



MATHEUS PAES PINTO REZENDE

**FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO EM
PROGÊNIES DE SOJA**

**LAVRAS - MG
2020**

MATHEUS PAES PINTO REZENDE

FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO EM PROGÊNIES DE SOJA

Monografia apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do curso de Agronomia, para a obtenção do título de Bacharel.

Prof. Dr. Adriano Teodoro Bruzi
Orientador (a)

Dr. Karina Barroso Silva
Coorientador (a)

**LAVRAS - MG
2020**

MATHEUS PAES PINTO REZENDE

FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO EM PROGÊNIES DE SOJA

Monografia apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do curso de Agronomia, para a obtenção do título de Bacharel.

Aprovada em 20 de agosto de 2020.

Prof. Dr. Adriano Teodoro Bruzi
Orientador (a)

Dr. Karina Barroso Silva
Coorientador (a)

LAVRAS - MG
2020

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus por toda proteção durante a minha caminhada acadêmica.

Aos meus pais José Carvalho (falecido) e Vera, por todo o apoio incondicional, ensinamentos e inspiração durante todos esses anos.

Ao meu irmão Daniel, pelo companheirismo e parceria durante o curso de Agronomia.

À minha namorada Fabiana, que sempre me incentivou e me ajudou a superar as dificuldades durante essa jornada.

Aos meus amigos do Edifício Alice Alvarenga, por toda amizade e momentos compartilhados.

Ao meu orientador Professor Dr. Adriano Bruzi, pela oportunidade, influência e ensinamentos adquiridos.

À minha coorientadora Dr. Karina Barroso, por me auxiliar na criação deste trabalho.

Ao doutorando João Paulo Carvalho, pela ajuda e disponibilidade para assistir a apresentação deste trabalho.

Aos membros do Pesquisa Soja e G-Soja, por toda amizade e conhecimento compartilhado.

Ao Núcleo de Estudos em Sistema de Plantio Direto (NESPD), por todas as amizades e ensinamentos.

RESUMO

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é um processo complexo que envolve a interação simbiótica entre planta e rizóbio. Como o suprimento de nitrogênio tem um papel crucial no crescimento e desenvolvimento da soja, uma maior capacidade de fixação de nitrogênio seria importante para obtenção de plantas maiores e mais produtivas. A FBN é um processo fundamental para o cultivo da soja, possibilitando o não uso de fertilizantes nitrogenados, que encarecem o custo de produção. Assim, objetivou-se estudar a fixação biológica de nitrogênio em progênies precoces e tardias de soja. Estas provenientes do Programa de Seleção de Cultivares Precoces e do Programa de Seleção de Cultivares para Produtividade, respectivamente. O experimento foi conduzido em casa de vegetação, do Departamento de Ciência dos Solos da Universidade Federal de Lavras, no ano de 2018. Foram utilizadas 24 progênies $S_{0.3}$, sendo estas 12 precoces e 12 tardias. As estirpes utilizadas foram SEMIA 5079, sendo esta, *Bradyrhizobium japonicum* e SEMIA 587, *Bradyrhizobium elkani*. Foi utilizado o delineamento em blocos casualizados, com 4 repetições. Os tratamentos foram representados por duas estirpes e duas testemunhas, sendo elas, sem inoculação e sem inoculação com adição de N. Cada parcela foi composta por um vaso de cinco litros, com duas plantas. Os caracteres avaliados foram: altura de plantas, massa seca de plantas, teor de nitrogênio e massa seca de nódulos. Os dados foram submetidos à análise de variância com auxílio do software R. Observou-se na análise interação significativa para todos os caracteres estudados. Há diferença significativa entre as progênies do Programa de Seleção para Precocidade e do Programa de Seleção para Produtividade quanto para estirpes. O contraste entre as progênies precoces vs tardias foi significativo para todos os caracteres. A interação Progênies x Tratamentos foi significativa para o caráter altura de plantas. A progênie 16 apresentou maior média para todos os caracteres avaliados maximizando assim a capacidade de promover a fixação biológica de nitrogênio.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
2. REFERENCIAL TEÓRICO	9
2.1 A cultura da soja.....	9
2.2 Fixação Biológica de Nitrogênio	10
2.3 Melhoramento da soja visando à Fixação Biológica de Nitrogênio	13
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	17
5. CONCLUSÕES	21
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	22

1. INTRODUÇÃO

A soja é uma das principais culturas no cenário agrícola mundial. O Brasil ocupa a posição de maior produtor dessa cultura, ultrapassando os Estados Unidos na safra 2019/2020, produzindo 120,4 milhões de toneladas em 36,9 milhões hectares plantados (CONAB, 2020). No entanto, a produtividade média de 3270 Kg/ha é abaixo do potencial produtivo das cultivares atuais, o que retrata a necessidade de melhoria das práticas agrícolas para aumentar a eficiência na produção.

A Fixação Biológica de Nitrogênio é o processo capaz de fornecer todo o N necessário para que a soja complete seu ciclo e obtenha altos rendimentos sem a adição de fertilizantes nitrogenados, os quais aumentariam o custo de produção, inviabilizando o cultivo da soja. Além disso, a não utilização destes fertilizantes trazem ganhos ambientais expressivos, como menor poluição dos recursos hídricos decorrentes da lixiviação do nitrato, bem como menos emissão de gases com efeito estufa, como o N₂O (HUNGRIA, 2012).

Para que ocorra a FBN são necessárias várias interações entre hospedeiro (planta) e bactérias fixadoras, chamadas de rizóbios. Além disso, fatores ambientais como disponibilidade hídrica, teor de oxigênio e adubação nitrogenada influenciam na eficiência deste processo. Dessa forma, o sucesso da FBN, no Brasil, resulta da seleção de estirpes compatíveis com as cultivares brasileiras, com alta eficiência na FBN e adaptadas às diferentes condições ambientais em que a soja é cultivada.

