

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EFEITO DO TRATAMENTO DE SEMENTES DE *Cicer arietinum*
COM COBALTO, MOLIBDÊNIO E BACTÉRIAS PROMOTORAS DE
CRESCIMENTO DE PLANTAS NA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO**

**Paula Wellen B. Gonçalves
Engenheira agrônoma**

2022

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EFEITO DO TRATAMENTO DE SEMENTES DE *Cicer arietinum*
COM COBALTO, MOLIBDÊNIO E BACTÉRIAS PROMOTORAS DE
CRESCIMENTO DE PLANTAS NA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO**

Paula Wellen B. Gonçalves

Orientador: Prof. Dr. Jairo Osvaldo Cazetta

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Agronomia (Ciência do Solo).

2022

G635e

Gonçalves, Paula Wellen Barbosa

Efeito do tratamento de sementes de *Cicer arietinum* com cobalto, molibdênio e bactérias promotoras de crescimento de plantas na fixação biológica de nitrogênio/ Paula Wellen Barbosa Gonçalves. -- Jaboticabal, 2022

102 p. : il.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientador: Jairo Osvaldo Cazetta

1. Mesorhizobium ciceri. 2. grão-de-bico. 3. inoculação de
sementes. 4. ureídeos. 5. nodulação. I. Título.

CDU 636.3.043

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo
autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

REGISTRO DE IMPACTO

O tratamento de sementes de grão-de-bico com cobalto, molibdênio e *Mesorhizobium ciceri* contribuem para aumentar a eficiência da fixação biológica de nitrogênio, contribuindo para a cultivo sustentável, por reduzir o uso de fertilizantes, e aumento na qualidade nutricional dos grãos sem elevar os custos de produção.

IMPACT RECORD

The treatment of chickpea seeds with cobalt, molybdenum and *Mesorhizobium ciceri* contributes to increase the efficiency of biological nitrogen fixation, contributing to sustainable cultivation, by reducing the use of fertilizers, and increasing the nutritional quality of the grains without increasing production costs.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: EFEITO DO TRATAMENTO DE SEMENTES DE *Cicer arifolium* COM COBALTO, MOLIBDÊNIO E BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO DE PLANTAS NA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO

AUTORA: PAULA WELLEN BARBOSA GONÇALVES

ORIENTADOR: JÁIRO OSVALDO CAZETTA

COORIENTADOR: ANDRÉ RODRIGUES DOS REIS

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Agronomia (Ciência do Solo), pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. JÁIRO OSVALDO CAZETTA (Participação Virtual)
Departamento de Biotecnologia Agropecuária e Ambiental / FCAV UNESP - Jaboticabal


Prof. Dr. RODINEI FACCO PEGORARO (Participação Virtual)
UFMG/CA / Montes Claros/MG


Prof. Dr. CASSIO HAMILTON ABREU JUNIOR (Participação Virtual)
Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas / Centro de Energia Nuclear na Agricultura - CENA/USP


Prof. Dra. MARA CRISTINA PESSOA DA CRUZ (Participação Virtual)
Departamento de Ciências da Produção Agrícola / FCAV UNESP Jaboticabal


Pós-doutoranda TEREZA CRISTINA LUQUE CASTELLANE (Participação Virtual)
Departamento de Biotecnologia Agropecuária e Ambiental / FCAV UNESP Jaboticabal

Jaboticabal, 10 de novembro de 2022

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

PAULA WELLEN BARBOSA GONÇALVES, nascida em Pirapora- MG, Brasil, em 30 de julho de 1992, filha de Elza Denire Barbosa Gonçalves e José dos Reis Azevedo Gonçalves. Possui título de Engenheira Agrônoma (2017) pela Universidade Federal de Minas Gerais, campus Montes Claros. Nesta instituição foi bolsista de iniciação científica (2013 a 2014), onde realizou pesquisas na área de agroquímica. Foi bolsista PET (2014 a 2016), ocasião em que realizou atividades vinculadas a ensino, pesquisa e extensão, ministrou palestras, organizou eventos, pesquisas e monitorias de fisiologia e fertilidade do solo. Em março de 2019 obteve o título de mestre em Produção Vegetal pela Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros-MG, sob orientação do Prof. Dr. Rodinei Facco Pegoraro. Durante o mestrado realizou estágio em docência na disciplina de fertilidade do solo e nutrição de plantas. Em março de 2019 ingressou no doutorado no Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Ciência do Solo), na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus Jaboticabal, sob a orientação do Prof. Dr. Jairo Osvaldo Cazetta.

“Todas as coisas cooperam para o bem
daqueles que amam a Deus”

Romanos 8:28

À Deus, que me deu forças para chegar até aqui. E aos meus pais, Elza e José, que mesmo com toda a simplicidade e dificuldades, sempre me incentivaram e apoiaram todas as minhas escolhas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, a Ele toda a honra e toda a glória. Aquele que sempre me deu forças, sempre foi o alicerce que nunca me deixou cair, apesar de todos os desafios, por ser meu refúgio e fortaleza, onde deposito toda a minha vida e esperança.

Agradeço aos meus pais, José dos Reis Azevedo Gonçalves e Elza Denire Barbosa Gonçalves. Meus exemplos de amor, fé e união. Agradeço imensamente por todo apoio e incentivo, por todo ensinamento de que é possível sonhar alto sem perder a humildade e sem abdicar dos valores e princípios.

Às minhas irmãs Thays e Layane, que apesar de toda dificuldade e distância, sempre pude contar nos momentos mais difíceis, com a ajuda, palavras e apoio.

À toda minha família. Em especial minhas tias Leuza, Anália, Lenir e Leidiane por cada oração e palavras de carinho. Meus tios Edson e Hélio e meus primos João (eterno Joãozinho), Ramon, Kamila, Bruno e Lucas.

Aos meus bons e maravilhosos amigos Alisson, Júlio, Eliene, Paulo e Isabella, que escutaram as mesmas histórias milhares de vezes. Que mesmo não estando juntos fisicamente sempre foram presentes em todos os momentos, seja de alegrias ou de tristeza.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Jairo Osvaldo Cazetta, pela confiança, disponibilidade, apoio, compreensão e orientação.

À Unesp Jaboticabal, pelo espaço, pelos profissionais de excelência e por proporcionar momentos de crescimento e evolução pessoal e profissional.

A todos os professores que contribuíram de alguma forma para a minha formação no mestrado e doutorado. Em especial Rodinei Facco Pegoraro, Cássio Hamilton Abreu Junior, Renato de Mello Prado e Mara Cristina Pessôa da Cruz.

Aos meus companheiros do laboratório de bioquímica de plantas da Unesp, Bruno, Bianca, Maira, Diego, Leonardo, com os quais compartilhei muitas descobertas e parcerias, além de terem tornado a jornada mais leve e divertida.

