

**FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO ASSOCIADA COM  
CULTIVARES DE ARROZ INUNDAO**

**MARLI DE FÁTIMA FIORE**  
**Bióloga**

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Siu Mui Tsai

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura  
"Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo para  
obtenção do título de Mestre em Agronomia, Área de  
Concentração: Energia Nuclear na Agricultura.

**PIRACICABA**  
Estado de São Paulo - Brasil  
Novembro - 1989

**Ao**  
***meu pai "in memorium"***  
***À minha mãe***

***Dedico***

## AGRADECIMENTOS

- Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) pelas facilidades proporcionadas.
- À Dra. Siu Mui Tsai pela orientação, apoio e amizade.
- À FAPESP e CAPES pelo suporte financeiro.
- Aos pesquisadores Dr. Reinaldo L. Victória, Dr. Paulo C.O. Trivelin e Dr. Robert M. Boddey pela valiosa colaboração.
- Ao Álvaro pelo carinho, compreensão e auxílio na elaboração dos dados.
- Aos colegas e amigos da Seção de Microbiologia do Solo Roberto Bonetti, Álvaro A.T. Vargas, Márcio A. Gava, Silvana P. Maziero e em especial a Francisco C. Montrazzi e Mario Bizetto pela colaboração constante.
- A todos da Seção de Isótopos Estáveis e Hidrologia e, em especial, a José A. Bonassi, João J. Isac e Cláudio L. Gonzaga pela colaboração nas análises isotópicas.
- Aos colegas e amigos Paulo M. da Silva, Raffaella Rossetto, Eliane A. Silvestre e Marcelo Z. Moreira pela amizade e colaboração.
- A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desse trabalho.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
LISTA DE FIGURAS .....	v
LISTA DE TABELAS .....	vi
RESUMO .....	viii
SUMMARY .....	ix
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	3
2.1. Características favoráveis para FBN em ambientes inundados .....	4
2.2. Microrganismos fixadores de N <sub>2</sub> em campos de arroz inundado .....	6
2.3. Bactérias fixadoras de N <sub>2</sub> nos campos de arroz inundado .....	7
2.4. Métodos utilizados para estimar a fixação biológica de nitrogênio em arroz inundado .....	10
2.4.1. Balanço de nitrogênio .....	10
2.4.2. Atividade de redução de acetileno .....	16
2.4.3. Uso do isótopo de <sup>15</sup> N .....	21
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	27
3.1. Estudo I. Avaliação do potencial da FBN em cultivares de arroz inundado pelo método da diluição isotópica de <sup>15</sup> N .....	27
3.1.1. Localização do experimento .....	27
3.1.2. Solo .....	27
3.1.3. Adição do fertilizante .....	29
3.1.4. Marcação do solo com <sup>15</sup> N .....	31
3.1.5. Tratamentos .....	31
3.1.6. Transplante das plântulas .....	32
3.1.7. Alagamento .....	34
3.1.8. Controle fitossanitário .....	34
3.1.9. Delineamento experimental - Análise dos dados .....	34
3.1.10. Amostragem do solo e preparo das amostras .....	34
3.1.11. Colheita das plantas e preparo das amostras .....	35
3.1.12. Parâmetros avaliados .....	35
3.2. Estudos II. Estimava do balanço de N para cultivares de arroz inundado e contribuição da FBN .....	39

3.3. Estudo III. Avaliação do potencial da FBN em cultivares de arroz inundado através da técnica de redução do acetileno .....	40
3.3.1. Localização do experimento .....	40
3.3.2. Solo .....	40
3.3.3. Adição do fertilizante .....	41
3.3.4. Tratamentos .....	41
3.3.5. Transplante das plântulas .....	41
3.3.6. Alagamento .....	41
3.3.7. Controle fitossanitário .....	41
3.3.8. Delineamento experimental - Análise dos dados .....	42
3.3.9. Amostragem das plantas .....	42
3.3.10. Parâmetros avaliados .....	42
3.4. Estudo IV. Isolamento de algumas bactérias heterotróficas fixadoras de N <sub>2</sub> em cultivares de arroz inundado .....	44
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	47
4.1. Estudo I. Avaliação do potencial da FBN em cultivares de arroz inundado pelo método da diluição isotópica de <sup>15</sup> N .....	47
4.1.1. Produção de matéria seca .....	47
4.1.2. Nitrogênio na planta .....	52
4.1.3. Nitrogênio no solo proveniente do fertilizante .....	63
4.2. Estudo II. Estimativa do balanço de N para cultivares de arroz inundado e contribuição da FBN .....	67
4.3. Estudo III. Avaliação do potencial da FBN em cultivares de arroz inundado através da técnica de redução de acetileno .....	71
4.4. Estudo IV. Isolamento de algumas bactérias heterotólicas fixadoras de N <sub>2</sub> em cultivares de arroz inundado .....	77
5. CONCLUSÕES .....	82
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	83
APÊNDICE .....	104

## LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Teores de nitrogênio provenientes de diferentes fontes em cultivares de arroz inundado utilizando-se o CNA-3314 como controle não fixador de N <sub>2</sub> , durante o primeiro ano de cultivo. ....	64
Figura 2: Teores de nitrogênio proveniente de diferentes fontes em cultivares de arroz inundado utilizando-se o CNA-3314 como controle não fixador de N <sub>2</sub> , durante o segundo ano de cultivo. ....	65
Figura 3: Variação do teor de átomos % de <sup>15</sup> N em excesso no solo durante dois cultivos sucessivos de arroz inundado e em solo não cultivado. ....	68
Figura 4: Variação da atividade da nitrogenase durante diferentes períodos de incubação. ....	74
Figura 5: Resultados da contagem de bactérias heterotróficas isoladas de diferentes partes de 15 cultivares de arroz inundado na época da emergência da panícula. ....	79
Figura 6: Resultados da contagem de <i>Azospirillum</i> isolados de diferentes partes de 15 cultivares de arroz inundado na época da emergência da panícula. ....	80
Figura 7: Resultados da contagem de <i>Pseudomonas</i> e <i>Enterobacter</i> isolados de diferentes partes de 15 cultivares de arroz inundado na época da emergência da panícula. ....	81

## LISTA DE TABELAS

	<b>Página</b>
Tabela 1: Ganhos de nitrogênio em estudos de balanço de nitrogênio desenvolvidos em solos inundados cultivados com arroz. ....	12
Tabela 2: Estimativa da FBN em campos de arroz inundado calculada através da ARA. ....	21
Tabela 3: Nitrogênio no arroz inundado proveniente da FBN estimado através do uso de <sup>15</sup> N. ....	24
Tabela 4: Resultados de algumas análises químicas e físicas do solo utilizado no experimento. ....	29
Tabela 5: Algumas características agrônômicas dos cultivares de arroz inundado usados no experimento. ....	32
Tabela 6: Meios de cultura semi-sólidos "Glucose Yeast Extract" (GYE) e LG malato usados para isolar bactérias. ....	45
Tabela 7: Produção de matéria seca de diferentes partes de 15 cultivares de arroz inundado durante dois cultivos sucessivos desenvolvidos em vasos de 10 litros contendo três plantas. ....	48
Tabela 8: Número de perfilhos e panículas de 15 cultivares de arroz inundado durante dois cultivos sucessivos desenvolvidos em vasos de 10 litros contendo três plantas. ....	50
Tabela 9: Índice de colheita de 15 cultivares de arroz inundado durante dois cultivos sucessivos desenvolvidos em vasos de 10 litros contendo três plantas. ....	51
Tabela 10: Quantidade de nitrogênio acumulado em diferentes partes de 15 cultivares de arroz inundado durante dois cultivos sucessivos desenvolvidos em vasos de 10 litros contendo três plantas. ....	53
Tabela 11: Porcentagem de átomos de <sup>15</sup> N em excesso de diferentes partes de 15 cultivares de arroz inundado durante dois cultivos sucessivos desenvolvidos em vasos de 10 litros contendo três plantas. ....	55
Tabela 12: Porcentagem de nitrogênio derivado do fertilizante (%Ndff) de diferentes partes de 15 cultivares de arroz inundado desenvolvidos em vasos de 10 litros contendo três plantas. ....	57

Tabela 13: Quantidade de nitrogênio derivado do fertilizante (QNdff) de diferentes partes de 15 cultivares de arroz inundado durante dois cultivos sucessivos desenvolvidos em vasos de 10 litros contendo três plantas. ....	58
Tabela 14: Porcentagem de recuperação do fertilizante marcado em diferentes partes de 15 cultivares de arroz inundado durante dois cultivos sucessivos desenvolvidos em vasos de 10 litros contendo três plantas. ....	60
Tabela 15: Estimativa da quantidade de nitrogênio proveniente da fixação de N <sub>2</sub> em 14 cultivares de arroz inundado durante dois cultivos sucessivos desenvolvidos em vasos de 10 litros contendo três plantas. ....	62
Tabela 16: Distribuição do <sup>15</sup> N, porcentagem de nitrogênio proveniente do fertilizante e porcentagem de recuperação do N-fertilizante no solo antes e depois de dois cultivos sucessivos de 15 cultivares de arroz inundado desenvolvidos em vasos de 10 litros contendo três plantas. .	67
Tabela 17: Balanço do N-total no sistema solo-planta de 15 cultivares de arroz inundado durante dois cultivos sucessivos desenvolvidos em vasos de 10 litros contendo três plantas. ....	69
Tabela 18: Balanço do N-fertilizante no sistema solo-planta para 15 cultivares de arroz inundado durante dois cultivos sucessivos desenvolvidos em vasos contendo três plantas. ....	70
Tabela 19: Produção de matéria seca e N-total de diferentes partes de 15 cultivares de arroz inundado na época da emergência da panícula, desenvolvidos em vasos de 5 litros contendo duas plantas. ....	73
Tabela 20: Atividade da nitrogenase em diferentes horas de 15 cultivares de arroz inundado na época da emergência da panícula, desenvolvidos em vasos de 5 litros contendo duas plantas ....	76



## Fixação Biológica de Nitrogênio Associada com Cultivares de Arroz Inundado

**Autora:** Marli de Fátima Fiore

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup> Dra. Siu Mui Tsai

### RESUMO

A fixação biológica de  $N_2$  (FBN) associada com arroz cultivado em vasos contendo solo alagado marcado com  $^{15}N$  foi determinada em condições "in situ" durante dois anos subsequentes. A técnica da diluição isotópica, o balanço de nitrogênio e a atividade da redução de acetileno (ARA) foram usados para avaliar a contribuição da fixação de nitrogênio em 15 cultivares de arroz. Isolamentos de algumas bactérias heterotróficas fixadoras de nitrogênio foram incluídos para correlacionar resultados positivos ( $^{15}N$ , balanço de N, ARA) com esses organismos - da rizosfera, rizoplano e hitosfera de arroz.

A diluição de  $^{15}N$  e nitrogênio total nas plantas indicaram diferenças significativas entre os cultivares. A contribuição da FBN em plantas foi calculada a partir de um cultivar com baixo potencial de fixação de  $N_2$  (CNA-3314), que apresentou o maior conteúdo de  $^{15}N$  na planta. Estimativas da FBN pela diluição isotópica de  $^{15}N$  mostraram valores entre 1,5 a 16,5% do total de N na planta no primeiro ano e 9,2 a 23,9% no segundo ano. IAC-4440, HUA-CHOU, BR-IRGA-409, IAC-1278 e BR-IRGA-410 mostraram superioridade em FBN, contribuindo com quantidades de 193, 148, 133, 130 e 123 mg N.vaso<sup>-1</sup>, respectivamente, no primeiro ano e 101, 213, 168, 108 e 140 mg N.vaso<sup>-1</sup> no segundo ano.

A ARA no período da emergência da panícula foi alta, variando de 0,6 a 1,6  $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4\cdot\text{planta}^{-1}\cdot\text{8h}^{-1}$ . Bactérias heterotróficas foram encontradas em associação com todos os cultivares, incluindo *Azospirillum*, *Pseudomonas* e *Enterobacter*. A menor contagem através do método de NMP foi obtida no cv. CNA-3314, que também mostrou ser mais restrito para as bactérias estudadas.

## Biological Nitrogen Fixation Associated with Flooded Rice Varieties

**Author:** Marli de Fátima Fiore

**Adviser:** Prof. Dr. Siu Mui Tsai

### SUMMARY

Biological N<sub>2</sub> Fixation (BNF) associated with rice grown in pots containing <sup>15</sup>N-labelled soil in shallow water was determined under "in situ" conditions, during two subsequent cropping. <sup>15</sup>N dilution technique, total nitrogen balance as well as acetylene reduction activity (ARA) were used to assess the contribution of nitrogen fixation to 15 rice varieties. Isolation of some heterotrophic N<sub>2</sub> fixing bacteria was also included to correlate positive data (<sup>15</sup>N, N-balance, ARA) with these organisms - from rhizosphere, rhizoplane and hitosphere of rice.

<sup>15</sup>N dilution and total nitrogen indicated significant differences in N<sub>2</sub>-fixing ability among the varieties. Contribution of BNF to nitrogen in plants was calculated from a poor N-fixing rice variety (CNA-3314), which showed the highest <sup>15</sup>N content in the plant. Estimates of BNF by N isotope dilution gave values from 1.5 to 16.5% of total N in the first year and 9.2 to 23.9% in the second year. IAC-4440, HUA-CHOU, BR-IRGA-409, IAC-1278, and BR-IRGA-410 varieties were superior in BNF contributing with total amounts of 193, 148, 133, 130 and 123 mg N.pot<sup>-1</sup>, respectively, in the first year and 101, 213, 168, 108 and 140 mg N.pot<sup>-1</sup> in the second year.

ARA at heading stage was high ranging from 0.6 to 1.6 μmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>.plant<sup>-1</sup>.8h<sup>-1</sup>. Heterotrophic bacteria were found in association with all varieties, including *Azospirillum*, *Pseudomonas* and *Enterobacter*. The least MPN count was obtained with var. CNA-3314 which also showed more restriction to bacterial growth.

## 1. INTRODUÇÃO

A grande extensão de áreas de várzeas do Brasil, a qual está estimada em 30 milhões de hectares, vem recebendo, nos últimos anos, bastante atenção, principalmente após a criação do PROVARZEAS, e sua importância para alcançar altas produtividades está cada vez mais estabelecida. A principal cultura para essas áreas é o arroz inundado devido ao seu sistema de difusão de ar da parte aérea para as raízes, denominado aerênquima. Entretanto, algumas outras culturas, tais como trigo e soja, podem ser produzidas nesses solos quando se faz um bom controle do lençol freático. Apesar da área de várzea ser significativa e de atualmente uma boa parte estar sendo sistematizada e utilizada para produção de culturas, praticamente nada se sabe sobre os solos e os processos físicos, químicos e microbiológicos que estão ocorrendo em condições brasileiras. Todo o conhecimento é baseado em resultados obtidos em áreas de várzeas de outros países e isso tem sido bastante enfatizado durante reuniões científicas sobre o assunto.

A baixa degradação da fertilidade do solo nos campos de arroz inundado é um fato bastante conhecido e estudado por alguns países da Ásia, tais como China, Japão, Índia e Filipinas. Muitos fatores são citados como responsáveis pela maior fertilidade desses solos, mas o suprimento natural de nutrientes para a planta, especialmente o nitrogênio (N), é considerado o fator dominante. Diversos ensaios desenvolvidos nesses países em condições de campo e de casa de vegetação mostraram que a principal entrada natural de nitrogênio nesses solos é através da fixação biológica de  $N_2$  (FBN). Os solos inundados favorecem o desenvolvimento de todos os principais grupos de microrganismos fixadores de  $N_2$  (cianobactérias, bactérias aeróbicas, anaeróbicas e microaerofílicas). As condições anaeróbicas desses solos são propícias para a FBN, uma vez que a nitrogenase é altamente sensível ao oxigênio. A presença da planta de arroz também favorece a FBN, pois fornece sítios apropriados para as bactérias heterotróficas fixadoras de  $N_2$ , as quais são dependentes das substâncias orgânicas excretadas pelas raízes. A planta de arroz também permite a difusão do  $N_2$  para as raízes e conseqüentemente para a rizosfera, devido ao seu sistema transportador de ar.

O aumento na contribuição do N fixado biologicamente para o arroz depende da capacidade da planta de promover a FBN e da sua eficiência em utilizar esse N. A fixação associativa de  $N_2$  envolve interações complexas entre a planta, população microbiana e condições ambientais. O genótipo da planta, o genótipo dos microrganismos e a interação entre esses fatores influenciam o fenótipo da planta. Esses componentes podem ser manipulados para aumentar a fixação de  $N_2$ . Atualmente, a seleção de genótipos de plantas e também o melhoramento, são alternativas utilizadas para alcançar resultados promissores. Assim, a necessidade de critérios simples, fáceis e rápidos de seleção de cultivares tem sido enfatizada.

O método da diluição isotópica de  $^{15}N$  tem sido empregado com sucesso para quantificar a FBN em sistemas associativos, cujas medidas são difíceis de serem avaliadas com precisão por métodos convencionais. Os testes de redução de acetileno também têm sido utilizados para medir as diferenças da atividade de fixação de  $N_2$  associada com diferentes cultivares de arroz e, atualmente, esses testes são realizados visando, principalmente, obter uma relação entre a atividade da nitrogenase e caracteres de crescimento da planta que auxiliem na seleção de cultivares mais eficientes na fixação de  $N_2$ .

Embora a quantidade de  $N_2$  fixado em campos de arroz inundado seja ainda discutível, estimativas feitas por BURNS & HARDY (1973) mostraram que 30 kg  $N \cdot ha^{-1} \cdot ano^{-1}$  são possíveis de serem obtidos e WATANABE (1985) estima que o total de  $N_2$  fixado no mundo em campos inundados cultivados com arroz está ao redor de 3,2 milhões de toneladas de N por ano. Esse último autor constatou que a fixação de  $N_2$  em campos de arroz inundado tem uma contribuição similar à cultura de soja, a qual é desenvolvida em 55 milhões de hectares e seu total de  $N_2$  fixado está estimado em 3,3 milhões de toneladas por ano. Todavia, a quantidade de pesquisas com FBN em arroz inundado é muito menor que em soja.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial da FBN em diferentes cultivares de arroz inundado através do método de redução de acetileno e da diluição isotópica de  $^{15}N$ , além de identificar alguns grupos de fixadores presentes na planta e na sua rizosfera. Cultivares promissores recentemente selecionados pelo Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) indicaram a potencialidade do seu uso nos testes, uma vez que eles apresentaram boas produções a nível de campo, sem a aplicação de N-mineral. Alguns cultivares selecionados em estudos de adubação nitrogenada no Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão (CNPAP/EMBRAPA, Goiânia, GO), também foram usados nos testes, bem como três cultivares pré-selecionados em estudos de FBN pelos pesquisadores do Instituto Internacional de Pesquisa do Arroz (IRRI - Filipinas).

## 2. RÊVISÃO DE LITERATURA

O arroz é um importante componente da dieta da população brasileira estando o consumo "per capita" ao redor de 45 kg.habitante<sup>-1</sup>.ano<sup>-1</sup> (EMBRAPA, 1981), sendo sua área de cultivo avaliada em aproximadamente 6 milhões de hectares com uma média de produção de 10 milhões de toneladas. O sistema de arroz inundado representa 19% dessa área estando a média de produtividade ao redor de 3,6 t.ha<sup>-1</sup> (MENEZES, 1987). Esses rendimentos são considerados relativamente baixos se forem comparados com os obtidos pelos países desenvolvidos produtores de arroz. A "revolução verde" iniciada no anos 70 contribuiu com aumentos consideráveis na produtividade dos cereais através do melhoramento e obtenção de cultivares que responderam a elevadas dosagens de adubos, mas que no nosso meio geralmente não trouxeram retornos econômicos recomendáveis. Entre estes insumos, o nitrogênio aparece como um dos elementos mais requeridos. Por outro lado, é justamente o nitrogênio o único elemento que pode ser obtido gratuitamente do ar. Na simbiose Leguminosa-*Rhizobium* a obtenção do N do ar já é uma prática consagrada, principalmente na cultura da soja. Os cereais não possuem simbiose tão eficiente, mas trabalhos desenvolvidos nos últimos anos têm demonstrado que associações de bactérias fixadoras de N<sub>2</sub> com vários cereais podem suprir entre 30 a 50% das necessidades desses elemento na planta. Dentre estes cereais, o arroz inundado aparece como uma das culturas mais promissoras.

O arroz origina-se de áreas inundadas e apesar de atualmente existirem cultivares selecionados que podem produzir bem em condições de sequeiro, se não ocorrer falta de água e nutrientes, as condições inundadas ainda apresentam-se como as melhores para alta produtividade. A inundação do solo favorece o crescimento de arroz pois: (1) provoca mudana no pH do solo para próximo de neutro; (2) torna os nutrientes, tais como P e Fe, mais disponíveis; (3) diminui a decomposio da matéria orgânica, mantendo a fertilidade do solo; (4) estimula a fixao biológica de N<sub>2</sub>; (5) diminui a incidência de doenas provocadas pelo solo; (6) promove ganho de nutrientes da água de irrigao; (7) diminui a incidência de ervas daninhas, particularmente algumas do tipo C<sub>4</sub>, e (8) atua como reservatório de água e protege contra a erosão do solo (WATANABE, 1986).

Em sistemas agrícolas de subsistência, onde o arroz inundado é cultivado anualmente sem aplicação de fertilizante, as produções são geralmente mais altas que as obtidas pelo arroz de sequeiro. Uma parte dessa diferença pode ser atribuída ao melhor suprimento de água dos solos inundados, mas parte da diferença é provavelmente devido ao aumento da fixação de nitrogênio ou aumento na conservação de N desses solos. O nitrogênio orgânico tende a acumular mais nos solos inundados que em solos bem drenados. Em muitos casos, o acúmulo de N nesses solos não é unicamente o resultado do aumento da FBN, mas também da menor decomposição dos compostos orgânicos nitrogenados, devido as condições de pouca aeração, o que evita a rápida reciclagem do N. Essa baixa taxa de mineralização permite que uma grande fração do N<sub>2</sub> fixado seja acumulado como nitrogênio orgânico do solo (BURESH et alii, 1980).

### **2.1. Características favoráveis para FBN em ambientes inundados**

As principais características dos campos de arroz inundado são determinadas pela inundação do solo, presença de plantas de arroz e ervas daninhas, e pelas práticas agrícolas (WATANABE & FURUSAKA, 1980).

A inundação cria condições anaeróbicas a poucos milímetros abaixo da superfície do solo. A inundação e as plantas de arroz promovem conjuntamente cinco diferentes condições ambientais relacionadas com propriedades físico-químicas e tróficas: (1) camada de água; (2) superfície do solo oxidada; (3) solo reduzido; (4) plantas de arroz (incluindo a parte submersa do caule, raízes, rizosfera e filosfera); (5) horizonte de impedimento (solo abaixo da camada arável) (WATANABE, 1986).

A camada de água propicia um ambiente aeróbico e luminoso, onde comunidades produtoras aquáticas (algas e ervas daninhas aquáticas) fornecem matéria orgânica para o solo e servem de alimento para os consumidores (bactérias, zooplâncton, invertebrados, etc) reciclando os nutrientes.

A camada reduzida do solo é um ambiente anaeróbico não luminoso, onde o Eh é predominantemente negativo, processos de redução são predominantes e a atividade microbiana está concentrada nos agregados de solos contendo partículas orgânicas (WADA et alii, 1979).

O horizonte de impedimento geralmente tem baixa atividade microbiana. O potencial de redox é determinado principalmente pelo regime de água dos campos inundados de arroz. Em solos bem drenados essa camada é oxidada mesmo quando inundada, e nos solos de várzeas, após a drenagem ou secagem, o solo reduzido torna-se re-oxidado.

A mais importante mudança causada pela inundação do solo é na aeração. Como o movimento de oxigênio é 10.000 vezes menor na fase aquosa que na gasosa, a capacidade do solo de trocar gases com a atmosfera decresce quando ele torna-se saturado. Condições anaeróbicas desenvolvem-se poucos milímetros abaixo da superfície do solo, sendo que nessa camada o suprimento de oxigênio já é insuficiente para a respiração dos microrganismos, mas a superfície do solo, a qual fica oxidada, mantém uma certa quantidade de oxigênio. Desde a descoberta da alta sensibilidade da nitrogenase para o oxigênio, condições anaeróbicas tem sido citada como ideal para a FBN.

A planta de arroz favorece o aparecimento de duas principais condições ambientais para desenvolvimento de microrganismos: partes da planta submersas e raízes. As partes submersas podem conter bactérias na porção basal do caule e bainha das folhas. As raízes proporcionam o crescimento de bactérias fora e dentro delas.

O arroz dispõe de um sistema eficaz para a passagem do ar do caule à raiz, o que o faz adaptável a uma ampla gama de condições ambientais, principalmente em solos alagados. O ar penetra na planta através dos limbos e cápsulas foliares e passa aos nós da base da planta. À medida que o ar avança, vai fornecendo oxigênio aos tecidos, onde é utilizado para a respiração. Das raízes, o ar se espalha pelo solo que as rodeia, difundindo o  $N_2$  pela rizosfera (DOMMERS & RINAUDO, 1979). A rizosfera conseqüentemente fica oxidada, mas quando o sistema de transporte de ar é danificado ela torna-se reduzida e substâncias tais como sulfetos são acumuladas (YOSHIDA, 1975). Para que o sistema funcione com eficiência, ao menos uma parte do caule deve estar exposta ao ar. Graças a esse sistema de passagem de ar (aerênquima), as raízes respiram aerobicamente e aproveitam os carboidratos para produzir a energia de que necessitam, ainda que sejam cultivadas no ambiente inundado anaeróbico. A maioria das plantas não pode ser cultivada em solos alagados porque seu sistema de passagem de ar é menos eficaz. No arroz, a eficiência do transporte de oxigênio é dez vezes maior do que na cevada e quatro vezes maior do que no milho.

O arroz, além de beneficiar o crescimento de bactérias na rizosfera devido ao transporte de  $N_2$  através do seu sistema vascular, suas raízes também excretam compostos orgânicos, o que presumivelmente cria um nicho favorável para o metabolismo dos microrganismos heterotróficos em sua vizinhança (RINAUDO et alii, 1971; YOSHIDA & ANCAJAS, 1971; DOBEREINER, 1974; YOSHIDA et alii, 1975; NAYAK & RAO, 1977).

Maior atenção tem sido dada a camada arável do solo plantado devido à presença de bactérias heterotróficas fixadoras de  $N_2$ , associadas com as raízes. Em solos inundados cultivados com arroz a FBN é maior que nos campos sem cultivo (YOSHIDA &

ANCAJAS, 1973; WATANABE et alii, 1978) e resultados de experimentos têm mostrado que as perdas de N nesses solos cultivados são somente 45 a 75% das observadas em solos inundados não cultivados (BROADBENT & TUSNEEM, 1971; MAEDA & ONIKURA, 1976). Portanto, pouca atenção tem sido dada para heterotróficas fixadoras de  $N_2$  na camada arável do solo sem raízes de arroz porque solos anaeróbicos requerem considerável quantidade (70-94 kg) de carboidrato para fixar 1 kg N (O'TOOLE & KNOWLES, 1973). Entretanto, os solos inundados durante as entressafas de arroz podem favorecer o suprimento de compostos orgânicos para as bactérias, através dos restos de raízes, ervas daninhas e fitoplânctons (MATSUGUCHI, 1979). Monossacarídeos liberados pela hidrólise ácida da matéria orgânica dos solos inundados e restos culturais de arroz disponíveis após a colheita, atingiram 5-12% e 56% do total de carbono orgânico, respectivamente (MURAYAMA, 1977). MATSUGUCHI (1979) baseando-se nesses dados calculou que a quantidade de carboidratos hidrolizáveis no solo e os dos restos culturais podem ser de aproximadamente 6 t.ha<sup>-1</sup>: 5 t do solo e 1 t dos restos culturais. Essa quantidade de carboidratos produzida equivale a um potencial de fixação de  $N_2$  pelas heterotróficas de 60 - 90 kg N.ha<sup>-1</sup>. Outros resultados obtidos comprovaram que resíduos de palha de arroz incorporados ao solos inundados aumentaram a FBN por serem fonte de matéria orgânica para as heterotróficas. Estimou-se que a incorporação de 1 t de palha.ha<sup>-1</sup> pode contribuir para fixar 2 - 5 kg N.ha<sup>-1</sup> (WATANABE, 1978).

## 2.2. Microrganismos fixadores de $N_2$ em campos de arroz inundado

As condições aeróbicas e anaeróbicas, e a presença ou ausência de luz dos solos inundados favorecem o desenvolvimento de todos os principais grupos de microrganismos fixadores de  $N_2$ . Estes podem ser autotróficos de vida livre ou simbióticos, heterotróficos simbióticos e heterotróficos de vida livre aeróbicos, anaeróbicos facultativos e anaeróbicos. Os metabolismos anaeróbicos tais como  $H_2$ ,  $CH_4$  e sulfetos podem também fornecer condições para crescimento dos quimioautotróficos fixadores de  $N_2$  na interface aeróbica/anaeróbica. A camada de água, as plantas submersas e a superfície aeróbica do solo são os sítios para os fixadores de  $N_2$  fotodependentes. A fixação heterotrófica de  $N_2$  ocorre preferencialmente em ambientes não luminosos: nos solos agregados que contêm partículas orgânicas e na rizosfera (WADA et alii, 1979; WATANABE, 1981).

Do ponto de vista ecológico os principais organismos fixadores de  $N_2$  nos campos de arroz inundado podem ser classificados como:



- (1) Três grupos autotróficos, chamados bactérias fotossintéticas, cianobactérias de vida livre e a simbiose *Azolla-Anabaena* ;
- (2) Dois grupos de heterotróficos compreendendo as bactérias fixadoras de  $N_2$  do solo e bactérias fixadoras de  $N_2$  associadas com o arroz.

A fixação de  $N_2$  pelo rizóbio na simbiose com leguminosas usadas como adubo verde tem sido usada ao longo do tempo como fertilizante orgânico para a cultura do arroz. Embora o adubo verde não seja atualmente muito utilizado em vários países como há 30 anos atrás por razões sócio-econômicas, sua alta taxa de fixação e a possibilidade técnica do seu uso não devem ser negligenciadas (WATANABE, 1986).

### 2.3. Bactérias fixadoras de $N_2$ nos campos de arroz inundado

Uma larga faixa de bactérias fixadoras de  $N_2$  tem sido relatada em diversos ecossistemas de arroz (WATANABE & CHOLITKUL, 1979; YOSHIDA & RINAUDO, 1982; LADHA et alii, 1982, 1983; BARRAQUIO et alii, 1983):

- (1) heterotróficas aeróbicas: *Azotobacter* sp, *Azomonas* sp, *Beijerinckia* sp, *Derxia* sp, *Pseudomonas paucimobilis*, *Pseudomonas* sp, *Azospirillum lipoferum*, *Azospirillum brasilense*, *Alcaligenes*, *Thiobacillus* sp oxidante de enxofre; *Methylosinus* sp. oxidante de metano;
- (2) heterotróficas anaeróbicas facultativas: *Bacillus* sp, *Klebsiella planticola*, *Enterobacter cloacae*;
- (3) heterotróficas anaeróbicas obrigatórias: *Clostridium butyricum* e *Desulfovibrio* sp reductora de sulfato;
- (4) fotossintéticas: *Rhodospseudomonas palustris*, *Rhodospirillum*, *Chromatium* e *Athiorhodaceae*.

**Bactérias da rizosfera e associativa:** A rizosfera do arroz é um sítio que favorece o crescimento de bactérias fixadoras de  $N_2$ . A bactéria cresce e fixa  $N_2$  na rizosfera (solo que envolve a raiz), rizoplano (superfície de fora da raiz) e hitosfera (dentro da raiz). A ocorrência de bactérias fixadoras de  $N_2$  na parte submersa de plantas de arroz (parte basal do caule e bainha das folhas) foi relatada por WATANABE et alii (1981). Esses autores informam que bactérias do rizoplano são aquelas obtidas após vigorosa agitação das raízes; bactérias da hitosfera são encontradas após a maceração de amostras de raízes cujas bactérias do rizoplano foram removidas. BALDANI & DOBEREINER (1980) consideraram bactérias da hitosfera (ou endorizosfera) aquelas que permaneceram vivas após a raiz ter sido esterilizada com cloramina T. Não existe evidência que a bactéria realmente colonize as células intercelularmente das raízes jovens de arroz, mas é possível que ocorra colonização intercelular das raízes nas partes mais velhas, onde as células estão geralmente deterioradas.

Na rizosfera do arroz prevalece principalmente as bactérias microaerofílicas. As anaeróbicas obrigatórias ou facultativas estão presentes, mas são geralmente menos abundantes (TROLLDENIER, 1977; BALANDREAU & KNOWLES, 1978). A alta proporção de bactérias microaerofílicas é provavelmente o resultado do caráter oxidado da rizosfera do arroz (YOSHIDA, 1975). As cinco principais características fisiológicas das heterotróficas consideradas essenciais para a FBN na rizosfera do arroz são: (1) proteção contra o oxigênio, (2) competitividade, ou habilidade para colonizar as raízes de arroz e usar os substratos que estão disponíveis nas diferentes regiões da rizosfera, (3) eficiência de FBN, (4) habilidade para fixar  $N_2$  na presença de N-combinado e (5) habilidade para excretar o  $N_2$  fixado como amônia, o qual pode ser diretamente aproveitado pela planta. Estudos preliminares das características fisiológicas dos fixadores de  $N_2$  da rizosfera de arroz indicam uma grande diferença entre as estirpes isoladas (DOMMERMUES & RINAUDO, 1979).

A presença na rizosfera do arroz de *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Enterobacter*, *Azospirillum*, *Pseudomonas* sp e *Alcaligenes* tem sido relatada (ROUQUEROL, 1964; RINAUDO, 1974; MATSUGUCHI et alii, 1975; WATANABE et alii, 1977; SILVA & DOBEREINER, 1978; WATANABE & BARRAQUIO, 1979). LADHA et alii (1982, 1983) e BARRAQUIO et alii (1982) observaram que *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Enterobacter* e *Klebsiella* são bactérias fixadoras de  $N_2$  comumente associadas com muitos cultivares de arroz. Várias estirpes de bactérias isoladas do caule, bainha das folhas e raízes de plantas de arroz crescendo em diferentes solos foram identificadas. Técnicas de imunodifusão e imunofluorescência foram empregadas para identificação e a técnica de imunofluorescência foi usada para contagem direta. Anticorpos fluorescentes preparados contra estirpes pertencentes a *A. lipoferum*, *A. brasilense*, *E. cloacae*, *K. planticola* e *Pseudomonas* H8 foram específicos até nível de espécies. Entretanto, a imunodifusão foi específica até nível de gênero

ou família.