No Brasil a pesquisa com inoculantes é altamente tecnicizada, através do controle genético e seleção dos microorganismos de maior eficiência. Contudo, desde os estudos iniciais envolvendo FBN, observa-se que a eficiência do processo é altamente dependente do genótipo da planta (WILSON, 1940). Diversos estudos têm demonstrado diferenças entre cultivares (AGOYI et al., 2016), entre estirpes (SOLOMON, PANT, ANGAW, 2012; ZIMER et al., 2016), bem como, a interação cultivar-estirpe (ARGAW, 2014) para características relacionadas à FBN.

Na literatura existem relatos de que muito embora o incremento na capacidade de FBN não tenha sido alvo dos melhoristas de soja, a seleção para tamanho das sementes, crescimento e desenvolvimento vegetativo das plantas e produtividade pode ter influenciado indiretamente este caráter, já que estão diretamente relacionados com a demanda de nitrogênio pela planta (BALBOA et al., 2018; TAMAGNO et al., 2017). Munõz et al. (2016) compararam a capacidade de FBN entre cultivares comerciais e espécies selvagens, os autores

relatam que os genótipos melhorados apresentaram maior capacidade de fixação biológica de nitrogênio.

Neste contexto, o entendimento do processo de fixação biológica de nitrogênio e de fatores que o controlam é de suma importância tanto para produtores como para pesquisadores (FAGAN, 2007). Sendo assim, objetivou-se estudar a FBN em progênies precoces e tardias visando identificar genótipos e estirpes de *Bradyrhizobium* que maximizem a fixação biológica de nitrogênio em soja.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A cultura da soja

A cultura da soja (*Glycine max* [L.] Merrill) apresenta como centro de origem o leste da Ásia. Segundo Hymowitz (1970), o surgimento da soja se deu inicialmente no nordeste da China em XVII a.C., em seguida, introduzida na Coreia e posteriormente levada para o Japão (PROBST & JUDD, 1973). Apenas em 1712, a soja foi apresentada aos europeus pelo alemão Engelbert Kaempher, após sua ida ao Japão entre 1691 e 1692, para que fosse cultivada pela primeira vez no Jardim Botânico Real, em Kew, na Inglaterra no ano de 1790. Em 1804, foi relatada a primeira referência da cultura nos Estados Unidos, no estado da Pensilvânia (PIPER & MORSE, 1923). O interesse pelo cultivo da soja se deu no fim do século XIX e início do século XX, quando os norte-americanos iniciaram a sua exploração comercial, primeiro como forrageira e, em seguida, como grãos (CÂMARA, 1992).

No ano de 1882, a soja chegava ao Brasil através de Gustavo D'utra, mais precisamente na Bahia, onde foi introduzida experimentalmente. Porém, o seu desempenho não foi satisfatório na região Nordeste do país e sua produção insuficiente, devido ao fato da sensibilidade da soja ao fotoperíodo. Mais adiante, no ano de 1935, o cultivo da leguminosa ganhava expressão nas regiões que possuíam condições climáticas favoráveis, como no Rio Grande do Sul, apresentando resultados de produtividade esperados. Dessa forma, a cultura ganhou importância econômica e despertava o interesse de produtores e demais envolvidos no sistema de produção de grãos, proporcionando um aumento na área plantada e na produção de soja (EMBRAPA, 2011).

Na década de 70, foi quando ocorreu o maior ritmo de expansão da cultura. Nesse período, houve um incentivo para que o agricultor substituísse outras culturas pela soja e para expandir seu território cultivado, motivado pelas altas cotações da soja no mercado internacional (EMBRAPA, 1987). Ainda neste período, a soja se tornou a principal cultura do agronegócio brasileiro, elevando sua produção de 1,5 milhão de toneladas em 1970 para 15 milhões de toneladas em 1979, este incremento está diretamente ligado ao aumento de produtividade que passou de 1,14 t/ha para 1,73 t/ha. Entretanto, o aumento da área passou de 1,3 milhões de ha para 8,8 milhões de ha (APROSOJA, 2014).

A expansão da soja para outras regiões do Brasil continuou nas décadas seguintes e, em 1980, a região Centro-Oeste já era responsável por 20% da produção nacional de soja, passando para mais de 40% na década de 1990 (EMBRAPA, 2013). Esse crescimento da

cultura para outras regiões do Brasil deve-se ao desenvolvimento de cultivares com o período juvenil longo, adaptadas aos ambientes de baixas latitudes (ALMEIDA, 1999). Dessa maneira, possibilitou a expansão do cultivo da soja para as regiões do Cerrado e mais recentemente no MATOPIBA (Maranhão, Tocantins, Piauí e Bahia) (FREITAS, 2011).

Na safra 2018/19, apresentou um crescimento de 2,1% na área plantada, totalizando 35,9 milhões de hectares, conseguindo uma produção de 115 milhões de toneladas em todo país, sendo o segundo maior produtor mundial de soja, atrás dos Estados Unidos (CONAB, 2019). A safra 2019/20, apresenta crescimento na área, sendo 2,7% maior em relação a última safra e a produção atingiu 120,4 milhões de toneladas, tornando-se um recorde na série histórica, ultrapassando os Estados Unidos como maior produtor mundial de soja. (CONAB, 2020).

De acordo com a FAO, é preciso aumentar a produção de alimento em 60% nos próximos 30 anos, para suprir a necessidade da população que será de 9 bilhões de pessoas. Dessa maneira, o atual sistema de produção, é desafiado a produzir cada vez mais e com sustentabilidade, atendendo sempre a necessidade do produtor e a demanda da população.

O complexo soja, isto é, grão, óleo e farelo, é uma das maiores commodities nacionais, sendo matéria prima para diversos produtos para usos industriais, alimentação humana, como óleo, margarina, massas alimentícias, simulados de carne, leite de soja, molhos, entre outros, além da alimentação animal, a qual é representada pela maior parte da destinação da produção. Portanto, a soja se torna a cultura de maior importância econômica para o agronegócio brasileiro (CÂMARA, 2015).