Aos amigos que pude conhecer na Unesp em Jaboticabal além do grupo de pesquisa, Antônio, Kamila, Daiane, Lívia, Maria, Patrícia e os amigos da APG e a todos que fizeram os meus dias serem mais descontraídos e leves.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES). - Código de Financiamento 001.

Obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO	iii
ABSTRACT.....	iv
CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS	5
1 Introdução.....	5
2 Revisão de literatura.....	6
2.1.1 Caracterização e importância do grão-de-bico.....	6
2.1.2 Qualidade nutricional do grão-de-bico	7
2.1.3 Fixação biológica de nitrogênio.....	8
2.1.4 Disponibilidade e distribuição de Co e Mo em solos	9
2.1.5 Tratamento de sementes com cobalto e molibdênio	10
2.1.6 Co como cofator na biossíntese de cobalamina (vitamina B12)	11
2.1.7 Mo nas enzimas assimiladoras de nitrogênio (nitrato redutase e nitrogenase)	13
2.1.8 Co e Mo no metabolismo de ureídeos na nodulação de plantas leguminosas	15
2.1.9 Bactérias promotoras de crescimento de plantas	16
3 Referências.....	17
CAPÍTULO 2 – CONTRIBUIÇÃO DA UTILIZAÇÃO DE COBALTO E MOLIBDÊNIO EM CULTIVARES DE GRÃO-DE-BICO	25
1 Introdução.....	26
2 Material e Métodos.....	27
3 Resultados e discussão.....	32
4 Conclusões.....	40
5 Referências.....	41
CAPÍTULO 3 - BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO DE PLANTAS NA NODULAÇÃO, METABOLISMO DE UREÍDEOS E CRESCIMENTO DE GRÃO-DE-BICO.....	44
RESUMO	44
1 Introdução.....	45

2	Material e métodos.....	46
3	Resultados.....	52
4	Discussão	61
5	Conclusões.....	64
6	Referências	64
CAPÍTULO 4 - NODULAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE UREÍDEOS EM GRÃO-DE-BICO TRATADO COM COBALTO E MOLIBDÊNIO.....		68
RESUMO		68
1	Introdução	69
2	Material e Métodos	71
3	Resultados	76
4	Discussão.....	83
5	Conclusões	87
7	Referências	87

EFEITO DO TRATAMENTO DE SEMENTES DE *Cicer arietinum* COM COBALTO, MOLIBDÊNIO E BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO DE PLANTAS NA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO

RESUMO – O grão-de-bico (*Cicer arietinum*, L) é uma cultura relevante e estratégica. É relevante por ter grande valor nutricional, sendo muito adotado na alimentação humana em todo o mundo. É estratégica pois pode ser utilizada em sucessão de cultivos com outros cereais, e possui capacidade de enriquecimento do solo devido sua habilidade em realizar fixação biológica de nitrogênio, o que lhe confere também grande relevância ambiental. No entanto, a área de cultivo de grão-de-bico no Brasil é pouco expressiva. Um dos fatores que levam a isso é a escassez de informações sobre a cultura, principalmente no que tange à nutrição das plantas relacionada com molibdênio (Mo) e cobalto (Co). Além disso, comercialmente não existem inoculantes específicos registrados para esta cultura. Diante disso, o objetivo com essa tese foi averiguar os efeitos do tratamento de sementes com Co e Mo e a inoculação com bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) sobre a eficiência da fixação biológica de nitrogênio (FBN) em grão-de-bico. Para isso, realizaram-se três experimentos (I, II e III) em casa de vegetação. O experimento I foi realizado para determinação das doses máximas de Co e Mo e a cultivar a serem usadas nos experimentos seguintes. No experimento II foi avaliado o efeito da inoculação com *Rhizobium leguminosarum* bv. Vicea, *Mesorhizobium ciceri*, *Rhizobium leguminosarum* (Semia 396), *Bacillus subtilis* e *Bradyrhizobium* ssp, na nodulação das plantas. No estudo experimento III foram definidas as doses ideais de Co e Mo para o tratamento de sementes dessa cultura. Plantas obtidas de sementes inoculadas com *Mesrhizobium ciceri* tiveram 85% mais nódulos ativos e viáveis, comparado a *Rhizobium Leguminosarum*, que foi a BPCP que apresentou o segundo melhor resultado. O tratamento de sementes de grão-de-bico com doses combinadas de Co e Mo e inoculadas com *Mesrhizobium ciceri* aumentou a eficiência da FBN, o que foi definido pelo aumento na nodulação das raízes das plantas, com maior massa seca nodular e aumento da concentração de ureídeos totais.

Palavras-chave: *Mesorhizobium ciceri*, grão-de-bico, inoculação de sementes, ureídeos, nodulação.

EFFECT OF *Cicer arietinum* SEED TREATMENT WITH COBALT, MOLYBDENUM AND PLANT GROWTH PROMOTING BACTERIA ON BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION

ABSTRACT – Chickpea (*Cicer arietinum*, L) is an important and strategic crop. It is important because it has high nutritional value and is widely used in human food worldwide. It is strategic because it can be used in rotation with other cereals and can enrich the soil due to its ability to biologically fix nitrogen, which also gives it great environmental importance. However, the area under chickpea cultivation in Brazil is not very productive. One of the reasons for this is the lack of information about the plant, especially in terms of plant nutrition. In addition, there are no specific inoculants approved commercially for this crop. Therefore, the objective of this work was to investigate the effects of seed treatment with cobalt (Co) and molybdenum (Mo) and inoculation with plant growth promoting bacteria (BPCP) on the efficiency of biological nitrogen fixation (BNF) in chickpea. For this purpose, three experiments (I, II and III) were conducted in a greenhouse. Experiment I was conducted to determine the maximum Co and Mo doses and the cultivar to be used in subsequent experiments. In experiment II the effect of inoculation with *Rhizobium leguminosarum* bv. Vicea, *Mesorhizobium ciceri*, *Rhizobium leguminosarum* (Semia 396), *Bacillus subtilis* and *Bradyrhizobium* ssp, on nodulation of plants was studied. In the experimental study III, the ideal Co and Mo doses for treating seeds of this crop were determined. Plants derived from seeds inoculated with *Mesorhizobium ciceri* had 85% more active and viable nodules compared to *Rhizobium leguminosarum*, the BPCP, which gave the second-best result. Treatment of chickpea seeds with combined doses of Co and Mo and inoculation with *Mesorhizobium ciceri* increased the efficiency of BNF, which was defined by the increase in nodulation of plant roots, with greater nodule dry mass and increased concentration of total ureides.

Keywords: *Mesorhizobium ciceri*, chickpea, seed inoculation, ureides, nodulation.