WATANABE & BARRAQUIO (1979) e WATANABE et alii (1979) fizeram a contagem da população de bactérias heterotróficas anaeróbicas fixadoras de  $N_2$  nas raízes e caules de arroz através dos métodos da contagem direta em placa e número mais provável (NMP). Fixadores de  $N_2$  representaram 80% do total da população de bactérias heterotróficas na hitosfera. Entre os fixadores de  $N_2$ , a *Pseudomonas* foi predominante alcançando  $10^7$  a  $10^8$  por grama de peso da matéria fresca da raiz. Isto foi confirmado pela contagem direta de *Pseudomonas* e *Azospirillum* utilizando a técnica de anticorpos fluorescentes (AF). A contagem bacteriana através do método AF foi comparada com os métodos da contagem direta em placa e NMP. Foram observadas aproximadamente cem vezes mais populações de *Pseudomonas* e *Azospirillum*.

WATANABE et alii (1982) constataram que as *Pseudomonas* apresentavam a capacidade de crescerem autotroficamente em  $H_2 + CO_2$  e  $O_2$ . Uma vez que em solos inundados cultivados com arroz há a produção de gás  $H_2$  isto pode ser uma das razões porque as *Pseudomonas* oxidantes de hidrogênio colonizam com sucesso as raízes de arroz inundado.

LADHA et alii (1983) fizeram a contagem de enterobactérias fixadoras de  $N_2$  produtoras de ácido e gás no caule e raízes de plantas de arroz. Eles encontraram população bacteriana de  $10^3$  a  $10^5$  por grama de peso da matéria seca, a qual é baixa comparada com o número de *Pseudomonas* e *Azospirillum* obtidas por WATANABE et alii (1979).

THOMAS-BAUZON et alii (1982) propuseram um modelo de espermosfera para estudar a ocorrência de bactérias fixadoras de  $N_2$  na rizosfera de arroz. Como é característico desse modelo, as bactérias predominantes no solo são crescidas em meio de cultura sem N enriquecido com carbono sintético e exudatos de arroz produzidos durante a germinação das sementes. Através desta técnica, eles obtiveram uma frequência de 65% de isolados fixadores de  $N_2$  pertencentes a *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas paucimobilis* e *Azospirillum*.

**Bactérias do solo:** KOBAYASHI et alii (1967) e MATSUGUCHI (1979) fizeram levantamento da distribuição de vários tipos de bactérias heterotróficas e fotossintéticas fixadoras de  $N_2$  nos solos cultivados com arroz inundado no sudeste da Ásia e Tailândia. KOBAYASHI et alii (1967) encontraram que bactérias heterotróficas (*Azotobacter* e *Clostridium*) estavam largamente distribuídas nos solos cultivados com arroz de vários países do sudeste da Ásia. Após trabalhar com vários tipos de solos cultivados com arroz da Tailândia MATSUGUCHI (1979) concluiu que fatores do solo são os responsáveis pela

formação específica da microflora fixadora de  $N_2$  em cada grupo de solo cultivado com arroz inundado. BECKING (1978) observou que *Beijerinckia* está largamente distribuída na região tropical. *Derxia* é frequentemente encontrada em solos inundados (DOBEREINER & CAMPELO, 1971).

Não existem muitas informações sobre o papel de bactérias fotossintéticas em campos de arroz. Seu comportamento característico é de fotossíntese anoxigênica (somente FS I). Entretanto, sua atividade fixadora de  $N_2$  atinge um máximo sob condições de luz e anaerobiose. Normalmente, é assumido que condições anaeróbicas e de luminosidade não existem na superfície dos solos submersos. Em estudos de cultura pura, entretanto, alta fixação de  $N_2$  foi observada quando as bactérias fotossintéticas foram misturadas com bactérias heterotróficas sob condições aeróbicas com iluminação (KOBAYASHI, 1982). A presença de bactérias fotossintéticas na quantidade de  $10^5$  a  $10^7$  células por ml de água ou por grama de solo foi observada e constatou-se que a aplicação de palha contribuiu para aumentar várias vezes o seu número (KOBAYASHI et alii, 1967).

Mais experimentos são necessários para provar ou não a importância das bactérias fotossintéticas nos campos de arroz.

#### **2.4. Métodos utilizados para estimar a fixação biológica de nitrogênio em arroz inundado**

A fixação biológica de nitrogênio em arroz inundado tem sido determinada utilizando-se principalmente três métodos mais facilmente empregados, embora eles também possuam restrições: balanço de N, atividade de redução de acetileno (ARA) e uso do isótopo  $^{15}N$ .

##### **2.4.1. Balanço de Nitrogênio**

O balanço de N consiste em medir as entradas e saídas de N do sistema solo-planta ou as mudanças ocorridas com o tempo no teor de N-total do solo e da planta em estudo, sendo essencial a utilização de uma técnica de análise confiável, pois é importante que ela inclua todas as formas de N. Atualmente a técnica mais utilizada para análise do N do solo tem sido a semimicro-Kjeldahl (STUMPE et alii, 1985; BREMNER, 1985).

O estudo de balanço de N pode ser dividido em três categorias: campo, lisímetro e casa-de-vegetação. Normalmente quanto maior o controle das condições experimentais,

menos relevantes podem-se tornar as condições de campo em estudo. Em geral, entretanto, os estudos de campo resultam em uma estimativa bruta das mudanças líquidas ocorridas durante um período de tempo. Quanto mais longo o experimento e maior o número de culturas, melhor será a estimativa. Por outro lado, os experimentos desenvolvidos em lisímetros ou em vasos em casa de vegetação permitem uma melhor avaliação das entradas e saídas de N.

Um rigoroso e verdadeiro balanço de N no sistema solo-planta deve controlar todas as formas de N (sólida, dissolvida e gasosa), entretanto, tais controles se tornam mais difíceis em condições de campo. As principais entradas de N para a cultura de arroz inundado incluem fertilizante, semente, água da chuva, água de irrigação, absorção de amônia atmosférica, lençol freático e fixação de  $N_2$  por bactérias e cianobactérias. As perdas ou remoção de N podem ocorrer devido à volatilização de amônia, denitrificação, remoção pela cultura, lixiviação através da infiltração e percolação, e drenagem. Obviamente alguns desses ganhos e perdas podem ser melhor medidos que outros. A amônia atmosférica, o movimento de N no lençol freático, a volatilização da amônia, a denitrificação e a lixiviação são mais difíceis de medir em certos casos para igualar a estimativa. Pequenas mudanças no teor de N-total do solo são particularmente difíceis de detectar devido à dificuldade de amostragem.

Alguns trabalhos iniciais de balanço de N referiram-se à recuperação do N aplicado na cultura de arroz podendo ser melhor chamados de ensaio de eficiência (KOYAMA & APP, 1979). Existem poucos dados disponíveis sobre balanço de N em arroz inundado na região tropical devido, provavelmente ao longo período exigido para tal estudo, sendo, então negligenciado em favor de pesquisas mais imediatistas visando a produtividade.

Estudos de balanço de N em cultura de arroz inundado nas condições de campo desenvolvidos no Japão, Tailândia, Indonésia e Filipinas mostraram um balanço positivo de N (Tabela 1).

No IRRI experimentos de fertilidade de longa duração com arroz inundado desenvolvidos durante 12 anos com 24 cultivos sucessivos, sem aplicação de N-mineral, não apresentaram diminuição na produção de grãos, a qual variou de 3,0 - 3,88 t.ha<sup>-1</sup> por cultivo. Foram observados ganhos anuais de N proveniente da água da chuva e da irrigação de 2,5 e 10 kg N.ha<sup>-1</sup>.ano<sup>-1</sup>, respectivamente e os cálculos de balanço de N mostraram que dois cultivos de arroz por ano resultaram num balanço positivo (Tabela 1) (APP et alii, 1984).

Estimativas do N proveniente da água da chuva requer análises exatas desse nutriente em baixa concentração na solução e a precisão é geralmente pobre. Estimativas desses N em clima temperado são geralmente abaixo de 10 kg N.ha<sup>-1</sup>.ano<sup>-1</sup> (ERIKSSON, 1952) exceto nas áreas próximas do mar ou afetadas por chuvas ácidas. Nas regiões tropicais algumas estimativas são semelhantes (MEYER & PAMPFER, 1959; KELLMAN et alii, 1982;

**Tabela 1. Ganhos de nitrogênio em estudos de balanço de nitrogênio desenvolvidos em solos inundados cultivados com arroz.**

Região	Condição do ensaio	Cultivos de arroz (nº)	Ganhos de N (kg.ha <sup>-1</sup> .ano <sup>-1</sup> )	Referências
Louisiana, EUA	vasos	1	75	WILLIS & GREEN, 1948
Bangkhon, Tailândia	campo	1	37	KOYAMA et alii, 1972
Chainat, Tailândia	campo	4	40	FIRTH et alii, 1973
Muara, Indonésia	campo	1	45	ISMUNADJI et alii, 1973
Pusakanegara, Indonésia	campo	1	65	ISMUNADJI et alii, 1973
Maliaya, Filipinas	campo	10	74*	DE DATTA & GOMEZ, 1975
Chainat, Tailândia	campo	15	126**	WALCOTT et alii, 1977
Aomori, Japão	campo	21	15	KOYAMA & APP, 1979
Kagawa, Japão	campo	21	38	KOYAMA & APP, 1979
Los Baños, Filipinas	vasos	6	21	APP et alii, 1980
Los Baños, Filipinas	vasos fechados	4	11	APP et alii, 1980
Maliaya, Filipinas	campo	17	79*	APP et alii, 1984
Los Baños, Filipinas	campo	24	103*	APP et alii, 1984

\* 2 cultivos.ano<sup>-1</sup>

\*\* 3 cultivos.ano<sup>-1</sup>

APP et alii, 1984), mas alguns trabalhos têm apresentado valores muito mais altos (30 - 50 kg N.ha<sup>-1</sup>.ano<sup>-1</sup>) (JONES, 1961; VIJAYALAKSMI & PANDALAI, 1962). Estimativas da absorção de amônia atmosférica pelo arroz ou pelo sistema solo-água são também difíceis de serem feitas e há poucos dados disponíveis sobre essas entradas (INGHAM, 1950; MALO & PURVIS, 1964; HUTCHINSON et alii, 1972; DENMEAD et alii, 1976).

Trabalhos desenvolvidos nos trópicos por SINGH et alii (1977) comparando entradas e saída de N através da água de irrigação mostraram que as perdas líquidas variaram consideravelmente, sendo essas variações atribuídas à localização do campo, ao método e época de aplicação de N e ao manejo da água. A perda máxima observada foi de aproximadamente 9 kg N.ha<sup>-1</sup> por cultura devido à aplicação a lanço do N-fertilizante e ao contínuo fluxo de irrigação durante a estação seca. Esses mesmos autores observaram que determinadas águas usadas para irrigação carregam um teor alto de N devido à contaminação, podendo esse N ser usado pelo arroz, sob certas condições de manejo. Estimativas feitas sobre entradas de N através de águas poluídas usadas para irrigação no Japão foram de 16 kg N.ha<sup>-1</sup> por cultura (YATAZAWA, 1977).

Estudos de campo sobre perdas de N através da lixiviação indicaram que um mínimo de 3 - 6 kg N.ha<sup>-1</sup> por cultura pode ser perdido em campos de arroz inundado (TABUCHI et alii, 1975). Outros estudos indicaram que pode haver um grande movimento de N no subsolo quando os campos de arroz são drenados após a colheita (MAEDA & ONIKURA, 1976). Perdas por lixiviação dependem obviamente da textura do solo e do controle da água (KOSHINO, 1975).

Asamo e Yatazama (citados por YAMAGUCHI, 1979) encontraram que os ganhos anuais de N provenientes da água da chuva e da irrigação, os quais têm aumentado nos recentes anos devido a intensificação da poluição ambiental, são estimados em 5 - 16,5 kg.ha<sup>-1</sup>, respectivamente, enquanto que o proveniente da FBN é de 40 kg.ha<sup>-1</sup>. As perdas de N nesse ensaio através da remoção pela cultura foram de 95,8 kg.ha<sup>-1</sup>, desnitrificação 70,0 kg.ha<sup>-1</sup>, lixiviação 20,0 kg.ha<sup>-1</sup> e escoamento superficial pela água da chuva 0,60 kg.ha<sup>-1</sup>.

A maioria dos estudos de balanço de N realizados até o momento não incluem as medidas de perdas de N, especialmente as perdas gasosas, as quais são difíceis de serem estimadas com base em dados anuais (FIRTH et alii, 1973; WALCOTT et alii, 1977; APP et alii, 1984). Nos campos de arroz inundado quando a presença de algas é acentuada, as perdas podem ser significativas, pois elas elevam o pH do solo devido ao processo de assimilação de CO<sub>2</sub>, favorecendo as perdas por volatilização (DE DATTA, 1981). Entretanto, mesmo ignorando as perdas de N se o balanço é positivo, isto constitui uma boa evidência da entrada desse elemento através da FBN.

Estudos de balanço de N de longa duração realizado no campo podem produzir

dados valiosos mesmo dentro de poucos anos se vários cultivares forem plantados em parcelas integradas com um delineamento experimental apropriado. Os cultivares capazes de manter sua produtividade podem ser distinguidos dos que diminuem sua produção devido à queda na disponibilidade de N do solo (BODDEY, 1987).

Para o controle das entradas e saídas das diversas formas de N no estudo de balanço de N foram desenvolvidas câmaras apropriadas (ROSS et alii, 1964, 1968; STEFANSON, 1970), visando principalmente medir as perdas por desnitrificação. Entretanto, devido as sérias dificuldades para manter o crescimento normal das plantas em tais condições, essas câmaras, atualmente, são mais utilizadas em experimentos contendo atmosfera enriquecida com  $^{15}\text{N}_2$ .

O uso de vasos abertos ou lisímetros é muito mais conveniente e vários trabalhos realizados contendo um bom delineamento e número de repetições têm mostrado aumentos significativos de N no sistema solo-planta (Tabela 1) (WILLIS & GREEN, 1948; APP et alii, 1980). A maioria de tais estudos tem por objetivo verificar a ocorrência de ganhos de N no sistema, utilizando comparações entre cultivares ou tratamento e se esses resultados podem ser extrapolados para as condições de campo.

Os experimentos desenvolvidos em vasos têm a vantagem do controle da irrigação o que evita as perdas por lixiviação. Entretanto, a maioria desses ensaios são realizados em casa de vegetação, a qual apresenta desvantagens tais como alta umidade do ar e a baixa intensidade luminosa que podem promover a proliferação de cianobactérias fixadoras de N ou reduzir a FBN associada à planta (VAN BERKUM & SLOGER, 1982; SMITH et alii, 1984). Uma casa de vegetação semi-móvel pode ser a solução ideal para permitir o controle da água, enquanto que na maioria do tempo as plantas poderiam estar expostas normalmente às intensidades luminosas do campo (BODDEY, 1987).

Um dos primeiros estudos de balanço de N em vasos contendo solo inundado cultivado com arroz foi realizado por WILLIS & GREEN (1948) nos EUA. O balanço foi feito em condições de casa de vegetação com apenas um cultivo de arroz e foram incluídos o N do solo, semente, fertilizante e cultura. Os autores concluíram que os ganhos líquidos no teor de N, especialmente no caso do sistema planta-solo-água, ocorreram durante o desenvolvimento da cultura (Tabela1).

Alguns pesquisadores incluem vasos contendo solo sem plantas como tratamento controle, mas esses normalmente mostram consideráveis perdas de N (MOORE, 1966; APP et alii, 1980) através da desnitrificação ou volatilização, enquanto que nos vasos com plantas o N é assimilado por elas e conseqüentemente imobilizado. O melhor tratamento controle nessas condições pode ser um vaso contendo uma planta, a qual é considerada muito próxima da planta em estudo, mas conhecida por não obter significativo N através da FBN. Se



essa planta não for disponível pode-se utilizar vários cultivares.

Uma consideração importante nos dados de balanço de N é que os valores são obviamente quantidades líquidas. Assim, o total de N fixado deve ser bem alto para que os dados de balanço de N possam indicar uma compensação das perdas de N no sistema. O total de N<sub>2</sub> fixado pode ser elevado devido a aumento da fixação ou pela redução nas perdas de N. APP et alii (1980) apesar de admitirem que não é possível determinar se o balanço positivo de N no seu trabalho foi devido ao aumento na FBN e redução nas perdas simultaneamente, acredita que no mínimo 14 a 18% do N removido por quatro cultivos sucessivos de arroz (Tabela 1) foram provenientes da FBN realizada por microrganismos heterotróficos.

Um dos problemas que surge normalmente em todos os tipos de estudo de balanço de N é que a técnica não estabelece diretamente se qualquer N<sub>2</sub> fixado foi incorporado nos tecidos da planta e também um erro no balanço é a soma de todos os erros envolvidos em cada estimativa de todas as entradas e saídas de N. Normalmente, a maior quantidade de N ocorre no solo, sendo que um pequeno erro na análise do solo conduz a um grande erro no balanço de N. Variabilidade entre as repetições dentro da mesma amostra de solo pode ser encontrada na análise de semimicro-Kjeldahl, sendo esta marcadamente reduzida quando o solo é moído e passado por uma peneira de 100 mesh (0,14 mm) (BREMNER, 1965; BODDEY, 1987). É altamente desejável, portanto, que todo o solo usado em experimento seja peneirado e completamente misturado para reduzir a variabilidade entre os vasos (BODDEY, 1987). Algumas técnicas utilizadas para coletar as amostras de solo dos vasos com poucas variações entre as repetições são citados por APP et alii (1980) e BODDEY (1987). Outros erros podem ser proporcionalmente grandes tais como aqueles associados com o N proveniente da água da chuva ou perdidos por lixiviação, mas como eles estão relacionados com pequenas quantidades, podem ter pequeno efeito na estimativa. Outro problema apresentado é que as entradas de N através da FBN são consideradas como sendo equivalentes a qualquer ganho de N resultando dessa maneira num balanço não identificado e quantificado. Isso pode causar uma superestimação da contribuição da FBN. Os riscos podem ser minimizados através do uso de plantas controles não fixadoras, assumindo que qualquer entrada de N está igualmente disponível a todos os tratamentos.

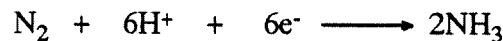
Como pode-se notar para tais estudos é necessário um longo período de tempo com contínuos cuidados. Sabe-se que dois terços ou mais de N das culturas de arroz provém do N do solo, mesmo quando se aplica N-mineral (KOYAMA, 1971; PATRICK & REDDY, 1976). Os vários fatores que influenciam o teor de N-total do solo podem ser manipulados através dos estudos de balanço de N. O teor de N-total das amostras de solo variam muito com as mudanças praticadas em solos onde a quantidade de N é menor que 75 - 100 kg N.ha<sup>-1</sup> e em muitos casos o limite pode ser muito mais alto. Assim, é necessário fazer

vários plantios sucessivos antes que mudanças significativas nos níveis de N do solo possam ser determinadas (KOYAMA & APP, 1979).

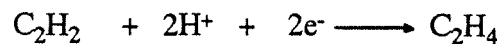
#### 2.4.2. Atividade de Redução do Acetileno

A nitrogenase é o complexo enzimático responsável pela redução do nitrogênio atmosférico em amônia e, além do N<sub>2</sub> atmosférico ela reduz uma série de substratos (BURNS & HARDY, 1975). Estudos realizados com substratos alternativos para essa enzima, permitiram descobrir que o acetileno (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>) inibe a redução de N<sub>2</sub> pela nitrogenase e que o C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> é reduzido a C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> (DILWORTH, 1966; SCHOLLHORN & BURRIS, 1966). Foi então sugerido que essa reação poderia ser utilizada como uma nova técnica para medida da atividade da nitrogenase (HARDY & KNIGHT, 1967).

A reação normalmente catalizada pela nitrogenase "in vivo" é:



Quando a nitrogenase é exposta ao acetileno na ausência de N<sub>2</sub>, essa reação é substituída por:



Alguns trabalhos realizados mostraram que o consumo de ATP por esse sistema enzimático é independente do substrato que está sendo reduzido (HARDY & KNIGHT, 1966; HARDY et alii, 1968). Isso significa que a atividade da nitrogenase não modifica quando o N<sub>2</sub> é substituído por C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>, mas os produtos formados é que são diferentes. HARDY et alii (1968), também observaram que o etileno é o único produto da redução do acetileno pela nitrogenase, e que o etileno não inibe a fixação de N<sub>2</sub> e nem é reduzido pela nitrogenase.

A redução de C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> para C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>, apesar de medir a taxa da nitrogenase indiretamente, tem se tornado o método mais popular para determinação da fixação de N<sub>2</sub> em condições de laboratório, casa de vegetação e campo, devido à sua simplicidade, sensibilidade e baixo custo (HARDY et alii, 1973; BURRIS, 1975; RENNIE & RENNIE, 1983).

Vários problemas e precauções devem ser considerados para a utilização do método da atividade da redução de acetileno (ARA). Esse método requer que o acetileno não altere outras atividades metabólicas dentro do sistema que está sendo investigado e que o

etileno produzido seja estável durante o período de teste. Entretanto, o acetileno tem apresentado influência sobre certas atividades microbianas. Ele inibe a formação de metano (OREMLAND & TAYLOR, 1975), a oxidação do metano (DE BONT & MULDER, 1976) e o crescimento da bactéria fixadora de  $N_2$ , *Clostridium pasteurianum* (OREMLAND & TAYLOR, 1975). Algumas bactérias fixadoras de  $N_2$  dependem da oxidação do metano para o seu metabolismo e, portanto, esse teste não deve ser empregado em ambientes onde elas estão presentes. As baixas taxas de oxidação de metano observadas nos campos de arroz por DE BONT et alii (1978) indicam que as bactérias fixadoras de  $N_2$  dependentes de metano estão, provavelmente, em pequeno número nesses solos. O etileno pode também ser produzido por plantas, fungos e bactérias (ABELES, 1973; DA SILVA et alii, 1974; WITTY, 1979) e isso ocorre frequentemente nos solos (SMITH & RESTALL, 1971; CORNFORTH, 1975; YOSHIDA & SUZUKI, 1975). Tanto o etileno produzido pela redução do acetileno como o produzido no solo podem ser absorvidos pelas raízes de arroz (YOSHIDA & ANCAJAS, 1971; YOSHIDA & SUZUKI, 1975) e pelo solo na presença de oxigênio (ABELES et alii, 1971), sendo que resultados obtidos por DE BONT (1976) e WITTY (1979) indicam que a degradação do etileno produzido do acetileno durante o teste de ARA não é significativa e não invalida o mesmo. As bactérias que utilizam o metano também podem oxidar o etileno, mas esse processo também é inibido na presença de acetileno, portanto a remoção do etileno por essas bactérias nos testes de ARA parece não ser provável (DE BONT & MULDER, 1976).

A exatidão do teste de ARA requer que o acetileno alcance os sítios da fixação de  $N_2$  e que o etileno produzido pela redução do  $C_2H_2$  seja quantitativamente recuperado. A técnica "in situ" para arroz inundado tem apresentado problemas de difusão gasosa, particularmente de etileno da rizosfera para a atmosfera amostrada (LEE et alii, 1977a; BODDEY & AHMAD, 1981). A transferência do acetileno da fase gasosa para a fase aquosa pode ser baixa durante os testes de ARA, mesmo sendo o acetileno solúvel em água (FLETT et alii, 1976) ou em solo saturado (LEE & WATANABE, 1977). O etileno sendo também solúvel em água, pode permanecer na fase aquosa, o que compromete a amostragem da atmosfera. A agitação das amostras imediatamente após a adição do acetileno e antes da amostragem do gás, é recomendada, para promover a difusão do acetileno para dentro do solo inundado e para liberar o etileno aprisionado na fase aquosa, respectivamente (LEE & WATANABE, 1977; FLETT et alii, 1976; MATSUGUCHI et alii, 1978). Esse problema de difusão gasosa faz com que a concentração de acetileno ideal que proporcione a saturação da enzima para obtenção da máxima ARA seja variável de acordo com os diferentes sistemas (HARDY et alii, 1968).

Uma fase "lag" na evolução de etileno tem sido observada durante a incubação

de raízes destacadas (TJEPKEMA & EVANS, 1976; LEE & YOSHIDA, 1977; KANA & TJEPKEMA, 1978). A causa deste período latente (lag) tem sido extremamente discutida, sem obtenção de conclusões claras (DOBEREINER et alii, 1972; VAN BERKUN & BOHLOOL, 1980; PATRIQUIN, 1982). Enquanto este período latente não for bem compreendido, permanecerão as dúvidas sobre a significância dos dados obtidos de experimentos utilizando raízes destacadas. Observações realizadas têm mostrado que plantas inteiras colocadas dentro do cilindro apresentaram ARAs significativamente menores do que as plantas crescidas desde a semente dentro do cilindros, e essa diminuição tem sido atribuída aos distúrbios físicos dos cilindros intactos no solo, uma vez que a atividade da nitrogenase associada com gramíneas parece ser sensível às alterações na  $pO_2$  (WANI et alii, 1983). Essa sensibilidade, também tem sido utilizada para explicar a baixa ARA inicial de raízes destacadas (DOBEREINER et alii, 1972). Diante do fato de que todas as associações gramíneas/diazotróficos estudadas até agora apresentaram sensibilidade à  $pO_2$  atmosférico (0,20 atm), é quase certo afirmar que um experimento realizado com raízes destacadas em  $pO_2$  atmosférico não produzirá atividades iguais àquelas obtidas em sistema intacto (DOBEREINER et alii, 1972; VAN BERKUN & BOHLOOL, 1980).

As análises de ARA realizadas em cilindro no solo e "in situ", também podem incluir a atividade das cianobactérias, mas isso pode ser evitado através da troca da água superficial por água limpa (LEE et alii, 1977a) ou através da aplicação do herbicida Propanil (BODDEY & AHMAD, 1981) ou estreptomina (HABTE & ALEXANDER, 1980), que inibem a atividade da cianobactéria, e para os quais as plantas de arroz são insensíveis.

As mudanças diurnas da atividade da nitrogenase na fixação associativa de  $N_2$  indicam que a ARA obtida em um dado período do dia, não pode ser extrapolada para taxas diárias (BALANDREAU et alii, 1974). O teste da ARA requer pequenos períodos de incubação, uma vez que longos períodos podem produzir falsos resultados (HARDY et alii, 1973; DAVID & FAY, 1977).

WITTY (1979) relatou que os erros nas medidas de ARA podem ser significantes para sistemas com baixa atividade fixadora de  $N_2$ , quando se utiliza o fator de conversão teórica igual a 3. A relação quantitativa da fixação de  $N_2$  é baseada numa taxa de conversão teórica onde para cada 1 mol de  $N_2$  fixado são reduzidos 3 moles de  $C_2H_2$ , mas essa relação não é uniforme para todos os sistemas fixadores de  $N_2$ , porém comumente são próximos de 1:4 (HARDY et alii, 1973; BURRIS, 1974). Esse desvio é principalmente devido à inibição da evolução do hidrogênio pelo acetileno. É bem conhecido que o hidrogênio é produzido pela nitrogenase incubada em  $N_2$  (ou ar), na ausência de acetileno. Parte do suprimento de ATP é desviado da redução de nitrogênio para a produção de hidrogênio, enquanto que em uma atmosfera contendo acetileno todo esse suprimento é envolvido na

produção de etileno (BERGERSEN, 1966; DART & DAY, 1971). A proporção de atividade da nitrogenase envolvida na produção de hidrogênio varia com o organismo, estágio e condições de crescimento. Parte ou todo o hidrogênio pode ser reciclado, recuperando um pouco da energia perdida (WALKER & YATES, 1978).

Apesar do método da ARA não medir a transferência do N fixado do diazotrófico para a planta associada,, ele tem sido empregado em estudo da fixação de nitrogênio em gramíneas (YOSHIDA & ANCAJAS, 1970; DOBEREINER et alii, 1972; DAY et alii, 1975; VAN BERKUM & SLOGER, 1979). A redução de  $C_2H_2$  nesse caso, somente identifica se a nitrogenase está presente ou não no sistema em particular, e apenas experimentos com  $^{15}N$  são capazes de demonstrar se a cultura é beneficiada significativamente pela fixação não simbiótica e/ou associativa. Entretanto, fatores que afetam o crescimento da planta também podem também afetar a ARA associada a planta (BALANDREAU et alii, 1977; BALANDREAU & DUCERF, 1980). Consequentemente, variações de ARAs são esperadas de planta para planta e são atribuídas às variações das condições ambientais (isto é, intensidade luminosa e temperatura) e fatores da planta. As observações de distribuição da ARA são também necessárias para determinar as transformações apropriadas dos dados para análise estatística (TIROL-PADRE et alii, 1988). Medidas da ARA "in situ" de cianobactérias e raízes de arroz e de *Arachis hypogea* mostram uma distribuição normal do log (ROGER et alii, 1978).

Assim, parece que a ARA pode ser melhor utilizada quando aplicada em estudos qualitativos para determinação do potencial da atividade de fixação de  $N_2$  do sistema ou em experimentos para comparar taxas relativas de fixação de  $N_2$  em diferentes amostras ou cultivares de plantas (BARRAQUIO et alii, 1986).

Vários tipos de testes da atividade da redução de acetileno têm sido empregados para medir da fixação de  $N_2$  associada com plantas de arroz inundado ( RINAUDO et alii, 1971; BALANDREAU & DOMMERGUES, 1973; LEE & YOSHIDA, 1977; WATANABE et alii, 1978; GILMOUR et alii, 1978; WATANABE & CABRERA, 1979; BODDEY & AHMAD, 1981; SANO et alii, 1981; VAN BERKUM & SLOGER, 1982). Estudos realizados têm indicado que os testes devem incluir não somente o solo da rizosfera e raiz, mas também a parte basal do caule e da bainha das folhas, os quais são também importantes sítios da fixação de  $N_2$  (WATANABE et alii, 1978; WATANABE et alii, 1979; WATANABE et alii, 1981; BARRAQUIO et alii, 1982). Testes "in situ" satisfazem esse requerimento mas outros métodos, tais como raízes destacadas (VAN BERKUM & SLOGER, 1982) e culturas em solução nutritiva (WATANABE & CABRERA, 1979), não. BARRAQUIO et alii (1986) desenvolveram um teste de ARA que inclui todas as condições mencionadas e pode ser eventualmente usado para medir a atividade de fixação de  $N_2$  de muitos cultivares de arroz, ao

mesmo tempo. Esse método é simples, rápido e conveniente para medir a atividade de redução de acetileno em grandes números de plantas crescidas em condições de campo e tem contribuído para reduzir os problemas encontrados em outros métodos.

Usando esse método LADHA (1986) e LADHA et alii (1986) estudaram o perfil de alguns cultivares de arroz inundado em seus diferentes estágios de crescimento e obtiveram os melhores resultados na época da emergência da panícula, onde verificaram que: a) as diferenças entre os cultivares foram mais evidentes, b) o coeficiente de variação foi menor (13 - 17%) e c) as correlações parciais entre ARA e matéria seca da raiz e parte aérea foram significantes. As possíveis razões associadas com a incidência máxima da ARA na emergência da panícula dada por esses autores incluem: a) um rápido esgotamento da disponibilidade de N no solo, b) aumento do suprimento dos fotossíntatos da planta para as raízes e c) aumento no transporte de nitrogênio atmosférico para as raízes através do aerênquima.

LADHA et alii (1987), selecionando cultivares de ciclo curto e longo para FBN, observaram também que a ARA foi maior na época da emergência da panícula para os dois ciclos, mas a biomassa de raiz foi diferente. Eles sugeriram que ao menos nos cultivares de ciclo longo a maior ARA poderia ser devido a um aumento na disponibilidade de compostos de carbono provenientes da degradação parcial das raízes da planta na emergência da panícula. Entretanto, esses mesmos autores argumentam que se o declínio das raízes foi uma possível causa do pico da ARA, então, nos cultivares de ciclo curto, o pico também deveria aparecer após o declínio da biomassa das raízes, o que não ocorreu. Diante disso, eles concluem que, embora a degradação de raízes seja importante, o suprimento de fotossíntatos é o fator mais dominante que afeta a ARA.

Diferenças significantes na capacidade de alguns genótipos de arroz para suportar a FBN foram relatadas (LEE et alii, 1977b; LADHA et alii, 1986) e a necessidade de critérios de seleção simples e fáceis tem sido enfatizada (LADHA et alii, 1986).

Alguns trabalhos têm mostrado correlação positiva entre a atividade da redução de acetileno associada a planta e o peso da matéria seca de raízes (LEE et alii, 1977b; HIROTA et alii, 1978; SANO et alii, 1981). Investigações mais completas da relação entre os caracteres de crescimento da planta de arroz associado com ARA podem levar à identificação de características associadas com alta fixação de  $N_2$ . É importante também considerar produção de grãos e índice de colheita quando se seleciona cultivares para FBN, pois o cultivar pode mostrar alta taxa de fixação de  $N_2$  mas baixa produção de grãos (VINCENT, 1984).

Algumas estimativas da FBN em campos de arroz inundado obtidas através do método da atividade da redução de acetileno são apresentadas na Tabela 2.

**Tabela 2. Estimativa da FBN em campos de arroz inundado calculada através da ARA.**

Região	N <sub>2</sub> fixado (kg.ha <sup>-1</sup> .cultura <sup>-1</sup> )	Referências
Shikoku, Japão	26	HIRANO, 1958
Los Baños, Filipinas	52 - 63	YOSHIDA & ANCAJAS, 1973
Tailândia	0,5 - 54	MATSUGUCHI et alii, 1976
Senegal	10 - 30	REYNAUD & ROGER, 1976
Los Baños, Filipinas	50	WATANABE et alii, 1977
Los Baños, Filipinas	4,9	BARRAQUIO et alii, 1982

#### 2.4.3. Uso do isótopo de <sup>15</sup>N

O nitrogênio atmosférico é composto por duas formas estáveis de isótopos de N, onde 99,6337 e 0,3663% dos átomos são <sup>14</sup>N e <sup>15</sup>N, respectivamente (JUNK & SVEC, 1958), mas no solo e nas plantas podem haver pequenas variações dessas proporções. O uso do isótopo de <sup>15</sup>N permite que produtos da fixação de N<sub>2</sub> sejam identificados dentro do N-total das plantas, através da derivação da proporção <sup>15</sup>N/<sup>14</sup>N nos tecidos das plantas testadas quando comparadas com o aumento na proporção de <sup>15</sup>N, acima da abundância natural.

Existem duas formas para uso de isótopos para quantificar a fixação biológica de nitrogênio associada a plantas: uso de gás N<sub>2</sub> enriquecido com <sup>15</sup>N (método direto) e enriquecimento do N do meio onde a planta cresce utilizando N-mineral (método indireto).