2.2 Fixação Biológica de Nitrogênio

É estimado que para cada 1000 Kg de grãos produzidos a soja necessita de 80 Kg de nitrogênio (N), aumentando a demanda deste nutriente, sendo ele, constituinte dos ácidos nucléicos, da molécula de clorofila, de proteínas, e requerido em maior quantidade pelas plantas. A obtenção de N pela cultura da soja pode ser feita através de quatro fontes, sendo elas, o solo, devido à decomposição da matéria orgânica, pela fixação não biológica, através dos fertilizantes nitrogenados e pelo processo de fixação biológica do nitrogênio atmosférico (FBN) (EMBRAPA, 2007).

O processo de fixação biológica de nitrogênio ocorre pelo estabelecimento de uma relação simbiótica entre a planta de soja e bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico,

principalmente das espécies *Bradyrhizobium japonicum* e *Bradyrhizobium elkanii*, sendo chamados, de maneira geral, de rizóbios. Estas bactérias são responsáveis pela formação de órgãos diferenciados e protegidos denominados de nódulos, são nestas estruturas, localizadas nas raízes das plantas, onde as bactérias ficam alojadas e realizam o processo de FBN (EMBRAPA, 2007).

A simbiose entre a soja e as bactérias não é obrigatória. A planta pode se desenvolver e completar seu ciclo de vida sem qualquer associação com os rizóbios, estes também ocorrem como organismos de vida livre no solo. Entretanto, sob condições limitantes de nitrogênio, os simbioses procuram uns aos outros, por meio de uma troca de sinais. Dessa maneira, existem genes específicos entre a planta hospedeira e organismos simbioses, sendo estes, chamados genes *nod*, os quais diferem entre as espécies de rizóbios e determinam a faixa de hospedeiros (TAIZ & ZEIGER, 2013).

Primeiramente, para o estabelecimento da relação simbiótica entre bactéria fixadora de nitrogênio e seu hospedeiro, deve ocorrer à migração da bactéria em direção às raízes da planta. Essa migração é uma resposta mediada por atrativos químicos que são secretados pelas raízes, sendo eles, isoflavonoides e betaínas, responsáveis por ativarem a proteína NodD no rizóbio, esta que irá induzir outros genes *nod* a codificar as proteínas de nodulação, a qual está envolvida na produção de fatores Nod (TAIZ & ZEIGER, 2013).

A infecção e organogênese do nódulo ocorrem simultaneamente. As bactérias se aderem aos pelos das raízes e induzem o enrolamento das células dos mesmos, devido aos fatores Nod liberados por ela, dando início ao processo de infecção. Posteriormente, ocorre a formação de um canal de infecção e o desenvolvimento do nódulo, onde as bactérias se diferenciam em bacterióides fixadores de nitrogênio (TAIZ & ZEIGER, 2013).

A enzima que catalisa a fixação do N_2 é a nitrogenase, formada por duas unidades proteicas, a Ferro-proteína (Fe-proteína) e a Molibdênio-Ferro-proteína (MoFe-proteína), responsáveis pela fixação de nitrogênio no nódulo. Porém, para que essa fixação ocorra, são necessárias condições anaeróbicas para a atuação da enzima nitrogenase. Para isso, os nódulos possuem heme proteínas, denominadas leghemoglobinas, que apresentam alta afinidade com O_2 . Sua função é aumentar a taxa de transporte do oxigênio para a respiração das células bacterianas simbióticas, levando à redução dos níveis de oxigênio na célula infectada. A atividade da leghemoglobina pode ser observada pela coloração rósea no interior do nódulo, caracterizando-o ativo (TAIZ & ZEIGER, 2013).

No processo de fixação biológica de nitrogênio, ocorre a reação de redução do N_2 atmosférico em amônia (NH_3), tornando disponível o nitrogênio às plantas. Este em contato

com o substrato aquoso do citoplasma dos bacterióides é transformado em NH_4 (amônio). Entretanto, o acúmulo de NH_4 inibe a fixação de nitrogênio dentro dos bacterióides, apresentando um efeito tóxico. Para isso, as enzimas glutamina sintetase (GS) e a glutamato sintase (GOGAT) convertem o NH_4^+ em aminoácidos, sendo as principais percussoras da reação de assimilação (FAGAN et al., 2007). Em soja, aproximadamente 90% do N total presente na seiva do xilema é translocado na forma de ureídeos em direção à parte aérea da planta, onde passa a participar do metabolismo nitrogenado (IPNI, 2014).

Com isso, estima-se que processo biológico contribua com cerca de 65% de todas as entradas de N na Terra, 50% dessa entrada, deve-se somente à fixação biológica do N_2 pela simbiose de rizóbios com leguminosas. Portanto, a FBN e o uso adequado dela, favorece a agricultura moderna, visando máximas produtividades, com a melhor relação custo/benefício e redução do impacto ambiental, principalmente pelo uso de fertilizantes nitrogenados (EMBRAPA, 2007).

O reservatório de N no solo está presente na matéria orgânica, sendo esse, limitado e podendo ser esgotado rapidamente. Com as condições de temperatura e umidade do Brasil, os processos de decomposição da matéria orgânica do solo e as perdas de N por volatilização e lixiviação, resultam em solos pobres desse nutriente, podendo fornecer, em média, 10 a 15 Kg de nitrogênio por cultivo, muito abaixo da necessidade das culturas dentro do sistema de produção, fazendo da FBN, o processo fundamental no cultivo da soja (EMBRAPA, 2007).

A adubação nitrogenada em soja ainda é uma prática adotada por muitos produtores, porém não se mostrando efetiva e economicamente viável. Segundo Hungria (2006), a aplicação de fertilizante nitrogenado em R2 (florescimento pleno) ou R4 (vagem completamente desenvolvida) prejudicou as atividades dos nódulos que ainda estavam ativos, diminuindo a FBN e rendimento de grãos de soja. A aplicação de N na semeadura também não se mostrou efetiva, muito pelo contrário, o ambiente pobre em N estimulava as plantas a formarem mais nódulos e iniciarem o processo de fixação de forma antecipada. De acordo com Mendes (2008), a soja não obteve resposta à utilização de sulfato ou nitrato de amônio, nos estádios reprodutivos, em 13 experimentos dos 15 conduzidos em sete anos, os quais nenhum apresentou retorno econômico (FUNDAÇÃO MT, 2019).

