

FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO POR PLANTAS DE COBERTURA CULTIVADAS NA ENTRE-LINHA DE CAFEIEIRO CONILON ORGÂNICO

Fábio Luiz Partelli²; Henrique Duarte Vieira³; José Antonio Azevedo Espindola⁴; Segundo Urquiaga⁴; Eliana Paula Fernandes²; Leandro Pereira Pacheco⁵

¹ Trabalho financiado pela FAPERJ e com apoio da UENF, EMBRAPA Agrobiologia, INCAPER, CNPq, UFG, FUNAPE/UFG, Fulin Laboratório e Jaudermir Bettim

² Professor D.Sc., Universidade Federal de Goiás - UFG, Goiânia-GO, partelli@yahoo.com.br, elianafernandes@agro.ufg.br

³ Professor D.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF, Campos dos Goytacazes-RJ, henrique@uenf.br

⁴ Pesquisador D.Sc., Embrapa Agrobiologia, Seropédica-RJ, jose@cnpab.embrapa.br, urquiaga@cnpab.embrapa.br

⁵ Doutorando, Universidade Federal de Goiás - UFG, Goiânia-GO, leandropacheco@terra.com.br

RESUMO: Objetivou-se, com este trabalho avaliar a fixação biológica de nitrogênio em lavoura de *C. canephora* cv. Conilon, sob manejo orgânico. O experimento foi conduzido no Estado do Espírito Santo - Brasil, em uma lavoura de café orgânico. Os tratamentos constaram de testemunha (ausência de plantas de cobertura), milho (*Pennisetum glaucum*) e as leguminosas feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*), mucuna-anã (*Mucuna deeringiana*) e feijão-guandu (*Cajanus cajan*), com e sem inoculação de rizóbio específico para cada espécie. Efetuaram-se análises químicas de solo e da parte aérea das plantas espontâneas e de cobertura. A fixação biológica de nitrogênio (FBN) foi determinada pela técnica da abundância natural. A FBN contribuiu com cerca de 80% do N acumulado pelas leguminosas, sendo que essa contribuição foi equivalente a 27 - 35 kg N ha⁻¹. Desta forma, as leguminosas podem suprir parte da necessidade de nitrogênio do cafeeiro Conilon. A inoculação com rizóbio não influenciou a ciclagem de nutrientes e FBN.

Palavras-chave: *Coffea canephora*, fixação biológica de nitrogênio, agricultura sustentável.

BIOLOGIC NITROGEN FIXATION BY COVER CROPS CULTIVATED AMONG-LINE OF SOWING ON ORGANIC CONILON COFFEE

ABSTRACT: The objective of this work was to evaluate biological nitrogen fixation in cover crops on organic *Coffea canephora* cv. Conilon. The experiment was performed in an organic coffee plantation at Espírito Santo state, Brazil. The treatments consisted on pearl millet (*Pennisetum glaucum*), leguminous plants: jack bean (*Canavalia ensiformis*) and pigeon pea (*Cajanus cajan*), with and without an specific rhizobium inoculation for each species, and a random without the use of cover crops. The chemical analysis of soil and weeds and cover plants shoot nutrient concentration were also performed. Biological nitrogen fixation (BNF) was determined by the natural abundance technique. BNF contributed with near 80 % of the nitrogen accumulated by the leguminous plants, corresponding to 27 to 35 kg N ha⁻¹ nitrogen contribution of dry biomass. Thus, leguminous plants may supply part of the Conilon coffee nitrogen requirements. Rhizobium inoculation did not influence in nutrient cycling and BNF.

Key words: *Coffea canephora*, biological nitrogen fixation, sustainable agriculture.

INTRODUÇÃO

A produção mundial de café nos últimos anos tem sido superior a 110 milhões de sacas, obtidas principalmente nos países em desenvolvimento (ICO, 2008). O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de café (*Coffea* sp.), gerando divisas e postos de trabalho, além de promover o desenvolvimento rural. Na safra de 2006/2007, a produção nacional foi de 42,5 milhões de sacas, numa área de 2,15 milhões de hectares e com um total de 5,67 bilhões de cafeeiros (Conab, 2007). No ano de 2008, foram exportadas 28 milhões de sacas, o que equivale a, aproximadamente, 65% da produção brasileira e 29% de todo café exportado no mundo (ICO, 2008).