É mais desejável usar o isótopo de <sup>15</sup>N na forma gasosa quando se mede a fixação de N<sub>2</sub>, pois a incorporação pela planta do N enriquecido proveniente de uma atmosfera marcada pode ser considerada uma prova definitiva de que a planta beneficia-se da FBN (BURRIS, 1974). Os únicos pré-requisitos para utilização dessa técnica é que o N<sub>2</sub> marcado esteja totalmente puro e que o enriquecimento dos tecidos das plantas seja suficientemente alto para que não possa ser confundido com a abundância natural. A maior limitação dessa técnica está na exposição da planta à atmosfera de <sup>15</sup>N<sub>2</sub>. Se somente as raízes da planta são expostas ao <sup>15</sup>N<sub>2</sub>, o equipamento não precisa ser muito sofisticado (OGHGHORIE & PATE, 1972; MONTANGE et alii, 1981). Entretanto, quando empregaram

essa técnica, YOSHIDA & YONEMA (1980) constataram grande vazamento de gases o que diminuiu consideravelmente o  $^{15}\text{N}_2$  durante o experimento. O arroz inundado também depende da difusão de oxigênio da parte aérea, através do aerênquima, para a respiração das raízes e para evitar os efeitos tóxicos do baixo potencial de redução da rizosfera (LEE et alii, 1981). Assim, é necessário incluir a planta toda de arroz para tais estudos. Entretanto, quando a planta inteira é exposta a uma atmosfera de  $^{15}\text{N}_2$  surgem problemas devido à necessidade de controle de  $\text{O}_2$ ,  $\text{CO}_2$ , transpiração, intensidade e qualidade de luz e temperatura para manter uma taxa fotossintética normal. Câmaras específicas para estudos da FBN foram descritas por WITTY & DAY (1978), YOSHIDA & YONEMA (1980), ITO et alii (1980) e ESKEW et alii (1981), mas mesmo nessas câmaras, não tem sido possível crescer plantas desde a semente ou transplante até a maturação em atmosfera marcada. O período máximo de exposição usado para esses estudos são menores que duas semanas e a maioria dos estudos realizados foram conduzidos com duas plantas somente. As condições ambientais, entretanto, bem controladas, não podem reproduzir exatamente aquelas encontradas no campo, e isto, combinado com o período de curta duração de exposição ao gás  $\text{N}_2$  enriquecido, impossibilita que as estimativas sejam extrapoladas para plantas crescidas em condições de campo (BODDEY, 1987).

As limitações encontradas na utilização do  $^{15}\text{N}_2$  pode ser superada se a fixação de  $\text{N}_2$  é determinada indiretamente através da técnica de diluição isotópica de  $^{15}\text{N}$ , onde o sistema fixador é suprido com uma fonte de N enriquecida do solo com  $^{15}\text{N}$  significativamente diferente do enriquecimento natural de  $\text{N}_2$  atmosférico (BROADBENT et alii, 1982). Este método baseia-se na marcação do N da fração orgânica do solo através de pequenas aplicações de fertilizante enriquecido com  $^{15}\text{N}$ . De acordo com essa técnica, os cultivares que não receberem contribuição da FBN apresentarão uma concentração de  $^{15}\text{N}$  equivalente à existente no N disponível do solo (não ocorre diluição isotópica). Entretanto, aqueles cultivares que receberem uma contribuição de N proveniente da FBN apresentarão menor concentração de  $^{15}\text{N}$  devido à diluição que ocorrerá com a entrada de  $^{14}\text{N}$  do ar, o qual encontra-se em alta concentração nesse meio. Essa técnica é mais apropriada para as medidas de FBN associadas com culturas agrícolas, em plantas crescidas em ambiente natural não perturbado. Nesses estudos o enriquecimento com  $^{15}\text{N}$  do N-mineral do solo é usualmente avaliado através do enriquecimento de  $^{15}\text{N}$  de uma planta controle não fixadora, a qual se desenvolve em idênticas condições. Para uma avaliação cuidadosa da FBN utilizando o enriquecimento do "pool" de N do solo, algumas hipóteses são consideradas: a) as perdas por volatilização não podem ocorrer; b) planta fixadora e controle devem utilizar o  $^{15}\text{N}$  igualmente; c) o solo deve ser uniformemente marcado; d) a aplicação de N no solo não deve afetar a taxa de fixação de  $\text{N}_2$  das plantas.

Algumas dificuldades, entretanto, têm surgido na escolha da planta controle



(RENNIE, 1982). É impossível fazer recomendações gerais para planta controle, uma vez que não se pode afirmar que ela será um bom controle para todas as plantas fixadoras de  $N_2$ . As taxas de crescimento da planta fixadora e do controle podem variar, dependendo de muitos fatores edáficos e ambientais, além do solo apresentar mudanças contínuas do enriquecimento do N disponível para a planta, sendo impossível prever qual controle acumulará N com o mesmo enriquecimento de N da planta fixadora. Algumas recomendações sugeridas baseiam-se no fato de que quando o solo é previamente marcado com  $^{15}N$  e cultivado previamente, o  $^{15}N$  enriquecido residual fica praticamente estável com o tempo (KOHL & SHEARER, 1980).

A inibição da FBN pela adição de  $^{15}N$  inorgânico e a diminuição da variação do enriquecimento de  $^{15}N$  no solo, podem ser contornadas adicionado juntamente com o adubo marcado, fontes de carbono para imobilizar o N. Essa técnica tem sido empregada por vários pesquisadores que utilizam vários substratos de carbono (sacarose, glicose, celulose, pó de serra, palha, etc..) visando imobilizar o N algum tempo antes do plantio (LEGG & SLOGER, 1975; BROADBENT et alii, 1982; VENTURA & WATANABE, 1983). Outra técnica semelhante é incorporar material de planta marcado com  $^{15}N$ , especialmente preparado ou resultante de experimentos anteriores. Essa técnica, entretanto, tem sido criticada, uma vez que a imobilização do N-mineral marcado aplicado em solos já deficientes em N, resulta em plantas com crescimento inadequado, aumentando a proporção do N proveniente da FBN, principalmente em cereais e gramíneas (CHALK, 1985; LEDGARD et alii, 1985). Entretanto, o objetivo até o momento acerca da FBN associada com gramíneas é estimar qualquer potencial de contribuição da FBN, sendo portanto, desejável as condições de solo deficiente em N (BODDEY, 1987).

Apesar de ser uma importante ferramenta para estudos da FBN, o  $^{15}N$  tem seu uso restringido devido a disponibilidade limitada do material, alto custo, além da sua aplicação em condições de campo ficar limitada a microparcelas.

Alguns estudos realizados com  $^{15}N_2$ , visando verificar a fixação biológica de  $N_2$  em solos inundados cultivados com arroz demonstraram que o  $^{15}N$  foi incorporado ao solo (REDDY & PATRICK, 1979; CHARYULU et alii, 1981) e nas plantas (YOSHIDA & YONEMA, 1980; ITO et alii, 1980; ESKEW et alii, 1981; WATANABE & VENTURA, 1982; VENTURA & WATANABE, 1983). Algumas estimativas da fixação de  $N_2$  em arroz calculada utilizando  $^{15}N$  estão apresentadas na Tabela 3.

**Tabela 3. Nitrogênio no arroz inundado proveniente da FBN estimado através do uso de  $^{15}\text{N}$ .**

Região	$\text{N}_2$ fixado (kg N.ha <sup>-1</sup> )	Método	Referências
Bangkhen, Tailândia	52	$^{15}\text{N}_2$	KOYAMA et alii, 1972
Los Baños, Filipinas	97 - 113	$^{15}\text{N}_2$	IRRI, 1974
Fuki e outras regiões, Japão	30 - 100	$^{15}\text{N}$ -fertilizante	KOYAMA, 1975
Tsukuba, Japão	11,6*	$^{15}\text{N}_2$	YOSHIDA & YONEMA, 1980
Maligaya, Filipinas	22,6**	$^{15}\text{N}_2$	ESKEW et alii, 1981

\* período de 13 dias de incubação

\*\* período de 30 dias de incubação

ITO et alii (1980) transferiram plantas de arroz do campo para solução nutritiva e as expuseram ao  $^{15}\text{N}_2$  durante 7 dias, e observaram que houve incorporação de  $^{15}\text{N}$  nas raízes, nó basal e exterior da bainha da folhas, sendo que menos de 10% do  $^{15}\text{N}$  foram translocados para os tecidos da planta. YOSHIDA & YONEMA (1980) conduziram quatro experimentos com exposição das plantas e solo ao  $^{15}\text{N}_2$  que variaram de 7 - 13 dias e constataram que 19 a 25% do total de  $\text{N}_2$  fixado estavam nas raízes, folhas, caules e panículas do arroz. Esses autores comparando os maiores valores obtidos nos seus experimentos com o pequeno enriquecimento alcançado por ITO et alii (1980) enfatizaram a importância da FBN realizada pelas bactérias da rizosfera e ressaltaram que as discrepâncias entre os dois resultados foram devido a presença do solo em seus experimentos.

ESKEW et alii (1981) expuseram ao  $^{15}\text{N}_2$ , durante 13 dias na época da emergência da panícula, plantas de arroz crescidas em vasos contendo solo inundado cobertos com pano preto para reduzir a atividade da fixação de  $\text{N}_2$  por microrganismos fotodependentes, e observaram que 11,3% do total de  $^{15}\text{N}$  no sistema foram encontrados na panícula, 2,3% nas raízes e 80,7% no solo submerso na época da maturação da planta. Esses autores constataram que a porcentagem de átomos em excesso nos grãos na maturação foi maior que na palha e que 70% do  $^{15}\text{N}$  na planta estavam nos grãos. Eles concluíram que os resultados forneceram evidências diretas da fixação heterotrófica de  $\text{N}_2$  associada com as raízes de arroz e solo inundado e que parte do N recém fixado ficou disponível para a planta.

ITO & WATANABE (1981) observaram em experimentos com solo enriquecido com glucose e incubados em  $^{15}\text{N}_2$ , que a imobilização do N-fixado pelas

heterotróficas e o N do solo sofrem processos de transformações semelhantes. Entretanto, as taxas de mineralização foram de 23,4 para o N-fixado e 4,6% para o N do solo após 16 dias e as plantas de arroz absorveram 34% do N-fixado e 8% do N do solo. Esses resultados, segundo os autores, mostraram que o N-fixado biologicamente permaneceu como composto prontamente decomponível, o que tornou-o suscetível ao ataque de microrganismos, fazendo com que ficasse mais disponível para as plantas do que o N do solo.

WATANABE & VENTURA (1982) desenvolveram experimentos com  $^{15}\text{N}_2$  e marcação do solo com  $^{15}\text{N}$  (método da diluição isotópica de  $^{15}\text{N}$ ) em vasos abertos, onde constataram que houve um menor enriquecimento de  $^{15}\text{N}$  nas partes submersas da planta (bainha das folhas e raízes) no experimento com solo marcado. Esse fato foi atribuído à diluição isotópica de  $^{15}\text{N}$ , uma vez que nessa região prevalece o crescimento de cianobactérias e a fixação de  $\text{N}_2$  fotodependente é alta. A hipótese de que estava havendo maior translocação do  $^{15}\text{N}$  dessas partes foi descartada, uma vez que no experimento com  $^{15}\text{N}_2$  estas estavam mais enriquecidas. Eles observaram também que os teores de  $^{15}\text{N}$  das várias partes da planta no experimento com  $^{15}\text{N}_2$  foi inversamente proporcional aos teores de  $^{15}\text{N}$  do experimento de diluição isotópica. No experimento com  $^{15}\text{N}_2$  observaram que 40% do N fixado foi translocado para as folhas e grãos na maturação. Esses autores observaram que os resultados obtidos no experimento com  $^{15}\text{N}_2$  foram opostos aos apresentados por ESKEW et alii (1981), os quais obtiveram maior enriquecimento dos grãos. Eles sugeriram, então, que o N fixado pelas cianobactérias e bactérias fotodependentes associadas com a parte submersa do arroz, estava menos disponível para os grãos do que o  $\text{N}_2$  fixado pelas bactérias heterotróficas, uma vez que o experimento foi realizado contabilizando a fixação fotodependente, enquanto que ESKEW et alii (1981) utilizaram vasos cobertos.

VENTURA & WATANABE (1983) empregando o método da diluição isotópica de  $^{15}\text{N}$  e dois tipos de controle (arroz sequeiro e vasos cobertos) observaram que 20-30% dos ganhos de N no sistema foram provenientes da fixação fotodependente quando utilizaram o controle vaso coberto. A recuperação do N pela planta de arroz foi de aproximadamente 35% e nos vasos cobertos 11% do total do N do solo foi absorvido pelas plantas. Isso significou que o N recém imobilizado pela adição de carboidrato foi três vezes mais disponível para a planta que o N nativo do solo. Eles também constataram que o arroz sequeiro não foi um bom controle, uma vez que os cálculos do N derivado da fixação excedeu ou foi igual ao balanço de N do sistema, e não há dúvidas de que o N na planta derivado da FBN deve ser menor que o total de N ganho no sistema. Os autores, entretanto, sugerem que o alto teor de  $^{15}\text{N}$  do arroz sequeiro foi devido à menor mineralização do N nativo do solo, pois a mineralização do N nativo do solo é mais intensa em solos inundados que solos drenados (ASAMI, 1971).

Apesar do uso dessa técnica estar baseada em várias suposições e alguns problemas, tais como a estabilidade da marcação das formas de N-mineral do solo e conseqüentemente a necessidade de culturas com ciclos de crescimento semelhantes, ela pode ser útil para selecionar cultivares de arroz com potencial para estimular a FBN, identificar sítios da fixação de  $N_2$  nas plantas e verificar os efeitos da inoculação.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

Dois experimentos foram realizados em condições semi-controladas com o objetivo de estimar o potencial da FBN de diferentes cultivares de arroz crescidos em solo inundado, sendo que no primeiro, desenvolvido durante dois anos consecutivos, utilizou-se a técnica da diluição isotópica de  $^{15}\text{N}$  (Estudo I) e também determinou-se o balanço de N no sistema (Estudo II). No segundo ensaio, a técnica utilizada foi a de redução de acetileno (Estudo III), tendo sido realizados isolamentos de alguns gêneros de bactérias fixadoras de  $\text{N}_2$  (Estudo IV).

#### **3.1. Estudo I: Avaliação do potencial da FBN em cultivares de arroz inundado pelo método de diluição de $^{15}\text{N}$**

##### **3.1.1. Localização do experimento**

O experimento foi conduzido durante dois anos consecutivos (1 cultivo.ano<sup>-1</sup>) em condições de casa-de-vegetação com cobertura móvel (Foto 1), a qual foi descrita em detalhes por FREITAS (1984), localizada numa área pertencente ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), da Universidade de São Paulo (USP), em Piracicaba, São Paulo.

##### **3.1.2. Solo**

O solo de várzea classificado como Aluvial foi coletado na Estação Experimental de Pindamonhangaba pertencente ao Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), Pindamonhangaba, São Paulo, uma região de cultivo de arroz sob irrigação por inundação. As amostras de solo foram coletadas a 0 - 20 cm de profundidade, compostas, misturadas,

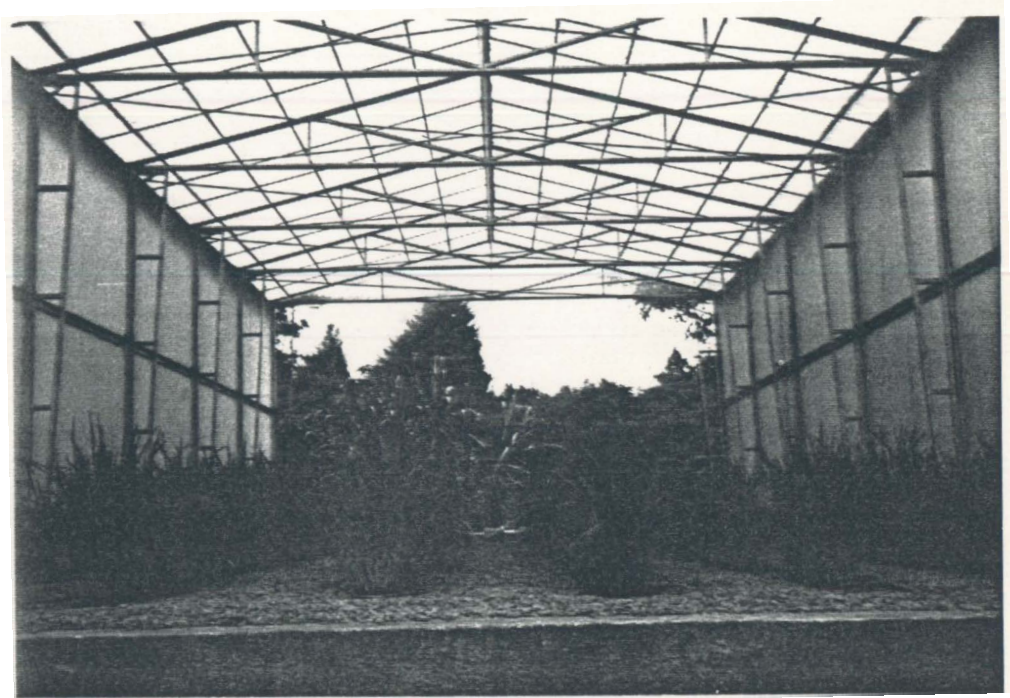


Foto 1. Vista geral da casa de vegetação com cobertura móvel, mostrando o experimento de diluição isotópica de  $^{15}\text{N}$ .

secas ao ar e posteriormente passadas por uma peneira de 2mm. O solo foi acondicionado em vasos plásticos de 10 litros com 26 cm de diâmetro e capacidade para 12 kg de solo, os quais foram enterrados sob área da cobertura móvel para não sofrerem altas variações de temperatura (Foto 2). Algumas de suas características químicas e físicas estão apresentadas na Tabela 4.

**Tabela 4. Resultados de algumas análises químicas e físicas do solo utilizado no experimento<sup>(1)</sup>.**

Análise química										
pH (H <sub>2</sub> O)	M.O. ----- % -----	N-total ----- % -----	PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> ----- % -----	K ----- % -----	Ca ----- % -----	Mg ----- % -----	H+Al ----- % -----	S <sup>(2)</sup> ----- % -----	CTC <sup>(3)</sup> ----- % -----	V <sup>(4)</sup> ----- % -----
4,9	2,14	0,14	0,12	0,40	2,56	1,44	5,18	4,4	9,6	45,9

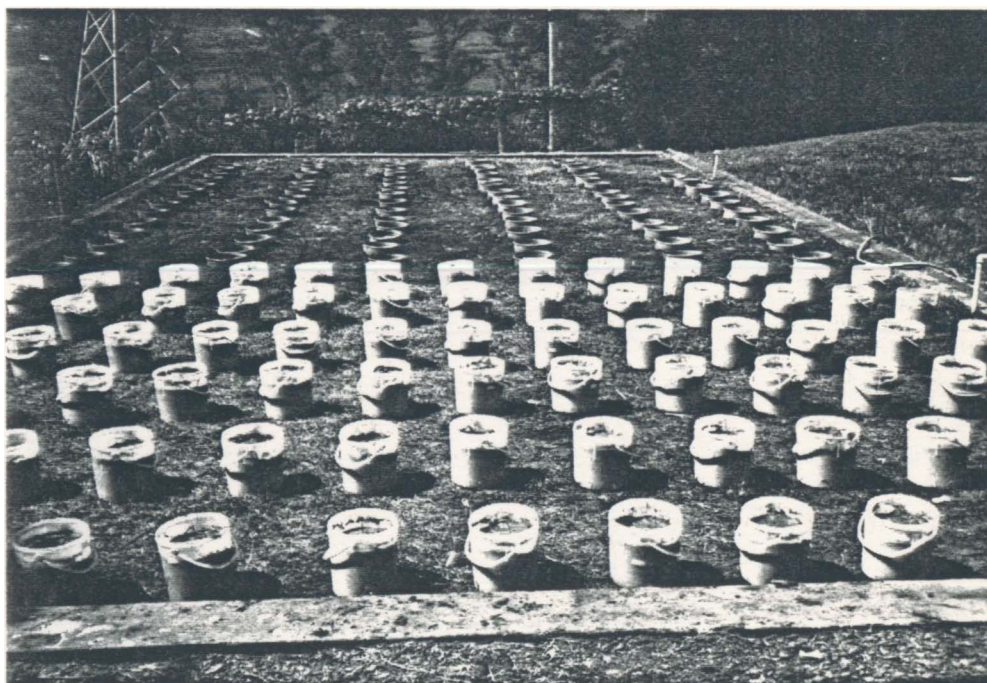
Análise Granulométrica			
Areia ----- % -----	Silte ----- % -----	Argila ----- % -----	Classe Textural
21,0	36,5	42,5	argilosa

(1) Análise do Departamento de Solos, Geologia e Fertilizantes - Centro de Estudos do Solo - ESALQ/USP

(2) Soma de Bases, (3) Capacidade de Troca Catiônica; (4) Saturação de Bases.

### 3.1.3. Adição de fertilizante

A adubação mineral aplicada foi baseada na recomendação de ALLEN et alii (1976) própria para arroz inundado cultivado em vaso e foi realizada uma vez somente antes do primeiro plantio. Foram adicionados no solo 5,5 g de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.vaso<sup>-1</sup> na forma de superfosfato triplo, 2,88 g K<sub>2</sub>O.vaso<sup>-1</sup> como sulfato de potássio, 245 mg de uma mistura de micronutrientes.vaso<sup>-1</sup> (ZnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O - 250 g, CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O - 100 g e Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>.10H<sub>2</sub>O - 100 g), 12 g de calcáreo.vaso<sup>-1</sup> (mistura de CaCO<sub>3</sub> e MgCO<sub>3</sub> na proporção de 4:1). A aplicação do fertilizante foi realizada vaso por vaso, retirando-se o solo do vaso, colocando-o em um plástico estendido no chão e misturando estes produtos homogeneamente. A adubação nitrogenada não foi realizada, aplicando-se apenas uma pequena quantidade de sulfato de amônio enriquecido com <sup>15</sup>N para marcar o solo.



**Foto 2. Ao fundo encontram-se os vasos enterrados sob área da cobertura móvel usados no ensaio de diluição isotópica de  $^{15}\text{N}$  e na frente os vasos usados no teste de ARA.**



#### 3.1.4. Marcação do solo com $^{15}\text{N}$

A marcação do solo foi feita adicionando-se 755 mg de sulfato de amônio enriquecido com 21,274 átomos % de  $^{15}\text{N}$  em excesso para cada vaso (160 mg de  $\text{N.vaso}^{-1}$  correspondendo a 34 mg de  $^{15}\text{N.vaso}^{-1}$ ). Para facilitar a aplicação do fertilizante marcado, preparou-se uma solução contendo 61,155 g de sulfato de amônio enriquecido com  $^{15}\text{N}$  e 4050 ml de água destilada, colocando-se 50 ml por vaso.

A imobilização do fertilizante enriquecido aplicado ao solo visando diminuir as perdas desse N e também para homogeneizar a marcação, foi realizada adicionando-se 30 g de sacarose em cada vaso juntamente com a adubação mineral e aplicação de  $^{15}\text{N}$ , seguindo a recomendação feita por VENTURA & WATANABE (1983). A sacarose funciona como fonte de carboidrato para os microrganismos do solo proporcionando maior crescimento da sua população e conseqüente aumento no consumo de N, ficando este imobilizado nos microrganismos, os quais vão liberando aos poucos esse N através da sua morte.

Para determinar a imobilização do N disponível utilizou-se do solo de um vaso que recebeu o mesmo tratamento e que foi posteriormente descartado. Na primeira amostragem, feita logo após a adição dos fertilizantes e da sacarose, retirou-se três amostras de solo e determinou-se os teores dos íons amônio e nitrato encontrando valores de 41,19 ppm e 6,46 ppm, respectivamente. Amostras foram retiradas em diversos dias até que aos 12 dias os teores dos íons amônio e nitrato medidos foram iguais a zero.

#### 3.1.5. Tratamentos

Os tratamentos utilizados no experimento constaram de vaso sem planta e dos cultivares de arroz inundado empregados: IAC-1278, IAC-81-318, IAC-4440 (provenientes do Instituto Agronômico de Campinas - IAC, Campinas, SP), CNA-0721, CNA-3314, CNA-3852, CNA-3879, CNA-4215, CNA-4501, CNA-4566, BR-IRGA-409, BR-IRGA-410 (provenientes do Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão - CNPAF/EMBRAPA, Goiânia, GO), IR-42, IR-58 e HUA-CHOU-CHI-MO-MOR (provenientes do International Rice Research Institute - IRRI, Filipinas). No segundo ano de cultivo cada cultivar foi transplantado para o vaso correspondente ao utilizado no primeiro ano. Algumas das características agronômicas dos cultivares usados estão apresentadas na Tabela 5.

**Tabela 5. Algumas características agrônômicas dos cultivares de arroz inundado usados no experimento.**

Cultivares	Cruzamento ou origem	Ciclo de maturação (dias)	Floresc. (dias)	Altura da planta (cm)	Resistência			Tipo de grão
					A <sup>(1)</sup>	B <sup>(2)</sup>	H <sup>(3)</sup>	
IAC-1278	P 1217/P 1236	133 - 145	110 - 120	80 - 90	R	S	MR	longo
IAC-81-318	IR-841/F-3-7	135 - 145	110 - 118	85 - 95	-	S	-	longo
IAC-4440	CICA-4(IR-665-23--3-1/ TETEP)	141 - 150	123 - 130	80 - 90	R	R	MS	longo fino
CNA-0721	-	-	-	-	-	-	-	-
CNA-3314	-	-	-	-	-	-	-	-
CNA-3852	P-738-137-7-1	130	86 - 98	90	R	MR	R	longo fino
CNA-3879	CICA-8/BG-90-2/ TETEP	130	99	90	R	R	MR	longo fino
CNA-4215	BN-1/CR-115	130	98	85	R	MR	MR	longo fino
CNA-4501	-	-	-	-	-	-	-	-
CNA-4566	IR-930-53/IR-579-160/IR-22/IR-930-147-8/IR-939-31-10/IR-662/ Colombia-1	110 - 145	80 - 115	100 - 111	R	R	MR	longo fino
BR-IRGA-409	IR-930-2/ IR-665-31-2-4	130 - 140	85 - 96	80 - 90	R	R	-	longo fino
BR-IRGA-410	IR-930-53/ IR-665-32-24	130 - 135	87 - 93	90 - 100	R	R	-	longo fino
IR-42	-	125 - 135	-	-	-	-	-	-
IR-58	-	105 - 110	-	-	-	-	-	-
HUA-CHOU	-	105 - 110	-	-	-	-	-	-

Resistência: (1) Acamamento, (2) Brusone, (3) Helminthosporiose: R = resistente  
S = suscetível  
MS = moderadamente suscetível  
MR = moderadamente resistente

Tipo de grão: classificado de acordo com o comprimento do grão descascado manualmente: *Curto* - até 4,99 mm; *Médio* - de 5 mm a 5,99 mm; *Longo* - de 6 mm a 6,99 mm (fino: relação comprimento/largura > 3; médio: relação comprimento/largura < 3); *extra longo* - de 7 mm em diante.

### 3.1.6. Transplante das plântulas

As sementes de arroz foram enroladas em papel de germinação, formando tubos, os quais foram acondicionados em frascos plásticos contendo água destilada, e colocados para germinar em sala de crescimento com temperatura constante de 28°C e fotoperíodo de 12 horas. Após 18 dias as plântulas com aproximadamente 18 cm de tamanho (Foto 3), foram retiradas do papel de germinação e transplantadas para os solos nos vasos, colocando-se três plântulas por vaso.



**Foto 3. Aspecto da germinação das sementes de arroz. Plântulas com 18 dias de idade.**

### 3.1.7. Alagamento

Após a constatação da imobilização total do N-mineral aplicado ao solo realizou-se o encharcamento do mesmo com água de torneira, sendo realizado o transplante das plântulas de arroz no dia seguinte. Após o transplante fez-se a inundação do solo, deixando-se uma lâmina de aproximadamente 5 cm de profundidade até o final do ciclo da cultura. Após a primeira colheita o solo foi mantido inundado, sendo todos os vasos cobertos com um plástico preto, permanecendo assim até o plantio subsequente.

### 3.1.8. Controle Fitossanitário

Foi realizado controle diário manual, sem aplicação de inseticida, do ataque da lagarta (*Elasmopalpus lignosellus* L.) para manutenção da sanidade das plantas. Observou-se que esse ataque somente ocorreu durante os primeiros 20 dias após o transplante das plântulas nos dois cultivos.

### 3.1.9. Delineamento experimental - Análise dos dados

O experimento consistiu de 80 vasos dispostos completamente ao acaso, os quais compreenderam 16 tratamentos e 5 repetições, com duas épocas de cultivo (1<sup>º</sup> ano e 2<sup>º</sup> ano). A análise de variância foi feita segundo modelo inteiramente ao acaso, utilizando-se o teste Duncan para comparação entre médias.

### 3.1.10. Amostragem do solo e preparo das amostras

A amostragem do solo foi realizada após a adubação mineral e aplicação de <sup>15</sup>N, mas antes do primeiro plantio, e após a colheita do segundo plantio, utilizando-se um pequeno trado, retirando-se três amostras por vaso. As amostras de cada vaso foram misturadas e colocadas para secar em estufa a 60°C até peso constante. Em seguida foram trituradas em almofariz, passadas por uma peneira de 0,5 mm e mantidas em sacos plásticos até o momento de serem analisadas.

### 3.1.11. Colheita das plantas e preparo das amostras

Os cultivares de arroz inundado foram colhidos após 120 dias do transplante. Coletou-se somente a parte aérea das plantas no primeiro ano de cultivo deixando as raízes nos vasos. Para que não houvesse brotamento do arroz procurou-se cortar a parte aérea bem na intersecção com a raiz, além de cobrir os vasos com plástico preto. Na colheita do segundo plantio as raízes foram retiradas. As plantas de cada vaso foram separadas em palha, grãos (no primeiro ano) e raiz (no segundo ano) e, assim, independentemente analisadas. O material vegetal coletado foi separadamente colocado em sacos de papel e secado em estufa com circulação de ar, a 60°C até peso constante. Após a secagem o material foi pesado e finalmente moído em moinho com malha de 60 mesh.

### 3.1.12. Parâmetros avaliados

**Matéria seca:** A produção de matéria seca foi determinada nas diferentes partes da planta através da pesagem de cada uma e a produção para a planta inteira foi obtida através da somatória dos valores encontrados nas diferentes partes da planta.

**Nitrogênio na planta:** O N-total das diversas partes da planta foi obtido após a digestão sulfúrica do material (PARKINSON & ALLEN, 1975) e análise colorimétrica de fluxo contínuo (ZAGATTO et alii, 1981). Os resultados expressos em porcentagem foram transformados para quantidade de nitrogênio total utilizando-se a equação 1 :

$$QNTN = \frac{TNTP \times MS}{100} \quad (1)$$

onde, TNTP = teor de nitrogênio total na parte da planta considerada (%)

MS = matéria seca produzida na parte da planta considerada (g.vaso<sup>-1</sup>)

As quantidades de N-total acumuladas pela planta inteira foram obtidas pela somatória dos valores encontrados para cada uma das partes consideradas.

**Nitrogênio na planta derivado do fertilizante:** As amostras de plantas para análise da concentração isotópica de  $^{15}\text{N}$  foram processadas pelo método de combustão modificada de Dumas segundo PROKSCH (1969) conforme metodologia apresentada por TRIVELIN et alii (1973) e analisadas por espectrometria de massa.

*a) Porcentagem de nitrogênio derivado do fertilizante*

Nas diversas partes da planta as porcentagens de nitrogênio derivado do fertilizante foram calculadas pela equação 2 :

$$\%N_{dff} = \frac{(\text{átomos } \% \text{ } ^{15}\text{N}_{\text{planta}} - \% \text{ A.N.})}{(\text{átomos } \% \text{ } ^{15}\text{N}_{\text{fertilizante}} - \% \text{ A.N.})} \times 100 \quad (2)$$

onde,

Atomos  $\% \text{ } ^{15}\text{N}_{\text{planta}}$  = porcentagem de átomos de  $^{15}\text{N}$  presentes na parte da planta em questão

Atomos  $\% \text{ } ^{15}\text{N}_{\text{fertilizante}}$  = porcentagem de átomos de  $^{15}\text{N}$  presentes no fertilizante

$\% \text{ A.N.}$  = átomos  $\%$  de abundância natural de  $^{15}\text{N}$

A abundância natural de  $^{15}\text{N}$  para as plantas de arroz foi determinada através da análise das diferentes partes da planta crescidas em solos sem adição de  $^{15}\text{N}$ . Os valores, obtidos através da média ponderada de cinco repetições, foram: 0,387 átomos  $\%$  de  $^{15}\text{N}$  em excesso na palha, 0,371 átomos  $\%$  de  $^{15}\text{N}$  em excesso nos grãos e 0,379 átomos  $\%$  de  $^{15}\text{N}$  em excesso nas raízes.

As porcentagens de átomos de  $^{15}\text{N}$  em excesso acumuladas pela planta inteira foram obtidas através dos valores ponderados entre as porcentagens de átomos de  $^{15}\text{N}$  em excesso encontradas para cada uma das partes da planta.

*b) Quantidade de nitrogênio derivado do fertilizante*

As quantidades de nitrogênio nas diversas partes da planta de arroz foram calculadas utilizando-se a equação 3 :

$$QN_{dff} = \frac{\%N_{dff} \times QNTP}{100} \quad (3)$$

tendo sido já apresentados  $\%N_{dff}$  e QNTP nas equações 1 e 2.

c) *Porcentagem de recuperação pela planta do fertilizante aplicado*

Para cada uma das diversas partes da planta em estudo a recuperação do fertilizante aplicado (R) foi determinada através da equação 4 :

$$R = \frac{\%N_{dff} \times QNTP}{QNA} \quad (4)$$

onde,

$\%N_{dff}$  e QNTP estão apresentadas nas equações 1 e 2

QNA = quantidade de nitrogênio aplicada (160 mg N.vaso<sup>-1</sup>)

d) *Nitrogênio na planta derivado da fixação de N<sub>2</sub>*

Assumindo que as hipóteses para que uma planta possa ser utilizada como controle não fixador são verdadeiras para o presente experimento, foi calculado o nitrogênio na planta derivado da fixação biológica de N<sub>2</sub> através da equação 5 e 6 :

$$\%N_{dfa} = \left[ 1 - \frac{(\text{átomos } \% \text{ } ^{15}\text{N em excesso na planta fixadora})}{(\text{átomos } \% \text{ } ^{15}\text{N em excesso na planta controle})} \right] \times 100 \quad (5)$$

onde,

$\%N_{dfa}$  = porcentagem de nitrogênio na planta derivado da fixação biológica de N<sub>2</sub>

$$QN_{dfa} = \left[ 1 - \frac{(\text{átomos } \% \text{ } ^{15}\text{N em excesso na planta fixadora})}{(\text{átomos } \% \text{ } ^{15}\text{N em excesso na planta controle})} \right] \times N\text{-total} \quad (6)$$

onde,

QN<sub>dfa</sub> = quantidade de nitrogênio na planta derivado da fixação biológica de N<sub>2</sub> (mg N.vaso<sup>-1</sup>)

A planta controle não fixadora de N<sub>2</sub> foi estabelecida após a análise de átomos % de <sup>15</sup>N em excesso e N-total de todos os cultivares, sendo selecionado o CNA-3314, o qual apresentou as menores quantidades de N-total e os maiores teores de átomos % de <sup>15</sup>N em excesso, mostrando-se com baixo potencial de fixação de N<sub>2</sub>.