A eficiência do uso do fertilizante nitrogenado pelas plantas, é baixa, chegando ao máximo a 50%, ocorrente das perdas por lixiviação e volatilização, principalmente. Portanto, para o uso de fertilizantes nitrogenados, considerando o preço do N a R\$4,00/Kg, podendo chegar a uma necessidade de 400 Kg de N por hectare, é um fator de risco econômico para o produtor que visa rentabilidade. Entretanto, considerando o custo de produção variável da soja

em diversas regiões do país, o inoculante representa menos de 0,30% desses gastos, podendo chegar a até R\$10,00 por hectare, tornando assim, a opção mais rentável para o produtor (FUNDAÇÃO MT, 2019).

Porém, são necessárias boas práticas de inoculação e de manejo do solo para garantir a eficiência da simbiose e que esta não seja afetada por fatores abióticos, como temperatura, acidez e déficit hídrico (EMBRAPA, 2007). Segundo Hungria (1997) o plantio direto proporciona o aumento do número de células de *Bradyrhizobium* e da eficiência no processo de fixação de N₂, quando comparado ao plantio convencional. O não revolvimento do solo e a permanência de resíduos vegetais favorecem a manutenção de agregados do solo, maiores teores de umidade, maior disponibilidade de fontes de carbono, redução das temperaturas máximas do solo e menores oscilações de temperatura (Bragagnolo & Mielniczuk, 1990; Morote et al., 1990; Derpsch et al., 1991), contribuem para um ambiente favorável ao *Bradyrhizobium* e à simbiose.

2.3 Melhoria da soja visando à Fixação Biológica de Nitrogênio

Para a obtenção de produtividades máximas, é necessário a utilização de práticas culturais avançadas e cultivares melhoradas. Todavia, com a crescente produção de alimentos, é evidente a necessidade do melhoramento de plantas para viabilizar um maior incremento de produtividade, tornando-se o objetivo principal da maioria dos melhoristas. Para a cultura da soja, a seleção de genótipos com elevada produtividade de grãos e capacidade de adaptação ambiental é o principal objetivo dos programas de melhoramento de plantas.

A seleção visando o aumento da fixação biológica de nitrogênio depende do entendimento dos fatores genéticos e ambientais que afetam os caracteres morfológicos associados com a fixação de N₂. Bohrer e Hungria (1998) encontraram alta correlação entre massa seca de nódulos (MSN) e nitrogênio total da planta, além disso, a massa de parte aérea seca (MPAS) também apresentou correlação com N₂ fixado. De maneira análoga, Sousa (2008) estimou correlações altas entre os caracteres MSN e NN (número de nódulos) e MPAS e nitrogênio total da planta. Portanto, estes autores sugerem que, os caracteres MSN e MPAS representam boas estimativas da FBN (SANTOS, 2009).

A produção de grãos também apresenta uma alta correlação com a FBN, estudos feitos por Ronis et al. (1985), mostraram que linhagens consideradas de alta capacidade de FBN, apresentaram maior massa total da planta e maior produção de grãos. Greder, Orf e Lambert (1986) estimaram correlações altas entre MSN e produção de grãos em três populações F_{3.5} e

F_{3:6}. Outro estudo, feito por Burias e Planchon (1992), foram encontrados valores de correlação da produtividade com quantidade de N₂ fixado, MSN e volume dos nódulos em linhas F₄, a população foi avançada até F₆ e novas avaliações foram feitas e apresentaram um acréscimo de 20 a 30% na FBN (SANTOS, 2009).

Alguns países desenvolveram programas específicos para o melhoramento da FBN em soja, como Austrália e Estados Unidos. O programa australiano explorou a variação natural de tolerância ao nitrato, porém, os materiais não superam a produtividade de linhagens do programa principal de melhoramento. Os Estados Unidos apresentam estirpes de *Bradyrhizobium sp.* bem estabelecidas em seus solos, altamente competitivas, mas pouco eficientes no processo de FBN. Dessa forma, existe uma busca por alternativas que possibilitem o desenvolvimento de cultivares capazes de nodular especificamente com estirpes eficientes dos inoculantes. Entretanto, alguns programas de melhoramento na África exploram o desenvolvimento de linhagens mais produtivas e de nodulação promíscua, capazes de nodular com rizóbios nativos presentes nos solos africanos (SANTOS, 2009).

No Brasil, por determinação de uma comissão formada em 1963, os programas de melhoramento passaram a omitir a fertilização nitrogenada e a inocular as plantas com as estirpes recomendadas. Muñoz et al. (2016) obteve resultados fisiológicos e genômicos para apoiar a hipótese de que uma melhoria na capacidade da FBN se formou no processo de domesticação da soja, ao evidenciar que os genótipos melhorados apresentam maior capacidade de fixar o nitrogênio atmosférico. Nesse sentido, o sucesso da fixação biológica de nitrogênio no país deve-se à inoculação das sementes com estirpes eficientes de *Bradyrhizobium sp.* e favorecida pela condução dos programas de melhoramento em solos pobres em N. Dessa forma, a FBN é apontada como um dos fatores responsáveis pelo sucesso do cultivo da soja no país. (SANTOS, 2009).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local do experimento

O experimento foi conduzido em casa de vegetação do Departamento de Ciência do Solo, da Universidade Federal de Lavras, no ano de 2018.

3.2 Progênies utilizadas

Foram utilizadas 24 progênies S_{0:3} oriundas do Programa de Melhoramento de Soja da Universidade Federal de Lavras. Sendo estas 12 progênies do Programa de Seleção para Precocidade e 12 do Programa de Seleção para Produtividade.

3.3 Estirpes utilizadas

Foram utilizadas duas estirpes de *Bradyrhizobium spp.*, que são aprovadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para uso como inoculante em soja.

As estirpes utilizadas foram SEMIA 5079, sendo esta, *Bradyrhizobium japonicum* da Embrapa Cerrados e SEMIA 587, *Bradyrhizobium elkani* da FEPAGRO/UFRGS/Embrapa Cerrados.