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

1 Introdução

O grão-de-bico possui grande importância social, ambiental e nutricional. Essa leguminosa é adaptável a amplas variações climáticas. Porém, por possuir baixa demanda hídrica, geralmente é cultivada em regiões de clima árido e semiárido (Ramirez et al., 2018). Assim como outras leguminosas, o grão-de-bico possui capacidade de fixação biológica de nitrogênio atmosférico (FBN), por meio de simbiose com rizóbios. Essa importante característica contribui para o cultivo dessa planta em solos que são pobres em nitrogênio, nutriente requerido em grande quantidade pela maioria das plantas, principalmente as leguminosas que armazenam N nos grãos em forma de proteínas, e consequentemente redução dos custos com adubação (Palmero et al. 2022; Romanyà and Casals 2020).

Entretanto, a FBN de grão-de-bico ainda é considerada ineficiente, porque não supre a necessidade total de N para essas plantas. Um dos motivos é a ausência de inoculantes com bactérias específicas para a cultura, a nível comercial e não existem informações suficientes sobre o tratamento de sementes com Co e Mo.

Para a cultura da soja, por exemplo, há diversos estudos sobre a eficiência da FBN. Na área de nutrição mineral de plantas, a utilização de elementos, como o Co, o Mo e o Ni, têm tido avanços importantes para melhorar a interação de plantas de soja com bactérias pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium*, altamente eficientes na realização da FBN (Lavres et al., 2016). Esses estudos para a cultura da soja, tem garantido o sucesso da FBN e, consequentemente, reduzindo os custos de produção e aumentando a produtividade e o rendimento de grãos, aumentando o interesse do produtor em cultivar essa leguminosa. Além de economicamente viável, a FBN é uma prática sustentável, por reduzir o uso de fontes inorgânicas de N, em cuja obtenção que se utilizam de grandes quantidades de energia. Também evita o excesso de N inorgânico nos solos, para além da demanda das culturas, evitando contaminação do ambiente, principalmente da água.

Em contrapartida, o grão-de-bico, principalmente as novas cultivares lançadas recentemente pela Embrapa, mais produtivas e adaptadas ambientalmente ao cerrado

brasileiro, aumentaram a demanda nutricional dos cultivos e a necessidade de elaboração de estudos relacionados a área de nutrição mineral de plantas. O pouco conhecimento sobre a cultura no Brasil, não tem atraído produtores para o cultivo dessa leguminosa.

O Mo e o Co são fundamentais no processo de FBN, por participarem como cofatores de compostos importantes relacionados às reações de ativação, redução e oxidação do N. Entretanto, não se sabe do ponto de vista de nutrição de plantas, sobre a utilização desses elementos na eficiência da FBN em grão-de-bico. Além disso, não está estabelecido dose ideal de Mo e Co para o tratamento das sementes dessa leguminosa, fazendo-se necessários estudos de avaliação da fixação biológica de N e do tratamento de semente com Co e Mo para verificação da eficiência da nodulação e da possível interferência nas bactérias usadas como inoculante.

2 Revisão de literatura

2.1.1 Caracterização e importância do grão-de-bico

Cicer arietinum, popularmente conhecido como grão-de-bico, feijão-de-bico ou grama bengala é uma leguminosa pertencente à família Fabaceae, e subfamília Faboideae, foi uma das primeiras leguminosas a ser domesticada no Oriente Médio (Lev-Yadun et al., 2000, Rybiński et al., 2019). Atualmente é considerada a terceira leguminosa mais cultivada no mundo, com produção total de 14,2 milhões de toneladas por ano e rendimento médio de 960 kg ha⁻¹ (Romanyà & Casals 2020).

Atualmente, a Índia é o maior produtor de grão-de-bico, representando cerca de 70% da produção global, seguida pela Austrália, Paquistão, Mianmar, Etiópia, Turquia, Irã, México, Canadá e Rússia. A Austrália é o maior exportador de grão-de-bico, responsável por mais de um terço do volume total das exportações mundiais, seguida pela Rússia, Índia, México, Canadá, Estados Unidos, Etiópia, Argentina, Tanzânia e Irã (Ramirez et al., 2018).

O grão-de-bico do tipo Desi e Kabuli são os mais cultivados e possuem algumas diferenças entre si. As cultivares do tipo Desi, que são considerados os de microsperma, tem as flores de coloração rosa ou vermelho, hastes coloridas devido a

presença de antocianinas. As sementes possuem o revestimento colorido e espesso, com o peso variando de 0,1 g a 0,3 g por semente (Jukanti et al., 2012; Rybiński et al., 2019). As cultivares do tipo Kabuli (macrosperma) possuem as flores brancas, baixa pigmentação de antocianinas no caule e as sementes tem a coloração branca ou bege, com a forma de cabeça de carneiro, peso variando de 0,2 g a 0,6 g e com o tegumento liso e fino (Frimpong et al., 2009; Jukanti et al., 2012; Rybiński et al., 2019).

As cultivares de grão-de-bico do tipo Desi estão em cerca de 80 a 85% da área total cultivada com grão-de-bico no mundo, principalmente no subcontinente indiano, na África Oriental e na Austrália. As cultivares do tipo Kabuli têm maior valor de mercado, o que está relacionado ao tamanho dos seus grãos. São amplamente cultivadas na Bacia do Mediterrâneo, Ásia Ocidental, Norte da África, América do Norte e Europa (Jukanti et al., 2012).

2.1.2 Qualidade nutricional do grão-de-bico

O grão-de-bico pode ser utilizado na alimentação animal, na confecção de biopolímeros termoplásticos e na melhoria da fertilidade do solo, como adubo verde, devido a sua capacidade de fixação de N atmosférico (Palmero et al., 2022). No entanto, sua maior relevância é na alimentação humana, principalmente nos países em desenvolvimento (Boukid 2021; FAO, 2016) em virtude do seu alto valor nutricional, principalmente fibras solúveis e insolúveis, carboidratos complexos, proteínas, vitaminas, zinco, ferro, cálcio, enxofre, magnésio e ácido fólico (Jukanti et al., 2012; Rachwa-Rosiak et al., 2015).

Ao contrário de outras leguminosas, como a soja por exemplo, o grão-de-bico apresenta baixos teores de óleos e gorduras. Porém, em seu óleo são encontrados tocoferóis, esteróis e tocotrienóis, que são nutricionalmente importantes e medicinais. Essas propriedades medicinais oferecem benefícios a saúde, como no controle do diabetes, da pressão arterial e do peso, atua contra doenças cardiovasculares e digestivas e na prevenção de alguns tipos de câncer (Jukanti et al., 2012). Ainda, apresenta propriedades antifúngicas, antibacterianas, anti-inflamatórias e antiulcerativas.