**Nitrogênio no solo:** A análise do teor de N-total foi iniciada seguindo a metodologia descrita por FREITAS (1984), a qual inclui  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NO}_2^-$ . Posteriormente, as amostras foram destiladas de acordo com o método semi-micro-Kjeldahl descrito por BREMNER (1965). Após esse procedimento, o destilado foi acidulado com três gotas de HCl 1N e concentrado em estufa ventilada a  $60^\circ\text{C}$  para posterior análise de  $^{15}\text{N}$ .

A quantidade de N-total no solo foi calculada pela seguinte equação 7 :

$$\text{QNTS} = \frac{\text{TNTS} \times \text{Massa do solo}}{100} \quad (7)$$

onde,

TNTS = teor de nitrogênio total no solo (%)

Massa do solo = massa do solo contida nos vasos (no presente caso 12 kg)

**Nitrogênio no solo derivado do fertilizante:** As amostras de solo, após passarem pelo processo descrito no item anterior, foram submetidas à análise da concentração isotópica de  $^{15}\text{N}$ , seguindo o método de Rittemberg, de acordo com BREMNER & EDWARDS (1965) e adaptado por TRIVELIN et alii (1973), sendo posteriormente analisadas por espectrômetria de massa.

*a) Porcentagem de nitrogênio no solo derivado do fertilizante*

A porcentagem de nitrogênio no solo derivado do fertilizante foi calculada através da equação:

$$\% \text{NSdff} = \frac{(\text{átomos } \% \text{ } ^{15}\text{N}_{\text{solo}} - \% \text{ A.N.})}{(\text{átomos } \% \text{ } ^{15}\text{N}_{\text{fertilizante}} - \% \text{ A.N.})} \times 100 \quad (8)$$

onde,

Átomos  $\% \text{ } ^{15}\text{N}_{\text{solo}}$  = porcentagem de átomos de  $^{15}\text{N}$  presente no solo

Os demais elementos da expressão foram descritos anteriormente. O valor da abundância natural do solo, determinada nos solos onde não se aplicou  $^{15}\text{N}$ , correspondendo à média ponderada de cinco repetições, foi 0,379.



*b) Quantidade de nitrogênio no solo derivado do fertilizante*

A quantidade de N no solo derivada do fertilizante, expressa em mg.vaso<sup>-1</sup>, por sua vez, foi calculada pela equação 9 :

$$QNSdff = \frac{\%NSdff \times QNTS}{100} \quad (9)$$

Os elementos da equação foram apresentados nas expressões 7 e 8.

*c) Porcentagem de recuperação do fertilizante aplicado no solo*

A recuperação do fertilizante aplicado (R) no solo foi calculada através da equação 10 :

$$R = \frac{\%NSdff \times QNTS}{QNA} \quad (10)$$

### **3.2. Estudo II. Estimativa do balanço de N para cultivares de arroz inundado e contribuição da FBN.**

O balanço do nitrogênio no sistema solo-arroz, o qual refere-se à contabilização das entradas e saídas do nutriente, no volume de solo e no período de tempo considerado, foi realizado, embora as entradas de N através da água de irrigação e/ou sementes e/ou absorção de amônia atmosférica e as perdas por denitrificação e/ou volatilização não tenham sido contabilizadas. Apesar da possibilidade da água de irrigação e/ou sementes terem contribuído com algum N, as perdas por denitrificação e volatilização certamente também ocorreram, como é evidentemente observado nos vasos sem plantas. A entrada de N proveniente de precipitações pluviométricas e as perdas por lixiviação e/ou escoamento superficial não foram consideradas devido às condições experimentais, ou seja, casa-de vegetação móvel e vasos fechados, respectivamente. O fertilizante aplicado embora numa pequena quantidade (160 mg N.vaso<sup>-1</sup>), não está incluído diretamente, mas no N inicial do solo, o qual foi analisado após a adição do N-fertilizante.

Assim, foram realizados o balanço de massa do N e o balanço de massa isotópico ( $^{15}\text{N}$ ), onde as expressões para cada caso foram dadas por:

*a) Balanço de N*

$$\text{Balanço} = \text{N final do solo} + \text{N na planta} - \text{N inicial do solo} \quad (11)$$

*b) Balanço do fertilizante aplicado*

$$\text{Balanço} = \text{N fert. final no solo} + \text{N fert. na planta} - \text{Nfert. inicial no solo} \quad (12)$$

As perdas de N em ambos os balanços (N e  $^{15}\text{N}$ -fertilizante) foram determinadas por diferença, ou seja :

$$\text{Perdas} = \text{N inicial no solo} - \text{N final no solo} \quad (13)$$

### **3.3. Estudo III. Avaliação do potencial da FNB em cultivares de arroz inundado através da técnica de Redução de Acetileno**

#### **3.3.1. Localização do experimento**

O experimento foi realizado no mesmo local e época do experimento citado no item 3.1.1.(Foto 2).

#### **3.3.2. Solo**

O solo aqui utilizado foi o mesmo citado no item 3.1.2. referente ao primeiro experimento. Ele foi acondicionado em vasos plásticos de 5 litros com 20 cm de diâmetro contendo 4,5 kg de solo (Foto 2).

### **3.3.3. Adição do fertilizante**

O fertilizante aplicado foi igualmente calculado para a quantidade de solo empregada de acordo com a recomendação de ALLEN et alii (1976) já descrita no item 3.1.3. do primeiro experimento. O procedimento para a realização da adubação também foi o mesmo do item 3.1.3. A adubação nitrogenada não foi aplicada.

### **3.3.4. Tratamentos**

Os tratamentos aqui empregados corresponderam aos 15 diferentes cultivares já mencionados no item 3.1.5. do primeiro experimento.

### **3.3.5. Transplante das plântulas**

A metodologia para germinação das sementes foi a mesma adotada no item 3.1.6. do primeiro experimento. Foram transplantadas duas plântulas por vaso, as quais estavam com 18 dias de idade.

### **3.3.6. Alagamento**

O solo foi encharcado , com água de torneira, logo após a sua adubação, recebendo o transplante das mudas no dia seguinte, e, então, foi inundado deixando-se uma lâmina de água de aproximadamente 5 cm de profundidade, permanecendo assim até a coleta das plantas.

### **3.3.7. Controle fitossanitário**

O procedimento aqui adotado foi o mesmo do item 3.1.8. referente ao primeiro experimento.

### 3.3.8. Delineamento experimental

O experimento consistiu de 75 vasos dispostos completamente ao acaso, compreendendo 15 tratamentos com 5 repetições. A análise de variância foi realizada seguindo o modelo inteiramente ao acaso, utilizando-se o teste Duncan para comparação entre médias.

### 3.3.9. Amostragem das plantas

Cada cultivar de arroz foi colhido na sua época de emergência da panícula, uma vez que, estudos já realizados (LADHA et alii, 1986), demonstraram a incidência de máxima atividade da enzima nitrogenase nesse estágio de desenvolvimento. A parte aérea foi separada das raízes, sendo esta última acondicionada em frascos de vidro de três litros e o resto do material levado para secar em estufa ventilada a 60 °C.

### 3.3.10. Parâmetros avaliados

**Atividade da redução de acetileno (ARA):** O método da redução de acetileno (HARDY et alii, 1968) que determina a atividade da enzima nitrogenase, foi empregado utilizando-se os frascos de vidro contendo as raízes, os quais foram recobertos com um saco de papel escuro para evitar a entrada de luz e vedados com uma tampa própria (Foto 4). Em seguida, injetou-se 10% do volume do frasco de gás acetileno (300 ml de acetileno.frasco<sup>-1</sup>) e 0,01% de gás propano (0,3 ml de propano.frasco<sup>-1</sup>). O gás propano serviu para verificar se houve vazamento de gás dos frascos. Amostras de gás de 0,5 ml foram retiradas dos frascos, usando-se seringas de 10 ml, e injetadas em cromatógrafo de gás.

Inicialmente as amostragens foram feitas no período de 2, 4, 6, 8, 24 horas após a incubação das raízes. Entretanto, constatou-se que o período onde havia maiores diferenças na atividade da enzima nitrogenase entre os cultivares estava localizado entre 8 e 24 horas, e então, para os cultivares coletados posteriormente, fêz-se amostragens de duas em duas horas até completar 24 horas. Após este período de incubação as raízes foram retiradas dos frascos de vidro, lavadas em água de torneira e colocadas para secar em estufa ventilada a 60°C.



**Foto 4. Aspecto dos frascos de vidro de 3 litros usados na incubação das raízes de arroz para o teste de ARA.**

**Matéria seca:** A produção de matéria seca foi obtida seguindo o mesmo procedimento descrito no item 3.1.12. do primeiro experimento.

**Nitrogênio na planta:** A análise do N-total da parte aérea e raiz foi realizada da mesma forma citada no item 3.1.12. do primeiro experimento.

#### **3.4. Estudo IV. Isolamento de algumas bactérias heterotróficas fixadoras de N<sub>2</sub> em cultivares de arroz inundado.**

O isolamento de bactérias heterotróficas foi realizado utilizando-se as raízes do ensaio descrito no item 3.3. (Método da redução de acetileno).

**Coleta do material:** Após a retirada das raízes dos frascos de vidro, coletou-se 10 g de solo, de cada repetição, que estavam aderidos às raízes, completando 50 g para cada cultivar (5 repetições). Em seguida, procedeu-se a lavagem das raízes com água de torneira, determinou-se o peso do material verde e coletou-se 10 g do material de cada repetição completando 50 g de raízes por cultivar.

**Preparo do material:** Para o isolamento das bactérias da rizosfera, preparou-se uma solução contendo as 50 g de solo mais 450 ml de solução tampão fosfato esterilizado (500 ml de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,05 M + 500 ml de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,05 M esterilizado em autoclave por 20 minutos). A solução para bactérias do rizoplano foi preparada colocando-se as 50 g de raízes de cada cultivar em um erlenmeyer esterilizado contendo 150 ml de tampão fosfato + 20 bolinhas de vidro. Agitou-se manualmente o recipiente durante 5 minutos, retirando em seguida a solução, colocando-a em um erlenmeyer esterilizado. Repetiu-se essa operação mais duas vezes, completando um volume final de 450 ml. O preparo da solução para isolamento das bactérias da hitosfera foi realizado utilizando-se as 50 g de raízes empregadas no isolamento das bactérias do rizoplano. Este material juntamente com 450 ml de solução tampão fosfato esterilizado foi macerado e transferido para um erlenmeyer também esterilizado.

**Isolamento:** Para isolamento das bactérias heterotróficas fêz-se as diluições de 10<sup>-5</sup> até 10<sup>-8</sup> das três soluções preparadas colocando-se 1 ml de cada diluição em placas de Petri contendo o meio de cultura "tryptic soy agar" (TSA - 1 g de tryptic soy broth + 15 g de noble agar)

conforme recomendado por WATANABE & BARRAQUIO (1979). As placas foram feitas em triplicatas para cada diluição. As placas de Petri foram então incubadas em estufa a 28°C e após 7 dias fêz-se a contagem do número de colônias de bactérias.

Foram preparados também os meios de cultura semi-sólidos "Glucose Yeast Extract" (GYE) para isolamentos de bactérias do gênero *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonas* e LG malato para *Azospirillum* (Tabela 6).

**Tabela 6. Meios de cultura semi-sólidos "Glucose Yeast Extract" (GYE) e LG malato usados para isolar bactérias.**

Reagentes	GYE	LG malato
	g.l <sup>-1</sup>	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5	0,1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	–	0,4
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2	0,2
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,2	0,02
NaCl	–	0,1
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,04	0,004
Yeast extract	0,1	–
Glucose	5,0	–
MnSO <sub>4</sub>	–	0,01
Acido málico sólido	–	5,0
KOH (sólido)	–	4,0
Agar	1,75	1,75
		ml.l <sup>-1</sup>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,15	–
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,004	–
CuSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,005	–
CoSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,07	–
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,11	–
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	5,9	–
Azul de bromotimol	–	2,5

Foram colocados 5 ml por tubo de ensaio destes meios de cultura, fazendo-se em seguida a esterilização dos mesmos em autoclave. Diluições de  $10^{-3}$  a  $10^{-8}$  em triplicatas foram realizadas, utilizando-se as três soluções preparadas. Os tubos de ensaio também foram incubados em estufa a  $28^{\circ}\text{C}$ .

**Atividade da redução de acetileno:** A atividade da enzima nitrogenase foi determinada através do método de redução de acetileno descrito por HARDY et alii (1968) em todos os tubos. Para essa determinação, retirou-se as tampas de algodão dos tubos de ensaio colocando tampas de borracha apropriadas. Esse procedimento foi realizado em câmara de repicagem de bactéria para evitar contaminações. Em seguida injetou-se 10% do volume do tubo de gás acetileno ( $0,2 \text{ ml de acetileno.tubo}^{-1}$ ). Após 24 horas retirou-se amostras de 0,5 ml de gás de cada tubo, usando-se seringas de 10 ml, e injetou-se no cromatógrafo de gás.

**Número mais provável (NMP):** A contagem através dessa técnica foi calculada utilizando-se a tabela de Mc Crady (POSTGATE, 1969). Os números de diazotróficos foram estimados através das diluições mais altas que apresentaram resultados positivos nos testes de redução de acetileno. Os tubos foram considerados positivos quando a atividade da nitrogenase foi maior que 6 nmoles  $\text{C}_2\text{H}_4$  por tubo.



## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Estudo I. Avaliação do potencial da FBN em cultivares de arroz inundado pelo método da diluição isotópica de $^{15}\text{N}$

#### 4.1.1. Produção de matéria seca

Os resultados de produção de matéria seca obtidos para as diferentes partes da planta e planta inteira de quinze cultivares de arroz inundado durante dois cultivos sucessivos, encontram-se na Tabela 7, elaborada a partir dos dados que constam dos Apêndices 1 e 2. De modo geral, verifica-se que houve diferenças na produção de matéria seca entre os cultivares no primeiro ano de cultivo, tanto para palha como para grãos e planta inteira, sendo que os dados de raízes não foram coletados, uma vez que seria impossível retirá-las sem causar perdas do solo marcado com  $^{15}\text{N}$ , o que afetaria o plantio subsequente. Vale ressaltar que, embora tenha sido realizada adubação P, K e micronutrientes no solo, a dose de N-mineral aplicada foi relativamente baixa ( $30 \text{ kg N}\cdot\text{ha}^{-1}$ ), uma vez que foi utilizada apenas para marcar o solo com  $^{15}\text{N}$ . A baixa adubação nitrogenada, entretanto, parece não ter afetado a produtividade nesse primeiro ano, uma vez que ela foi relativamente alta para todos os cultivares, apresentando diferenças estatísticas entre eles. As melhores produções de grãos foram apresentadas igualmente pelo cultivares BR-IRGA-409, IAC-1278 e CNA-4566 ( $26,3 \text{ g}\cdot\text{pl}^{-1}$ ) e as mais baixas foram observadas para os IR-42, CNA-4501, CNA-3314, IAC-4440 e CNA-0721 ( $17, 19, 20, 20$  e  $21 \text{ g}\cdot\text{pl}^{-1}$ , respectivamente).

No segundo ano de cultivo, observa-se que não houve praticamente diferenças estatísticas na produção de matéria seca a não ser para raízes. No entanto, foram obtidas diferenças na produção de matéria seca total de até 33% entre um cultivar e outro (CNA-3314 e BR-IRGA-409, por exemplo). Verifica-se também que a produtividade caiu em média 25% para todos os cultivares, sendo que o CNA-3314 mostrou a maior queda (36,7%) e o IAC-81-318 a menor (11,8%). Apesar dessa diminuição de produção de grãos, obteve-se

**Tabela 7. Produção de matéria seca de diferentes partes de 15 cultivares de arroz inundado durante dois cultivos sucessivos desenvolvidos em vasos de 10 litros (12 kg solo.vaso<sup>-1</sup>), contendo três plantas. Médias de cinco repetições.**

CULTIVARES	1º ano				2º ano				Total
	Palha	Grãos	Total	g.vaso <sup>-1</sup>	Palha	Grãos	Raiz	Total	
	g.vaso <sup>-1</sup>								
IAC-1278	74,15 bcd	78,78 a	152,93 ab	55,36 a	54,21 a	28,57 ab	138,14 a	291,07 a	
IAC-81-318	70,23 bcde	70,74 abcd	140,97 abc	68,96 a	62,42 a	26,84 ab	158,22 a	299,19 a	
IAC-4440	82,30 abc	60,02 def	142,32 abc	73,03 a	43,77 a	29,57 ab	146,37 a	288,69 a	
CNA-0721	74,59 bcd	62,26 cdef	136,85 bcd	58,65 a	50,22 a	29,96 ab	138,83 a	275,68 a	
CNA-3852	71,15 bcde	72,35 abcd	143,50 abc	64,36 a	56,10 a	34,74 a	155,20 a	298,70 a	
CNA-3879	84,41 ab	64,40 cde	148,81 ab	46,75 a	46,23 a	32,71 a	125,69 a	274,50 a	
CNA-4215	57,16 ef	76,07 ab	133,23 bcd	66,54 a	59,39 a	25,72 ab	151,65 a	284,88 a	
CNA-4501	82,90 ab	58,39 ef	141,29 abc	72,65 a	45,30 a	28,49 ab	146,44 a	287,73 a	
CNA-4566	65,48 de	78,87 a	144,35 abc	57,40 a	58,63 a	27,22 ab	143,25 a	287,60 a	
BR-IRGA-409	67,27 cde	78,10 a	145,37 abc	70,55 a	61,19 a	27,74 ab	159,48 a	304,85 a	
BR-IRGA-410	61,64 def	75,95 ab	137,59 bcd	57,30 a	55,15 a	25,04 ab	137,49 a	275,08 a	
IR-42	76,88 bcd	52,41 f	129,29 bcd	66,36 a	40,34 a	31,26 ab	137,96 a	267,25 a	
IR-58	49,50 f	65,83 bcde	115,33 d	51,53 a	55,29 a	15,51 b	122,33 a	237,66 a	
HUA-CHOU	94,53 a	69,69 abcde	164,22 a	62,95 a	49,08 a	24,04 ab	136,07 a	300,29 a	
CNA-3314	63,31 def	60,74 def	124,05 cd	44,44 a	38,43 a	23,49 ab	106,36 a	230,41 a	
C.V. (%)	14,7	11,7	11,3	36,6	32,3	40,6	34,2	18,7	

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de 5% de significância pelo teste Duncan.

uma média geral de 17,2 g.pl<sup>-1</sup>, o que corresponde a 4,3 t.ha<sup>-1</sup> (considerando 25 planta.m<sup>-2</sup>) estando ainda acima da média da produtividade brasileira (3,6 t.ha<sup>-1</sup>) (MENEZES, 1987). As maiores produtividades no segundo ano de cultivo, quando o solo estava praticamente deficiente em N, foram obtidas pelos cultivares IAC-81-318 (20,8 g.pl<sup>-1</sup>) e BR-IRGA-409 (20,4 g.pl<sup>-1</sup>) e as menores foram encontradas nos cultivares CNA-3314 (12,8 g.pl<sup>-1</sup>) e IR-42 (13,4 g.pl<sup>-1</sup>).

As diferenças estatísticas na produção de matéria seca no primeiro ano de cultivo podem estar relacionadas com as características agronômicas de cada cultivar, uma vez que as práticas culturais e as condições ambientais foram idênticas para todos eles. O segundo plantio, entretanto, foi realizado visando avaliar o balanço de N no sistema durante dois anos, portanto, foram considerados somente os efeitos residuais dos fertilizantes, o que provavelmente não promoveu as melhores respostas.

O número de perfilhos e panículas (Tabela 8) apresentou diferenças estatísticas entre os cultivares tanto no primeiro como segundo ano de cultivo. Observa-se que, para alguns cultivares, ocorreu aumento no número de perfilhos e conseqüentemente no de panícula durante o segundo ano de cultivo quando comparado com o primeiro ano (IAC-81-318, CNA-0721, CNA-3852,, CNA-4215, BR-IRGA-409, BR-IRGA-410 e IR-58). Já o número de panículas foi praticamente superior em todos os cultivares no segundo ano, com exceção do CNA-4566 e HUA-CHOU. Apesar disso, verifica-se que a produção de grãos foi menor nesse ano, indicando que houve esterilidade das espiguetas.

A relação entre o peso do grão e o peso da matéria seca total (índice de colheita) no presente experimento variou de 0,405 a 0,573 no primeiro ano e de 0,381 a 0,519 no segundo ano. Os cultivares que apresentaram os maiores índices nos dois cultivos foram os CNA-4215, CNA-4566, BR-IRGA-409, BR-IRGA-410 e IR-58, enquanto que os menores foram observados nos IAC-4440, CNA-4502, IR-42 e HUA-CHOU (Tabela 9).

Os resultados dos parâmetros de produção discutidos acima devem ser considerados quando se seleciona cultivares para a FBN, pois o cultivar pode mostrar alta taxa de fixação de N<sub>2</sub>, mas baixa produção de grãos (VINCENT, 1984). LADHA et alii (1986) sugerem que a capacidade para estimar a fixação biológica de N<sub>2</sub> de cultivares de arroz pode estar estreitamente associada com a alta produção de biomassa (conseqüência da atividade fotossintética) em solos não adubados e/ou deficientes em nitrogênio. Diante disso, discute possíveis critérios para selecionar grande número de cultivares de arroz capazes de estimular a FBN no campos, os quais incluem: medidas da ARA, peso da matéria seca da raiz e parte aérea na época da emergência da panícula, juntamente com as determinações de produção de biomassa (grãos + palha) e índice de colheita na maturação. LADHA (1986) também relata

**Tabela 8. Número de perfilhos e panículas de 15 cultivares de arroz inundado durante dois cultivos sucessivos desenvolvidos em vasos de 10 litros (12 kg solo.vaso<sup>-1</sup>) contendo três plantas. Médias de cinco repetições.**

CULTIVARES	1º ano		2º ano	
	Perfilhos	Panículas número.vaso <sup>-1</sup>	Perfilhos	Panículas
IAC-1278	34,2 def	31,0 cde	32,8 b	31,4 b
IAC-81-318	26,0 g	23,2 g	31,6 b	31,2 b
IAC-4440	39,8 bc	31,8 cde	37,8 ab	36,8 ab
CNA-0721	33,2 ef	29,4def	34,2 b	32,8 ab
CNA-3852	38,2 bcde	36,2 bc	41,6 ab	41,2 ab
CNA-3879	36,0 cde	29,6 def	31,8 b	31,2 b
CNA-4215	37,2 cde	34,0 cd	40,2 ab	37,8 ab
CNA-4501	34,0 def	28,0 efg	30,6 b	30,0 b
CNA-4566	34,6 cdef	31,8 cde	32,6 b	31,6 b
BR-IRGA-409	30,2 fg	28,4 ef	33,4 b	33,0 ab
BR-IRGA-410	26,2 g	25,2 fg	29,0 b	27,4 b
IR-42	39,4 bcd	34,6 cd	38,2 ab	37,2 ab
IR-58	46,8 a	41,2 a	49,8 a	47,4 a
HUA-CHOU	43,0 ab	39,8 ab	37,8 ab	36,2 ab
CONTROLE (CNA-3314)	33,2 ef	28,2 efg	29,4 b	28,8 b
C.V. (%)	10,9	11,7	29,3	29,4

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de 5% de significância pelo teste Duncan.

**Tabela 9. Índice de Colheita de 15 cultivares de arroz inundado durante dois cultivos sucessivos desenvolvidos em vasos de 10 litros (12 kg solo.vaso<sup>-1</sup>) contendo três plantas. Médias de cinco repetições.**

CULTIVARES	Índice de Colheita <sup>1</sup>	
	1º ano	2º ano <sup>2</sup>
IAC-1278	0,517 bc	0,504 a
IAC-81-318	0,501 bcd	0,476 ab
IAC-4440	0,421 e	0,381 c
CNA-0721	0,455 de	0,473 ab
CNA-3852	0,506 bc	0,470 ab
CNA-3879	0,432 e	0,507 a
CNA-4215	0,573 a	0,472 ab
CNA-4501	0,415 e	0,383 c
CNA-4566	0,550 ab	0,519 a
BR-IRGA-409	0,541 ab	0,466 ab
BR-IRGA-410	0,552 ab	0,486 a
IR-42	0,405 e	0,381 c
IR-58	0,571 a	0,518 a
HUA-CHOU	0,425 e	0,418 bc
CNA-3314	0,490 cd	0,487 a
C.V. (%)	7,3	9,6

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de 5% de significância pelo teste Duncan.  
 peso do grão

(1) Índice de Colheita =  $\frac{\text{peso do grão}}{\text{peso da matéria seca total}}$

(2) não foi incluído o peso da matéria seca da raiz.

que as diferenças dos cultivares para suportar a FBN podem estar relacionadas com a especificidade da associação bactéria-planta, diferenças na exudação de compostos pelas raízes e eficiência na difusão de gases.

#### 4.1.2. Nitrogênio na planta

**Quantidade de nitrogênio total na planta:** As quantidades de nitrogênio total absorvidas pelas diferentes partes da planta e planta inteira dos quinze cultivares de arroz inundado em dois anos de cultivo estão indicadas na Tabela 10, calculada pelos dados apresentados no Apêndice. Os resultados obtidos permitiram observar que houve diferenças estatísticas entre todos os parâmetros analisados, quanto ao acúmulo de nitrogênio entre os cultivares, sendo essa diferença mais acentuada no primeiro plantio. Verifica-se que o cultivar BR-IRGA-409 foi o que mostrou a maior quantidade de N na planta inteira, tanto no primeiro como no segundo ano (1,372 e 1,184 g.vaso<sup>-1</sup>, respectivamente). No primeiro plantio esse cultivar apresentou diferença estatística no acúmulo de N em relação aos cultivares IAC-4440, CNA-0721, IR-42 e CNA-3314, enquanto que no segundo plantio essa diferença foi observada somente em relação ao cultivar CNA-3314. O BR-IRGA-409 foi considerado por FAGERIA & BARBOSA (1982) como eficiente e responsivo à aplicação de N-mineral, enquanto que o CNA-3314 foi classificado como não eficiente mas responsivo à aplicação de N-mineral.

Deve-se ressaltar, que a escolha dos quinze cultivares selecionados para esse estudo foi baseada principalmente na capacidade de cada um de absorver N (FAGERIA & BARBOSA, 1982), estudo de FBN onde o cultivar foi utilizado (LADHA et alii, 1986; LADHA et alii, 1987) e cultivares que são atualmente plantados em áreas de cultivo de arroz no Brasil (CNPAF, IAC). Acredita-se que um cultivar eficiente e responsivo à aplicação de N-mineral, além de aproveitar eficientemente o N aplicado, vai utilizar melhor o N amoniacal proveniente da FBN, disponível na sua rizosfera.

Segundo PEDROSO (1982), a porcentagem de N, em termos médios em arroz inundado, é de 1,27 e 0,31 para grãos e palha, respectivamente. No presente experimento a média da porcentagem de N encontrada nos grãos de todos os cultivares ficou abaixo desse valor no primeiro e segundo ano, os quais foram 1,14 e 0,84%, respectivamente, enquanto que os teores de N na palha no primeiro e segundo plantio ficaram acima desses valores e foram iguais a 0,64 e 0,59%, respectivamente (ver apêndice).

**Tabela 10. Quantidade de nitrogênio acumulado em diferentes partes de 15 cultivares de arroz inundado durante dois cultivos sucessivos desenvolvidos em vasos de 10 litros (12 kg solo.vaso<sup>-1</sup>) contendo três plantas. Médias de cinco repetições.**

CULTIVARES	1º ano			2º ano			
	Palha	Grãos	Total	Palha	Grãos	Raiz	Total
IAC-1278	0,437 bcd	0,839 ab	1,276 ab	0,290 b	0,415 ab	0,134 ab	0,839 ab
IAC-81-318	0,406 cd	0,821 abc	1,227 ab	0,378 ab	0,510 ab	0,131 ab	1,019 ab
IAC-4440	0,483 abc	0,682 de	1,165 b	0,366 ab	0,342 b	0,156 ab	0,864 ab
CNA-0721	0,426 bcd	0,691 de	1,117 b	0,363 ab	0,399 ab	0,158 ab	0,920 ab
CNA-3852	0,438 bcd	0,780 bcd	1,218 ab	0,344 ab	0,489 ab	0,170 a	1,003 ab
CNA-3879	0,529 ab	0,716 de	1,245 ab	0,303 b	0,359 ab	0,168 a	0,830 ab
CNA-4215	0,358 d	0,849 ab	1,207 ab	0,333 ab	0,480 ab	0,128 ab	0,941 ab
CNA-4501	0,574 a	0,726 cde	1,300 ab	0,337 ab	0,387 ab	0,136 ab	0,860 ab
CNA-4566	0,411 bcd	0,869 ab	1,280 ab	0,313 b	0,450 ab	0,124 ab	0,887 ab
BR-IRGA-409	0,459 abcd	0,913 a	1,372 a	0,490 a	0,551 a	0,144 ab	1,184 a
BR-IRGA-410	0,401 cd	0,851 ab	1,252 ab	0,351 ab	0,447 ab	0,122 ab	0,920 ab
IR-42	0,485 abc	0,646 e	1,131 b	0,354 ab	0,358 ab	0,145 ab	0,857 ab
IR-58	0,429 bcd	0,831 ab	1,260 ab	0,357 ab	0,508 ab	0,077 b	0,942 ab
HUA-CHOU	0,493 abc	0,705 de	1,198 ab	0,347 ab	0,399 ab	0,147 ab	0,893 ab
CNA-3314	0,454 bcd	0,703 de	1,157 b	0,262 b	0,329 b	0,117 ab	0,708 b
C.V. (%)	18,2	9,8	10,1	33,9	30,6	41,2	31,3

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de 5% de significância pelo teste Duncan.

**Porcentagem de átomos de  $^{15}\text{N}$  em excesso:** As porcentagens de átomos de  $^{15}\text{N}$  em excesso na planta derivadas do fertilizante para as suas diversas partes e para a planta inteira dos cultivares considerados nos dois plantios, encontram-se na Tabela 11, obtida dos resultados que constam nos Apêndices 3 e 4. Observa-se que o enriquecimento com  $^{15}\text{N}$ , para todos os cultivares, foi maior nos grãos que na palha nos dois cultivos. Como a palha é produzida primeiro e os grãos mais tarde, era esperado que esta tivesse um enriquecimento maior que os grãos, uma vez que parte do N absorvido é incorporado às células constitutivas das folhas + caules (palha) e outra é armazenada temporariamente para uso gradual, sendo translocada à medida que outros órgãos vão sendo formados. WATANABE & VENTURA (1982) também obtiveram maior enriquecimento dos grãos em vasos abertos com o método da diluição isotópica e menor enriquecimento quando utilizaram  $^{15}\text{N}_2$ . Entretanto, quando compararam os seus resultados com os obtidos por ESKEW et alii (1981), os quais trabalharam com vasos fechados, constataram que eles foram opostos. Esses autores sugeriram, então, que o N fixado pelas cianobactérias e/ou bactérias fotodependentes associadas com a parte submersa do arroz, estava menos disponível para os grãos do que o  $\text{N}_2$  fixado pelas bactérias heterotróficas, uma vez que nos seus resultados foram contabilizados o N proveniente da fixação fotodependente, enquanto que no de ESKEW et alii (1981) apenas o N fixado pelas bactérias heterotróficas foi considerado. Embora esse fato possa também ter ocorrido no presente ensaio, o qual foi desenvolvido em vaso aberto, não se pode descartar a hipótese de as plantas estarem ainda absorvendo  $^{15}\text{N}$  na maturação e translocando-o diretamente para os grãos, uma vez que o N é importante também nessa fase de desenvolvimento para manter as folhas verdes para o processo de fotossíntese e, conseqüentemente, aumentar a porcentagem de grãos cheios (FAGERIA, 1984).

Os resultados obtidos nesse parâmetro contribuiu para selecionar um cultivar como controle não fixador de  $\text{N}_2$ , o qual foi usado na estimativa do  $\text{N}_2$  fixado pelos diferentes cultivares. O cultivar selecionado foi o CNA-3314 uma vez que apresentou os maiores valores na planta inteira para átomos % de  $^{15}\text{N}$  em excesso nos dois plantios (0,931 primeiro plantio e 0,384 no segundo plantio), embora esses resultados não tenham sido diferentes significativamente dos obtidos pelos outros cultivares. Um outro fator importante para a escolha desse cultivar foi a sua menor concentração de N-total na planta inteira conforme pode ser observado na Tabela 10.