Estima-se que os gastos com fertilizantes e corretivos representem 30% do custo total da produção do cafeeiro. Dos insumos utilizados na cultura do café, aproximadamente, 200 mil toneladas por ano correspondem aos fertilizantes nitrogenados, uma vez que é um dos nutrientes mais exigidos pelas plantas, representando um gasto estimado de cerca de 200 milhões de dólares no Brasil (Embrapa, 2004).

A adoção de práticas conservacionistas, dentre elas a utilização de plantas de cobertura, desponta como uma prática viável. Isso se justifica pois o cultivo de tais espécies favorece a ciclagem de nutrientes e, quando se utilizam leguminosas, também promove, juntamente com bactérias específicas, a fixação biológica do nitrogênio atmosférico (Oliveira et al., 2002; Perin et al., 2004; Alves et al., 2006; Teixeira et al., 2006; Pietsch et al., 2007). Dessa forma, tal prática contribui positivamente para o balanço de N e P (Castro et al., 2004), aumento do estoque de C e N no solo (Bayer et al., 2000) e, conseqüentemente, pode proporcionar aumento na produção das culturas (Kaizzi et al., 2006).

A redução do nitrogênio molecular do ar (N₂) até duas moléculas de amônia (2 NH₃) ocorre por meio da enzima nitrogenase, através de uma série de processos biológicos que catalisam a redução biológica (Rees e Howard, 2000; Santos et al., 2007). Esse processo implica em gastos de energia (Howard e Rees, 1996; Rees e Howard, 2000).

Segundo Reich et al. (2001), a fixação mundial de N pela indústria é superior a 80 milhões de toneladas, enquanto a proveniente da fixação biológica fica em torno de 170 milhões de toneladas (Schlesinger, 1997). Esse valor pode ser influenciado, dentre outros fatores, pela inoculação de estirpes de bactérias apropriadas (Oliveira et al., 2002) e aplicação de adubos fosfatados, pois a baixa disponibilidade de P no solo prejudica a fixação biológica de N₂ (Somado et al., 2006; Oberson et al., 2007). Dessa forma, a melhoria da fertilidade do solo, por meio da ciclagem de nutrientes e substituição e/ou complemento de N com a utilização de plantas fixadoras de N₂, podem levar a produtividades satisfatórias, com menor custo de produção e com maior sustentabilidade.

Apesar da relevância do tema, ainda existe necessidade de maiores estudos sobre a fixação biológica de nitrogênio em lavouras de café Conilon (*C. canephora* cv. Conilon), associado à utilização de plantas de cobertura. Assim, objetivou-se, neste trabalho a fixação biológica de nitrogênio por plantas de cobertura em lavoura de *C. canephora*, sob manejo orgânico.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no município de Jaguaré, Espírito Santo - Brasil, localizado a uma altitude de, aproximadamente, 80 m, com coordenadas 18° latitude Sul e 40° longitude Oeste de Greenwich. A região apresenta clima tropical, com verão quente e úmido e inverno seco. A precipitação média anual é de 1200 mm, sendo que a temperatura nos meses mais frios é superior a 12 °C, enquanto nos meses mais quentes é inferior a 34 °C (Incapar, 2007).

A área experimental consistiu num cafezal formado por *C. canephora* cv. Conilon com 6,5 anos, em espaçamento de 2,0 x 1,5 m, sendo cultivado conforme as normas de produção orgânica (Brasil, 2003). No último ano, foi adubado com 80 g de fosfato natural e 2 kg de composto por cova, correspondendo a 300 kg e 10 m³ ha⁻¹, respectivamente.

As análises químicas e granulométricas do solo foram realizadas de acordo com Silva (1999). O solo coletado no início do experimento apresentou textura franco arenosa, com 79% de areia, 5% de silte e 16% de argila. O solo apresentou pH de 4,82, matéria orgânica igual a 1,07 dag kg⁻¹ e P pelo extrator Mehlich 1, K, Zn, Fe, Mn, Cu e B de 4,52; 40,0; 2,48; 51,6; 17,5; 0,15 e 0,16 mg kg⁻¹, respectivamente. As concentrações de Ca, Mg, Al, H+Al, soma de bases e capacidade de troca catiônica a pH 7 foram de 1,91; 0,55; 0,08; 2,86; 2,62; e 4,49 cmol_c dm⁻³ e saturação de bases de 58,4%.

O delineamento experimental foi de blocos ao acaso, em arranjo fatorial com tratamentos adicionais, com quatro repetições. Os tratamentos constaram de testemunha (sem plantio de plantas de cobertura), milheto (*Pennisetum glaucum* cv. ENA 1) e as leguminosas feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*), mucuna-anã (*Mucuna deeringiana*) e feijão-guandu (*Cajanus cajan*), com e sem inoculação de rizóbio específico para cada espécie.