A necessidade de maior ingestão de alimentos vegetais ricos em proteínas, em substituição às carnes, tem aumentado a demanda internacional de grão-de-bico (Wallace et al., 2016), devido ao hábito alimentar, cultural e religioso do oriente (Fischer, 2016) e, atualmente, com as práticas veganas e vegetarianas. Na Índia, por exemplo, 30% da população é vegetariana (Shridhar et al., 2014), devido a questões religiosas, ligadas ao hinduísmo (Fischer, 2016). Segundo Jukanti et al. (2012), a utilização do grão-de-bico na alimentação é comum em países em desenvolvimento, devido às suas características nutricionais e ao aumento da população vegana e vegetariana. Com isso, tem sido reconhecido como uma excelente fonte de proteína e incluído como parte de uma dieta saudável.

2.1.3 Fixação biológica de nitrogênio

O nitrogênio é o elemento exigido em maior quantidade pelas plantas, principalmente pelas leguminosas, que são altamente exigentes, devido ao grande teor de proteína presente nos grãos, podendo elevar os custos de produção com fertilizantes nitrogenados. Porém, apresentam como vantagem a capacidade de realizar simbiose com microrganismos, aproveitando o nitrogênio atmosférico (N_2) (Palmero et al., 2022).

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é uma das alternativas mais eficazes para reduzir o uso de fertilizantes nitrogenados, melhorar a nutrição das plantas, reduzir os impactos ambientais, como as perdas de N por lixiviação e volatilização, e aumentar os teores de N no solo (Palmero et al., 2022; Romanyà & Casals, 2020).

Embora parte do N fixado pelas leguminosas, como o grão-de-bico, seja removida na colheita dos grãos, que possuem altos teores de proteína, pode ocorrer contribuição residual de N para os solos agrícolas, aumentando a fertilidade do solo com N (Romanyà & Casals, 2020). Isso implica na melhoria da produtividade das próximas culturas em sistema de rotação.

Nas plantas leguminosas, os cofatores metálicos, tais como cobalto e molibdênio, são requeridos pelas bactérias endossimbióticas localizadas nas células corticais do sistema radicular (Bosse et al., 2021). No entanto, em solos tropicais,

geralmente ácidos, a deficiência desses elementos pode ser induzida, comprometendo a fixação biológica do N.

2.1.4 Disponibilidade e distribuição de Co e Mo em solos

O cobalto (Co) é um metal de transição, oriundo de rochas da crosta terrestre. Na forma natural o Co é composto pelo isótopo estável ^{59}Co , e pode assumir diferentes estados de oxidação: Co^{3+} , Co^{2+} e de forma menos comum Co^{1+} . O Co é comumente encontrado em associação ao Ni e Cr presentes em rochas máficas e basalto, com concentração média de Co de 150 e 48 mg kg^{-1} , respectivamente. Também está presente nos minerais como eritrite $[\text{Co}_3(\text{AsO}_4)_2 \cdot (8\text{H}_2\text{O})]$, glaucodote $[(\text{Co}_{0.50}\text{Fe}_{0.50})\text{AsS}]$ e escuterudita $(\text{CoAs}_3 - x)$ (Albanese et al., 2015).

No solo, os teores de Co são variáveis, podendo ser encontradas concentrações entre 1 a 60 mg kg^{-1} , podendo ocorrer valores maiores em virtude do material de origem (Albanese et al., 2015; Campo et al., 2009) e das atividades antrópicas (Liu et al., 2019). A concentração média de Co nos solos é de 10 a 40 mg kg^{-1} (He et al., 2005). Em locais onde ocorre a mineração desse metal, por exemplo, a sua concentração pode ser 1000 vezes superior, quando comparado a solos normais (Lange et al., 2014).

A disponibilidade de Co^{2+} é regida por mecanismos complexos, intimamente relacionados a todos os processos biogeoquímicos que ocorrem na rizosfera (Lange et al., 2014), e pode ser afetada pelas propriedades biológicas (Zaborowska et al., 2016), físicas e químicas do solo, como pH, matéria orgânica do solo (Liu et al., 2019), óxidos de ferro e manganês (Lange et al., 2014), teor de argila e a própria concentração desse metal no solo. O íon Co^{2+} tem alta mobilidade no solo, e em valores de pH próximos de 5,5 apresenta maior solubilidade e disponibilidade, podendo ser lixiviado.

O molibdênio (Mo) é um elemento essencial para as plantas (Broadley, 2012) e também outros organismos (Magalon et al., 2011). É considerado um metal pesado ou elemento traço, sendo necessário no ambiente em pequenas quantidades. As concentrações de Mo observadas nos solos do mundo são de 1 a 5 mg kg^{-1} , e em solos com elevados teores de metais o Mo encontra-se na faixa de 10 a 100 mg kg^{-1} .

(He et al., 2005). Elevadas concentrações do Mo no solo, semelhantemente ao Co, tornam-se um importante inibidor da atividade de desidrogenases e urease (Zaborowska et al., 2016).

A forma rastreadável, é a forma redox Mo^{+5} , presente no solo em pH maior do que 5 (Buekers et al., 2010; Woodward et al., 2018). A forma predominante do Mo observada na solução do solo em pH maior que 5 é de ânion molibdato (MoO_4^{2-}), forma solúvel e mais absorvida pelas plantas (Buekers et al., 2010). No entanto, em pH do solo menor do que 5 podem ocorrer espécies desprotonadas na forma de molibdato de hidrogênio (HMoO_4^-) ou molibdato dihidrogênio (H_2MoO_4) (Buekers et al., 2010).

A disponibilidade do Mo na solução do solo é variável, devido a sua dinâmica no solo: solúvel na solução do solo; adsorvido na fração coloidal; retido na rede cristalina dos minerais primários; e quelada à matéria orgânica. Dentre os fatores que mais influenciam a disponibilidade do Mo, tem-se o pH. A adsorção máxima de Mo ocorre em pH baixo e perto do pH 8 a adsorção do Mo praticamente não acontece (Buekers et al., 2010).

Desta forma, em solos tropicais, intemperizados, ricos em óxidos de ferro e alumínio e com acidez alta, a adsorção é favorecida, o que reduz a disponibilidade de Co e Mo (McGrath et al., 2010). Além disso, com o passar dos anos a deficiência de Co e Mo na soja e nas demais culturas tem se intensificado. Muito em função da exportação destes elementos pelas culturas na forma de grãos, fibras, colmos e demais produtos agrícolas, promovendo a redução da disponibilidade desses elementos nos solos cultivados com soja e com as demais culturas. Com isso, à medida que a agricultura se intensifica e as produtividades aumentam, cria-se a necessidade de fornecimento desses elementos.