**Porcentagem de nitrogênio na planta proveniente do fertilizante:** A porcentagem de nitrogênio na planta proveniente do fertilizante (%Ndff) para as diversas partes da planta e



**Tabela 11. Porcentagem de átomos de  $^{15}\text{N}$  em excesso de diferentes partes de 15 cultivares de arroz inundado durante dois cultivos sucessivos desenvolvidos em vasos de 10 litros (12 kg solo.vaso<sup>-1</sup>) contendo três plantas. Médias de cinco repetições.**

CULTIVARES	átomos % $^{15}\text{N}$ em excesso							
	1º ano				2º ano			
	Palha	Grãos	Total		Palha	Grãos	Raiz	Total
IAC-1278	0,777 a	0,868 a	0,837 a		0,303 a	0,363 a	0,316 a	0,335 a
IAC-81-318	0,837 a	0,931 a	0,900 a		0,309 a	0,365 a	0,306 a	0,337 a
IAC-4440	0,865 a	0,914 a	0,893 a		0,311 a	0,370 a	0,319 a	0,335 a
CNA-0721	0,863 a	0,911 a	0,893 a		0,304 a	0,352 a	0,319 a	0,327 a
CNA-3852	0,789 a	0,895 a	0,857 a		0,288 a	0,351 a	0,320 a	0,324 a
CNA-3879	0,830 a	0,896 a	0,868 a		0,304 a	0,358 a	0,318 a	0,330 a
CNA-4215	0,859 a	0,943 a	0,918 a		0,313 a	0,370 a	0,309 a	0,342 a
CNA-4501	0,822 a	0,884 a	0,856 a		0,322 a	0,367 a	0,323 a	0,342 a
CNA-4566	0,804 a	0,924 a	0,886 a		0,304 a	0,362 a	0,311 a	0,334 a
BR-IRGA-409	0,725 a	0,897 a	0,839 a		0,287 a	0,363 a	0,320 a	0,326 a
BR-IRGA-410	0,760 a	0,876 a	0,839 a		0,286 a	0,353 a	0,310 a	0,322 a
IR-42	0,857 a	0,901 a	0,882 a		0,318 a	0,364 a	0,335 a	0,340 a
IR-58	0,778 a	0,949 a	0,891 a		0,289 a	0,364 a	0,291 a	0,330 a
HUA-CHOU	0,735 a	0,869 a	0,814 a		0,248 a	0,324 a	0,278 a	0,287 a
CNA-3314	0,907 a	0,947 a	0,931 a		0,385 a	0,391 a	0,364 a	0,384 a
C.V. (%)	18,5	9,8	10,0		39,8	36,0	43,3	36,5

Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si ao nível de 5% de significância pelo teste Duncan.

planta inteira dos cultivares de arroz estudados durante os dois anos de cultivo acham-se na Tabela 12, obtida dos resultados que constam dos Apêndices 3 e 4. Os dados foram calculados pela equação 2 (página 36). Verifica-se que a porcentagem de N-fertilizante na planta inteira, tanto no primeiro como segundo ano de plantio, não apresentou diferenças estatísticas entre os cultivares, variando igualmente com o teor de átomos % de  $^{15}\text{N}$  em excesso (Tabela 11). No primeiro ano a média do N na planta derivado do fertilizante dos quinze cultivares ficou em torno de 4,0%, enquanto que no segundo essa variação ficou ao redor de 1,5%. A diminuição no segundo ano era esperada, pois não foi realizada nova adubação para o segundo plantio.

O melhor aproveitamento do N-fertilizante foi obtido pelo cultivar CNA-3314, o qual apresentou 4,4 e 1,8% de N na planta proveniente do adubo marcado no primeiro e segundo ano, respectivamente. Os cultivares IAC-1278, BR-IRGA-409, BR-IRGA-410 e HUA-CHOU apresentaram as menores porcentagens de N-fertilizante na planta inteira no primeiro ano de cultivo, embora esses valores não tenham sido diferentes estatisticamente dos obtidos pelos outros cultivares. Já no segundo ano a menor porcentagem de N-fertilizante foi apresentada pelo HUA-CHOU, embora também não tenha sido significativamente diferente dos demais.

**Quantidade de nitrogênio na planta proveniente do fertilizante:** Os resultados da quantidade de N na planta proveniente do fertilizante (QNdff), nas diversas partes e planta inteira de quinze cultivares de arroz inundado, estão apresentados na Tabela 13. Esses resultados foram calculados pela equação 3 (página 36).

Analisando os resultados obtidos nas diferentes partes da planta e na planta inteira no estágio de maturação de quinze cultivares de arroz, verifica-se que esses valores apresentaram diferenças significativas entre si no primeiro ano de cultivo. Embora o BR-IRGA-409 tenha acumulado a maior quantidade de N-fertilizante na planta inteira, a qual foi igual a  $54,09 \text{ mg.vaso}^{-1}$ , ele diferiu estatisticamente apenas do HUA-CHOU, o qual mostrou o menor valor que foi de  $45,86 \text{ mg.vaso}^{-1}$ . Já no segundo ano, apesar do BR-IRGA-409 ter novamente apresentado o maior acúmulo, as quantidades de N na planta inteira provenientes do fertilizante não foram estatisticamente diferentes para todos os cultivares. As maiores quantidades do fertilizante marcado no estágio de maturação dos cultivares foram encontradas de forma decrescente nos grãos, palha e raiz.

**Tabela 12. Porcentagem de nitrogênio derivado do fertilizante (%Ndff) de diferentes partes de 15 cultivares de arroz inundado durante dois cultivos sucessivos desenvolvidos em vasos de 10 litros (12 kg solo.vaso<sup>-1</sup>) contendo três plantas. Médias ponderadas de cinco repetições.**

CULTIVARES	%Ndff					
	1º ano			2º ano		
	Palha	Grãos	Total	Palha	Grãos	Total
IAC-1278	3,652 a	4,080 a	3,933 a	1,423 a	1,705 a	1,487 a
IAC-81-318	3,936 a	4,375 a	4,230 a	1,450 a	1,717 a	1,438 a
IAC-4440	4,067 a	4,295 a	4,200 a	1,459 a	1,737 a	1,501 a
CNA-0721	4,055 a	4,284 a	4,197 a	1,428 a	1,654 a	1,498 a
CNA-3852	3,711 a	4,205 a	4,027 a	1,353 a	1,652 a	1,505 a
CNA-3879	3,901 a	4,211 a	4,079 a	1,428 a	1,684 a	1,496 a
CNA-4215	4,037 a	4,431 a	4,314 a	1,472 a	1,741 a	1,451 a
CNA-4501	3,870 a	4,155 a	4,029 a	1,513 a	1,723 a	1,517 a
CNA-4566	3,780 a	4,345 a	4,163 a	1,429 a	1,700 a	1,462 a
BR-IRGA-409	3,405 a	4,215 a	3,945 a	1,348 a	1,708 a	1,503 a
BR-IRGA-410	3,574 a	4,116 a	3,942 a	1,345 a	1,661 a	1,457 a
IR-42	4,112 a	4,233 a	4,183 a	1,496 a	1,711 a	1,576 a
IR-58	3,656 a	4,461 a	4,186 a	1,360 a	1,710 a	1,370 a
HUA-CHOU	3,455 a	4,085 a	3,825 a	1,168 a	1,522 a	1,306 a
CNA-3314	4,263 a	4,451 a	4,376 a	1,810 a	1,837 a	1,711 a
C.V. (%)	18,4	9,8	10,0	39,8	36,0	43,3
						36,5

Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si ao nível de 5% de significância pelo teste Duncan.

**Tabela 13. Quantidade de nitrogênio derivado do fertilizante (QNdff) de diferentes partes de 15 cultivares de arroz inundado durante dois cultivos sucessivos desenvolvidos em vasos de 10 litros (12 kg solo.vaso<sup>-1</sup>) contendo três plantas. Médias de cinco repetições.**

CULTIVARES	1º ano			2º ano		
	Palha	Grãos	Total	Palha	Grãos	Total
IAC-1278	15,95 cd	34,21 abcd	50,16 ab	4,13 a	7,07 a	11,20 a
IAC-81-318	15,97 cd	35,94 ab	51,91 ab	5,48 a	8,75 a	14,23 a
IAC-4440	19,65 abc	29,30 ef	48,95 ab	5,35 a	5,93 a	11,28 a
CNA-0721	17,28 bcd	29,60 def	46,88 ab	5,18 a	6,60 a	11,78 a
CNA-3852	16,27 bcd	32,79 bcde	49,06 ab	4,66 a	8,07 a	12,73 a
CNA-3879	20,65 ab	30,14 def	50,79 ab	4,32 a	6,04 a	10,36 a
CNA-4215	14,47 d	37,60 a	52,07 ab	4,91 a	8,36 a	13,27 a
CNA-4501	22,20 a	30,15 def	52,35 ab	5,10 a	6,66 a	11,76 a
CNA-4566	15,55 cd	37,74 a	53,29 ab	4,47 a	7,65 a	12,12 a
BR-IRGA-409	15,62 cd	38,47 a	54,09 a	6,60 a	9,41 a	16,01 a
BR-IRGA-410	14,32 d	35,03 abc	49,35 ab	4,73 a	7,43 a	12,16 a
IR-42	19,94 abc	27,35 f	47,29 ab	5,30 a	6,13 a	11,43 a
IR-58	15,70 cd	37,08 ab	52,78 ab	4,86 a	8,68 a	13,54 a
HUA-CHOU	17,05 bcd	28,81 ef	45,86 b	4,05 a	6,07 a	10,12 a
CNA-3314	19,37 abc	31,29 cdef	50,66 ab	4,74 a	6,04 a	10,78 a
C.V. (%)	18,2	9,9	10,1	37,5	32,5	45,5
						34,2

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de 5% de significância pelo teste Duncan.

**Recuperação pela planta do N-fertilizante aplicado:** Os dados que expressam a porcentagem de recuperação do N aplicado nas diferentes partes da planta e planta inteira para os quinze cultivares de arroz inundado encontram-se na Tabela 14. Os valores informados foram calculados através da equação 4 (página 37).

Embora a quantidade do N-fertilizante aplicado tenha sido pequena, aproximadamente  $30 \text{ kg N.ha}^{-1}$  ( $160 \text{ mg N}$  em  $12 \text{ kg}$  de solo), observa-se que houve diferenças estatísticas entre os cultivares para recuperação do N-fertilizante nos grãos na época da maturação no primeiro ano de cultivo. As diferenças observadas na planta inteira, embora não significativas, foram, provavelmente, devido às características de cada cultivar quanto a eficiência na absorção de N, o que já foi constatado por vários autores (FAGERIA & BARBOSA, 1982; LADHA et alii, 1986). Os resultados obtidos no segundo plantio não apresentaram diferenças estatísticas para esse parâmetro, entre os cultivares estudados, tanto na planta inteira como na palha, grãos e raízes. Observa-se, também, que a porcentagem de recuperação foi menor no segundo plantio (média de  $9,7\%$ ) que no primeiro (média de  $31,6\%$ ). Entretanto, isso era esperado, pois não foi feita nova adubação no solo que recebeu o segundo plantio.

A baixa recuperação pelo arroz do N-fertilizante aplicado em solos inundados tem sido relatada por diversos autores (IAEA, 1978; KAI & WADA, 1979; JANSSON & PERSSON, 1982; WESCOTT & MIKKELSON, 1985; BOULDIN, 1986, COLAÇO, 1988, MEYER et alii, 1989). Estudos realizados pela IAEA (1978) com arroz em solos inundados, resultaram em observações onde se constatou que a utilização do N-fertilizante pela planta foi dependente da época de aplicação. O N aplicado por ocasião do transplante do arroz foi absorvido com uma eficiência de  $12\%$ , comparada a uma eficiência de  $34\%$  para aplicação no início do primórdio da panícula (emborrachamento). A explicação para a recuperação, normalmente maior quando o N foi aplicado nos estágios mais tardios, foi que a desnitrificação e a imobilização desse N nos estágios iniciais são maiores quando comparadas aos estágios mais tardios de desenvolvimento do arroz. Outra explicação dada foi também que o sistema radicular é bem mais desenvolvido nos estágios tardios e absorve N mais rapidamente, sendo que uma parte considerável de N absorvido nos estágios iniciais, é perdida, devido à queda das folhas.

O arroz inundado depende mais da fertilidade do solo do que da aplicação de fertilizante (YOSHIDA, 1981), portanto, a mineralização do N do solo é importante no suprimento desse elemento para o crescimento da cultura, mas simultaneamente com a mineralização, os processos microbianos imobilizam o N. Em condições de solos inundados as taxas de mineralização e imobilização são importantes para calcular a recuperação do

**Tabela 14. Porcentagem de recuperação do fertilizante marcado em diferentes partes de 15 cultivares de arroz inundado durante dois cultivos sucessivos desenvolvidos em vasos de 10 litros (12 kg solo.vaso<sup>-1</sup>) contendo três plantas. Médias ponderadas de cinco repetições.**

CULTIVARES	Recuperação do fertilizante aplicado (%)				Total			
	1º ano		2º ano					
	Palha	Grãos	Palha	Grãos				
IAC-1278	10,07 a	21,49 abc	2,81 a	4,85 a	31,49 a	1,30 a	8,88 a	39,70 a
IAC-81-318	10,34 a	22,58 abc	3,54 a	5,47 a	32,58 a	1,20 a	10,16 a	42,54 a
IAC-4440	12,55 a	18,45 bc	3,65 a	3,99 a	30,80 a	1,62 a	9,21 a	39,78 a
CNA-0721	11,04 a	18,61 abc	3,86 a	4,65 a	29,34 a	1,81 a	10,26 a	38,78 a
CNA-3852	10,46 a	20,52 abc	3,04 a	5,30 a	30,87 a	1,76 a	10,00 a	40,89 a
CNA-3879	13,14 a	19,11 abc	3,25 a	4,69 a	31,77 a	2,08 a	9,91 a	40,61 a
CNA-4215	9,27 a	23,54 ab	3,12 a	5,23 a	32,69 a	1,22 a	9,51 a	42,13 a
CNA-4501	14,13 a	18,86 abc	3,80 a	4,91 a	32,88 a	1,53 a	10,12 a	41,70 a
CNA-4566	10,10 a	23,76 ab	3,18 a	5,22 a	33,72 a	1,29 a	9,66 a	42,73 a
BR-IRGA-409	10,46 a	24,25 a	4,21 a	5,91 a	34,44 a	1,42 a	11,43 a	45,46 a
BR-IRGA-410	9,03 a	22,06 abc	2,99 a	4,83 a	30,96 a	1,12 a	8,86 a	39,77 a
IR-42	12,54 a	17,13 c	3,97 a	4,41 a	29,62 a	1,74 a	9,81 a	38,76 a
IR-58	10,04 a	23,34 ab	3,08 a	5,55 a	33,11 a	0,68 a	9,26 a	42,13 a
HUA-CHOU	10,82 a	18,05 bc	2,74 a	4,42 a	28,71 a	1,38 a	8,48 a	36,20 a
CNA-3314	12,21 a	19,59 abc	3,72 a	4,55 a	31,75 a	1,61 a	9,75 a	40,10 a
C.V. (%)	34,7	18,5	61,1	51,3	18,5	74,1	53,2	22,7

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de 5% de significância pelo teste Duncan.

N-fertilizante aplicado através da técnica de  $^{15}\text{N}$ . Os trabalhos mais recentes (BOULDIN, 1986; MEYER et alii, 1989) relatam que a baixa eficiência de utilização pela planta do  $^{15}\text{N}$  aplicado é devido a reciclagem mineralização - imobilização "MIT - mineralization-immobilization turnover" do N. Quando o MIT é ignorado um aparente efeito "priming" é também observado (JANSSON & PERSSON, 1982). WESCOTT & MIKKELSON (1985) e MAYER et alii (1989) concluíram que o efeito "priming" em solos inundado cultivados com arroz é devido à falta de consideração do MIT e esses dados tendem a confirmar a especulação de que a baixa recuperação pelo arroz do  $^{15}\text{N}$ -fertilizante aplicado, quando comparada com a recuperação calculada pelo N-total é devido ao MIT (BOULDIN, 1986; VLEK & BYRNES, 1986).

Essas observações, de modo geral, são semelhantes a tendências notadas no presente experimento para os dados de recuperação do N-fertilizante, onde se constatou baixas taxas de recuperação.

Vale também ressaltar que no presente experimento a imobilização do N-fertilizante aplicado foi estimulada através da aplicação de sacarose no solo, uma vez que havia a necessidade de alcançar uma liberação lenta desse N-fertilizante para que as plantas tivessem uma marcação mais homogênea e também para diminuir as perdas.

**Estimativa do nitrogênio na planta proveniente da fixação biológica de  $\text{N}_2$ :** As estimativas da quantidade e porcentagem de nitrogênio proveniente da FBN (QNdfa e %Ndfa, respectivamente) em quinze cultivares de arroz inundado, durante dois anos de cultivo estão apresentadas na Tabela 15 e foram calculadas utilizando-se as equações 5 e 6 (página 37).

O maior problema encontrado para utilizar a equação 5 está em selecionar uma planta não fixadora como controle. No presente experimento foi postulado que o controle seria o CNA-3314, pois esse cultivar acumulou as menores quantidades de N-total nos dois períodos de cultivo e também os maiores teores de átomos % de  $^{15}\text{N}$  em excesso. Entretanto, acredita-se que as estimativas da FBN dos cultivares tenham sido subestimadas, uma vez que alguma FBN deve ter ocorrido nos solos onde se desenvolveu o cultivar CNA-3314. VENTURA & WATANABE (1983) relatam a dificuldade de se obter um controle não fixador eficiente para quantificar a FBN em arroz inundado. Esses autores ao utilizarem uma planta de arroz sequeiro como controle observaram que o N na planta proveniente da fixação de  $\text{N}_2$  excede ou fica igual ao balanço de N no sistema. Não há dúvidas que o N na planta proveniente da FBN deveria ser menor que o total de N ganho no sistema. Nesse aspecto o arroz sequeiro é impróprio. Os autores relataram que o alto teor de N do arroz sequeiro foi

**Tabela 15. Estimativa da quantidade e porcentagem de nitrogênio proveniente da fixação de N<sub>2</sub> em 14 cultivares de arroz inundado durante dois cultivos sucessivos desenvolvidos em vasos de 10 litros (12 kg solo.vaso<sup>-1</sup>) contendo três plantas. Médias de cinco repetições.**

CULTIVARES	Ndfa (mg N.vaso <sup>-1</sup> )		%Ndfa	
	1º ano	2º ano	1º ano	2º ano
IAC-1278	129,69 ab	107,77 b	10,17 ab	12,85 b
IAC-81-318	38,27 ab	117,57 b	3,12 b	11,55 b
IAC-4440	193,48 a	100,84 b	16,60 a	11,67 b
CNA-0721	43,47 ab	125,01 b	3,89 b	13,59 ab
CNA-3852	93,84 ab	149,70 ab	7,70 ab	14,92 ab
CNA-3879	84,73 ab	110,40 b	6,80 ab	13,30 ab
CNA-4215	18,31 b	98,07 b	1,52 b	10,41 b
CNA-4501	101,12 ab	82,15 b	7,78 ab	9,56 b
CNA-4566	63,26 ab	108,48 b	4,94 ab	12,23 b
BR-IRGA-409	133,06 ab	168,22 ab	9,70 ab	14,21 ab
BR-IRGA-410	122,56 ab	140,40 ab	9,79 ab	15,25 ab
IR-42	56,91 ab	96,42 b	5,03 ab	11,25 b
IR-58	52,33 ab	126,53 b	4,15 b	13,43 b
HUA-CHOU	147,56 ab	213,17 a	12,31 ab	23,88 a
CNA-3314	0,00	0,00	0,00	0,00
C.V. (%)	119,5	46,0	118,3	49,3

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de 5% de significância pelo teste Duncan.



devido à menor mineralização do N nativo do solo. ASAMI (1971) demonstrou que a mineralização do N do solo foi mais intensa nos solos inundados que nos sequeiros.

O cultivar IAC-4440, no primeiro ano de cultivo, apresentou o maior acúmulo de N proveniente da FBN (193,48 mg N.vaso<sup>-1</sup>) diferente significativamente do cultivar CNA-4215, o qual mostrou o menor acúmulo (18,31 mg N.vaso<sup>-1</sup>). Já no segundo ano, quando o N provavelmente foi um fator limitante de crescimento, isso não ocorreu, ficando o cultivar HUA-CHOU com a maior quantidade de N proveniente da fixação de N<sub>2</sub> (213,17 mg N.vaso<sup>-1</sup>), o qual apresentou diferenças estatísticas com quase todos os outros cultivares, com exceção do CNA-3852, BR-IRGA-409 e BR-IRGA-410.

A estimativa do nitrogênio na planta proveniente da fixação de N<sub>2</sub> no segundo ano foi praticamente maior para todos os cultivares, com exceção do IAC-1278, IAC-4440 e CNA-4501.

As variações dentro das repetições no segundo ano, foram bastante reduzidas em comparação com o primeiro ano, o que pode ser observado através do coeficiente de variação, o qual foi igual a 46,0% no segundo plantio e 119,5% no primeiro plantio.

As porcentagens de nitrogênio na planta proveniente da FBN do primeiro e segundo ano, em relação às porcentagens do N-fertilizante e N do solo podem ser observadas nas Figuras 1 e 2. A maior contribuição foi dada pelo N do solo, o qual representou, em média para os quinze cultivares, 89% do N na planta no primeiro ano e 86% no segundo ano. Tais resultados são semelhantes as observações realizadas por BROADBENT (1979) e PATNAIK & RAO (1979), os quais constataram que o solo contribui com 50 a 80% do N (principalmente o da matéria orgânica) absorvido pela cultura de arroz em alagamento, mesmo quando ela recebe doses elevadas de N-fertilizante.

A porcentagem de N-fertilizante na planta ficou em média ao redor de 4% no primeiro ano e 1,5% no segundo, enquanto que o N proveniente da FBN na planta foi superior, sendo que, em média, os quatorze cultivares apresentaram 7,39% e 13,44% no primeiro e segundo ano, respectivamente.

#### **4.1.3. Nitrogênio no solo proveniente do fertilizante**

Os resultados de átomos % de <sup>15</sup>N em excesso, porcentagem de N no solo proveniente do fertilizante (%NSdff) e porcentagem de recuperação desse N-fertilizante, antes do primeiro plantio e após a colheita do segundo plantio estão apresentados na Tabela 16, obtida dos dados que constam do Apêndice 5. Os dados foram calculados através das

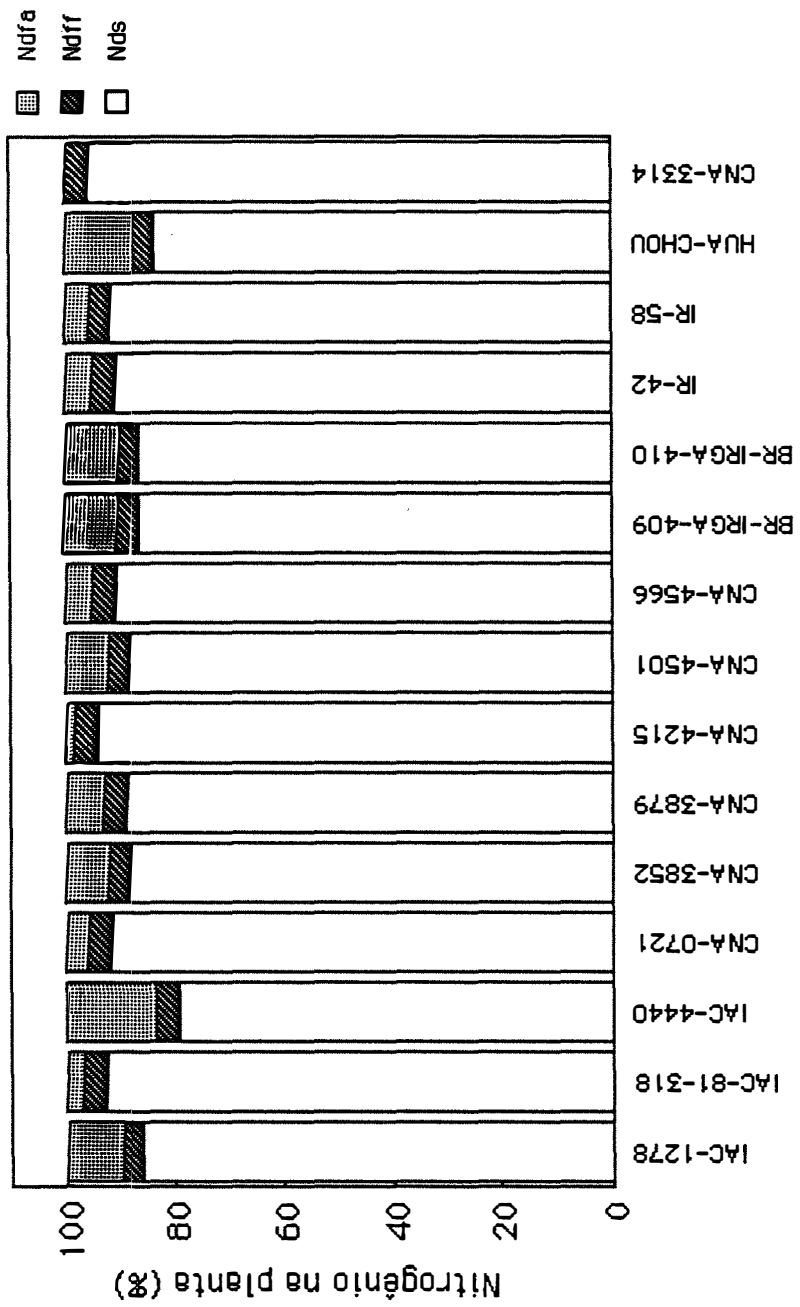


Figura 1. Teores de nitrogênio provenientes de diferentes fontes em cultivares de arroz inundado utilizando-se o CNA-3314 como controle não fixador de N<sub>2</sub>, durante o primeiro ano de cultivo. Médias de cinco repetições.

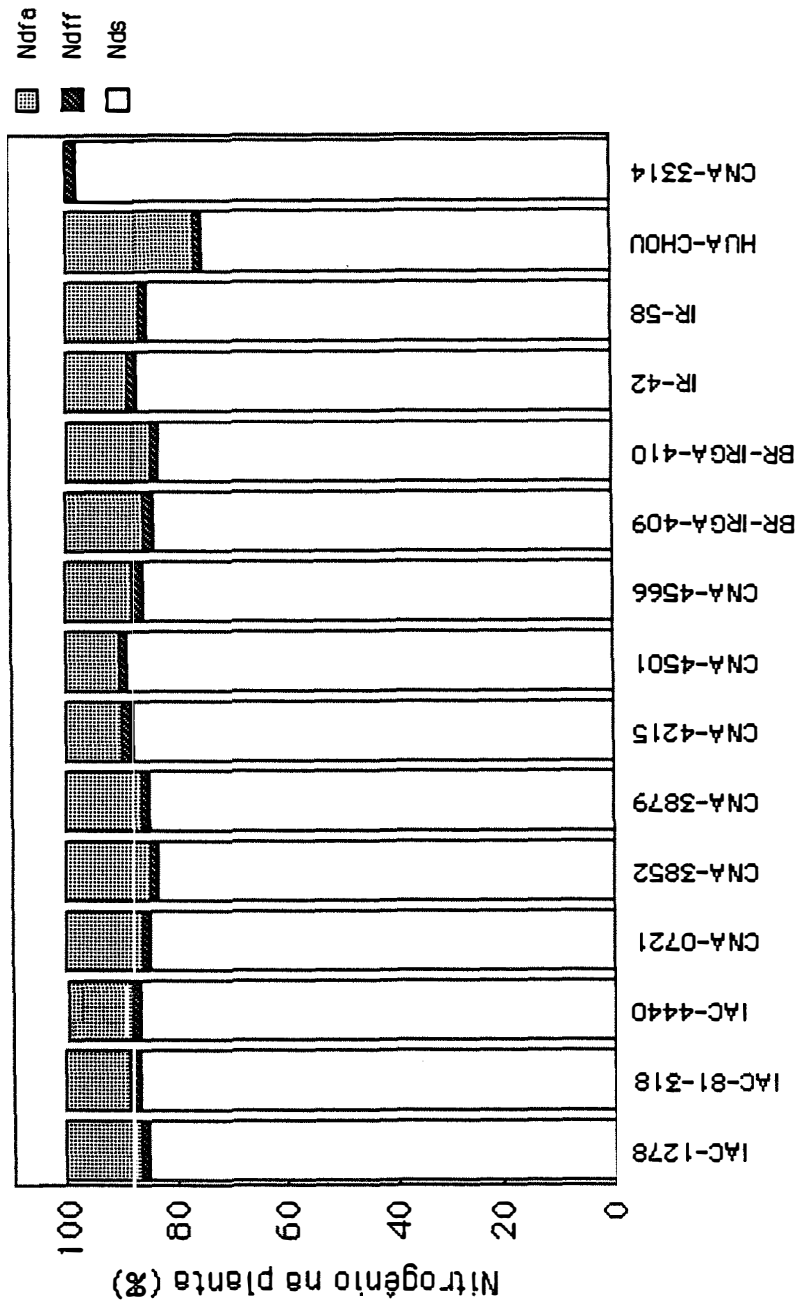


Figura 2. Teores de nitrogênio provenientes de diferentes fontes em cultivares de arroz inundado utilizando-se o CNA-3314 como controle não fixador de N<sub>2</sub>, durante o segundo ano de cultivo. Médias de cinco repetições.

Tabela 16. Distribuição do  $^{15}\text{N}$ , porcentagem de nitrogênio proveniente do fertilizante e porcentagem de recuperação do N-fertilizante no solo antes e depois de dois cultivos sucessivos de 15 cultivares de arroz inundado desenvolvidos em vasos de 10 litros (12 kg solo.vaso $^{-1}$ ) contendo três plantas. Médias ponderadas de cinco repetições.

CULTIVARES	átomos % $^{15}\text{N}$ excesso		%NSdff		Recuperação do N-fertilizante (%)	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
IAC-1278	0,183±0,026 a	0,094±0,012 b	0,859 a	0,440 b	88,75 a	41,50 b
IAC-81-318	0,180±0,024 a	0,101±0,014 b	0,844 a	0,476 b	90,47 a	44,49 ab
IAC-4440	0,167±0,010 a	0,095±0,008 b	0,786 a	0,447 b	83,99 a	41,86 b
CNA-0721	0,185±0,019 a	0,102±0,016 b	0,869 a	0,480 b	95,65 a	46,11 ab
CNA-3852	0,176±0,015 a	0,109±0,011 ab	0,829 a	0,513 ab	87,64 a	47,52 ab
CNA-3879	0,174±0,021 a	0,095±0,011 b	0,819 a	0,445 b	87,46 a	39,62 b
CNA-4215	0,167±0,013 a	0,099±0,005 b	0,783 a	0,464 b	87,16 a	44,20 ab
CNA-4501	0,189±0,011 a	0,105±0,011 b	0,887 a	0,492 b	93,90 a	45,06 ab
CNA-4566	0,170±0,031 a	0,099±0,009 b	0,799 a	0,466 b	84,83 a	42,32 b
BR-IRGA-409	0,178±0,011 a	0,094±0,013 b	0,836 a	0,443 b	87,42 a	40,15 b
BR-IRGA-410	0,160±0,010 a	0,096±0,008 b	0,751 a	0,452 b	82,22 a	41,34 b
IR-42	0,173±0,029 a	0,100±0,017 b	0,811 a	0,468 b	85,32 a	44,47 ab
IR-58	0,170±0,015 a	0,100±0,010 b	0,799 a	0,468 b	89,32 a	44,91 ab
HUA-CHOU	0,172±0,038 a	0,100±0,008 b	0,809 a	0,469 b	86,98 a	42,67 ab
CNA-3314	0,163±0,041 a	0,097±0,014 b	0,768 a	0,454 b	80,78 a	40,90 b
SEM PLANTA	0,168±0,020 a	0,124±0,011 a	0,790 a	0,581 a	84,42 a	53,54 a
C.V. (%)	14,7	12,9	14,7	13,0	16,0	16,9

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de 5% de significância pelo teste Duncan.

equações 8 (%NSdff) e 10 (% recuperação) (páginas 38 e 39). A porcentagem de átomos de  $^{15}\text{N}$  em excesso no solo na primeira amostragem não mostrou diferença significativa entre todos os solos contidos nos diferentes vasos, e o desvio padrão foi baixo (0,010 - 0,041), mostrando que a marcação do solo foi relativamente homogênea. As diferenças estatísticas obtidas no final do experimento são justificáveis, uma vez que as perdas de N e a absorção pelos cultivares, podem ter variado para cada vaso. A Figura 3 apresenta a variação de átomos % de  $^{15}\text{N}$  em excesso no solo com planta e sem planta, durante o período de desenvolvimento do experimento.

A porcentagem de N no solo proveniente do fertilizante logo após sua aplicação ficou ao redor de 0,815%, sendo que na última amostragem ficou em aproximadamente 0,465% nos vasos onde havia sido plantado arroz e 0,581% nos vasos sem planta, sendo esse último diferente estatisticamente dos demais, com exceção do CNA-3852. A porcentagem no solo de N proveniente do fertilizante após os dois cultivos sucessivos mostrou metade dos valores da primeira amostragem.

Da quantidade de N aplicada inicialmente no solo ( $160 \text{ mg N.vaso}^{-1}$ ), 87,3% foram recuperados antes do primeiro plantio. Após os dois cultivos foi possível obter uma recuperação de aproximadamente 43,14% nos solos cultivados com arroz e 53,54% nos solos sem planta.

#### **4.2. Estudo II. Estimativa do balanço de N para cultivares de arroz inundado e contribuição da FBN**

O balanço do nitrogênio total e o balanço do  $^{15}\text{N}$ -fertilizante, no sistema solo-arroz em estudo, para os quinze cultivares, encontram-se nas Tabelas 17 e 18, respectivamente.