3.4 Condução do experimento e parâmetros avaliados em casa de vegetação

Foi utilizado o delineamento em blocos casualizados, com quatro repetições, 24 progênies, duas estirpes de *Bradyrhizobium spp.* e duas testemunhas, sendo elas, sem inoculação (I); sem inoculação, com N na concentração recomendada para a soja (II).

Inicialmente, foi realizada a coleta do solo, do subsolo em latossolo vermelho distrófico, em área onde não houve cultivo de leguminosa. Posteriormente, o mesmo foi seco ao ar, destorroado e peneirado, para a realização da mistura com areia na proporção 2:1 (duas partes de areia para uma de solo). Os vasos utilizados foram PL 24 com volume de 5 litros. A adubação foi realizada de acordo com as recomendações de Sediya, Silva e Borém (2015).

As sementes utilizadas foram desinfestadas com álcool a 80% e hipoclorito de sódio a 10%, lavadas com água deionizada e plantadas. Em cada vaso, foram semeadas seis sementes e a inoculação realizada com 1 ml de inóculo por semente para os tratamentos inoculados. Para os tratamentos com aplicação de N foram seguidas as recomendações da INSTRUÇÃO NORMATIVA DAS Nº 13 (BRASIL, 2011). Após a germinação, foi realizado o desbaste, deixando duas plantas por vaso.

A irrigação foi realizada manualmente duas vezes ao dia (manhã e tarde), com água destilada, até atingir a capacidade de campo.

O controle de insetos praga foi feito com inseticidas dos grupos químicos Neonicotinóide, Piretróide e Clorpirifós, de acordo com a necessidade de controle. O uso de controle químico de plantas daninhas não foi necessário e não foi realizada aplicação de fungicida.

No florescimento pleno, estágio R2, foi realizado um corte das plantas, no ponto de inserção dos cotilédones, onde foram separadas raízes de parte aérea e avaliados os seguintes caracteres:

- Altura de plantas: Obtida por meio de uma régua aferida e disposta ao lado da planta, sendo obtido o valor da distância do solo até o ápice da planta (cm);
- Massa seca de plantas: Obtida pela pesagem das duas plantas da parcela, após secagem em estufa a 65°C.
- Teor de nitrogênio: As partes aéreas das plantas foram secas em estufa a 65°C até atingirem peso constante e moídas para se realizar a análise de teor de N.
- Massa seca de nódulos: Os nódulos foram separados das raízes, secos em estufa a 65°C e pesados.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância com o auxílio do software computacional R Development Core Team (2016), considerando o modelo:

$$y_{ij} = \mu + g_i + a_j + ga_{ij} + e_{ij}$$

em que:

y_{ij} : observação da parcela que recebeu a progênie i no tratamento j ;

μ : constante associada a todas as observações;

g_i : efeito da progênie i ;

a_j : efeito do tratamento j ;

ga_{ij} : efeito aleatório da interação progênie i com o tratamento j ;

e_{ij} : erro experimental aleatório associado à observação y_{ij}

Para aferir a qualidade experimental, foram estimados o coeficiente de variação (CV%) e acurácia seletiva proposta por Resende & Duarte (2007).

A acurácia seletiva foi determinada pelo seguinte estimador (RESENDE; DUARTE, 2007):

$$r_{gg} = \sqrt{1 - \frac{1}{F}}$$

em que:

F: F de Snedecor calculado para os genótipos

Por sua vez, os coeficientes de variação (CV%) foram estimados por:

$$CV(\%) = \frac{\sqrt{\sigma_E^2}}{\bar{Y}} * 100$$

em que:

σ_E^2 : variância ambiental;

\bar{Y} : média fenotípica geral.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A precisão experimental é fundamental para a confiabilidade de qualquer tipo de pesquisa. Dessa forma, esta precisão é aferida pelo coeficiente de variação (CV), a qual é considerada ótima quando inferior a 10%, boa entre 10 a 20%, regular quando de 20 a 30% e ruim quando superior a 30% (PIMENTEL GOMES, 2009). Nesse sentido, as estimativas de CV são consideradas: ótima para o caráter massa seca de nódulos (MSN), boa para altura (ALT) e teor de nitrogênio (TN) e ruim para massa seca de parte aérea (MSP) (Tabela 1).

A acurácia seletiva é um dos parâmetros mais relevantes para a avaliação da qualidade de um experimento. Sendo assim, quando feita a adoção desta ferramenta, o efeito da média é suprimido sendo uma das principais vantagens na adoção da acurácia seletiva (RESENDE; DUARTE, 2007). Desta forma, o caractere ALT apresentou acurácia muito alta, para os caracteres MSP, TN e MSN a acurácia foi alta (Tabela 1).

A análise de variância para os caracteres altura de planta, massa seca de parte aérea, teor de nitrogênio e massa seca de nódulos estão apresentados na tabela 1. Observou-se diferenças significativas ao nível de 1% de probabilidade entre as progênies (Pr), estirpes (Es) e o contraste entre progênies precoces e produtividade (PREC vs PROD), para todos os caracteres avaliados. Considerando o desdobramento da fonte de variação progênie em precoce e produtividade, observa-se diferença significativa para o caractere ALT ($p \leq 1\%$) e para os caracteres MSP e MSN ($p < 5\%$). Portanto, é possível concluir que existe diferença entre as progênies, quanto a capacidade de FBN.

Por seu turno, a interação Progênes x Estirpes foi significativa a 1% de probabilidade para os caracteres altura de plantas e teor de nitrogênio, além do caráter MSN que apresentou significância a 5%. Indicando assim, comportamento não coincidente das progênes quando avaliada nas diferentes estirpes e tratamentos de inoculação.

Tabela 1. Resumo da análise de variância referente à avaliação de progênes e tratamentos de inoculação conduzidos em Lavras – MG.