As covas foram espaçadas 0,4 m umas das outras, em uma única linha por carreira de café, aplicando-se 20 g de fosfato natural por cova (correspondente a 250 kg ha⁻¹). A inoculação das sementes de leguminosas com rizóbio foi realizada em forma de pasta úmida, por ocasião da semeadura. Em seguida, foram colocadas 2 a 6 sementes por cova, para as leguminosas e 20 sementes para o milheto.

A coleta das plantas espontâneas foi realizada aos 76 dias após a semeadura das plantas de cobertura, utilizando-se um retângulo de vergalhão, equivalente a 0,5 m² (1,0 x 0,5 m), o qual foi colocado sempre na direção da 3ª planta de café, entre a linha da planta de cobertura (no meio da carreira de café) e a linha da carreira de café. As coletas de milheto, feijão-de-porco e mucuna-anã também foram realizadas aos 76 dias após o semeio e a do feijão-guandu aos 170 dias, quando as plantas de cobertura estavam em estágio de floração. Foi determinada a matéria fresca correspondente às plantas localizadas nos 5 m centrais da fileira do meio das plantas de cobertura, perfazendo uma área útil de 10 m², ou seja, 5 m de linha por 2 m de largura da carreira do cafeeiro, tendo cada parcela duas carreiras de bordaduras. Sub-amostras, com cerca de 300 g das plantas de cobertura e de plantas espontâneas, foram coletadas em cada parcela e secas em estufa de circulação forçada à temperatura de 65°C até atingir peso constante, visando determinar a matéria seca, concentração e acúmulo de nutrientes e a fixação biológica de N₂ nas leguminosas.

O acúmulo de nutrientes na parte aérea foi obtido pelo produto da matéria seca pela concentração de nutrientes, analisados conforme Silva (1999). A contribuição da FBN nas leguminosas foi calculada pela técnica da abundância natural de ¹⁵N (δ¹⁵N), conforme Shearer e Kohl (1996) e Boddey et al. (2000), com a utilização de um espectrômetro de massa Finniga MAT, modelo Delta Plus Alemanha. A contribuição da FBN foi calculada pela equação: % FBN = 100(δ¹⁵N planta testemunha - δ¹⁵N planta fixadora) / (δ¹⁵N planta testemunha - B), sendo B a proporção de ¹⁵N da planta fixadora crescida em condições de total dependência de fixação biológica de N₂, na qual foi utilizado o valor de -0,9 para feijão-guandu (Boddey et al., 2000) e -1 para feijão-de-porco e mucuna-anã, baseado em outras espécies semelhantes relatadas na revisão feita por Boddey et al. (2000). Como referência das plantas não fixadoras de N₂ foram utilizados o milheto (*Pennisetum glaucum*), picão preto (*Bidens subalternans*) e capim pambuco (*Paspalum maritimum*).

Os procedimentos estatísticos constaram da análise de variância, levando-se em consideração o cálculo de 2 resíduos (um para o fatorial e outro para os tratamentos adicionais). Nas fontes de variação, onde houve diferença significativa, aplicou-se o teste de Tukey (p<0,05) para a comparação de médias.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Por intermédio da análise de variância, foi verificado que a inoculação com estipes de rizóbio proporcionou efeito somente na concentração de ferro na parte aérea do feijão-de-porco (dados não apresentados), apresentando maior valor quando as sementes foram inoculadas ($61,52 \text{ mg}^{-1}\text{kg}$). Possivelmente, esta maior concentração está relacionada ao fato de que no processo de redução do N_2 envolve proteínas ricas em Fe e ter como cofator da nitrogenase a proteína MoFe (Rees e Howard, 2000; Santos et al., 2007). Portanto, a inoculação não exerceu influência direta nas demais variáveis avaliadas, que foram então avaliadas conjuntamente, desconsiderando-se o efeito da inoculação.

As concentrações de N da parte aérea do feijão-de-porco e mucuna-anã foram maiores que os das demais plantas de cobertura (Tabela 1). Normalmente, as leguminosas apresentam altas concentrações de N em seus tecidos vegetais, o que acarreta, depois do seu corte, uma contribuição significativa de N para o sistema solo - planta (Castro et al., 2004; Perin et al., 2004).