Através dos resultados obtidos, verificou-se que as perdas de N-total no solo, determinada pela diferença entre os valores totais de entradas e saídas do N do solo, não foram diferentes significativamente entre os solos que receberam cultivares e o solo sem planta. Entretanto, quando os valores de N retirados pela cultura foram somados ao N-total do solo de cada vaso da última amostragem (balanço de N), observou-se que ocorreram diferenças estatísticas de acordo com os cultivares e o solo sem planta. As maiores perdas de N foram observadas no solo sem planta, o que confirma os dados da literatura (MOORE, 1966; BROADBENT & TUSNEEM, 1971; MAEDA & ONIKURA, 1976; APP et alii, 1980;

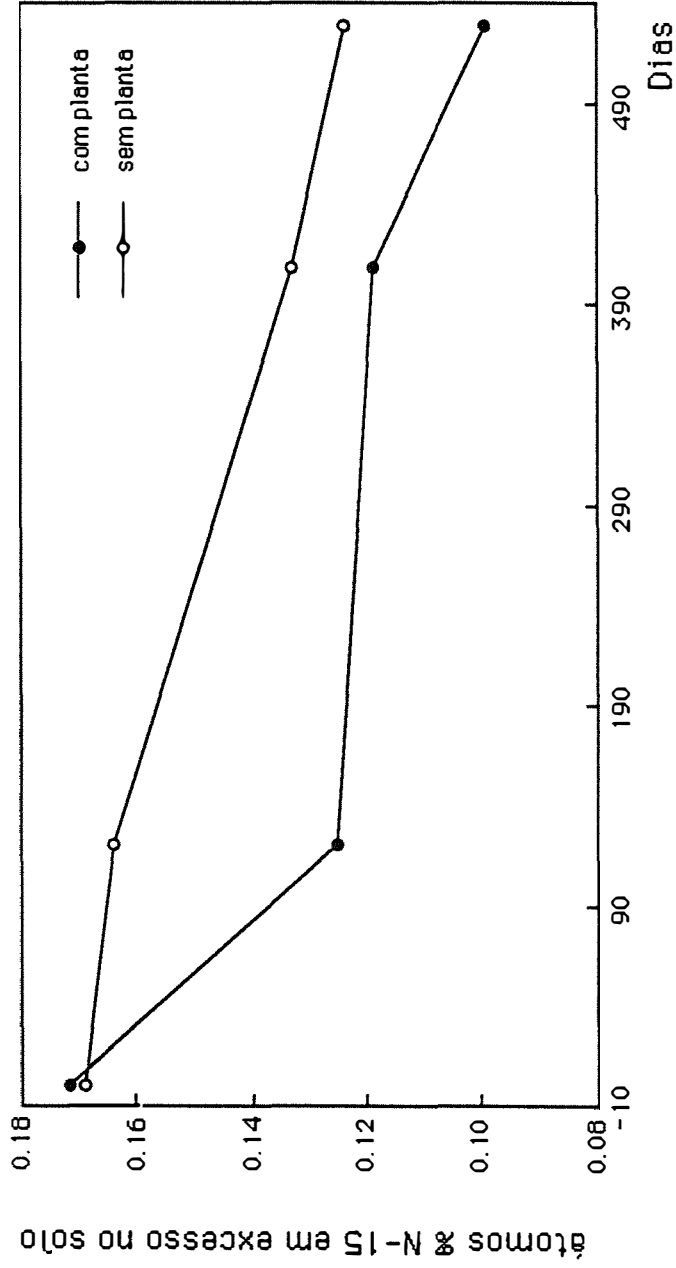


Figura 3. Variação do teor de átomos % de  $^{15}\text{N}$  em excesso no solo durante dois cultivos sucessivos de arroz inundado e em solo não cultivado.

**Tabela 17. Balanço do N-total no sistema solo-planta de 15 cultivares de arroz inundado durante dois cultivos sucessivos desenvolvidos em vasos de 10 litros (12 kg solo.vaso<sup>-1</sup>) contendo três plantas. Médias de cinco repetições.**

CULTIVARES	N na planta <sup>1</sup>	N no solo			Balanço <sup>2</sup>
		Inicial	Final	Perdas	
----- g N.vaso <sup>-1</sup> -----					
IAC-1278	2,115 ab	16,49 a	15,00 a	1,49 a	+0,626±1,11 a
IAC-81-318	2,246 ab	17,06 a	14,90 a	2,16 a	+0,085±1,17 a
IAC-4440	2,029 b	17,09 a	14,95 a	2,14 a	-0,106±0,87 ab
CNA-0721	2,037 b	17,64 a	15,29 a	2,35 a	-0,315±1,09 ab
CNA-3852	2,221 ab	16,94 a	14,71 a	2,23 a	-0,008±1,55 a
CNA-3879	2,075 b	17,09 a	14,28 a	2,81 a	-0,733±0,71ab
CNA-4215	2,148 ab	17,74 a	15,19 a	2,54 a	-0,395±1,51 ab
CNA-4501	2,160 ab	16,94 a	14,59 a	2,35 a	-0,193±1,56 ab
CNA-4566	2,167 ab	17,06 a	14,57 a	2,50 a	-0,329±0,85 ab
BR-IRGA-409	2,557 a	16,68 a	14,49 a	2,18 a	+0,371±0,83 a
BR-IRGA-410	2,172 ab	17,52 a	14,59 a	2,93 a	-0,756±0,80 ab
IR-42	1,988 b	16,85 a	15,05 a	1,80 a	+0,188±0,82 a
IR-58	2,202 ab	17,81 a	15,21 a	2,59 a	-0,389±1,30 ab
HUA-CHOU	2,091 b	17,14 a	14,54 a	2,52 a	-0,428±0,76 ab
CNA-3314	1,865 b	16,94 a	14,40 a	2,54 a	-0,679±1,04 ab
SEM PLANTA	-	17,14 a	14,74 a	2,40 a	-2,400±0,50 b
C.V. (%)		14,4	5,6	5,9	

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de 5% de significância pelo teste Duncan.

(1) Soma da parte aérea e grãos.

(2) Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de 1% de significância pelo teste Duncan.

**Tabela 18. Balanço do N-fertilizante no sistema solo-planta para 15 cultivares de arroz inundado durante dois cultivos sucessivos desenvolvidos em vasos de 10 litros (12 kg solo.vaso<sup>-1</sup>) contendo três plantas. Médias de cinco repetições.**

CULTIVARES	N na planta <sup>1</sup>	N no solo			Balanço
		Inicial	Final	Perdas	
----- mgN-fertilizante.vaso <sup>-1</sup> -----					
IAC-1278	63,35 ab	141,68 a	66,12 b	75,56 a	-12,21±17,7 a
IAC-81-318	68,02 ab	143,97 a	70,98 b	72,99 a	- 4,97±22,9 a
IAC-4440	62,57 ab	134,29 a	66,80 b	67,49 a	- 4,92±17,2 a
CNA-0721	61,03 b	153,30 a	73,42 b	79,88 a	-18,85±30,3 ab
CNA-3852	64,36 ab	140,42 a	75,60 ab	64,82 a	- 0,46± 9,0 a
CNA-3879	63,67 ab	139,98 a	63,48 b	76,50 a	-12,83±20,5 a
CNA-4215	67,20 ab	138,93 a	70,48 b	68,45 a	- 1,25±13,0 a
CNA-4501	66,17 ab	150,37 a	71,87 b	78,50 a	-12,33± 6,4 a
CNA-4566	67,22 ab	136,31 a	67,85 b	68,46 a	- 1,24±21,9 a
BR-IRGA-409	72,26 a	139,45 a	64,25 b	75,20 a	- 2,94± 9,5 a
BR-IRGA-410	63,29 ab	138,52 a	65,92 b	72,60 a	- 9,31±21,9 a
IR-42	61,00 b	136,67 a	70,48 b	66,19 a	- 5,19±32,8 a
IR-58	67,38 ab	142,31 a	71,29 b	71,02 a	- 3,64± 8,7 a
HUA-CHOU	57,90 b	138,66 a	68,23 b	70,43 a	-12,43±28,7 a
CNA-3314	63,43 ab	130,05 a	65,39 b	64,66 a	- 1,23±37,6 a
SEMP LANTA	-	135,44 a	87,27 a	48,17 a	-48,17±19,2 b
C.V. (%)		10,4	14,7	12,9	

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de 5% de significância pelo teste Duncan.  
 (1) Soma do N-total da planta inteira do 1º e 2º ano.



COLAÇO, 1988). Esse fato ocorre porque as perdas por denitrificação e/ou volatilização são maiores nos solos não cultivados, pois em solos cultivados a planta assimila e conseqüentemente imobiliza parte do N, diminuindo as perdas.

Os cultivares IAC-1278, IAC-81-318, BR-IRGA-409 e IR-42, mostraram valores positivos no balanço de N do sistema, mas diferiram estatisticamente apenas do tratamento sem planta. Balanço positivo de N em solos cultivados com arroz inundado tem sido citado por vários autores ( FIRTH et alii, 1973; WALLCOTT et alii, 1977; APP et alii, 1980; APP et alii, 1984), principalmente em experimentos de longa duração, onde não se aplicou adubação nitrogenada e esse acréscimo de N no sistema tem sido considerado, por esses autores, como provenientes da FBN.

No presente experimento constatou-se entrada de N no sistema com dois cultivos de arroz apenas e parece que essa entrada foi influenciada pelo cultivar. Alguns cultivares podem favorecer a FBN através de sua alta produção de raízes e capacidade de suprir com alguns de seus fotossintatos a parte submersa da planta (LADHA et alii, 1987).

As perdas por denitrificação e/ou volatilização não foram contabilizadas no presente experimento e mesmo assim, para alguns cultivares o balanço foi positivo, havendo portanto uma boa evidência da entrada de N através da FBN.

No balanço do N-fertilizante foram considerados a quantidade de N proveniente do fertilizante na planta inteira nos dois anos de cultivo e a quantidade de N-fertilizante do solo antes e depois dos dois plantios (Tabela 18). Aqui novamente se observa a efetividade da planta em reduzir as perdas de N no sistema e o efeito de cultivar. As perdas do N-fertilizante não foram diferentes estatisticamente para os solos cultivados e não cultivados. Entretanto, no balanço de N, onde os ganhos de N pela cultura são contabilizados, observa-se que houve diferença significativa entre os solos cultivados e os sem planta, sendo que nos solos sem planta as perdas chegaram a  $-48,17 \text{ mg N.vaso}^{-1}$ , enquanto que o cultivar CNA-3852, por exemplo, apresentou  $-0,46 \text{ mg de N.vaso}^{-1}$  de perdas de N, o que significa que esse cultivar diminuiu as perdas em 99%.

#### **4.3. Estudo III. Avaliação do potencial da FBN em cultivares de arroz inundado através da técnica de redução de acetileno**

A produção de matéria seca e N-total da parte aérea, raiz e planta inteira na época da emergência da panícula de 15 cultivares de arroz inundado está apresentada na Tabela

19. Todos os parâmetros avaliados apresentaram diferenças estatísticas entre os cultivares, sendo que a maior produção da matéria seca total nessa estágio de crescimento foi obtida pelo cultivar HUA-CHOU (28,88 g.pl<sup>-1</sup>) e a menor pelo BR-IRGA-409 (19,62 g.pl<sup>-1</sup>). Esse último cultivar também apresentou o menor acúmulo de N-total (154,49 mg.pl<sup>-1</sup>) nesse estágio de crescimento e o maior acúmulo foi obtido pelo CNA-4501.

A atividade da redução de acetileno apresentou uma fase "lag" até aproximadamente 6 horas de incubação, seguido de um aumento praticamente linear até 24 horas de incubação (Figura 4). YOSHIDA & ANCAJAS (1973) observaram uma relação linear entre o tempo de incubação e ARA realizada em raízes destacadas durante 24 horas de incubação após um período de 30 minutos de fase "lag". LEE et alii (1977a) medindo ARA em condições de campo observaram um aumento linear até 48 horas de incubação com uma fase "lag" de 3 horas no estágio de maturação. BARRAQUIO et alii (1986) constataram que as taxas de ARA foram menores nas primeiras 4 horas na época da emergência da panícula. Esses resultados concordam com os obtidos por LEE et alii (1977a) e WATANABE & CABRERA (1979) que observaram fase "lag" no período de 0 - 3 horas nos testes em condições de campo e de 2 - 3 horas nos testes realizados em solução nutritiva, respectivamente. VAN BERKUM & SLOGER (1982) obtiveram taxas lineares de ARA após um período de 1 - 4 horas quando eles usaram testes em raízes intactas, mas observaram uma aceleração das taxas quando usaram raízes lavadas e destacadas. Testes realizados por BARRAQUIO et alii (1986) em condições aeróbicas, microaerofílicas e anaeróbicas mostraram a mesma tendência, indicando que outros fatores, além da exposição ao ar durante as amostragens, podem estar envolvidos. A difusão do C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> e C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> entre os sítios de fixação de N<sub>2</sub> e a atmosfera amostrada pode ser uma das razões para as taxas iniciais não lineares da ARA (VAN BERKUM & SLOGER, 1982). No presente experimento a longa fase "lag" provavelmente foi provocada pelo problema de difusão dos gases, uma vez que, devido ao tipo de preparo de solo, destruiu-se a sua estrutura diminuindo o espaço poroso, além do fato dele estar encharcado. Problemas de difusão de gases em solos alagados são citados na literatura como sendo particularmente sérios (FLETT ET ALII, 1976; MATSUGUCHI et alii, 1978).

BARRAQUIO et alii (1986) selecionaram o período de 6 horas de incubação para avaliação da FBN em cultivares de arroz inundado, pois observaram que: a) está além do período de "lag"; b) está dentro da fase linear de atividade; c) tem atividade adequada para mascarar artefatos (isto é, contaminação de C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> no C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> endógeno, etc..) e d) é um período conveniente para ser efetuado dentro do dia do teste. Neste ensaio, entretanto, a produção de C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> em  $\mu\text{mol.planta}^{-1}$  semelhante à obtida por esses autores em 6 horas de

**Tabela 19. Produção de matéria seca e N-total de diferentes partes de 15 cultivares de arroz inundado na época da emergência da panícula, desenvolvidos em vasos de 5 litros (4,5 kg solo.vaso<sup>-1</sup>), contendo duas plantas. Médias de cinco repetições.**

CULTIVARES	Matéria seca (g.pl <sup>-1</sup> )			N-total (mg.pl <sup>-1</sup> )		
	Parte aérea	Raiz	Total	Parte aérea	Raiz	Total
IAC-1278	18,71 abc	7,31 abcd	26,02 abc	150,48 abc	21,63 bc	172,11 bcd
IAC-81-318	18,72 abc	4,54 e	23,26 cde	160,09 abc	15,28 c	175,37 abcd
IAC-4440	19,29 abc	7,82 abc	27,11 ab	163,76 ab	28,18 ab	191,94 ab
CNA-0721	15,82 def	8,28 a	24,10 bcd	154,62 abc	30,82 a	185,44 abc
CNA-3852	20,68 ab	6,43 abcd	27,11 ab	174,69 ab	23,05 abc	197,74 ab
CNA-3879	18,20 bcd	6,11 bcde	24,31 bcd	153,51 abc	25,54 ab	179,05 abcd
CNA-4215	17,66 cde	6,67 abcd	24,33 bcd	158,91 abc	21,55 bc	180,46 abcd
CNA-4501	19,25 abc	7,95 ab	27,20 ab	174,57 ab	29,68 ab	204,25 a
CNA-4566	12,74 g	7,32 abcd	20,06 ef	134,44 c	22,12 bc	156,56 cd
BR-IRGA-409	13,37 fg	6,25 bcde	19,62 f	132,93 c	21,56 bc	154,49 d
BR-IRGA-410	15,09 efg	6,03 cde	21,12 def	147,28 bc	21,67 bc	168,95 bcd
IR-42	19,69 abc	7,28 abcd	26,97 ab	170,77 ab	26,12 ab	196,89ab
IR-58	13,43 fg	6,69 abcd	20,12 ef	158,53 abc	16,06 c	174,59 abcd
HUA-CHOU	21,11 a	7,76 abc	28,87 a	165,10 ab	27,49 ab	192,59 ab
CNA-3314	17,23 cde	5,75 de	22,98 cdef	175,34 a	23,40 abc	198,74 ab
C.V. (%)	11,3	18,6	10,3	11,6	24,1	11,3

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de 5% de significância pelo teste Duncan.

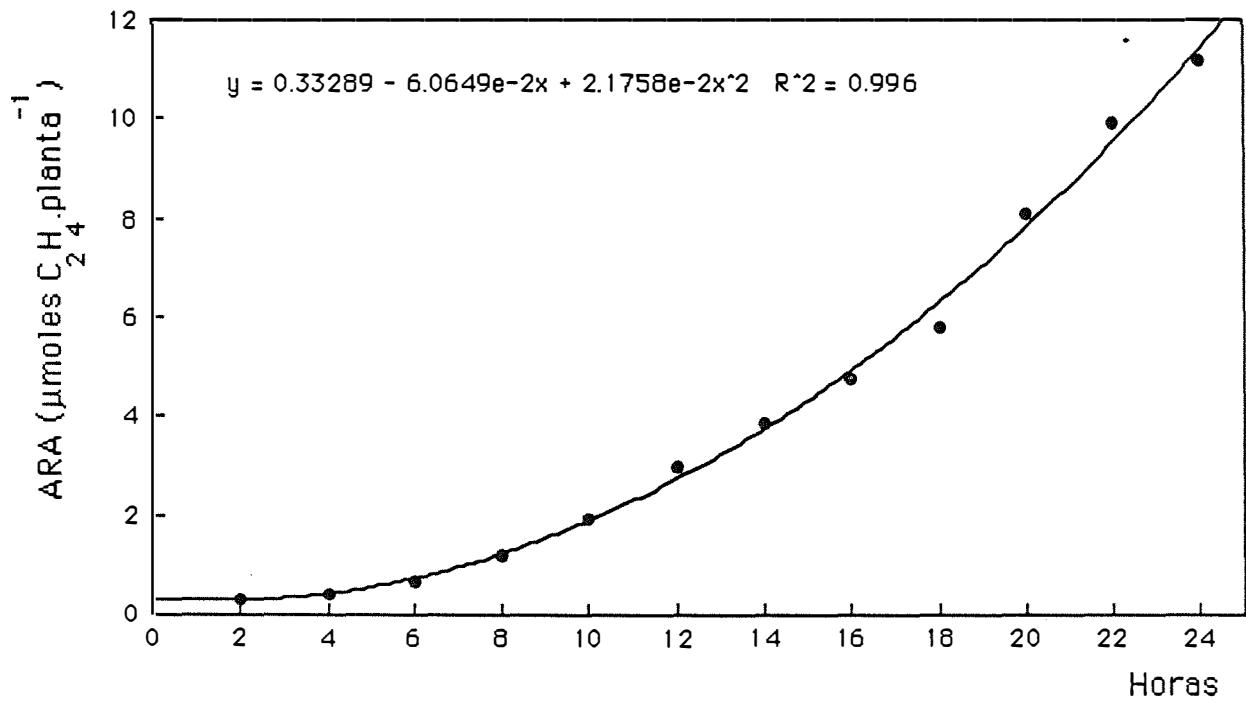


Figura 4. Variação da atividade da nitrogenase durante diferentes período de incubação. Os pontos representam a média de 15 cultivares de arroz inundado.

incubação, inclusive com o mesmo cultivar utilizado por eles (IR-42), somente foram obtidas após 14 horas de incubação. Provavelmente, isso também ocorreu devido ao problema de difusão dos gases conforme discutido anteriormente.

Neste experimento, embora os testes de ARA tenham sido elaborados até 24 horas de incubação, foi estabelecido o tempo de 8 horas de incubação para a comparação da atividade da nitrogenase entre os cultivares, uma vez que nesse tempo iniciou-se a fase linear de atividade (Tabela 20), e também porque testes de curta duração são preferíveis do que de longa duração devido aos efeitos não desejáveis do  $C_2H_2$  no metabolismo da planta e dos microrganismos (HARDY et alii, 1973; DAVID & FAY, 1977), a multiplicação dos microrganismos e a presença de fatores que decompõe o  $C_2H_2$  (WATANABE & GUZMAN, 1980).

LADHA et alii (1986) estudando os cultivares IR-42, IR-58 e HUA-CHOU e outros constataram que as grandes diferenças na ARA entre os cultivares na época da emergência da panícula foram comandadas pelas diferenças no total de matéria seca entre os cultivares de ciclo curto e ciclo longo. Eles observaram que o IR-42, cultivar de ciclo longo (125 - 235 dias), o qual apresentou alta produção de biomassa, mostrou o maior valor de ARA entre os cultivares estudados, enquanto que o IR-58, cultivar de ciclo curto (105 - 110 dias), apresentou a mais baixa ARA. A ARA do HUA-CHOU, cultivar de ciclo curto (105 - 110 dias) também foi inferior ao do IR-42. DE DATTA (1984) observaram que o cultivar IR-42 apresenta um bom desenvolvimento em solo sem aplicação de fertilizante nitrogenado e também utiliza o N do solo eficientemente. No presente experimento, após 8 horas de incubação constatou-se que o cultivar HUA-CHOU, apresentou a maior ARA mostrando diferença estatística do BR-IRGA-409, CNA-3852 e IR-58, sendo que esses último apresentou a menor atividade da nitrogenase. Comparando o desenvolvimento dos IR-42, IR-58 e HUA-CHOU em Los Baños, Filipinas, com o desenvolvimento desses cultivares em Piracicaba, Brasil, observou-se que a época de emergência da panícula foi alcançada num período superior à de Los Baños, ou seja, 70, 85 e 110 dias após transplante (DAT) para IR-58, HUA-CHOU e IR-42, respectivamente, enquanto que em Los Baños esse estágio foi observado na mesma sequência em aproximadamente 58, 65 e 92 DAT (LADHA et alii, 1986). Provavelmente essas diferenças foram decorrentes das diferentes condições ambientais dos locais. Nas nossas condições constatou-se que entre os cultivares provenientes do IRRI o HUA-CHOU mostrou os melhores resultados superando o IR-42, o qual tem se mostrado superior na maioria dos ensaios de FBN desse Instituto (BARRAQUIO et alii, 1986; LADHA et alii, 1986, 1987). Entretanto, no presente experimento, os resultados obtidos com alguns cultivares brasileiros tem se mostrado igual ou superior a esse cultivar.

**Tabela 20. Atividade da nitrogenase em diferentes horas de 15 cultivares de arroz inundado na época da emergência da panícula, desenvolvidos em vasos de 5 litros (4,5 kg solo.vaso<sup>-1</sup>) contendo duas plantas. Médias de cinco repetições.**

CULTIVARES	ARA ( $\mu\text{moles C}_2\text{H}_4\text{.planta}^{-1}$ )			
	2h	4h	6h	8h
IAC-1278	0,351 bc	0,416 bcd	0,617 bcd	1,091 abc
IAC-81-318	0,328 bc	0,461 bcd	0,668 bcd	1,007 abc
IAC-4440	0,236 c	0,289 cd	0,490 cd	1,319 ab
CNA-0721	0,266 bc	0,269 d	0,508 bcd	1,130 bc
CNA-3852	0,315 bc	0,423 bcd	0,599 bcd	0,947 bc
CNA-3879	0,359 b	0,517 ab	0,725 bcd	1,103 abc
CNA-4215	0,241 c	0,362 bcd	0,618 bcd	1,267 ab
CNA-4501	0,303 bc	0,453 bcd	0,672 bcd	1,269 ab
CNA-4566	0,465 a	0,531 ab	0,787 bc	1,247 ab
BR-IRGA-409	0,272 bc	0,395 bcd	0,642 bcd	0,965 bc
BR-IRGA-410	0,298 bc	0,480 bc	0,838 b	1,512 ab
IR-42	0,322 bc	0,395 bcd	0,645 bcd	1,380 ab
IR-58	0,315 bc	0,349 bcd	0,393 d	0,604 c
HUA-CHOU	0,535 a	0,684 a	1,162 a	1,572 a
CNA-3314	0,338 bc	0,409 bcd	0,800 bc	1,368 ab
C. V. (%)	23,5	29,8	32,7	33,1

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de 5% de significância pelo teste Duncan.

Analisando a ARA após 8 horas de incubação observa-se que o CNA-3314, o qual foi usado como controle não fixador no experimento do item 4.1., apresentou atividade da nitrogenase estatisticamente igual ao cultivar com maior ARA (HUA-CHOU) e o BR-IRGA-409, que foi considerado um dos cultivares com potencial para FBN, mostrou menor atividade da nitrogenase, estatisticamente diferente do cultivar de maior ARA. O teste de ARA não mede a transferência do N fixado do diazotrófico para a planta associada (VAN BERKUM & SLOGER, 1979), e isso provavelmente explica o fato acima relatado. Pode-se sugerir, portanto, que o CNA-3314 embora tenha apresentado ARA superior ao BR-IRGA-409, o N-fixado não foi absorvido eficientemente por essa planta. Entretanto, observa-se que os cultivares HUA-CHOU, IAC-4440, BR-IRGA-410, os quais apresentaram maior ARA também se mostraram superiores na estimativa da FBN no experimento de diluição isotópica de  $^{15}\text{N}$ .

A necessidade de critérios de seleção simples e fácil de cultivares de arroz para FBN tem sido enfatizado (LADHA et alii, 1986) e alguns autores têm buscado encontrar nos caracteres da planta principalmente na massa de raiz, correlações positivas com a ARA (LEE et alii, 1977b; HIROTA et alii, 1978; SANO et alii, 1981; LADHA et alii, 1986). No presente experimento, entretanto, não foram observadas nenhuma correlação entre ARA e peso da matéria seca da raiz ou peso da matéria seca da parte aérea. Provavelmente isso ocorreu devido ao fato das correlações terem sido feitas com o peso da matéria seca da raiz e/ou parte aérea na época da emergência da panícula, enquanto que nos trabalhos citados na literatura, embora os testes de ARA tenham sido realizados na época da emergência, as correlações foram feitas com a matéria seca da raiz e/ou parte aérea do final do ciclo da cultura (LEE et alii, 1977b; LADHA et alii, 1986).

#### **4.4. Estudo IV. Isolamento de algumas bactérias heterotróficas fixadoras de $\text{N}_2$ em cultivares de arroz inundado**

A contagem de bactérias heterotróficas isoladas da rizosfera, rizoplano e hitosfera de 15 cultivares de arroz inundado na época da emergência da panícula está apresentada na Figura 4. Observa-se que para a maioria dos cultivares a população de heterotróficas foi maior no rizoplano e/ou hitosfera, com exceção do CNA-3852, CNA-4215 e BR-IRGA-409, os quais apresentaram maior número de microrganismos heterotróficos na rizosfera. Os cultivares IAC-4440, IR-42, CNA-3879 e CNA-4501, os quais apresentaram

ARAs estatisticamente igual ao cultivar de maior ARA (Tabela 20), também mostraram as maiores populações de heterotróficas. O HUA-CHOU, cultivar de maior ARA mostrou baixo número de microrganismos heterotróficos em relação aos outros cultivares, sendo superado apenas pelo CNA-3314, o qual apresentou os menores valores de heterotróficos principalmente na rizosfera e hitosfera.

Foi detectado atividade da nitrogenase em todos os tubos de ensaio contendo os meios para *Azospirillum*, *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonas*, apresentando valores de atividade da nitrogenase que variaram de 0,42 - 829,96 nmoles  $C_2H_4$ .tubo<sup>-1</sup>.24h<sup>-1</sup>.

Alguns trabalhos realizados mostraram que as bactérias dos gêneros *Azospirillum*, *Pseudomonas* e *Enterobacter*, são bactérias fixadoras de  $N_2$  comumente associadas com muitos cultivares de arroz (LADHA et alii, 1982, 1983; BARRAQUIO et alii, 1982). WATANABE & BARRAQUIO (1979) e WATANABE et alii (1979) constataram que 80% do total da população de bactérias heterotróficas na hitosfera eram fixadores de  $N_2$  e que *Pseudomonas* foi o gênero predominante. LADHA (1986) observou que nessa parte da planta havia aproximadamente cem vezes mais populações de *Pseudomonas* e *Azospirillum*.

A contagem de *Azospirillum*, *Pseudomonas* e *Enterobacter* realizada através do número mais provável, mostrou que todos os cultivares são colonizados por essas bactérias (Figuras 6 e 7). Entretanto, não foram observadas populações de *Azospirillum* na rizosfera do IR-42 e do CNA-3314. Esse último cultivar também não apresentou *Azospirillum*, *Pseudomonas* e *Enterobacter* na sua hitosfera e nem *Pseudomonas* e *Enterobacter* no seu rizoplano.



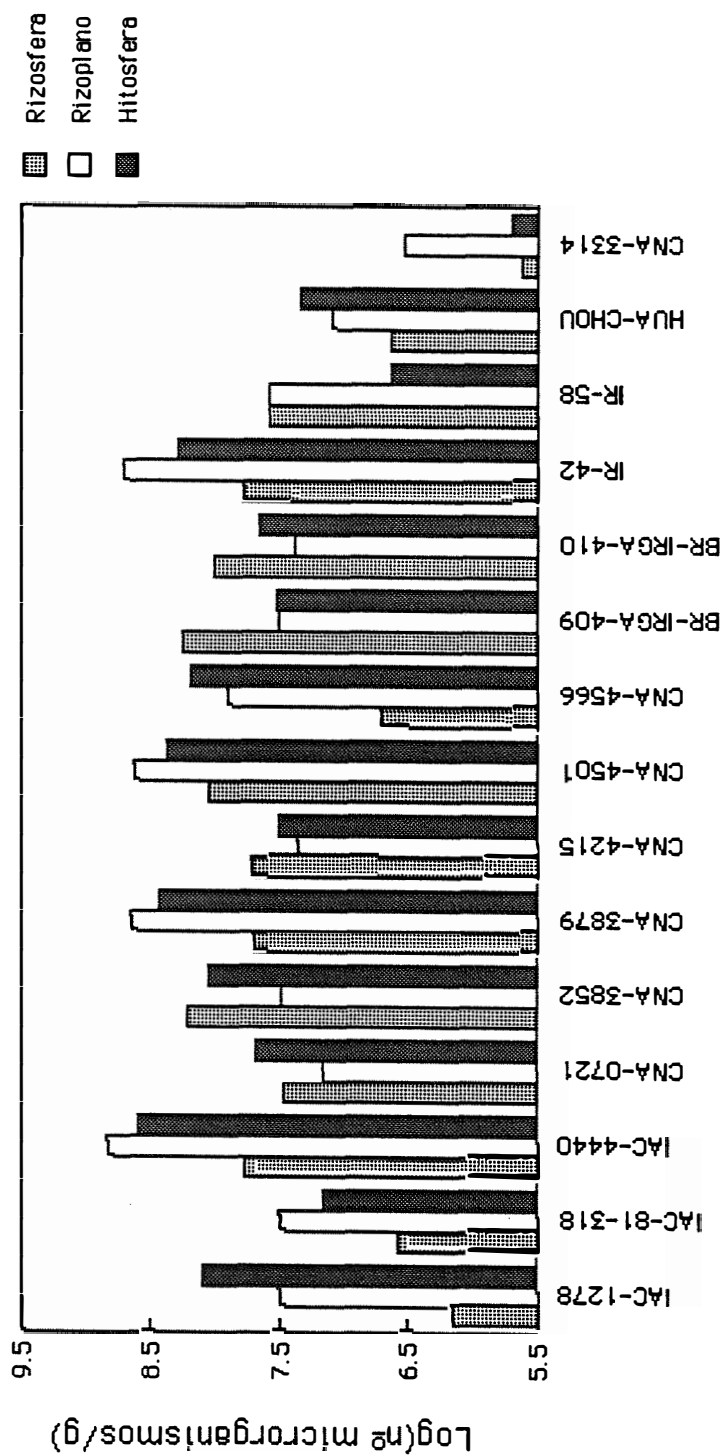


Figura 5. Resultados da contagem de bactérias heterotróficas isoladas de diferentes partes de 15 cultivares de arroz inundado na época da emergência da panícula. Médias de três repetições.

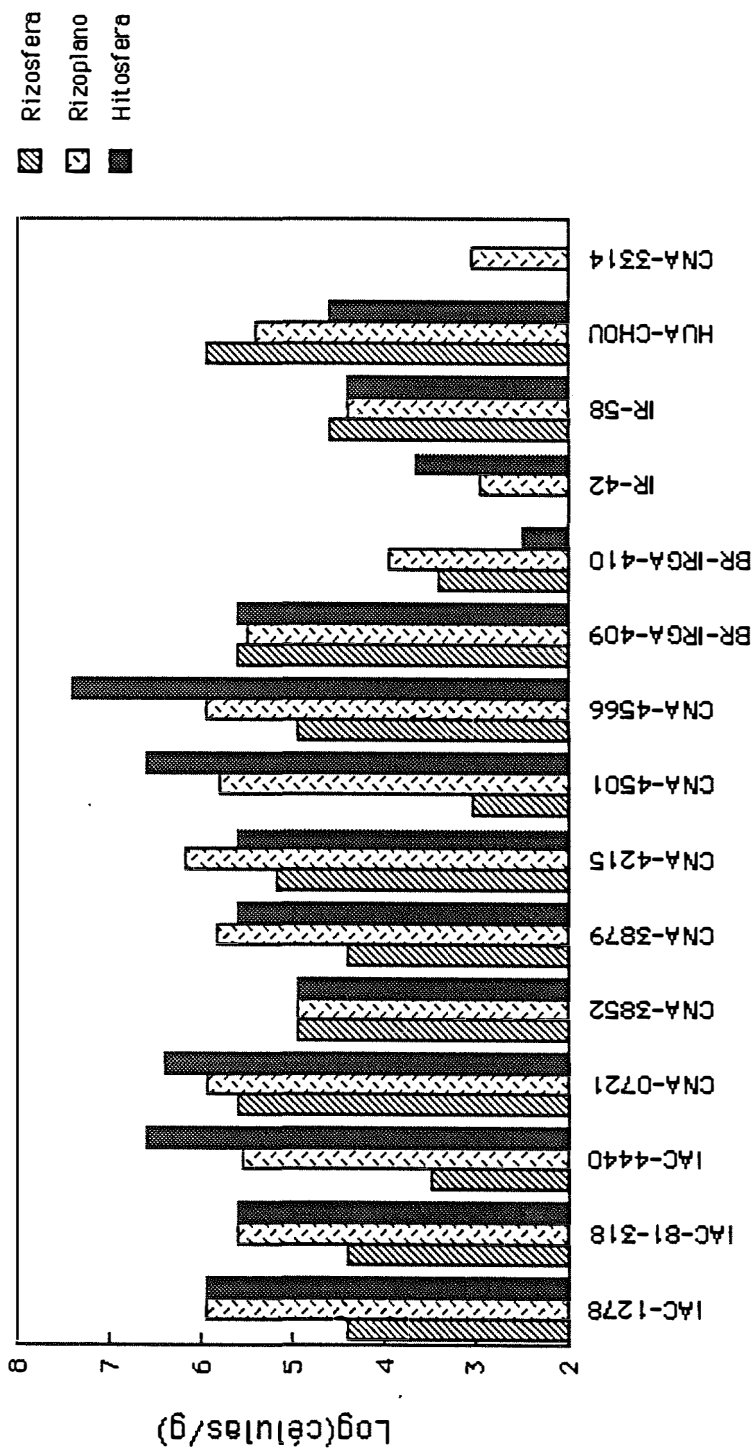


Figura 6. Resultados da contagem de *Azospirillum* isolados de diferentes partes de 15 cultivares de arroz inundado na época da emergência da panícula. Médias de três repetições.