2.1.5 Tratamento de sementes com cobalto e molibdênio

Uma forma de otimizar o aproveitamento de Co e Mo é por meio do tratamento de sementes. O tratamento de sementes com micronutrientes é considerada uma prática barata e eficiente, podendo melhorar a emergência, o estabelecimento das plântulas e o aumento na produtividade da cultura (Farooq et al. 2012). Além disso, a

integração da inoculação com o tratamento de sementes com micronutrientes aumenta o vigor das sementes e pode prolongar o seu tempo de armazenamento (Farooq et al. 2012; Shcherbakova et al. 2017). O cobalto e o molibdênio são importantes na nutrição de plantas, no caso do Co plantas leguminosas, e normalmente são utilizados no tratamento de sementes de soja e estão diretamente ligados ao metabolismo do nitrogênio. Segundo Farooq et al. (2012), o tratamento de sementes com esses elementos, em muitos casos, é mais eficiente do que a aplicação via solo.

O Co é considerado um elemento benéfico para algumas plantas, principalmente para as leguminosas, pois compõe a vitamina B12 (cobalamina), que tem função de impedir a inativação da enzima nitrogenase (Gopalakrishnan et al., 2018). Os efeitos benéficos do Co também incluem retardamento da senescência foliar, inibição da biossíntese de etileno e estimulação da biossíntese de alcalóides (Palit et al., 1994).

O Mo faz parte de duas metaloenzimas: a nitrogenase, que auxilia as bactérias dos nódulos das leguminosas a fixar o nitrogênio atmosférico, e a redutase do nitrato, enzima de relevante importância na assimilação do N na planta (Gopal et al., 2016). Embora seja um nutriente requerido em baixas quantidade em solos ácidos, como do cerrado brasileiro, as plantas podem apresentar deficiência de Mo, pois sua disponibilidade é influenciada quando o pH do solo está abaixo de 7 (Sims, 2000). A capacidade de fixação biológica de N nas plantas leguminosas é severamente prejudicada pela ausência de Mo. A deficiência de Mo em grão-de-bico, pode ocorrer a redução na produção e tamanho de flores e em alguns casos não abrirem ou amadurecerem, levando a um menor rendimento de grãos (Gopal et al., 2016). Antes disso, sua deficiência acarreta sintomas de deficiência de N, devido ao acúmulo de nitrato, forma de N não assimilável pelas plantas, prejudicando seu desenvolvimento (Broadley , 2012).

2.1.6 Co como cofator na biossíntese de cobalamina (vitamina B12)

O Co é um elemento importante para a fixação biológica do nitrogênio atmosférico (N₂). Isso porque ele é um componente da cobalamina (vitamina B12) e

seus derivados, que dá origem a leg-hemoglobina, quando sofre a ação da enzima mutase do metilmalonil CoA (Figura 1). Todo esse processo ocorre no interior do nódulo do bacteroide. Porém, quando o suprimento do Co é deficiente, prejudica a síntese da leg-hemoglobina, afeta a síntese de metionina e do DNA nos nódulos dos bacteroides (Dilworth & Chatel, 1984), por reduzir a eficiência da atividade da nitrogenase e, conseqüentemente, a absorção (N_2) e assimilação do nitrogênio é prejudicada (Ali et al., 2010; Dilworth & Chatel, 1984).

A cobalamina é uma biomolécula sintetizada majoritariamente por protobactérias (Lu et al., 2020). Apresenta-se em diferentes formas químicas, que podem estar enzimaticamente ativas como adenosilcobalamina (Ado-B12), metilcobalamina (Me-B12), hidroxocobalamina (OH-B12), e na forma inativa de cianocobalamina (CN-B12). As formas ativas atuam como cofatores enzimáticos para procariotos e eucariotos (Cheng et al., 2016; Younis, 2011). Algumas enzimas são conhecidas por ser dependentes da cobalamina, dentre elas a sintetase da metionina, redutase de ribonucleotídeos e a mutase de metil malonil-coA que está envolvida na síntese da leg-hemoglobina (Dilworth & Chatel, 1984).

A leg-hemoglobina é um pigmento de uma proteína hemocromática, que confere coloração avermelhada em nódulos ativos (Figura 1). A leg-hemoglobina regula o suprimento ideal de oxigênio, mantendo a enzima nitrogenase ativa no nódulo. Desta forma, a atividade da nitrogenase aumenta com aumento do teor de leg-hemoglobina (Ali et al., 2010).



Figura 1. Fotografia do interior de nódulos ativos de grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.), com coloração rosácea, cortados histologicamente e obtido das plantas tratadas com inoculantes com *Mesorhizobium ciceri*. Fonte: Da autora.

2.1.7 Mo nas enzimas assimiladoras de nitrogênio (nitrato redutase e nitrogenase)

O Mo é um elemento essencial para as plantas superiores, requerido em pequenas quantidades. Semelhante a outros metais necessários para o crescimento das plantas, o Mo participa de reações de redução e oxidação em enzimas vegetais específicas. Essas enzimas usam o Mo metálico na forma de molibdênio cofator (Moco). O Mo é integrante de um complexo orgânico de pterina, molibdopterina, o qual é denominado molibdênio cofator (Moco), que se liga às molibdoenzimas, enzimas que requerem Mo. A pterina tem a função de posicionar o átomo catalítico Mo corretamente dentro do centro ativo, controlar seu comportamento redox, e provavelmente participar da transferência de elétrons para ou do átomo de Mo (Hille et al., 2011).

Existem mais de 50 enzimas que são catalisadas pelo Mo, importantes nos ciclos do carbono, nitrogênio e enxofre, dentre as quais se destacam nitrogenase, nitrato redutase, sulfito redutase, aldeído oxidase e xantina redutase/oxidase, encontradas em plantas (Hille et al. 2006). A eficácia bioquímica entre as enzimas que requerem Moco, depende das variações na estrutura enzimática, particularmente nos ambientes de coordenação do Mo (Mintmier et al., 2020).

No ciclo do N, duas importantes enzimas são ativadas por Mo: a nitrato redutase e a nitrogenase. Nessas enzimas o Mo atua como grupo prostético e ativador enzimático. Assim como outras enzimas molíbdicas nas plantas, a nitrato redutase (NR) é uma proteína homodimérica, em que cada subunidade idêntica é capaz de operar de forma independente na redução de nitrato (Broadley , 2012), cada uma é composta por três domínios funcionais: o domínio n-terminal associado a um cofator de molibdênio (Moco), o domínio de heme central (citocromo b557) e o domínio FAD terminal C (Schwarz & Mendel, 2006).