Tabela 1 - Concentração de nitrogênio, matéria seca e acúmulo de nitrogênio na parte aérea das plantas de cobertura (PC) no início da floração e das plantas espontâneas (PE), por ocasião do corte das primeiras plantas de cobertura.

Tratamento	N (g^{-1}kg)	MS (kg^{-1}ha)		N (kg^{-1}ha)	
		PC*	PE	PC	PE
Esponthneas**	17,5bc	1217b	1217a	21,2bc	21,2a
Milheto	12,1c	704b	271b	8,4c	4,7b
Feijão-de-porco	29,1a	1343b	413ab	39,3ab	7,2ab
Mucuna-anã	32,6a	1047b	440ab	33,9ab	7,7ab
Feijão-guandu	19,0b	2408a	679ab	44,7a	11,9ab
CV (%)	12,81	32,0	72,9	32,2	74,6

Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

* Houve influência da inoculação apenas para o Fe. ** Sem semeio de plantas de cobertura.

A produção de matéria seca do feijão-guandu foi maior que nos demais tratamentos (Tabela 1) ao considerar o seu potencial máximo, o que pode ser explicado pelo fato de essa espécie haver apresentado o maior período vegetativo (170 dias após a semeadura) em relação às demais plantas de cobertura. No entanto, por ocasião do corte das outras plantas de cobertura (76 dias após a semeadura), essa leguminosa apresentava a menor biomassa entre as leguminosas, com apenas $397 \text{ kg}^{-1}\text{ha}$.

Ao considerar o N contido nos tecidos vegetais da parte aérea das leguminosas somados aos das plantas espontâneas, na mesma área onde se cultivou as leguminosas, percebe-se que a ciclagem total de N foi superior ao tratamento sem plantas de cobertura e a área semeada com milho, corroborando com Castro et al. (2004) e Perin et al. (2004). Além disso, as leguminosas podem proporcionar melhor aproveitamento de adubos nitrogenados e menor perda de N no sistema solo - planta (Ambrosano et al., 2005).

O milho é uma planta com grande potencial de produção de biomassa (Boer et al., 2007). Entretanto, no presente trabalho, apresentou baixa produção de massa seca (Tabela 1), fato que pode estar relacionado à sensibilidade dessa espécie à baixa irradiância (Baligar et al., 2006) ocasionada pelo sombreamento do cafeeiro. Tal comportamento se explica porque o milho apresenta metabolismo C_4 , necessitando de elevada luminosidade para desenvolver todo seu potencial de crescimento.

Os valores de abundância natural de ^{15}N encontrados na parte aérea das leguminosas foram significativamente menores do que as testemunhas não fixadoras empregadas como referência (6,986 ‰), indicando uma grande contribuição da FBN na nutrição nitrogenada das leguminosas em estudo. A porcentagem e quantidade de N nas plantas proveniente da FBN entre as leguminosas não diferiram estatisticamente (Tabela 2). Cerca de 80% do N acumulado pelas plantas foram derivados da FBN, de forma similar aos resultados encontrados por Ramos et al. (2001), Alves et al. (2006) e superior aos relatados por Castro et al. (2004), Perin et al. (2004), Kaizzi et al. (2006), Somado et al. (2006), Teixeira et al. (2006), Oberson et al. (2007), Pietsch et al. (2007).

Tabela 2 - Valores de abundância natural de ^{15}N ($\delta^{15}\text{N}$) das leguminosas usadas na adubação verde e contribuição da fixação biológica de nitrogênio (FBN).

Tratamento	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	FBN (%)	FBN (kg ha^{-1})
Feijão-de-porco	0,4683	81,37	31,82
Mucuna-anã	0,5100	80,51	27,43
Feijão-guandu	0,8367	77,73	34,87
CV (%)	51,18	5,25	27,17

O valor de $\delta^{15}\text{N}$ da planta não fixadora de N_2 foi de $6,9867 \pm 0,8534$, em que se utilizaram 3 repetições de cada uma das espécies: *Pennisetum glaucum*, *Bidens subalternans* e *Paspalum maritimum*. Não houve diferença significativa a 5% de probabilidade pelo teste t.