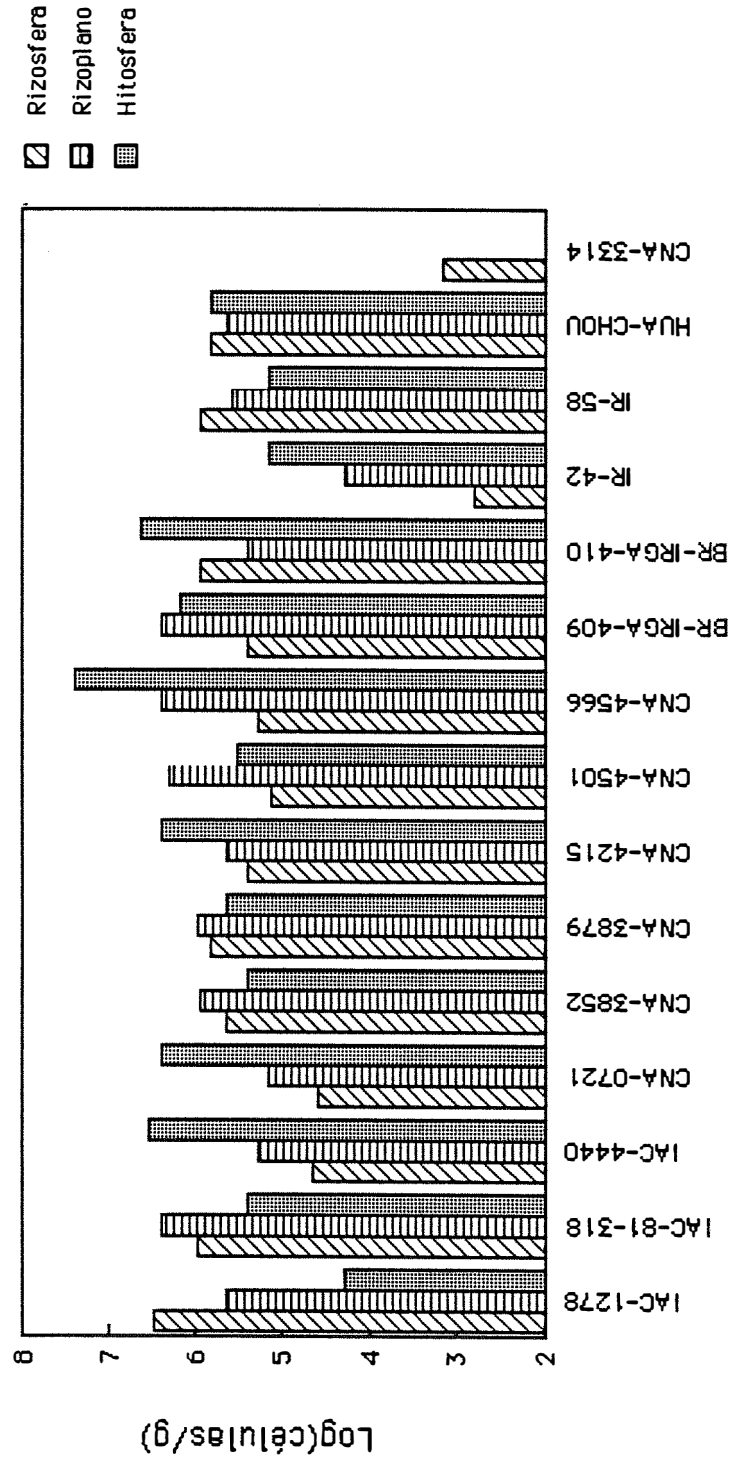


Figura 7. Resultados da contagem de *Pseudomonas* e *Enterobacter* isolados de diferentes partes de 15 cultivares de arroz inundado na época da emergência da panícula. Médias de três repetições.

## 5. CONCLUSÕES

A partir dos objetivos propostos e resultados obtidos pode-se concluir que:

- Os cultivares apresentaram diferenças entre si quanto à capacidade de fixar  $N_2$ , sendo essas diferenças mais acentuadas em solo deficiente em N.
- As maiores contribuições para o N da planta foram provenientes do solo em todos os cultivares, seguido pelo proveniente da fixação de  $N_2$  em quase todos os cultivares, calculado usando o cultivar CNA-3314 como controle não fixador, e por último do N-fertilizante.
- As perdas de N do solo foram reduzidas com a presença da planta de arroz, sendo que alguns cultivares favoreceram a entrada natural de N, muito provavelmente através da FBN, mostrando balanço positivo de N no sistema solo-planta com apenas dois cultivos sucessivos.
- Populações de bactérias heterotróficas foram observadas na rizosfera, rizoplano e hitosfera de todos os cultivares estudados. As bactérias fixadoras de  $N_2$  dos gêneros *Azospirillum*, *Pseudomonas* e *Enterobacter* foram encontradas em todos os cultivares, com exceção do *Azospirillum* na rizosfera dos IR-42 e CNA-3314 e de *Pseudomonas* e *Enterobacter* no rizoplano e hitosfera desse último cultivar.
- Os cultivares BR-IRGA-409, BR-IRGA-410, IAC-4440, IAC-1278 e HUA-CHOU foram os que apresentaram maior potencial de FBN, enquanto que o CNA-3314 mostrou baixo potencial e/ou baixa eficiência no aproveitamento do N-fixado.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABELES, F.B.; CRAKER, L.E.; FORRENCE, L.E.; LEATHER, G.R. . Fate of air pollutants: removal of ethylene, sulfur dioxide, and nitrogen dioxide by soil. *Science*, Washington, 173: 914-916, 1971.

ABELES, F.B. *Ethylene in plant biology*. New York, Academic Press. 1973. 250 p.

ALLEN, S.E.; TERMAN, G.L.; CLEMENT, L.B. *Greenhouse techniques for soil-plant-fertilizer research*. Bulletin Y-104. National Fertilizer Development Center, TVA, MUSCLE SHOALS, Alabama. 1976. 57 p.

APP, A.; WATANABE, I.; ALEXANDER, M.; VENTURA, W.; DAEZ, C.; SANTIAGO, T.; DE DATTA, S.K. Non-symbiotic nitrogen fixation associated with the rice plant in flooded soils. *Soil Science*, Baltimore, 130(5): 283-289, 1980.

APP, A.; SANTIAGO, T.; DAEZ, C.; MENGUITO, C.; VENTURA, W.; TIROL, A.; PO, J.; WATANABE, I. DE DATTA, S.K.; ROGER, P. Estimation of the nitrogen balance for irrigated rice and the contribution of phototrophic nitrogen fixation. *Field Crops Research*, Amsterdam, 9: 17-27, 1984.

ASAMI, T. Immobilization of added inorganic nitrogen and mineralization of soil organic nitrogen in paddy soil incubated under submerged or upland condition. *Journal Science Soil Manure*, 42: 74-80, 1971.

BALANDREAU, J.P. & DOMMERGUES, Y.R. Assaying nitrogenase (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>) activity in the field. *Bulletin Ecological Research Communications*, Stockholm, 17: 246-254, 1973.

- BALANDREAU, J.P.; MILLIER, C.R.; DOMMERGUES, Y.R. Diurnal variations of nitrogenase activity in the field. *Applied Microbiology*, Washington, 27(4): 662-665, 1974.
- BALANDREAU, J.P.; MILLIER, C.R.; WEINHARD, P.; DUCERF, P.; DOMMERGUES, Y.R. A model approach of acetylene reducing activity of plant-rhizosphere diazotroph systems. In: NEWTON, W.; POSTGATE, J.R. & RODRIGUEZ-BARRUECO, C. ed. *Recent Development in Nitrogen Fixation*. London, Academic Press. 1977. p. 523-529.
- BALANDREAU, J. P. & KNOWLES, R. The rhizosphere. In: DOMMERGUES, Y. R.; KRUPA, S. V. ed. *Interaction between non-pathogenic soil microorganisms and plants*. Amsterdam, Elsevier. 1978. p. 243-268.
- BALANDREAU, J.P. & DUCERF, P. Analysis of factors limiting nitrogenase (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>) activity in the field. In: NEWTON, W.E. & ORME-JOHNSON, W.H. ed. *Nitrogen Fixation*. Baltimore, University Park Press, Vol. 2. 1980. p. 229-242.
- BALDANI, D.L.V. & DOBEREINER, J. Host-plant specificity in the infection of cereal with *Azospirillum* spp. *Soil Biology Biochemistry*, Oxford, 12: 433-439, 1980.
- BARRAQUIO, W.L.; DE GUZMAN, M.R.; BARRION, M.; WATANABE, I. Population of aerobic heterotrophic nitrogen-fixing bacteria associated with wetland and dryland rice. *Applied Environmental Microbiology*, Washington, 43: 124-128, 1982.
- BARRAQUIO, W.L.; LADHA, J.K.; WATANABE, I. Isolation and identification of N<sub>2</sub>-fixing *Pseudomonas* associated with wetland and dryland rice. *Applied Environmental Microbiology*, Washington, 29: 867-873, 1983.
- BARRAQUIO, W.L.; DAROY, M.L.G.; TIROL, A.C.; LADHA, J.K.; WATANABE, I. Laboratory acetylene reduction assay for relative measurement of N<sub>2</sub>-fixing activities associated with field-grown wetland rice plants. *Plant Soil*, Hague, 90: 359-372, 1986.

- BECKING, J.H. *Beijerinckia* in irrigated rice soils. Environmental role of nitrogen-fixing blue-green algae and asymbiotic bacteria. *Bulletin Ecological Research Communication*, Stockholm, **26**: 116-129, 1978.
- BERGENSEN, F.J. Some properties of nitrogen fixing breis prepared from soybean root nodules. *Biochimica Biophysica Acta*, Amsterdam, **130**: 304-312, 1966.
- BREMNER, J.M. Total nitrogen. In: BLACK, C.A. et alii. ed. *Methods of soil analysis. Chemical and microbiological properties*. Agronomy n° 9, Part 2, American Society of Agronomy, Wisconsin, 1965. p. 1149-1178.
- BREMNER, J.M. & EDWARDS, A.P. Determination and isotope-ratio analysis of different forms of nitrogen in soils. I. Apparatus and procedure for distillation and determination of ammonium. *Soil Science Society American Proceedings*, Madison, **29**: 504-507, 1965.
- BREMNER, J.M. Determination and isotope-ratio analysis of different forms of nitrogen in soil. *Journal Association Official Analytical Chemists*, Arlington, **68**: 155-161, 1985.
- BODDEY, R.M. & AHMAD, N. Seasonal varieties in nitrogenase activity of various varieties measured with an "in situ" acetylene reduction technique in the field. In: VOSE P.B. & RUSCHEL, A.P. ed. *Associative N<sub>2</sub>-fixation*, Boca Raton, CRC Press Inc., Vol. II. 1981. p. 219-229.
- BODDEY, R.M. Methods for quantification of nitrogen fixation associated with gramineae. *CRC Critical Reviews in Plant Sciences*, **6**(3): 209-266, 1987.
- BOULDIN, D.R. The chemistry and biology of flooded soils in relation to the nitrogen economy in rice fields In: DE DATTA, S.K. & PATRICK, W.H. ed. *Nitrogen economy of flooded rice soils*. Dordrecht, Martinus Nijhoff Publishers. 1986. p. 1-14.
- BROADBENT, F.E. & TUSNEEM, M.E. Losses of nitrogen from some flooded soils in tracer experiments. *Soil Science Society American Proceedings*, Madison, **35**: 922-926, 1971.

- BROADBENT, F.E. Mineralization of organic nitrogen in paddy soils. In: INTERNATIONAL RICE RESEARCH INSTITUTE. *Nitrogen and Rice*. Los Baños. IRRI. 1979. p. 105-118.
- BROADBENT, F.E.; NAKASHIMA, T.; CHANG, G.Y. Estimation of nitrogen fixation by isotope dilution in field and greenhouse experiments. *Agronomy Journal*, Madison, 74: 625-629, 1982.
- BURESH, R.J.; CASSELMAN, M.E.; PATRICK, W.H. Jr. Nitrogen fixation in flooded soil systems, a review. *Advances in Agronomy*, New York, 33: 149-192, 1980.
- BURNS, R.C. & HARDY, R.W.F. *Nitrogen fixation in bacteria and higher plants*. Berlin, Springer Verlag. 1973. 18 p.
- BURNS, R.C. & HARDY, R.W.F. Nitrogen fixation in bacteria and higher plants. *Mol. Biol. Biochem. Biophys. Acta*, 127: 285-294, 1975.
- BURRIS, R.H. Methodology. In: QUISPÉL, A. ed. *The Biology of Nitrogen Fixation*. Amsterdam, North Holland. 1974. p. 9-33.
- BURRIS, R.H. The acetylene reduction technique. In: STEWART, W.D.P. ed. *Nitrogen fixation by free-living microorganisms*. Cambridge, Cambridge University Press, 1975. p. 249.
- CHALK, P.M. Estimation of N fixation by isotope dilution: an appraisal of techniques involving N enrichment and their application. *Soil Biology Biochemistry*, Oxford, 17: 389-346, 1985.
- CHARYULU, P.B.N.; NAYAK, D.N.; RAO, R.V. N incorporation by rhizosphere soil: influence of rice (*O. sativa*) varieties, organic matter and combined nitrogen. *Plant Soil*, Hague, 59: 399-406, 1981.
- COLAÇO, W. Transformações do nitrogênio no sistema solo-planta-atmosfera, sob condições de laboratório e casa de vegetação, com ênfase à denitrificação. Piracicaba. 1988. 377 p. (Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).



- CORNFORTH, I.S. The persistence of ethylene in aerobic soil. *Plant Soil*, Hague, 42: 85-96, 1975.
- DART, P.J. & DAY, J.M. Effect of incubation temperature and oxygen tension on nitrogenase activity of legume root nodules. *Plant Soil Special Volume*, Hague, 1971. p. 167-184.
- DA SILVA, E.; HENRIKSSON, E.; HENRIKSSON, L.A. Ethylene production by fungi. *Plant Science Letters*, Amsterdam, 2: 63-66, 1974.
- DAVID, K.A.V. & FAY, P. Effects of long term treatment with acetylene on nitrogen fixing microorganisms. *Applied Environmental Microbiology*, Washington, 34: 640-646, 1977.
- DAY, J.M.; HARRIS, D.; DART, P.J.; VAN BERKUM, P. The Broadbalk experiment. An investigation of nitrogen gains from non-symbiotic nitrogen fixation. In: STEWART, W.D.P. ed. *Nitrogen fixation by free-living microorganisms*. Cambridge, Cambridge University Press. 1975, p. 71.
- DE BONT, J.A.M. Oxidation of ethylene by soil bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 42: 59-71, 1976.
- DE BONT, J.A.M. & MULDER, E.G. Invalidity of the acetylene reduction assay in alkane-utilizing, nitrogen-fixing bacteria. *Applied Environmental Microbiology*, Washington, 31(5): 640-647, 1976.
- DE BONT, J.A.M.; LEE, K.K.; BOULDIN, D. Bacterial oxidation of methane in rice paddy. *Bulletin Ecological Research Communications*, Stockholm, 26: 91-96, 1978.
- DE DATTA, S.K. & GOMEZ, K.A. Changes in soil fertility under intensive rice cropping with improved varieties. *Soil Science*, Baltimore, 120: 361-366, 1975.
- DE DATTA, S.K. *Principles and practices of rice production*. New York, John Wiley & Sons, Inc. 1981. 270 p.

- DE DATTA, S.K. Availability and management of nitrogen in lowland rice in relation to soil characteristics. In: WORKSHOP ON CHARACTERIZATION, CLASSIFICATION AND UTILIZATION OF WETLAND SOILS. Los Baños. 1984. Proceedings. Los Baños, International Rice Research Institute. Laguna. 1984. p. 31-34.
- DENMEAD, O.T.; FRENEY, J.R.; SIMPSON, J.R. A close ammonia cycle within a plant canopy. *Soil Biology Biochemistry*, Oxford, 8: 161-164, 1976.
- DILWORTH, M.J. Acetylene reduction fixing preparations of *Clostridium pasteurianum*. *Biochimica Biophysica Acta*, Amsterdam, 127: 285-294, 1966.
- DOBEREINER, J. & CAMPELO, A.B. Non-symbiotic nitrogen fixing bacteria in tropical soils. *Plant Soil Special Volume*, Hague, 1971. p. 457-470.
- DOBEREINER, J.; DAY, J.M.; DART, P.J. Nitrogenase activity and oxygen sensitivity of the *Paspalum notatum*-*Azotobacter paspalii* association. *Journal General Microbiology*, London, 71: 103-116, 1972.
- DOBEREINER, J. Nitrogen fixing bacteria in the rhizosphere. In: QUISPÉL, A. ed. *The biology of nitrogen fixation*. Amsterdam, Northolland. 1974. p. 86-120.
- DOMMERGUES, Y.R. & RINAUDO, G. Factors affecting N<sub>2</sub> fixation in the rice rhizosphere. In: INTERNATIONAL RICE RESEARCH INSTITUTE. *Nitrogen and Rice*. Los Baños, IRRI. 1979. p. 241-260.
- EMBRAPA. Departamento Técnico-Científico. Programa Nacional de Pesquisa de Arroz. Brasília, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Departamento de Informação e Documentação. 1981. 69 p.
- ERIKSSON, E. Composition of atmospheric precipitation. I. Nitrogen compounds. *Tellus*, Stockholm, 4: 215-219, 1952.
- ESKEW, D.L.; EAGLESHAM, A.R.J.; APP, A.A. Heterotrophic <sup>15</sup>N<sub>2</sub> fixation and distribution of newly fixed nitrogen in a rice-flooded soil system. *Plant Physiology*, Washington, 68: 48-52, 1981.

- FAGERIA, N.K. & BARBOSA FILHO, M.P. Avaliação preliminar de cultivares de arroz irrigado para maior eficiência de utilização de nitrogênio. *Pesquisa agropecuária brasileira*, Brasília, **17**(12): 1709-1712, 1982.
- FAGERIA, N.K. *Adubação e Nutrição da Cultura de Arroz*. Rio de Janeiro, Editora Campus. 1984. 341 p.
- FIRTH, P.; THITIPOCA, H.; SUTHIPRADIT, S.; WETSELAAR, R.; BEECH, D.F. Nitrogen balance studies in the Central Plain of Thailand. *Soil Biology Biochemistry*, Oxford, **5**: 41-46, 1973.
- FLETT, R.J.; HAMILTON, R.D.; CAMBELL, N.E.R. Aquatic acetylene-reduction techniques: solution to several problems. *Canadian Journal Microbiology*, Ottawa, **22**: 43-51, 1976.
- FREITAS, J.R. Dinâmica do nitrogênio em um solo terra roxa estrutura (TRE) tratado com matéria orgânica vegetal e sulfato de amônio enriquecidos com o isótopo  $^{15}\text{N}$ . Piracicaba. 1984. 113 p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- GILMOUR, J.T.; GILMOUR, C.M.; JOHNSTON, T.H. Nitrogenase activity of rice plant root systems. *Soil Biology Biochemistry*, Oxford, **10**: 261-164, 1978.
- HABTE, M. & ALEXANDER, M. Use of streptomycin for suppressing blue-green algal nitrogenase activity during the assessment of nitrogenase activity in the rice rhizosphere. *Soil Science Society American Journal*, Madison, **44**: 756-761, 1980.
- HARDY, R.W.F. & KNIGHT, E. Jr. Reductant-dependent adenosine triphosphate of nitrogen fixing extracts of *Azotobacter vinelandii*. *Biochimica Biophysica Acta*, Amsterdam, **132**: 520-531, 1966.
- HARDY, R.W.F. & KNIGHT, E. Jr. ATP-dependent reduction of azide and HCN by  $\text{N}_2$ -fixing enzymes of *Azotobacter vinelandii* and *Clostridium pasteurianum*. *Biochimica Biophysica Acta*, Amsterdam, **139**: 69-90, 1967.

- HARDY, R.W.F.; HOLSTEN, R.D.; JACKSON, E.K.; BURNS, R.C. The acetylene-ethylene assay for N<sub>2</sub>-fixation: Laboratory and field evaluation. *Plant Physiology*, Washington, **43**: 1185-1207, 1968.
- HARDY, R.W.F.; BURNS, R.C.; HOLSTEN, R.D. Applications of the acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation. *Soil Biology Biochemistry*, Oxford, **5**: 47-81, 1973.
- HIRANO, T. Studies on blue green algae. Part II. Study on the formation of humus due to the growth of blue green algae. *Bull. Shikoku Agri. Exp. Stn.*, **4**: 63-74, 1958.
- HIROTA, Y.; FUJII, T.; SANO, Y.; IYAMA, S. N<sub>2</sub> fixation in the rhizosphere of rice. *Nature*, London, **276**: 416-417, 1978.
- HUTCHINSON, G.L.; MILLINGTON, R.J.; PETERS, D.B. Atmosphere ammonia absorption by plant leaves. *Science*, Washington, **175**: 771-771, 1972.
- INGHAM, G. The mineral content of air and rain and its importance to agriculture. *Journal Agricultural Science*, Cambridge, **40**: 55,61,1950.
- INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY (IAEA). Isotope studies on rice fertilization. IAEA. Vienna. 1978. 138 p. (Technical Report series 181).
- INTERNATIONAL RICE RESEARCH INSTITUTE. *Annual Report for 1973* Los Baños. 1974. 384 p.
- ISMUNADJI, M.I.A.; ZULKARAINI, A.; PRAWIROSAMUNDRO, A.; YAZAMA, F. Productivity of some major Java soils with special reference to yield and nitrogen nutrition of lowland rice. *Contrib. Cent. Res. Inst. Agric. Bogor*, **7**: 1-7, 1973.
- ITO, O. CABRERA, D.; WATANABE, I. Fixation of dinitrogen-15 associated with rice plant. *Applied Environmental Microbiology*, Washington, **39**: 554-558, 1980.

- ITO, O. & WATANABE, I. Immobilization, mineralization and availability to rice plants of nitrogen derived from heterotrophic nitrogen fixation in flooded soils. *Soil Science Plant Nutrition*, Tokyo, 27(2): 169-176, 1981.
- JANSSON, S.L. & PERSSON, J. Mineralization and immobilization of soil nitrogen. In: STEVENSON, F.J. et alii. ed. *Nitrogen in Agricultural Soils*. Agronomy. Vol. 22. 1982. p. 229-252.
- JONES, E. Contribution of rainwater to the nutrient economy of soil in Northern Nigeria. *Nature*, London, 188: 432-436, 1961.
- JUNK, G. & SVEC, H.I. The absolute abundance of the nitrogen isotopes in the atmosphere and compressed gas from various sources. *Geochimica Cosmochimica Acta*, London, 14: 234-243, 1958.
- KAI, H. & WADA, K. Chemical and biological immobilization of nitrogen in paddy soils. In: INTERNATIONAL RICE RESEARCH INSTITUTE. *Soil and Rice*. Los Baños. IRRI. 1979. p. 157-174.
- KANA, T.M. & TJEPKEMA, J.D. Nitrogen fixation associated with *Scirpus atrovirens* and other nonnodulated plants in Massachusetts. *Canadian Journal Botany*, Ottawa, 56(21): 2636-2640, 1978.
- KELLMAN, M.; HUDSON, J.; SANMUGADAS, K. Temporal variability in atmospheric nutrient influx to a tropical ecosystem. *Biotropica*, Washington, 14: 1-5, 1982.
- KOBAYASHI, M.; TAKAHASHI, E. & KAWAGUCHI, K. Distribution of nitrogen fixing microorganisms in paddy soils of South East Asia. *Soil Science*, Baltimore, 104: 113-118, 1967.
- KOBAYASHI, M. The role of phototrophic bacteria in nature and their utilization. In: SUBBA RAO, S. ed. *Advances in Agricultural Microbiology*. Oxford and IBH Publ. Co., 1982. p. 443-662.

- KOHL, D.H. & SHEARER, G. Isotope fractionation associated with symbiotic nitrogen fixation and uptake of  $\text{NO}_3^-$  by plants. *Plant Physiology*, Washington, **66**: 51-60, 1980.
- KOSHINO, M. Incoming and outgoing of fertilizer nutrients in cropped lands. In: Science Council of Japan Science for better environment. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON THE HUMAN ENVIRONMENT (HESC).. Proceedings. Kyoto. 1975. p. 206-214.
- KOYAMA, T.; CHAMMEK, C.; NIAMSRICHAND, N. Soil-plant nutrition studies on tropical rice. III. The effect of soil fertility utilization of rice plants in Bangkhen paddy soil. *Soil Science Plant Nutrition*, Tokyo, **17**: 210-219, 1972.
- KOYAMA, T. Soil plant studies on tropical rice. III. The effect of soil fertility status of nitrogen and its liberation upon the nitrogen utilization by the rice plants in Bangkhen paddy soil. *Soil Science Plant Nutrition*, Tokyo, **19**: 265-274, 1971.
- KOYAMA, T. Practive determining potential nitrogen supplying capacity of paddy soils and rice yield. *J. Soc. Soil Manure*, **46**: 260-265, 1975.
- KOYAMA, T. & APP, A. Nitrogen balance in flooded rice soils. In: INTERNATIONAL RICE RESEARCH INSTITUTE. *Nitrogen and Rice*. Los Baños. IRRI. 1979. p. 95-104.
- LADHA, J.K.; BARRAQUIO, W.L.; WATANABE, I. Immunological techniques to identify *Azospirillum* associated with wetland rice. *Canadian Journal Microbiology*, Ottawa, **28**: 478-485, 1982.
- LADHA, J.K.; BARRAQUIO, W.L.; WATANABE, I. Isolation and identification of nitrogen-fixing *Enterobacter cloacae* and *Klebsiella planticola* associated with rice plants. *Canadian Journal Microbiology*, Ottawa, **29**: 1031-1038, 1983.
- LADHA, J.K. Studies of  $\text{N}_2$  fixation by free-living and rice rice plant-associated bacteria in wetland rice field. *Bionature*, **6**(2) 47-58, 1986.

- LADHA, L.K.; TIROL, A.C.; DOROY, M.L.G.; CALDO, G.; VENTURA, W.; WATANABE, I. Plant-associated  $N_2$  ( $C_2H_2$ -reduction) fixation by five rice varieties, its relationship with plant growth characters as affected by straw incorporation. *Soil Science Plant Nutrition*, Tokyo, 32(1): 91-106, 1986.
- LADHA, L.K.; TIROL-PADRE, A.; PUNZALAN, G.C.; WATANABE, I. Nitrogen-fixing ( $C_2H_2$ -reducing) activity and plant growth characters of 16 wetland rice varieties. *Soil Science Plant Nutrition*, Tokyo, 33(2): 187-200, 1987.
- LEDGARD, S.F.; MORTON, R.; FRENEY, J.R.; BERGENSEN, F.J.; SIMPSON, J.R. Assessment of the relative uptake of added and indigenous soil nitrogen by nodulated legumes and reference plant in the  $^{15}N$  dilution measurement of  $N_2$  fixation. I. Determination of method. *Soil Biology Biochemistry*, Oxford, 17: 317-330, 1985.
- LEE, K.K. & YOSHIDA, T. An assay technique of measurement of nitrogenase activity in root zone of rice for varietal screening by acetylene reduction method. *Plant Soil*, Hague, 46: 127-134, 1977.
- LEE, K.K. & WATANABE, I. Problems of the acetylene reduction technique applied to water-saturated paddy soils. *Applied Environmental Microbiology*, Washington, 34(6): 654-660, 1977.
- LEE, K.K.; ALIMAGNO, B.V.; YOSHIDA, T. Field technique using the acetylene reduction method to assay the nitrogenase activity and its association with the rice rhizosphere. *Plant Soil*, Hague, 47: 519-526, 1977a.
- LEE, K.K.; CASTRO, T.F.; YOSHIDA, T. Nitrogen fixation throughout growth and varietal differences in nitrogen fixation by rhizosphere of rice planted in POPS. *Plant Soil*, Hague, 48: 613-619, 1977b.
- LEE, K.K.; HOLST, I.; WATANABE, I.; APP. A.A. Gas transport through rice. *Soil Science Plant Nutrition*, Tokyo, 27: 151-158, 1981.

- LEGG, J.O. & SLOGER, C. A tracer method for determining symbiotic nitrogen fixation in field studies. In: KLEIN, E.R. & KLEIN, P.D. ed. Proc. 2nd Int. Conf. Stable Isotope. Oak Brook. III. 1975. p. 661-666.
- MAEDA, K. & ONIKURA, Y. Fertilizer N balance in soil variously irrigated in a pot experiment with rice. *Journal Science Soil Manure*, 47: 99-106, 1976.
- MALO, B.A. & PURVIS, E. Soil absorption of atmospheric ammonia. *Soil Science*, Baltimore, 97: 242-247, 1964.
- MATSUGUCHI, T.; TANAGCHAM, B.; PATIYUTH, S. Free living nitrogen fixers and acetylene reduction in tropical rice field. *Jpn. Agric. Res. Q.*, 8: 253-256, 1975.
- MATSUGUCHI, T.; TANGCHAM, B.; PATIYUTH, A. Flora and activities of non-symbiotic nitrogen fixing microorganisms in Thailand. *Tsudii to Beiseibutsu*, 18: 7-20, 1976.
- MATSUGUCHI, T. SHIMOMURA, T.; LEE, S.K. Reexamination of assay conditions for heterotrophic nitrogen fixation ( $C_2H_2$ ) in paddy soil. *Bulletin Ecological Research Communication*, Stockholm, 26: 137-147, 1978.
- MATSUGUCHI, T. Factor affecting heterotrophic nitrogen fixation in submerged rice soils. In: INTERNATIONAL RICE RESEARCH INSTITUTE. *Nitrogen and Rice*. Los Baños, IRRI. 1979. p. 207-222.
- MENEZES, V.G. Produção do arroz no Brasil. *Lavoura Arrozeira*, Porto Alegre, 40(372): 23-31, 1987.
- MEYER, J. & PAMPFER, E. Nitrogen content of rain water collected in humid Central Congo basin. *Nature*, London, 184: 717-719, 1959.
- MEYER, M.L.; BLOOM, P.R. & GRAVA, J. Transformation and losses applied of nitrogen-15 labeled ammonium in a flooded organic soil. *Soil Science Society American Journal*, Madison, 53: 79-85, 1989.



- MONTANGE, D.; WAREMBOURG, F.R.; BARDIN, R. Utilisation du  $^{15}\text{N}_2$  pour estimer la fixation d'azote et sa repartition chez le legumineuses. *Plant Soil*, Hague, 63: 131-142, 1981.
- MOORE, A.W. Non-symbiotic nitrogen fixation in soil and soil-plant system. *Soil Fertilizers*, Inglaterra, 29: 113-128, 1966.
- MURAYAMA, S. Saccharides in some Japanese paddy soils. *Soil Science Plant Nutrition*, Tokyo, 23: 479-489, 1977.
- NAYAK, D.K. & RAO, V.R. Nitrogen fixation by *Spirillum* sp. from rice roots. *Archives Microbiology*, Berlin, 115: 359-360, 1977.
- OGHOGHORIE, C.G.O. & PATE, J.S. Exploration of the nitrogen transport system of a nodulated legume using  $^{15}\text{N}$ . *Planta*, Berlin, 104: 35-45, 1972.
- OKON, Y. ALBRECHT, S.L.; BURRIS, R.H. Methods of growing *Spirillum lipoferum* and for counting it in pure culture and in association with plant. *Applied Environmental Microbiology*, Washington, 33: 85-88, 1977.
- OREMLAND, R.S. & TAYLOR, B.F. Inhibition of methanogenesis in marine sediments by acetylene and ethylene: Validity of the acetylene reduction assay for anaerobic microcosms. *Applied Environmental Microbiology*, Washington, 30: 707-709, 1975.
- O'TOOLE, P. & KNOWLES, R. Efficiency of acetylene reduction (nitrogen fixation) in soil: effect of type and concentration of available carbohydrate. *Soil Biology Biochemistry*, Oxford, 5: 789-797, 1973.
- PARKINSON, J.A. & ALLEN, S.E. A wet oxidation procedure suitable for the determination of nitrogen and mineral nutrients in biological material. *Communication Soil Science Plant Analysis*, New York, 6: 1-11, 1975.
- PATNAIK, S. & RAO, M.V. Source of nitrogen for rice production. In: INTERNATIONAL RICE RESEARCH INSTITUTE. *Nitrogen and Rice*. Los Baños. IRRI. 1979. p. 25-44.

- PATRICK, W.H. & REDDY, K.R. Fate of fertilizer nitrogen in flooded rice. *Soil Science Society American Journal*, Madison, **40**: 678-681, 1976.
- PATRIQUIN, D.G. New developments in grass bacteria associations. In: SUBB RAO, N.S. ed. *Advances in Agricultural Microbiology*. New Delhi, Oxford & IBH. 1982. p. 139-148.
- PEDROSO, B.A. *Arroz Irrigado: obtenção e manejo de cultivares*. Porto Alegre, SAGRA, 1982. 175 p.
- POSTGATE, J.R. Viable counts and viability. In: NORRIS & RIBBONS, D.W. ed. *Methods in Microbiology*. New York, Academic Press Inc. 1969 p. 611-628.
- PROKSCH, G. Routin analysis of  $^{15}\text{N}$  in plant material by mass-spectrometry. *Plant Soil*, Hague, **31**(2): 380-384, 1969.
- REDDY, K.R. & PATRICK, W.H. Jr. Nitrogen fixation in flooded rice. *Soil Science*, Baltimore, **128**: 80-85, 1979.
- REIDERER-HENDERSON, M.A. & WILSON, P.W. Nitrogen fixation by sulfate reducing bacteria. *Journal General Microbiology*, London, **61**: 27-31, 1970.
- RENNIE, R.J. Quantifying dinitrogen fixation in soybeans by  $^{15}\text{N}$  isotope dilution: the question of the nonfixing control plant. *Canadian Journal Botany*, Ottawa, **60**: 856-862, 1982.
- RENNIE, R.J. & RENNIE, D.A. Techniques for quantifying  $\text{N}_2$ -fixation in association with nonlegumes under field and greenhouse conditions. *Canadian Journal Microbiology*, Ottawa, **29**: 1022-1034, 1983.
- REYNAUD, P.A. & ROGER, P.A. Nitrogen fixing algal biomass in Senegal rice field. In: ENVIRONMENTAL ROLE OF NITROGEN FIXING BLUE-GREEN ALGAE AND ASYMBIOTIC BACTERIA. Proceedings.Uppsalla. 1976.