A NR é uma proteína que representa uma cadeia de transporte de elétrons curta localizada no citosol, que catalisa a transferência de dois elétrons de NADPH para nitrato (em que o N com estado de oxidação +5), é reduzido a nitrito (em que o N tem estado de oxidação +3), e ainda reduzido a amônio (com N no estado de oxidação -3) nos plastídeos. De forma resumida a NR age com um catalisador na

primeira etapa do NO_3^- caminho de redução, produzindo NO_2^- , que por sua vez é ainda mais reduzido a NH_4^+ , que será convertido em compostos orgânicos (Yu et al., 2010). A outra função da NR é a redução do nitrito para óxidos nítrico e nitroso.

Na planta, as formas químicas nitrato, nitrito e amônio, em concentrações elevadas são tóxicas. Isso ocorre quando fatores ambientais, isoladamente e especialmente associados, interferem na atividade da enzima NR, tais como carência de Mo, grande disponibilidade de nitrato no solo e pouca luz (Kovács et al., 2015). A atividade da NR é mais eficiente com o fornecimento adequado de Mo, indicando que há uma relação estreita entre os níveis de Mo, absorção de nitrato, redução de nitrato e assimilação geral de nitrogênio (Abbasifar et al., 2020; Kovács et al., 2015). Diante disso, a aplicação de Mo interfere nos rendimentos agrícolas aumentando o peso fresco, seco e a altura da planta, aumento da atividade da NR, aumento da concentração de clorofila (a e b) e aumento do N-protéico e reduzindo a concentração de NO_3^- , (Abbasifar et al., 2020).

A nitrogenase é uma metaloenzima importante para o processo de FBN, catalisando a reação de quebra do N_2 atmosférico, convertendo o N para a forma de NH_3 , com gasto energético (ATP). A enzima nitrogenase realiza o processo de fixação de N de forma complexa e semelhante ao processo industrial, porém nas condições ambientais ideais. A nitrogenase é uma enzima complexa, muitas vezes denominada complexo enzimático da nitrogenase, pois é constituída por duas proteínas componentes (Rousk et al., 2017). Uma delas é a Fe-proteína I (NifH), um homodimer contendo uma ponte de subunidade contendo 4 átomos de Fe e 4 átomos de S (Fe_4S_4) e um local de vinculação de trifosfato de adenosina (ATP) dentro de cada subunidade. A outra proteína componente é a Fe-Mo proteína (NifDK), que é a proteína catalítica que tem o Mo, a qual é um $\alpha_2\beta_2$ -tetramero contendo um aglomerado P (Fe_8S_7) em cada interface α/β -subunidade e um cluster M ($\text{MoFe}_7\text{S}_9\text{C}$ -homocitrate) dentro de cada α -subunidade (Hu & Ribbe, 2016; Howard & Rees, 1996). Desta forma, o Mo participa ativamente do processo de FBN, pois sua presença aumenta a atividade da nitrogenase (Rousk et al., 2017).

2.1.8 Co e Mo no metabolismo de ureídeos na nodulação de plantas leguminosas

O fornecimento de Co e Mo favorece aumento de peso, número e tamanho dos nódulos em leguminosas (Alam et al., 2015; Rod et al., 2019). Isso porque o Co está envolvido no processo de formação da cobalamina nos bacteroides, que regula três enzimas que estão associadas à atividade do nódulo na raiz. Essas enzimas são: disthionina sintetase - responsável pelo tamanho do bacteroide e síntese proteica; reductase do ribonucleotídeo - que determina a síntese de DNA e a divisão celular do *Rhizobium*, e mutase do metilmalonil-coA- envolvida na síntese da leg-hemoglobina (Ali et al., 2010; Dilworth & Chatel, 1984). Com isso, a deficiência de Co inibe a iniciação dos nódulos (Alam et al., 2015).

Em plantas leguminosas, o Moco é requerido para ser parte constituinte da Fe-Mo proteína. O FeMoco é utilizado por bactérias diazotróficas que vivem dentro de órgãos radiculares diferenciados, os nódulos. Esses órgãos se desenvolvem em um processo complexo a partir da detecção de fatores de nodulação rizobial, gene NifDk, pela planta hospedeira, que leva à enrolação capilar das raízes, captura de bactérias, hidrólise da parede celular vegetal e entrega de bactérias ao primórdio do nódulo radicular através de um fio de infecção (Tejada-Jiménez et al., 2017).

Após a formação do nódulo, e atuação da nitrogenase a mobilização e exportação de nitrogênio fixado para fora do nódulo, requer a atividade da enzima xanthine dehidrogenase/oxidase (XDH). Dependendo das espécies de leguminosas, o nitrogênio fixado é exportado como amidas (glutamina e asparagina) ou ureídeos (alantoína e ácido alantóico), que são inicialmente derivados da quebra oxidativa das purinas. Durante esse processo, XDH catalisa a conversão da hipoxantina em xantina e a xantina para ácido úrico (Baral & Izaguirre-Mayoral, 2017; Schwarz & Mendel, 2006). Com isso, a deficiência de Mo pode prejudicar o transporte via xilema do N reduzido no nódulo.

O metabolismo de ureídeos sofre grande influência do ambiente, mas é considerado importante, principalmente para plantas que estão em condição de estresse (Baral & Izaguirre-Mayoral, 2017). Notadamente, a aplicação de Co e Mo em plantas de amendoim aumentou a concentração de ureídeos totais, porém os

aminoácidos representaram a maioria dos compostos nitrogenados, podendo indicar que a aplicação de Co e Mo favorece a incorporação de amônia em compostos de menor peso molecular, tais como os aminoácidos (Gericó et al., 2020).

2.1.9 Bactérias promotoras de crescimento de plantas

A adoção de sistemas de produção sustentáveis que visam elevar as produções agrícolas, tem aumentado consideravelmente nos últimos anos, sem não agredir o meio ambiente (Santos et al., 2019). Plantas leguminosas como grão-de-bico (*Cicer arietinum*) tem grande relevância na alimentação humana e animal (Merga & Haji, 2019), devido ao seu alto valor proteico (Jukanti et al., 2012). No entanto, para uma produção sustentável de grão-de-bico é necessário que o processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN) seja eficiente, fornecendo o nitrogênio (N) necessário para as plantas e garantindo altos rendimentos (Merga & Haji, 2019).

Uma alternativa é o uso de bactérias promotoras de crescimento de plantas. O uso de *Bradyrhizobium* é bem conhecido na cultura da soja, por promover a eficiência da FBN nessa cultura (Moretti et al., 2018). Muitas outras bactérias são usadas para promover o crescimento de plantas. Uma das mais difundidas no Brasil e no mundo são as cepas de *Azospirillum*, que tem sido amplamente utilizadas em inoculantes comerciais para culturas de grãos, incluindo leguminosas e não-leguminosas (Santos et al., 2019).