A FBN contribuiu com 27 a $34 \text{ kg N}^{-1}\text{ha}$ para o sistema de produção, sem considerar a contribuição das

raízes, quantidades que podem ser consideradas modestas, mas essa contribuição depende da produção de biomassa das plantas (Reining, 2005) e pode ser subestimada também pelas perdas de N fixado transferido para o solo ou para outras plantas do consórcio (Sierra e Nigre, 2006). Os elevados valores de FBN podem estar relacionados ao fato de que o solo apresentava baixos valores de N (não adubado com adubos industrializados/solúveis e baixo conteúdo de matéria orgânica) e a boa disponibilidade de água proveniente de chuvas e da irrigação na época de desenvolvimento das plantas, os quais são fatores que favorecem a fixação biológica de N₂ (Hungria e Vargas, 2000; Ramos et al., 2001; Reining, 2005; Teixeira et al., 2006; Pietsch et al., 2007).

A inoculação com estirpes apropriadas de bactérias fixadoras em sementes de leguminosas pode proporcionar um aumento da FBN na ordem de 30% em relação às espécies que não foram inoculadas (Oliveira et al., 2002). Entretanto, no presente trabalho, isso não ocorreu. Tal fato pode estar relacionado com a presença natural do rizóbio na área experimental, uma vez que nos anos anteriores a área já tinha sido cultivada com espécies de leguminosas.

CONCLUSÕES

A FBN contribuiu com cerca de 80% do N acumulado pelas leguminosas, sendo que em função da produção de biomassa seca a contribuição foi equivalente a 27 – 35 kg N ha⁻¹. Desta forma, as leguminosas podem suprir parte da necessidade de nitrogênio do cafeeiro Conilon.

O feijão-de-porco e mucuna-anã apresentaram maior concentração de N e o acúmulo variou entre as plantas de cobertura. A inoculação com rizóbio não influenciou a acumulação de nutrientes e fixação biológica de N.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, B.J.R.; ZOTARELLI, L.; FERNANDES, F.M.; HECKLER, J.C.; MACEDO, R.A.T.; BODDEY, R.M.; JANTALIA, C.P.; URQUIAGA, S. Fixação biológica de nitrogênio e fertilizantes nitrogenados no balanço de nitrogênio em soja, milho e algodão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, p.449-456, 2006.
- AMBROSANO, E.J.; TRIVELIN, P.C.O.; CANTARELLA, H.; AMBROSANO, G.M.B.; SCHAMMASS, E.A.; GUIRADO, N.; ROSSI, F.; MENDES, P.C.D.; MURAOKA, T. Utilization of nitrogen from green manure and mineral fertilizer by sugarcane. **Scientia Agrícola**, v.62, p.534-542, 2005.
- BALIGAR, V.C.; FAGERIA, N.K.; PAIVA, A.Q.; SILVEIRA, A.; POMELLA, A.W.V.; MACHADO, R.C.R. Light intensity effects on growth and micronutrient uptake by tropical legume cover crops. **Journal of Plant Nutrition**, v.29, p.1959-1974, 2006.
- BAYER, C.; MIELNICZUCK, J.; AMADO, T.J.C.; MARTIN-NETO, L.; FERNANDES, S.V. Organic matter storage in a Sandy Clay loam Acrisoleffected tillage and cropping systems in southern Brazil. **Soil & Tillage Research**, v.54, p.101-109, 2000.
- BODDEY, R.M.; PEOPLES, M.B.; PALMER, B.; DART, P.J. Use of ¹⁵N natural abundance technique to quantify biological nitrogen fixation by woody perennials. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v.57, p.235-270, 2000.
- BOER, C.A.; ASSIS, R.L.; SILVA, G.P.; BRAZ, A.J.B.P.; BARROSO, A.L.L.; CARGNELUTTI FILHO, A.; PIRES, F.R. Ciclagem de nutrientes por plantas de cobertura na entressafra em um solo de cerrado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, p.1269-1276, 2007.
- BRASIL. Presidência da República. Casa Civil Sub-chefia de Assuntos Jurídicos. Lei nº 10831 de 23 de dezembro de 2003. Dispõe sobre a agricultura orgânica e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 24 de dezembro de 2003.
- CASTRO, C.M.; ALVES, B.J.R.; ALMEIDA, D.L.; RIBEIRO, R.L.D. Adubação verde como fonte de nitrogênio para a cultura da berinjela em sistema orgânico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, p.779-785, 2004.
- CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento). **3º levantamento de café 2007/2008 - agosto 2007**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/Boletim.pdf>. Acesso em 7 dez. 2007.
- EMBRAPA, Café **Consórcio Brasileiro de Pesquisas e desenvolvimento do café**. 2004, 147p.
- HOWARD, J.B.; REES, D.C. Structural basis of biological nitrogen fixation. **Chemistry**, v.96, p.2965-2982, 1996.
- HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T. Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. **Field Crops Research**, v.65, p.151-164, 2000.
- ICO, International Coffee Organization. **Trade statistics**. Disponível em: http://www.ico.org/coffee_prices.asp. Acesso em 21 fev. 2008.
- INCAPER – Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural. **Caraterização climática do município de Jaguaré**. Disponível em: http://siag.incaper.es.gov.br/jaguare_carac.htm. Acesso em 16 fev. 2007.
- KAIZZU, C.K.; SSALI, H.; VLEK, P.L.G. Differential use and benefits of Velvet bean (*Mucuna pruriens* var. utilis) and N fertilizers in maize production in contrasting agro-ecological zones of E. Uganda. **Agricultural Systems**, v.88, p.44-60, 2006.
- OBERSON, A.; NANZER, S.; BOSSHARD, C.; DUBOIS, D.; MADER, P.; FROSSARD, E. Symbiotic N₂ fixation by soybean in organic and conventional cropping systems estimated by ¹⁵N dilution and ¹⁵N natural abundance. **Plant and Soil**, v.290, p.69-83, 2007.
- OLIVEIRA, A.L.M.; URQUIAGA, S.; DOBEREINER, J.; BALDANI, J.I. The effect of inoculating endophytic N₂-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. **Plant and Soil**, v.242, p.205-215, 2002.