- RINAUDO, G.; BALANDREAU, J.; DOMMEGUES, Y.R. Algal and bacteria non-symbiotic nitrogen fixation in paddy soils. *Plant Soil Special Volume*, Hague, 1971. p. 471-479.
- RINAUDO, G. Fixation biologique de l'azote dans trois types de sol de rizière de Côte d'Ivoire. *Rev. Ecol. Biol. Sol*, 11: 149-168, 1974.
- ROGER, P.A.; REYNAUD, P.A.; MONNIAUX, G. Normalisation des données et calcul de la précision des mesures en microbiologie du sol. *Cahiers Office de la Recherche Scientifique et Technique Outre-Mer serie Biologie*, 8: 171-180, 1978.
- ROSS, P.J.; MARTIN, A.E.; HENZELL, E.F. A gas-tight growth chamber for investigating gaseous nitrogen changes in the soil-plant-atmosphere system. *Nature*, London, 204: 444-449, 1964.
- ROSS, P.J.; MARTIN, A.E.; HENZELL, E.F. Gas lysimetry as a technique in nitrogen studies on the soil-plant-atmosphere system. *Trans. 9th Int. Congr. Soil Sci.*, 2: 487-495, 1968.
- ROUQUEROL, T. Sur l'activité des fixateurs d'azote dans les sols du delta de Comargue. Application d'une technique de mesure de capacité potentielle de fixation. *Annales Agronomiques*, Paris, 15: 599-617, 1964.
- SANO, Y.; FUJI, T.; IYAMA, S. HIROTA, Y.; KOMAGATA, K. Nitrogen fixation in the rhizosphere of cultivated and wild rice strains. *Crop Science*, Madison, 21: 758-761, 1981.
- SCHOLLHORN, R. & BURRIS, R.H. Study of the intermediates in nitrogen fixation. *Federation Proceedings*, Bethesda, 24: 710-715, 1966.
- SILVA, M.F.S. & DOBEREINER, J. Occurrence of *Azospirillum* sp. in soils and roots. In: DOBEREINER, J.; BURRIS, R.H. & HOLLAENDER, A. ed. *Limitations and potentials for biological nitrogen fixation in the tropics*. New York, Plenum Press, 1978. 372 p.

- SINGH, V.P.; WICKHAM, T.H.; CORPUZ, I.Y. Nitrogen movement through Laguma Lake through drainage from rice field. In: JENKINS, S.H. ed. *Progress in water technology*. Birmingham, Pergamon Press. 1977. p. 102-115.
- SMITH, K.A. & RESTALL, S.W.F. The occurrence of ethylene in anaerobic soil. *Journal Soil Science*, 22: 430-443, 1971.
- SMITH, R.L.; SCHANK, S.C.; LITTELL, R.C. The influence of shading on associative N<sub>2</sub> fixation. *Plant Soil*, Hague, 80: 43- 49, 1984.
- STEFANSON, R.C. Sealed growth chamber for studies of the effects of plants on the atmosphere. *Journal Agriculture Engineering Research*, London, 15: 295-301, 1970.
- STUMPE, J.M.; CHRISTIANSON, C.B.; BURESH, R.J. An aluminium block digestion procedure for determination of total N in soil containing <sup>15</sup>N. *Communication Soil Science Plant Analysis*, New York, 16: 1-7, 1985.
- TABUCHI, T.; TAKAMURA, S.; KUBOTA, H.; SUZUKI, S. The water quality and load of rivers during manuring period. *Trans. JSIDRE*, 58: 8-13, 1975.
- THOMAS-BAUZON, D.; WEINHARD, P.; VILLECOURT, P.; BALANDREAU, J. The spermosphere model. I. Its use in growing counting and isolating N<sub>2</sub>-fixing bacteria from the rhizosphere of rice. *Canadian Journal Microbiology*, Ottawa, 28: 922-928, 1982.
- TIROL-PADRE, A. LADHA, J.K.; PUNZALAN, G.C.; WATANABE, I. A plant sampling procedure for acetylene reduction assay to detect rice varietal differences in ability to stimulate N<sub>2</sub> fixation. *Soil Biology Biochemistry*, Oxford, 20(2): 175-183, 1988.
- TJEPKEMA, J.D. & EVANS, H.J. Nitrogen fixation associated with *Juncus balticus* and other plants of Oregon wetlands. *Soil Biology Biochemistry*, Oxford, 8(6): 505-509, 1976.

- TRIVELIN, P.C.O.; SALATI, E.; MATSUI, E. Preparo de amostras para análise de  $^{15}\text{N}$  por espectrometria de massa. Boletim Técnico, BT-002, CENA, Piracicaba, 1973. 41 p.
- TROLLDENIER, G. Influence of some environmental factors on nitrogen fixation in the rhizosphere of rice. *Plant Soil*, Hague, **47**: 203-217, 1977.
- VAN BERKUM, P. & SLOGER, C. Immediate acetylene reduction by excised grass roots not previously preincubated at low oxygen tensions. *Plant Physiology*, Washington, **64**: 739-743, 1979.
- VAN BERKUM, P. & BOHLOOL, B.B. Evaluation of nitrogen-fixation by bacteria in association with roots of tropical grasses. *Microbiological Reviews*, Washington, **44** (3): 491-517, 1980.
- VAN BERKUM P. & SLOGER, C. Physiology of root-associated nitrogenase activity in *Oryza sativa*. *Plant Physiology*, Washington, **69**: 1161-1164, 1982.
- VENTURA, W. & WATANABE, I.  $^{15}\text{N}$  dilution technique of assessing the contribution of nitrogen fixation to rice plant. *Soil Science Plant Nutrition*, Tokyo, **29**: 123-131, 1983.
- VIJAYALAKSMI, K. & PANDALAI, K.M. Nutrient enrichment of the coconut soils of the humid Kerala coast through monsoon precipitations. *Nature*, London, **194**: 112-117, 1962.
- VINCENT, J.M. Potential for enhancing biological nitrogen fixation. In: VOSE, P.B. & BLIXT, S.G. ed. *Crop Breeding - A Contemporary Basis*. Oxford, Pergamon Press. 1984. p. 185-215.
- VLEK, P.L.G. & BYRNES, B.H. The efficacy and loss of fertilizer N in lowland rice. In: DE DATTA, S.K. & PATRICK, W.H. ed. *Nitrogen economy of flooded rice soils*. Dordrecht, Martinus Nijhoff Publishers. 1986. p. 131-147.
- WADA, H. PANICHSAKPATANA, S. KIMURA, M. & TAKAI, Y. Organic debris as microsite for nitrogen fixation. *Soil Science Plant Nutrition*, Tokyo, **25**: 453-456, 1979.

- WALCOTT, J.J.; CHAUVIROJ, M. CHICHEST, A.; CHOTICHEUY, P.; FERRARIS, R.; NORMAN, B.W. Long-term productivity of intensive rice cropping systems on the Central Plain of Thailand. *Experimental Agriculture*, Cambridge, 13: 305-315, 1977.
- WALKER, C.C. & YATES, M.G. The hydrogen cycle in nitrogen-fixing *Azotobacter chroococum*. *Biochimie*, Paris, 60: 225-231, 1978.
- WANI, S.P.; DART, P.J.; UPADHYAYA, M.N. Factors affecting nitrogenase activity ( $C_2H_2$ reduction) associated with sorghum and millet estimated using soil core assay. *Canadian Journal Microbiology*, 29: 1063-1069, 1983.
- WATANABE, I.; LEE, K.K.; ALIMAGNO, B.V.; SATO, M.; DEL ROSARIO, D.C.; GUZMAN, M.R. *Biological nitrogen fixation in paddy field studies by in situ acetylene-reduction assay*. IRRI Research Papers Series, Vol. 3, 1977. 16 p.
- WATANABE, I. Biological nitrogen fixation in rice soils. In: INTERNATIONAL RICE RESEARCH INSTITUTE. *Soil and Rice*. Los Baños. IRRI. 1978. p. 465-478.
- WATANABE, I.; LEE, K.K.; ALIMAGNO, B.V. Seasonal change of  $N_2$  fixing rate in rice field by "in situ" acetylene reduction technique. I. Experiments in long term fertility plots. *Soil Science Plant Nutrition*, Tokyo, 24: 1-13, 1978.
- WATANABE, I. & BARRAQUIO, W.L. Low levels of fixed nitrogen required for isolation of free-living  $N_2$ -fixing organisms from rice roots. *Nature*, London, 277: 565-566, 1979.
- WATANABE, I. & CABRERA, D.R. Nitrogen fixation associated with the rice grown in water culture. *Applied Environmental Microbiology*, Washington, 37: 373-378, 1979.
- WATANABE, I. & CHOLITKUL, W. Field studies on nitrogen fixation in paddy soils. In: INTERNATIONAL RICE RESEARCH INSTITUTE. *Nitrogen and Rice*. Los Baños. IRRI. 1979. p. 223-239.

- WATANABE, I.; BARRAQUIO, W.L.; GUZMAN, M.R.; CABRERA, D.A. Nitrogen-fixing (acetylene reduction) activity and population of aerobic heterotrophic nitrogen-fixing bacteria associated with wetland rice. *Applied Environmental Microbiology*, Washington, 37(5): 813-819, 1979.
- WATANABE, I. & GUZMAN, M.R. Effect of nitrate on acetylene disappearance from anaerobic soil. *Soil Biology Biochemistry*, Oxford, 12: 193-194, 1980.
- WATANABE, I. & FURUSAKA, C. Microbial ecology of flooded soils. *Advances in Microbial Ecology*, 4: 125-168, 1980.
- WATANABE, I. Biological nitrogen fixation associated with wetland rice. In: GIBSON, A. & NEWTON, A. ed. *Current perspectives in nitrogen fixation*. Canberra, Austral. Acad. Sci. 1981. p. 313-316.
- WATANABE, I.; CABRERA, D. A.; BARRAQUIO, W.L. Contribution of basal portion of shoot to N<sub>2</sub>-fixation associated with wetland rice. *Plant Soil*, Hague, 59: 391-398, 1981.
- WATANABE, I. & VENTURA, W. Nitrogen fixation associated with deepwater rice. *Soil Science Plant Nutrition*, Tokyo, 28(4): 553-558, 1982.
- WATANABE, I. BARRAQUIO, W.L.; DAROY, M.L.G. Predominance of hydrogen-utilizing bacteria among nitrogen-fixing bacteria in wetland rice roots. *Canadian Journal Microbiology*, Ottawa, 28: 1051-1054, 1982.
- WATANABE, I. Nitrogen fixation associated with wetland rice plant. In: MALIK, K.A. et alii. *Nitrogen and Environmental*. Faisalabad, Published by NIAB. 1985. p. 185-192.
- WATANABE, I. Nitrogen fixation by non-legumes in tropical agriculture with special reference to wetland rice. *Plant Soil*, Hague, 90: 343-357, 1986.

- WESTCOTT, M.P. & MIKKELSEN, D.S. Comparative effects of an organic and inorganic nitrogen source in flooded soils. *Soil Science Society American Journal*, Madison, 49: 1470-1475, 1985.
- WILLIS, W.H. & GREEN, V.E. Movement of nitrogen in flooded soil planted to rice. *Soil Science Society American Proceedings*, Madison, 13: 229-237, 1948.
- WITTY, J.F. & DAY, J.M. Use of  $^{15}\text{N}_2$  in evaluating asymbiotic N fixation. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. *Isotopes on Biological Dinitrogen Fixation*. Vienna. IAEA. 1978. p. 135-148.
- WITTY, J.F. Acetylene reduction assay can over estimate nitrogen-fixation in soil. *Soil Biology Biochemistry*, Oxford, 11: 209-210, 1979.
- YAMAGUCHI, M. Biological nitrogen fixation in flooded rice field. In: INTERNATIONAL RICE RESEARCH INSTITUTE. *Nitrogen and Rice*. Los Baños. IRRI. 1979. p. 193-204.
- YATAZAWA, M. Cycling of mineral nutrients in agricultural ecosystems. *Agro-ecosystems*, Amsterdam, 4: 177-179, 1977.
- YOSHIDA, T. & ANCAJAS, R.R. Application of the acetylene reduction method in nitrogen fixation studies. *Soil Science Plant Nutrition*, Tokyo, 16(6): 234-237, 1970.
- YOSHIDA, T. & ANCAJAS, R.R. Nitrogen fixation by bacteria in the root zone of rice. *Soil Science American Proceedings*, Madison, 35: 156-158, 1971.
- YOSHIDA, T. & ANCAJAS, R.R. Nitrogen-fixing activity in upland and flooded rice fields. *Soil Science American Proceedings*, Madison, 37: 42-46, 1973.
- YOSHIDA, T. Microbial metabolism of flooded soils. In: PAUL, A. & MACLAREN, A.D. ed. *Soil Biochemistry*. New York, Marcel Dekker, Vol. 3. 1975. p. 83-115.
- YOSHIDA, T.; TAKAI, Y. & ROSARIO, D.C.D. Molecular nitrogen content in a submerged rice field. *Plant Soil*, Hague, 42: 653-660, 1975.



- YOSHIDA, T. & SUZUKI, M. Formation and degradation of ethylene in submerged rice soils. *Soil Science Plant Nutrition*, Tokyo, 21: 129-135. 1975.
- YOSHIDA, T. & YONEYAMA, T. Atmospheric dinitrogen fixation in the flooded rice rhizosphere as determined by the  $^{15}\text{N}$  isotope technique. *Soil Science Plant Nutrition*, Tokyo, 26(4): 551-559, 1980.
- YOSHIDA, S. *Fundamentals of Rice Crop Science*. Los Baños. IRRI. 1981. 269 p.
- YOSHIDA, T. & RINAUDO, G. Heterotrophic  $\text{N}_2$  fixation in paddy soils. In: DOMMERGUES, Y.R. & DIEM, H.G. ed. *Microbiology of Tropical Soils and Plant Productivity*. Hague, Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publishers. 1982. p. 75-107.
- ZAGATTO, E.A.G.; JACINTHO, A.O.; REIS, B.F.; KRUG, F.J.; BERGAMIN FILHO, H.; PESSEDA, L.C.R.; MORTATTI, J.; GINE, M.F. *Manual de análises de planta empregando sistemas de injeção em fluxo*. Piracicaba. CENA. 1981. 45 p.

## APÊNDICE

**Apêndice 1. Produção de matéria seca de diferentes partes e número de perfilhos e panículas de 15 cultivares de arroz inundado crescidos em vasos de 10 litros (12 kg solo.vaso<sup>-1</sup>) durante o primeiro ano de cultivo.**

CULT.	Matéria seca (g.vaso <sup>-1</sup> )		Número.vaso <sup>-1</sup>		
	Palha	Grãos	Perfilhos	Panículas	
IAC-1278	1	58,50	68,15	29	25
	2	79,29	84,01	38	35
	3	100,07	96,70	41	36
	4	67,81	74,57	30	29
	5	65,06	70,45	33	30
IAC-81-318	1	81,79	79,74	28	23
	2	67,23	74,42	24	24
	3	72,49	76,94	26	25
	4	64,74	56,82	25	19
	5	64,89	65,80	27	25
IAC-4440	1	91,97	49,36	42	22
	2	79,72	62,62	40	36
	3	91,44	71,77	44	35
	4	72,37	54,44	37	32
	5	75,98	61,92	36	34
CNA-0721	1	60,51	49,06	26	23
	2	85,75	81,47	41	38
	3	70,62	62,05	33	28
	4	66,82	60,45	29	29
	5	89,24	58,26	37	29
CNA-3852	1	68,11	72,35	39	39
	2	56,86	68,35	35	35
	3	71,51	76,91	38	36
	4	84,61	73,16	40	38
	5	74,68	70,99	39	33
CNA-3879	1	91,79	66,77	38	32
	2	92,65	56,36	45	31
	3	67,46	61,11	30	26
	4	80,58	84,75	32	31
	5	89,58	53,03	35	28
CNA-4215	1	52,38	66,23	40	33
	2	53,81	78,34	35	35
	3	76,00	85,76	37	37
	4	51,26	72,94	35	33
	5	52,33	77,08	39	34

CNA-4501	1	79,67	56,39	34	30
	2	78,58	57,70	38	27
	3	87,92	54,48	37	28
	4	70,93	65,38	30	28
	5	97,40	57,98	31	27
CNA- 4566	1	51,15	76,67	28	28
	2	51,75	78,36	36	30
	3	81,84	81,12	38	36
	4	83,52	94,63	37	35
	5	59,13	63,58	34	30
BR-IRGA-409	1	44,87	71,29	22	22
	2	69,56	83,65	38	33
	3	84,69	85,61	31	31
	4	62,48	69,17	30	26
	5	74,76	80,78	30	30
BR-IRGA-410	1	66,00	72,71	27	26
	2	57,06	74,79	25	25
	3	63,39	78,14	27	27
	4	60,97	77,43	28	28
	5	60,79	76,68	24	24
IR-42	1	72,34	55,40	40	37
	2	84,26	54,58	39	39
	3	70,91	45,16	36	31
	4	70,66	60,01	42	35
	5	86,21	46,90	40	31
IR-58	1	50,02	65,24	48	42
	2	46,91	60,46	43	38
	3	58,13	63,61	51	45
	4	43,78	64,85	45	36
	5	48,68	75,01	47	45
HUA-CHOU	1	81,05	67,03	40	32
	2	105,66	72,84	43	43
	3	91,51	75,75	45	45
	4	91,28	67,31	49	42
	5	103,16	65,53	38	37
CNA-3314	1	57,82	53,60	31	29
	2	63,43	62,12	32	27
	3	65,14	64,87	37	30
	4	63,25	60,27	35	31
	5	66,92	62,85	31	24

---

Apêndice 2. Produção de matéria seca de diferentes partes e número de perfilhos e de panículas de 15 cultivares de arroz inundado crescidos em vasos de 10 litros (12 kg solo.vaso<sup>-1</sup>) durante o segundo ano de cultivo.

CULT.	Rep.	Matéria seca (g.vaso <sup>-1</sup> )			Número.vaso <sup>-1</sup>	
		Palha	Grãos	Raiz	Perfilhos	Panículas
IAC-1278	1	70,35	64,26	40,20	35	33
	2	70,54	73,12	36,10	37	35
	3	20,35	28,12	18,00	34	31
	4	54,96	54,50	23,22	30	30
	5	60,62	51,06	25,35	28	28
IAC-81-318	1	59,62	59,98	25,28	28	27
	2	69,10	64,88	31,53	32	31
	3	82,45	68,16	27,03	33	33
	4	68,71	57,09	28,60	32	32
	5	64,92	61,98	21,74	33	33
IAC-4440	1	25,10	19,29	15,02	23	23
	2	85,40	40,06	25,12	38	38
	3	94,40	64,16	40,58	40	39
	4	80,54	46,06	31,42	45	44
	5	79,71	49,30	35,71	43	40
CNA-0721	1	15,80	17,70	7,51	12	12
	2	70,12	64,80	41,58	53	51
	3	86,98	54,76	40,79	38	35
	4	69,07	65,84	38,44	38	36
	5	51,30	47,98	21,47	30	30
CNA-3852	1	62,10	60,23	32,26	43	43
	2	35,63	35,31	19,93	29	29
	3	69,90	61,71	38,52	42	42
	4	87,70	67,25	44,22	53	52
	5	66,45	55,98	38,76	41	40
CNA-3879	1	67,80	62,54	51,76	45	43
	2	6,68	8,57	4,96	9	9
	3	54,26	53,30	28,55	37	36
	4	63,35	68,45	55,28	42	42
	5	41,65	38,30	23,01	26	26
CNA-4215	1	61,04	58,85	18,34	42	36
	2	64,30	51,80	23,98	40	40
	3	64,25	62,60	31,11	41	41
	4	79,75	63,02	30,30	42	39
	5	63,38	60,67	24,89	36	33

CNA-4501	1	64,58	47,96	24,05	29	29
	2	76,42	49,94	37,41	39	38
	3	86,98	57,09	33,68	35	34
	4	116,73	61,40	38,55	41	40
	5	18,54	10,10	8,77	9	9
CNA-4566	1	12,90	19,16	7,30	15	14
	2	67,10	67,60	43,81	37	35
	3	73,20	67,35	23,87	35	35
	4	69,30	75,36	34,31	41	40
	5	64,48	63,70	26,80	35	34
BR-IRGA-409	1	66,10	61,51	20,50	34	33
	2	60,98	60,51	31,46	28	28
	3	68,25	65,30	31,12	32	30
	4	83,26	60,42	31,80	32	32
	5	74,18	58,21	23,84	34	34
BR-IRGA-410	1	40,95	32,62	24,46	26	24
	2	68,25	69,48	28,42	33	31
	3	59,66	62,94	25,79	32	30
	4	59,67	59,61	26,08	31	29
	5	57,95	51,08	20,43	23	23
IR-42	1	73,80	51,85	28,17	44	44
	2	18,50	11,10	12,74	15	15
	3	59,30	42,32	25,45	40	39
	4	76,68	59,80	41,94	52	52
	5	103,50	36,65	4,01	40	39
IR-58	1	58,36	49,82	16,11	59	59
	2	50,61	56,88	14,10	44	44
	3	53,30	57,56	14,72	50	41
	4	56,85	68,10	21,89	62	62
	5	38,52	44,10	10,72	34	31
HUA-CHOU	1	17,52	7,94	7,85	12	12
	2	78,14	63,70	37,89	46	43
	3	76,62	56,14	27,92	43	41
	4	73,76	60,55	27,73	44	42
	5	68,71	57,09	21,97	44	43
CNA-3314	1	26,90	25,80	13,47	24	24
	2	62,24	61,02	40,35	42	39
	3	9,85	14,62	7,38	11	11
	4	77,80	55,70	32,04	41	41
	5	45,43	35,02	24,23	29	29

---

Apêndice 3. Porcentagem de nitrogênio e átomos % de  $^{15}\text{N}$  em excesso de diferentes partes de 15 cultivares de arroz inundado crescidos em vasos de 10 litros ( $12 \text{ kg solo.vaso}^{-1}$ ) durante o primeiro ano de cultivo.

CULT.	Rep.	Nitrogênio (%)		átomos % $^{15}\text{N}$ em excesso	
		Palha	Grãos	Palha	Grãos
IAC-1278	1	0,62	1,11	0,780	0,844
	2	0,58	0,93	0,838	0,919
	3	0,53	1,01	0,612	0,793
	4	0,67	1,09	0,892	0,924
	5	0,58	1,23	0,892	0,875
IAC-81-318	1	0,71	1,13	0,765	0,809
	2	0,58	1,05	0,766	0,927
	3	0,45	1,25	0,842	0,909
	4	0,59	1,29	0,939	1,018
	5	0,54	1,11	0,922	1,026
IAC-4440	1	0,58	1,19	0,850	0,885
	2	0,53	1,13	0,785	0,846
	3	0,62	1,09	0,842	0,903
	4	0,71	1,21	0,949	0,991
	5	0,50	1,09	0,897	0,946
CNA-0721	1	0,80	1,19	0,912	0,971
	2	0,53	0,99	0,762	0,829
	3	0,58	1,09	0,891	0,935
	4	0,45	1,17	0,917	0,958
	5	0,54	1,17	0,850	0,886
CNA-3852	1	0,67	1,03	0,908	0,820
	2	0,58	1,07	0,631	0,820
	3	0,58	1,07	0,776	0,858
	4	0,58	1,11	0,835	0,915
	5	0,67	1,11	0,752	0,848
CNA-3879	1	0,58	1,05	0,754	0,819
	2	0,58	1,17	0,855	0,901
	3	0,71	1,09	0,929	1,017
	4	0,53	1,05	0,840	0,897
	5	0,75	1,25	0,793	0,849
CNA-4215	1	0,75	1,33	0,756	0,848
	2	0,58	1,03	0,751	0,876
	3	0,58	0,99	0,955	0,954
	4	0,67	1,25	0,901	0,954
	5	0,58	1,03	0,915	1,020

CNA-4501	1	0,75	1,35	0,845	0,899
	2	0,71	1,27	0,818	0,856
	3	0,75	1,30	0,815	0,912
	4	0,62	1,09	0,782	0,833
	5	0,63	1,23	0,838	0,920
CNA- 4566	1	0,67	1,07	0,864	0,998
	2	0,58	1,05	0,700	0,841
	3	0,53	1,11	0,904	1,020
	4	0,67	1,09	0,700	0,837
	5	0,71	1,21	0,866	0,940
BR-IRGA-409	1	0,80	1,27	0,806	0,943
	2	0,67	1,19	0,734	0,872
	3	0,85	1,17	0,674	0,914
	4	0,60	1,13	0,757	0,870
	5	0,50	1,09	0,700	0,881
BR-IRGA-410	1	0,75	1,11	0,669	0,785
	2	0,75	1,35	0,735	0,848
	3	0,60	1,09	0,775	0,848
	4	0,53	0,97	0,844	0,974
	5	0,62	1,09	0,822	0,936
IR-42	1	0,75	1,31	0,793	0,849
	2	0,53	1,15	0,858	0,886
	3	0,75	1,31	0,933	0,977
	4	0,62	1,11	0,835	0,891
	5	0,54	1,32	0,863	0,913
IR-58	1	0,88	1,31	0,801	0,952
	2	1,02	1,23	0,767	0,947
	3	0,88	1,27	0,786	0,961
	4	0,75	1,17	0,804	1,017
	5	0,80	1,32	0,732	0,886
HUA-CHOU	1	0,67	1,01	0,848	0,980
	2	0,53	0,91	0,622	0,764
	3	0,45	1,01	0,695	0,822
	4	0,49	1,05	0,673	0,764
	5	0,49	1,09	0,827	1,016
CNA-3314	1	0,84	1,31	0,831	0,881
	2	0,75	1,11	0,877	0,921
	3	0,71	1,09	0,956	0,988
	4	0,59	1,11	0,889	0,970
	5	0,71	1,19	0,981	0,973

---



Apêndice 4. Porcentagem de nitrogênio e átomos %  $^{15}\text{N}$  em excesso de 15 cultivares de arroz inundado crescidos em vasos de 10 litros ( $12 \text{ kg solo.vaso}^{-1}$ ) durante o segundo ano de cultivo.

CULT.	Rep.	Nitrogênio (%)			átomos % $^{15}\text{N}$ em excesso		
		Parte aérea	Grãos	Raiz	Parte aérea	Grãos	Raiz
IAC-1278	1	0,48	0,83	0,40	0,289	0,359	0,297
	2	0,47	0,77	0,45	0,321	0,368	0,340
	3	0,66	0,81	0,51	0,227	0,299	0,253
	4	0,55	0,74	0,53	0,326	0,388	0,348
	5	0,57	0,68	0,52	0,308	0,373	0,326
IAC-81-318	1	0,48	0,85	0,42	0,270	0,332	0,305
	2	0,69	0,81	0,49	0,319	0,383	0,276
	3	0,49	0,74	0,48	0,313	0,381	0,314
	4	0,54	0,90	0,55	0,316	0,363	0,316
	5	0,54	0,80	0,49	0,313	0,367	0,326
IAC-4440	1	0,57	0,95	0,49	0,313	0,347	0,290
	2	0,55	0,83	0,55	0,263	0,350	0,300
	3	0,54	0,72	0,54	0,308	0,367	0,330
	4	0,52	0,85	0,57	0,340	0,391	0,321
	5	0,47	0,69	0,48	0,339	0,380	0,332
CNA-0721	1	0,66	0,89	0,49	0,280	0,312	0,244
	2	0,67	0,85	0,50	0,287	0,333	0,325
	3	0,63	0,83	0,55	0,303	0,354	0,311
	4	0,60	0,74	0,54	0,347	0,393	0,347
	5	0,54	0,72	0,53	0,279	0,340	0,295
CNA-3852	1	0,51	0,85	0,44	0,287	0,354	0,336
	2	0,74	0,83	0,51	0,270	0,344	0,316
	3	0,46	0,95	0,41	0,309	0,362	0,319
	4	0,54	0,85	0,58	0,294	0,355	0,348
	5	0,52	0,86	0,50	0,274	0,336	0,275
CNA-3879	1	0,58	0,85	0,48	0,335	0,380	0,319
	2	0,92	0,89	0,65	0,212	0,260	0,260
	3	0,75	0,79	0,55	0,293	0,355	0,324
	4	0,59	0,72	0,52	0,326	0,373	0,338
	5	0,67	0,71	0,51	0,266	0,320	0,277
CNA-4215	1	0,44	0,83	0,48	0,294	0,354	0,260
	2	0,56	0,91	0,47	0,325	0,372	0,330
	3	0,50	0,72	0,53	0,275	0,360	0,304
	4	0,47	0,81	0,50	0,338	0,387	0,310
	5	0,54	0,79	0,50	0,324	0,378	0,329

CNA-4501	1	0,44	0,85	0,40	0,301	0,351	0,291
	2	0,40	0,93	0,49	0,342	0,385	0,313
	3	0,49	0,81	0,45	0,338	0,362	0,331
	4	0,47	0,85	0,51	0,321	0,376	0,355
	5	0,66	0,76	0,57	0,267	0,303	0,268
CNA-4566	1	0,70	1,00	0,60	0,257	0,327	0,262
	2	0,58	0,79	0,36	0,332	0,365	0,307
	3	0,48	0,75	0,50	0,272	0,331	0,310
	4	0,54	0,72	0,50	0,285	0,374	0,324
	5	0,56	0,76	0,47	0,336	0,389	0,317
BR-IRGA-409	1	0,63	0,93	0,48	0,276	0,339	0,281
	2	0,67	0,95	0,46	0,311	0,365	0,301
	3	0,65	0,85	0,55	0,314	0,383	0,343
	4	0,72	0,95	0,54	0,302	0,382	0,343
	5	0,78	0,82	0,56	0,241	0,346	0,309
BR-IRGA-410	1	0,73	0,91	0,51	0,252	0,349	0,287
	2	0,51	0,81	0,48	0,291	0,46	0,316
	3	0,63	0,78	0,49	0,306	0,364	0,306
	4	0,58	0,81	0,46	0,277	0,342	0,314
	5	0,67	0,79	0,50	0,297	0,368	0,331
IR-42	1	0,44	0,87	0,47	0,314	0,368	0,309
	2	0,66	1,15	0,46	0,296	0,337	0,288
	3	0,49	0,81	0,37	0,321	0,372	0,364
	4	0,59	0,89	0,53	0,313	0,369	0,355
	5	0,56	0,92	0,46	0,328	0,353	0,331
IR-58	1	0,69	0,97	0,44	0,296	0,358	0,229
	2	0,65	0,93	0,55	0,299	0,377	0,330
	3	0,62	0,91	0,55	0,276	0,365	0,304
	4	0,71	0,91	0,44	0,294	0,367	0,303
	5	0,83	0,91	0,58	0,279	0,347	0,281
HUA-CHOU	1	0,92	1,05	0,60	0,267	0,314	0,251
	2	0,58	0,83	0,58	0,250	0,332	0,270
	3	0,55	0,85	0,55	0,254	0,327	0,297
	4	0,49	0,77	0,66	0,224	0,313	0,252
	5	0,49	0,77	0,60	0,257	0,324	0,314
CNA-3314	1	0,58	0,87	0,39	0,383	0,394	0,360
	2	0,54	0,89	0,46	0,378	0,388	0,356
	3	0,82	1,00	0,54	0,362	0,370	0,331
	4	0,58	0,82	0,58	0,388	0,395	0,367
	5	0,63	0,78	0,49	0,396	0,398	0,385

---

Apêndice 5. Porcentagem de nitrogênio e átomos %  $^{15}\text{N}$  em excesso no solo antes e depois de dois cultivos sucessivos de 15 cultivares de arroz inundado crescidos em vasos de 10 litros (12 kg solo.vaso<sup>-1</sup>).

CULT.	Rep.	Nitrogênio (%)		átomos % $^{15}\text{N}$ em excesso	
		Início	Final	Início	Final
IAC-1278	1	0,133	0,126	0,202	0,111
	2	0,142	0,118	0,166	0,082
	3	0,131	0,135	0,150	0,094
	4	0,141	0,125	0,215	0,095
	5	0,140	0,121	0,180	0,086
IAC-81-318	1	0,140	0,124	0,206	0,116
	2	0,150	0,122	0,186	0,080
	3	0,140	0,132	0,177	0,109
	4	0,135	0,118	0,178	0,103
	5	0,137	0,125	0,149	0,098
IAC-4440	1	0,145	0,118	0,179	0,089
	2	0,141	0,129	0,174	0,103
	3	0,141	0,120	0,167	0,092
	4	0,137	0,125	0,159	0,099
	5	0,148	0,131	0,157	0,092
CNA-0721	1	0,144	0,114	0,222	0,099
	2	0,155	0,129	0,157	0,103
	3	0,144	1,133	0,170	0,127
	4	0,144	0,129	0,199	0,088
	5	0,148	0,130	0,179	0,093
CNA-3852	1	0,138	0,137	0,195	0,112
	2	0,154	0,120	0,144	0,119
	3	0,142	0,123	0,197	0,112
	4	0,131	0,119	0,180	0,103
	5	0,141	0,114	0,169	0,100
CNA-3879	1	0,148	0,118	0,158	0,110
	2	0,142	0,117	0,208	0,103
	3	0,140	0,119	0,187	0,100
	4	0,141	0,124	0,147	0,076
	5	0,141	0,117	0,172	0,085
CNA-4215	1	0,154	0,111	0,171	0,113
	2	0,147	0,133	0,175	0,091
	3	0,172	0,149	0,141	0,091
	4	0,143	0,121	0,175	0,104
	5	0,123	0,119	0,177	0,098

CNA-4501	1	0,144	0,116	0,188	0,097
	2	0,154	0,120	0,172	0,113
	3	0,132	0,124	0,204	0,105
	4	0,133	0,129	0,210	0,113
	5	0,143	0,119	0,174	0,095
CNA- 4566	1	0,148	0,119	0,142	0,095
	2	0,137	0,118	0,235	0,118
	3	0,140	0,124	0,170	0,090
	4	0,141	0,118	0,173	0,107
	5	0,145	0,128	0,134	0,087
BR-IRGA-409	1	0,142	0,124	0,164	0,086
	2	0,151	0,122	0,179	0,079
	3	0,141	0,123	0,186	0,079
	4	0,126	0,119	0,183	0,115
	5	0,135	0,116	0,178	0,086
BR-IRGA-410	1	0,145	0,123	0,153	0,084
	2	0,154	0,138	0,151	0,102
	3	0,143	0,118	0,155	0,102
	4	0,142	0,109	0,185	0,106
	5	0,146	0,120	0,156	0,094
IR-42	1	0,145	0,123	0,134	0,096
	2	0,135	0,118	0,227	0,085
	3	0,135	0,130	0,157	0,108
	4	0,147	0,137	0,185	0,115
	5	0,140	0,119	0,162	0,091
IR-58	1	0,145	0,119	0,182	0,094
	2	0,170	0,140	0,165	0,103
	3	0,141	0,140	0,186	0,099
	4	0,145	0,116	0,161	0,105
	5	0,141	0,119	0,157	0,097
HUA-CHOU	1	0,140	0,118	0,127	0,091
	2	0,140	0,127	0,153	0,093
	3	0,147	0,118	0,230	0,101
	4	0,142	0,122	0,184	0,114
	5	0,145	0,121	0,164	0,100
CNA-3314	1	0,140	0,121	0,218	0,113
	2	0,144	0,120	0,149	0,112
	3	0,145	0,117	0,174	0,084
	4	0,129	0,121	0,195	0,079
	5	0,148	0,121	0,087	0,095

SEM PLANTA	1	0,140	0,122	0,162	0,116
	2	0,151	0,129	0,128	0,127
	3	0,146	0,121	0,173	0,141
	4	0,137	0,124	0,180	0,111
	5	0,140	0,118	0,201	0,123

---