FV	GL	QM			
		ALT	MSP	TN	MSN
Progênes (Pr)	23	147,05**	3,25**	0,82**	0,02**
Precocidade	11	16,66**	2,26*	0,33	0,03*
Produtividade	11	140,02**	2,58*	0,21	0,02*
PREC vs PROD	1	1658,69**	21,40**	12,91**	0,06**
Estirpes (Es)	3	469,63**	153,16**	10,50**	7,50**
Pr*Es	69	18,12**	1,47	0,38**	0,01*
Erro	285	9,16	1,29	0,19	0,01
Fc		16,04	2,52	4,32	2,27
CV (%)		13,11	32,44	14,00	8,02
Acurácia (%)		96,83	77,66	87,66	74,79
Média Geral		23,09	3,50	3,12	1,42

FV: fonte de variação; GL: graus de liberdade; Fc: F calculado; CV: Coeficiente de variação; ALT: altura de planta; MSP: massa seca de parte aérea; TN: teor de nitrogênio; MSN: massa seca de nódulos. *Significativo a 5% de probabilidade. **Significativo a 1% de probabilidade. Fonte: Do autor (2020).

As médias fenotípicas dos tratamentos inoculados, com adição de N e sem inoculação e sem N são apresentados na tabela 2. Os tratamentos com adição de N apresentaram maiores médias para os caracteres ALT, MSP e TN. Uma possível explicação para este fato, está pautada na possibilidade de o nitrogênio estar mais prontamente disponível do que nos tratamentos inoculados ou nos pouquíssimos casos que isso foi verificado, este incremento com a adição de N está relacionado a alguma condição de estresse abiótico que limitou a FBN (FUNDAÇÃO MT, 2019). Por outro lado, para o caráter MSN, os tratamentos com adição de N apresentaram as piores médias mesmo em comparação com o tratamento sem inoculante e sem N. Este fato deve-se à redução da eficiência da bactéria para fixar o N atmosférico, por conta do uso do fertilizante nitrogenado. Isso já era esperado, pois segundo Saturno (2012), ao avaliar o efeito da adição de N sobre a fixação biológica de nitrogênio em soja, a massa de nódulos foi a característica mais influenciada negativamente pela adição de N. Hungria (2006) também evidenciou uma drástica redução na massa seca de nódulos ao aplicar 200 Kg de N em soja. Bizarro (2004), também constatou uma redução da massa de nódulos quando os valores de nitrogênio mineral do solo superaram 12 mg/Kg. De maneira análoga, Nogueira et

al. (2010), ao avaliar o efeito de diferentes doses de adubação nitrogenada sobre a nodulação de plantas de soja, verificou que o desenvolvimento vegetativo das plantas é positivamente afetado nas doses de N.

Tabela 2. Médias fenotípicas dos tratamentos inoculados, com aplicação de N (Ad. N) e sem inoculação e sem N (Sem N/I) para os caracteres avaliados em Lavras – MG.

	Progênes	ALT	MSP	TN	MSN
Tardias	16	31,45 a	3,87 a	3,35 a	1,45 a
	23	30,85 a	2,91 b	3,19 a	1,40 b
	20	26,44 b	3,83 a	3,34 a	1,47 a
	24	24,99 c	3,38 b	3,06 b	1,41 b
	18	24,07 c	3,37 b	3,24 a	1,41 b
	17	24,00 c	3,25 b	3,28 a	1,41 b
	22	23,86 c	3,45 b	3,36 a	1,36 b
	19	23,65 c	3,06 b	3,23 a	1,37 b
	21	23,50 c	2,91 b	3,28 a	1,40 b
	15	23,35 c	2,44 b	3,37 a	1,35 b
	13	23,11 c	3,15 b	3,36 a	1,38 b
	14	22,71 c	3,52 b	3,34 a	1,45 a
	Precoces	9	22,60 c	4,01 a	2,87 b
12		22,22 c	4,28 a	3,01 b	1,41 b
7		22,21 c	3,89 a	2,88 b	1,44 b
8		22,03 c	3,99 a	2,95 b	1,48 a
4		21,16 d	3,35 b	3,00 b	1,36 b
10		20,67 d	4,05 a	2,67 b	1,54 a
1		20,58 d	3,74 a	2,85 b	1,39 b
3		20,55 d	3,39 b	3,09 b	1,43 b
11		20,46 d	4,11 a	2,81 b	1,47 a
5		20,17 d	3,60 a	3,07 b	1,43 b
6		20,01 d	3,21 b	2,80 b	1,40 b
2		19,44 d	3,19 b	3,17 a	1,42 b

Tratamentos					
	Ad. N	24,64 a	5,09 a	3,41 a	1,03 d
	SEMIA 5079	24,37 a	3,71 b	3,28 b	1,58 b
	SEMIA 587	23,49 b	3,14 c	3,11 c	1,66 a
	Sem N/I	19,85 c	2,05 d	2,65 d	1,40 c

As médias seguidas pela mesma letra nas colunas pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott a 95% de confiabilidade. ALT: altura de plantas (cm); MSP: massa seca de parte aérea (gramas/planta); TN: teor de nitrogênio (%); MSN: massa seca de nódulos (gramas/planta). Fonte: Do autor (2020).

Os tratamentos com inoculação da estirpe SEMIA 5079 apresentou melhores resultados para os caracteres ALT, MSP e TN, quando comparada à estirpe SEMIA 587. Por outro lado, esta última apresentou maiores médias de MSN em comparação à estirpe SEMIA 5079. Nesse sentido, Mendes (2000), ao avaliar o estabelecimento de estirpes de

Bradyrhizobium japonicum e *Bradyrhizobium elkanii*, constatou a capacidade competitiva elevada da estirpe do sorogrupo 566 (SEMIA 5079), mesmo em áreas não inoculadas com estas estirpes. Portanto, este fato pode explicar as melhores médias para os caracteres ALT, MSP e TN para o tratamento com a estirpe SEMIA 5079 (EMBRAPA, 2000). Por outro lado, Bizarro (2008) observou que as estirpes de *B. elkanii* são mais competitivas, predominando na ocupação nodular, comparadas com *B. japonicum*. Corroborando os resultados obtidos no presente estudo.