PERIN, A.; SANTOS, R.H.S.; URGUAGA, S.; GUERRA, J.G.M.; CECON, P.R. Produção de fitomassa, acúmulo de nutrientes e fixação biológica de nitrogênio por adubos verdes em cultivo isolado e consorciado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, p.35-40, 2004.

PIETSCH, G. FRIEDEL, J.K.; FREYER, B. Lucerne management in an organic farming system under dry site conditions. **Field Crops Research**, v.102, p.104-118, 2007.

RAMOS, M.G.; VILLATORO, M.A.A.; URQUIAGA, S.; ALVES, B.J.R.; BODDEY, R.M. Quantification of the contribution of biological nitrogen fixation to tropical green manure crops and the residual benefit to a subsequent maize crop using ¹⁵N-isotope techniques. **Journal of Biotechnology**, v.91, p.105-115, 2001.

REES, D.C.; HOWARD, J B. Nitrogenase: standing at the crossroads. **Current Opinion in Chemical Biology**, 4, p.559-566, 2000.

REICH, P.B.; KNOPS, J.; TILMAN, D.; CRAINE, J.; ELLSWORTH, D.; TJOELKER, M.; LEE, T.; WEDINK, D.; NAEEM, S.; BAHAUDDIN, D.; GEORGE, D.; HENDREY, G.; JOSE, S.; WRAGE, K.; GOTH, J.; BENGSTON, W. Plant diversity enhances ecosystem responses to elevated CO₂ and nitrogen deposition. **Nature**, v.410, p.809-812, 2001.

REINING, E. Assessment tool for biological nitrogen fixation of *Vicia faba* cultivated as spring main crop. **European Journal of Agronomy**, v.23, p.392-400, 2005.

SANTOS, P.C.; MAYER, S.M.; BARNEY, B.M.; SEEFELDT, L.C.; DEAN, D.R. Alkyne substrate interaction within the nitrogenase MoFe protein. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.101, p.1642-1648, 2007.

SCHLESINGER, W.H. **Biogeochemistry: an analysis of global change**. 2nd Edition. Academic Press, San Diego, 1997, 443p.

SHEARER, G.; Kohl, D.H. N₂-fixation in field settings: estimations based on natural ¹⁵N abundance. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.13, p.699-756, 1996.

SIERRA, J.; NYGREN, P. Transfer of N fixed by a legume tree to the associated grass in a tropical silvopastoral system. **Soil Biology & Biochemistry**, v.38, p.1893-1903, 2006.

SILVA, F.C. (org). **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. Brasília: EMBRAPA, 1999, 370p.

SOMADO, E.A.; SAHRAWAT, K.L.; KUEHNE, R.F. Rock phosphate-P enhances biomass and nitrogen accumulation by legumes in upland crop production systems in humid West Africa. **Biology and Fertility Soils**, v.43, p.124-130, 2006.

TEIXEIRA, F.C.P.; REINERT, F.; RUMJANEK, N.G.; BODDEY, R.M. Quantification of the contribution of biological nitrogen fixation to *Cratylia mollis* using the ¹⁵N natural abundance technique in the semi-arid Caatinga region of Brazil. **Soil Biology & Biochemistry**, v.38, p.1989-1993, 2006.