As bactérias promotoras de crescimento de plantas, são comumente referidas como um grupo heterogêneo de bactérias que vivem perto ou na superfície das raízes, podem facilitar direta ou indiretamente o crescimento das plantas (Gopalakrishnan et al., 2018). Os mecanismos de ação empregados por essas bactérias incluem a produção de auxina, ácido indol acético, ACC deaminase, citocinina, giberelina, cianeto de hidrogênio, sideróforos, fixação de nitrogênio, solubilização de fósforo, resistência sistêmica induzida e biocontrole contra fitopatógenos (Laranjeira et al., 2021).

3 Referências

- Abbasifar, A., ValizadehKaji, B., & Iravani, M. A. (2020). Effect of green synthesized molybdenum nanoparticles on nitrate accumulation and nitrate reductase activity in spinach. *Journal of Plant Nutrition*, 43(1), 13–27. <https://doi.org/10.1080/01904167.2019.1659340>
- Alam, F., Kim, T. Y., Kim, S. Y., Alam, S. S., Pramanik, P., Kim, P. J., & Lee, Y. B. (2015). Effect of molybdenum on nodulation, plant yield and nitrogen uptake in hairy vetch (*Vicia villosa* Roth). *Soil Science and Plant Nutrition*, 61(4), 664–675. <https://doi.org/10.1080/00380768.2015.1030690>
- Albanese, S., Sadeghi, M., Lima, A., Cicchella, D., Dinelli, E., Valera, P., Falconi, M., Demetriades, A., De Vivo, B., Andersson, M., Baritz, R., Batista, M. J., Bel-lan, A., Birke, M., W. De Vos, Duris, M., Dusza-Dobek, A., Eggen, O. A., Eklund, M., ... Zomeni, Z. (2015). GEMAS: Cobalt, Cr, Cu and Ni distribution in agricultural and grazing land soil of Europe. *Journal of Geochemical Exploration*, 154, 81–93. <https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2015.01.004>
- Ali, B., Hayat, S., Hayat, Q., & Ahmad, A. (2010). Cobalt stress affects nitrogen metabolism, photosynthesis and antioxidant system in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Journal of Plant Interactions*, 5(3), 223–231. <https://doi.org/10.1080/17429140903370584>
- Baral, B., & Izaguirre-Mayoral, M. L. (2017). Purine-Derived Ureides Under Drought and Salinity. In *Advances in Agronomy* (1^o ed, Vol. 146). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.agron.2017.07.001>
- Baral, B., Teixeira da Silva, J. A., & Izaguirre-Mayoral, M. L. (2016). Early signaling, synthesis, transport and metabolism of ureides. *Journal of Plant Physiology*, 193, 97–109. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2016.01.013>
- Bosse, M. A., Silva, M. B. da, Oliveira, N. G. R. M. de, Araujo, M. A. de, Rodrigues, C., Azevedo, J. P. de, & Reis, A. R. dos. (2021). Physiological impact of flavonoids on nodulation and ureide metabolism in legume plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 166(June), 512–521. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.06.007>
- Boukid, F. (2021). Chickpea (*Cicer arietinum* L.) protein as a prospective plant-based ingredient: a review. *International Journal of Food Science and Technology*, 56(11), 5435–5444. <https://doi.org/10.1111/ijfs.15046>

Broadley M, Brown P, Cakmak I, Rengel Z, Zhao F (2012) Function of nutrients: micronutrients. In.: Marschner P (Ed.) Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants. 3rd Edn, Oxford: Elsevier, p.191–249.

Buekers, J., Mertens, J., & Smolders, E. (2010). Toxicity of the molybdate anion in soil is partially explained by effects of the accompanying cation or by soil pH. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29(6), 1274–1278. <https://doi.org/10.1002/etc.162>

Campo, R. J., Araujo, R. S., & Hungria, M. (2009). Molybdenum-enriched soybean seeds enhance N accumulation, seed yield, and seed protein content in Brazil. *Field Crops Research*, 110(3), 219–224. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2008.09.001>

Cheng, Z., Yamamoto, H., & Bauer, C. E. (2016). Cobalamin's (Vitamin B12) Surprising Function as a Photoreceptor. *Trends in Biochemical Sciences*, 41(8), 647–650. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.05.002>

Dilworth, M. J., & Chatel, D. L. (1984). Cobalt and Nitrogen Fixation in *Lupinus Angustifolius* L. I. Growth, Nitrogen Concentrations and Cobalt Distribution. *New Phytologist*, 98(1), 311–316. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1979.tb00726.x>

Farooq, M., Wahid, A., & Siddique, K. H. M. (2012). Micronutrient application through seed treatments - a review. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 12(1), 125–142. <https://doi.org/10.4067/S0718-95162012000100011>

Farooq, Muhammad, Ullah, A., Lee, D. J., Alghamdi, S. S., & Siddique, K. H. M. (2018). Desi chickpea genotypes tolerate drought stress better than kabuli types by modulating germination metabolism, trehalose accumulation, and carbon assimilation. *Plant Physiology and Biochemistry*, 126(March), 47–54. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.02.020>

Fischer, J. (2016). Markets, religion, regulation: Kosher, halal and Hindu vegetarianism in global perspective. *Geoforum*, 69, 67–70. <https://doi.org/10.1016/j.geoforum.2015.12.011>

Flowers, T. J., Gaur, P. M., Gowda, C. L. L., Krishnamurthy, L., Samineni, S., Siddique, K. H. M., Turner, N. C., Vadez, V., Varshney, R. K., & Colmer, T. D. (2010). Salt sensitivity in chickpea. *Plant, Cell and Environment*, 33(4), 490–509. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.02051.x>

Frimpong, A., Sinha, A., Tar'an, B., Warkentin, T. D., Gossen, B. D., & Chibbar, R. N. (2009). Genotype and growing environment influence chickpea (*Cicer arietinum* L.) seed composition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(12), 2052–2063. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3690>

Ge, F., Huang, W., Chen, Z., Zhang, C., Xiong, Q., Bowler, C., Yang, J., Xu, J., & Hu, H. (2014). Methylcrotonyl-CoA carboxylase regulates triacylglycerol accumulation in the model diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant Cell*, 26(4), 1681–1697. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.124982>

Gericó, T. G., Tavanti, R. F. R., de Lima, J. P., Ribeiro, R. P., dos Santos, L. C. C., da Silva, M. S., & dos Reis, A. R. (2020). Cobalt and molybdenum stimulate compounds of primary metabolism, nitrogen forms, and photosynthetic pigments in peanut plants (*Arachis hypogaea* L.). *Journal of Plant Nutrition*, 43(12), 1907–1922. <https://doi.org/10.1080/01904167.2020.1750646>

Gopal, R., Sharma, Y. K., & Shukla, A. K. (2016). Effect of molybdenum stress on growth, yield and seed quality in black gram. *Journal of Plant Nutrition*, 39(4), 463–469. <https://doi.org/10.1080/01904167.2015.1016176>