Considerando a média fenotípica das progênes para o caráter massa seca de nódulos (tabela 2), as progênes tardias 14, 16 e 20 apresentaram os melhores resultados, juntamente com as progênes precoces 8, 10 e 11. Contudo, para o caráter massa seca de parte aérea (MSP), a maioria das progênes precoces apresentaram as maiores médias, sendo elas 1, 5, 7, 8, 9, 10, 11 e 12, além das progênes tardias, genótipos 16 e 20. Uma possível explicação para este resultado pode ser o fato da capacidade de as progênes precoces converterem o nitrogênio disponível em matéria seca de parte aérea. Este mesmo caráter foi utilizado na avaliação de Bizarro (2008), o qual observou melhores resultados de MSP em uma cultivar precoce, em comparação com uma tardia.

Nesse sentido, Bohrer e Hungria (1998) verificaram diferenças marcantes entre as cultivares quanto ao potencial de nodulação e fixação de nitrogênio, e constataram que a quantificação da massa seca da parte aérea é um bom parâmetro para a seleção das simbioses mais promissoras. Souza et al. (2008) também constatou que os dados das massas dos nódulos e da parte aérea são adequados para avaliar o crescimento e o desempenho simbiótico.

O caráter teor de nitrogênio, foi maior para 11 progênes tardias, apenas a progênie 24 não apresentou média elevada em relação às demais. A progênie 2 foi a única com melhores médias entre as precoces. Alves et al. (2003) descrevem que tanto a matéria seca da parte aérea, quanto o nitrogênio total acumulado no tecido tendem a ser maiores à medida que a FBN tenha sido mais eficiente. Nesse sentido, trabalhos evidenciam que genótipos de soja tardios, foram superiores na fixação de N₂ quando comparada a genótipos precoces. Estas diferenças podem ser atribuídas em grande parte à maior biomassa adquirida pela planta (BUSHBY e LAWN, 1992) e maior duração de crescimento e desenvolvimento no campo (EAGLESHAM et al. 1982). Resultados semelhantes também foram obtidos por Argaw (2014), ao testar três estirpes de *Bradyrhizobium* e seis genótipos de soja com diferentes grupos de maturação.

A progênie 16 foi a única que apresentou as melhores médias para todos os caracteres avaliados, sugerindo uma alta capacidade de FBN.

Incrementos de nitrogênio proveniente da FBN foram evidenciados por Muñoz et al. (2016), indicando que a domesticação e seleções humanas podem ter levado a uma melhoria do crescimento geral da soja, o qual pode ser resultado do aumento do nitrogênio fixado. Estes incrementos, dependem também do genótipo das estirpes bacterianas e diferenças quantitativas devem-se, em grande parte, mais a interações planta-bactéria do que aos efeitos genéticos atribuídos individualmente aos genótipos das plantas ou dos rizóbios (MYTTON, 1984). Além disso, a homogeneização dos genótipos bacterianos, que se dá pela seleção e veiculação das melhores estirpes, pode favorecer os programas de melhoramento que visam o aumento da FBN (SANTOS, 2009). Dessa forma, é necessário compreender os fatores genéticos e ambientais que afetam os parâmetros estudados nesse trabalho e a simbiose entre planta e bactéria.

5. CONCLUSÕES

A progênie 16 apresenta maior média para todos os caracteres avaliados maximizando assim a capacidade de promover a fixação biológica de nitrogênio.

A estirpe SEMIA 5079 apresenta melhores resultados para os caracteres altura de plantas, massa seca de plantas e teor de nitrogênio. Por seu turno, para o caráter massa seca de nódulos a estirpe SEMIA 587 é superior em relação à SEMIA 5079.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOYI, E. E. et al. Mode of inheritance of promiscuous nodulation and combining abilities in soybean genotypes. **International Journal of Agronomy and Agricultural Research (IJAAR)**, v. 9, n. 1, p. 73-82, 2016a.

AGOYI, E. E. et al. **Screening soybeans genotypes for promiscuous symbiotic association with Bradyrhizobium strains.** **African Crop Science Journal**, v. 24, n. 1, p. 49–59, 2016.

ALMEIDA, L.A.; KIIHL, R.A. de S.; MIRANDA, M.A.C.; CAMPELO, G.J. de A. **Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas para o Nordeste Brasileiro: melhoramento da soja para regiões de baixas latitudes.** Londrina: EMBRAPA,1999.

ALVES, B.J.R.; BODDEY, R.M.; URQUIAGA, S. The success of BNF in soybean in Brazil. *Plant and Soil*, Netherlands, v. 252, n.1, p.1-9, 2003.

APROSOJA BRASIL. **A história da soja.** Disponível em: <<http://aprosojabrasil.com.br/2014/sobre-a-soja/a-historia-da-soja/>>. Acesso em: 11 de março de 2020.

ARGAW, A. Symbiotic effectiveness of inoculation with Bradyrhizobium isolates on soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] genotypes with different maturities. **Springer Plus**, v. 3, p. 753, 2014.

BALBOA, G. R., SADRAS, V.O., CIAMPITTI, I.A. Shifts in soybean yield, nutrient uptake, and nutrient stoichiometry: A historical synthesis analysis. **Crop Sci.**, v. 58, p. 43–54, 2018.

BIZARRO M.J., Inoculação de soja em solo submetido a diferentes sistemas de manejo. 2004. 60 f. Dissertação (Mestrado).

BIZARRO M.J., Simbiose e variabilidade de estirpes de *Bradyrhizobium* associadas à cultura da soja em diferentes manejos do solo. 107p 2008. Tese (Doutorado).

BOHRER, T. R. J.; HUNGRIA, M. Avaliação de cultivares de soja quanto à fixação biológica do nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 33, n. 6, p. 937–952, 1998. BRASIL. Instrução Normativa Sda No 13, De 24 De Março De 2011. 24 p., 2011.

BRAGAGNOLO, N. & MIELNICZUK, J. Cobertura do solo por palha de trigo e seu relacionamento com a temperatura e umidade do solo. R. Bras. **Ci. Solo**, 14:369-374, 1990.

BUSHBY HVA, LAWN RJ (1992) Accumulation and partitioning of nitrogen and dry matter by contrasting genotypes of mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). **Aust J Agric Res** 43:1609–1628.

CÂMARA, G. M. S. Introdução ao agronegócio soja. Departamento de Produção Vegetal. **ESALQ, USP**. 2015.

CAMARA,G.M.S.; GODOY, O.P.; MARCOS FILHO,J; D'ARCE, M.A.B.R. **Soja: produção pré-processamento e transformação agroindustrial**. Série Extensão Agroindustrial, v.07, 1992.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO- CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos, v. 7 Safra 2019/20** - Nono levantamento, Brasília. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 2 de julho de 2020.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO- CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos, v. 6 Safra 2018/19** – Décimo segundo levantamento, Brasília. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 9 de março de 2020.

DERPSCH, R.; ROTH, C.H.; SIDIRAS, N. & KÖPKE, U. Controle da erosão no Paraná, Brasil: Sistemas de cobertura do solo, plantio direto e preparo conservacionista do solo. **Eschborn, GTZ**, 1991.

EAGLESHAM ARJ, AYANABA A, RANGA RAO V, ESKEW DL (1982) Mineral N effects on cowpea and soybean crops in a Nigerian soil. **II. Amounts of N fixed and accrual to the soil. Plant Soil** 68:183–192.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **Tecnologias de produção de soja - Região central do Brasil 2014**. Londrina: Embrapa Soja, 2013. 265 p. 2015.

FAGAN, E.B. et al. Fisiologia da fixação biológica do nitrogênio em soja – revisão. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia (FZVA)**, v. 14, n. 1, p. 89-106, 2007.

FERREIRA, M.C.; ANDRADE, D.S.; CHUEIRE, L.M.O.; TAKEMURA, S.M. & HUNGRIA, M. Effects of tillage method and crop rotation on the population sizes and diversity of bradyrhizobia nodulating soybean. **Soil Biol. Biochem.**, 32:627-637, 2000.

FREITAS, M. C. M. A CULTURA DA SOJA NO BRASIL: O crescimento da produção brasileira e o surgimento de uma nova fronteira agrícola. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.7, n.12; 2011.

Fundação MT. **Boletim de Pesquisa 2019/2020**. P. 50-62.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C.; GRAHAM, P. H. Contribution of biological nitrogen fixation to the N nutrition of grain crops in the tropics: the success of soybean (*Glycine max* L. Merr.) in South America. In: SINGH, R. P.; SHANKAR, N.; JAIWAL, P. K. (Eds.). **Nitrogen nutrition in plant productivity**. Houston: Studium Press/LLC, 2006, p. 43-93.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; MENDES, I.C. A importância do processo de fixação biológica de nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro. Londrina: **Embrapa Soja**, 2007a. 80p.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C.; A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro. Londrina: **Embrapa soja**, 2007. 80 P. (Documentos 283).

MENDES I.C.; VARGAS M.A.T.; HUNGRIA M. Estabelecimento de estirpes de *Bradyrhizobium japonicum*/*B. elkanii* e seus efeitos na reinoculação da soja em solos de Cerrado. **Embrapa Cerrados**, 2000.

MENDES, I.C.; REIS JUNIOR, F.B.; HUNGRIA. M. Adubação nitrogenada suplementar tardia em soja cultivada em latossolos do Cerrado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n.8, p.1053-1060. 2008.

MUÑOZ, N. et al. Improvement in nitrogen fixation capacity could be part of the domestication process in soybean. **Heredity**, v. 117, p. 84-93, 2016.

MYTTON, L. R. Developing a breeding strategy to exploit quantitative variation in symbiotic nitrogen fixation, **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 82, n. 3, p. 329-335, 1984.

NOGUEIRA, P. D. M.; JÚNIOR, D. G. S.; RAGAGNIN, V. A. Clorofila foliar e nodulação em soja adubada com nitrogênio em cobertura. **Global Science and Technology**, v.03, n.02, p. 117 - 124, 2010.

PIMENTEL GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. Piracicaba: FEALQ, 15.ed., 451p 2009.

PIPER, C.V. & MORSE, W. J. **The soybean**. New York, McGraw Hill, 1923. 320p.

PROBST, A.H. & JUDD, R. W. Origin, US history and development, and world distribution. **Soybeans; improvement, production and uses**. Madison, ASA, 1973. p.1-15.

RESENDE, M. D. V.; DUARTE, J. B. **Precisão e controle de qualidade em experimentos de avaliação de cultivares**. Pesquisa Agropecuária Tropical, Goiânia: [s.n.], v.37, n.3, p.182-194, 2007.

SANTOS M. A.; HUNGRIA M. Mapeamento de QTL para caracteres relacionados com a fixação biológica de nitrogênio em soja. Piracicaba: **ESALQ/USP**, 2009.

SANTOS, M. A.; NICOLÁS, M. F.; HUNGRIA, M. Identificação de QTL associados à simbiose entre *Bradyrhizobium japonicum*, *B. elkanii* e soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 1, p. 67-75, 2006.

SOLOMON, T.; PANT, L. M.; ANGAW, T. Effects of inoculation by *Bradyrhizobium japonicum* strains on nodulation, nitrogen fixation, and yield of soybean (*Glycine max* L. Merrill) varieties on Nitisols of Bako, Western Ethiopia. **ISRN Agronomy**, v. 2012, p. 1 - 8, 2012

SOUZA, R. A.; HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J. C.; CHUEIRE, L. M. O.; BARCELLOS, F. G.; CAMPO R. J. Avaliação qualitativa e quantitativa da microbiota do solo e da fixação biológica do nitrogênio pela soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 1, p. 71-82, 2008.

TAIZ, L. e ZIEGER, E. Fisiologia vegetal. Trad. SANTARÉM, E. R. et al., 5° ed., Porto Alegre: **Artemed**, 2013. 919 p.

WILSON, P.W. Biochemistry of symbiotic Nitrogen fixation. Madison: **University of Wisconsin Press**, 130 p., 1940.

ZIMMER, S. et al. Effects of soybean variety and Bradyrhizobium strains on yield, protein content and biological nitrogen fixation under cool growing conditions in Germany. **European Journal of Agronomy**, v. 72, p. 38 – 46, 2016