Gopalakrishnan, S., Srinivas, V., Vemula, A., Samineni, S., & Rathore, A. (2018). Influence of diazotrophic bacteria on nodulation, nitrogen fixation, growth promotion and yield traits in five cultivars of chickpea. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 15(May), 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.05.006>

He, Z. L., Yang, X. E., & Stoffella, P. J. (2005). Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 19(2–3), 125–140. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2005.02.010>

Hille, R., Nishino, T., & Bittner, F. (2011). Molybdenum enzymes in higher organisms. *Coordination Chemistry Reviews*, 255(9–10), 1179–1205. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.11.034>

Howard, J. B., & Rees, D. C. (1996). Structural basis of biological nitrogen fixation. *Chemical Reviews*, 96(7), 2965–2982. <https://doi.org/10.1021/cr9500545>

Hu, Y., & Ribbe, M. W. (2016). Biosynthesis of the Metalloclusters of Nitrogenases. *Annual Review of Biochemistry*, 85, 455–483. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-034108>

Jukanti, A. K., Gaur, P. M., Gowda, C. L. L., & Chibbar, R. N. (2012). Nutritional quality

and health benefits of chickpea (*Cicer arietinum* L.): A review. *British Journal of Nutrition*, 108(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1017/S0007114512000797>

Kovács, B., Puskás-Preszner, A., Huzsvai, L., Lévai, L., & Bódi, É. (2015). Effect of molybdenum treatment on molybdenum concentration and nitrate reduction in maize seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*, 96, 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2015.07.013>

Lange, B., Faucon, M. P., Meerts, P., Shutcha, M., Mahy, G., & Pourret, O. (2014). Prediction of the edaphic factors influence upon the copper and cobalt accumulation in two metallophytes using copper and cobalt speciation in soils. *Plant and Soil*, 379(1–2), 275–287. <https://doi.org/10.1007/s11104-014-2068-y>

Laranjeira, S., Fernandes-Silva, A., Reis, S., Torcato, C., Raimundo, F., Ferreira, L., Carnide, V., & Marques, G. (2021). Inoculation of plant growth promoting bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi improve chickpea performance under water deficit conditions. *Applied Soil Ecology*, 164(February), 103927. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.103927>

Lavres, J., Franco, G. C., & de Sousa Câmara, G. M. (2016). Soybean seed treatment with nickel improves biological nitrogen fixation and urease activity. *Frontiers in Environmental Science*, 4(MAY), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2016.00037>

Lev-Yadun, S., Gopher, A., & Abbo, S. (2000). The cradle of agriculture. *Science*, 288(5471), 1602–1603. <https://doi.org/10.1126/science.288.5471.1602>

Liu, B., Huang, Q., Su, Y., Sun, L., Wu, T., Wang, G., & Kelly, R. M. (2019). Rice husk biochar treatment to cobalt-polluted fluvo-aquic soil: speciation and enzyme activities. *Ecotoxicology*, 28(10), 1220–1231. <https://doi.org/10.1007/s10646-019-02134-x>

Lopes, A. S., & Guimarães Guilherme, L. R. (2016). A career perspective on soil management in the Cerrado region of Brazil. In *Advances in Agronomy* (Vol. 137). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.agron.2015.12.004>

Lu, X., Heal, K. R., Ingalls, A. E., Doxey, A. C., & Neufeld, J. D. (2020). Metagenomic and chemical characterization of soil cobalamin production. *ISME Journal*, 14(1), 53–66. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0502-0>

Magalon, A., Fedor, J. G., Walburger, A., & Weiner, J. H. (2011). Molybdenum enzymes in bacteria and their maturation. *Coordination Chemistry Reviews*, 255(9–10), 1159–1178. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.12.031>

McGrath, S. P., Micó, C., Curdy, R., & Zhao, F. J. (2010). Predicting molybdenum toxicity to higher plants: Influence of soil properties. *Environmental Pollution*, 158(10), 3085–3094. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.06.030>

Merga, B., & Haji, J. (2019). Economic importance of chickpea: Production, value, and world trade. *Cogent Food and Agriculture*, 5(1), 1–12. <https://doi.org/10.1080/23311932.2019.1615718>

Mintmier, B., McGarry, J. M., Bain, D. J., & Basu, P. (2020). Kinetic consequences of the endogenous ligand to molybdenum in the DMSO reductase family: a case study with periplasmic nitrate reductase. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 0123456789. <https://doi.org/10.1007/s00775-020-01833-9>

Moretti, L. G., Lazarini, E., Bossolani, J. W., Parente, T. L., Caioni, S., Araujo, R. S., & Hungria, M. (2018). Can additional inoculations increase soybean nodulation and grain yield? *Agronomy Journal*, 110(2), 715–721. <https://doi.org/10.2134/agronj2017.09.0540>

Nascimento, Warley Marcos; Cardoso, Antonio Ismael Inácio; Suinaga, Fabio Akiyoshi; Boiteux, Silva Leonardo; Lana, Milza Moreira; Peixoto, N. (2016). Hortaliças Leguminosas. In W. M. Nascimento (Org.), *Embrapa* (1ª, Vol. 13, Número 1).

Olanrewaju, O. S., Glick, B. R., & Babalola, O. O. (2017). Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(11), 1–16. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2364-9>

Palit, S., Sharma, A., & Talukder, G. (1994). Effects of cobalt on plants. *The Botanical Review*, 60(2), 149–181. <https://doi.org/10.1007/BF02856575>

Palmero, F., Fernandez, J. A., Garcia, F. O., Haro, R. J., Prasad, P. V. V., Salvagiotti, F., & Ciampitti, I. A. (2022). A quantitative review into the contributions of biological nitrogen fixation to agricultural systems by grain legumes. *European Journal of Agronomy*, 136(April), 126514. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2022.126514>

Pandey, S., Gupta, S., & Ramawat, N. (2019). Unravelling the potential of microbes isolated from rhizospheric soil of chickpea (*Cicer arietinum*) as plant growth promoter. *3 Biotech*, 9(7), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1809-2>

Rachwa-Rosiak, D., Nebesny, E., & Budryn, G. (2015). Chickpeas—Composition, Nutritional Value, Health Benefits, Application to Bread and Snacks: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(8), 1137–1145.

<https://doi.org/10.1080/10408398.2012.687418>

Ramirez, M. L., Cendoya, E., Nichea, M. J., Zachetti, V. G. L., & Chulze, S. N. (2018). Impact of toxigenic fungi and mycotoxins in chickpea: a review. *Current Opinion in Food Science*, 23, 32–37. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.05.003>

Rod, N. K., Gudadhe, N. N., Karmakar, N., Mehta, P. V., & Narwade, A. V. (2019). Cobalt chloride enhances crop duration, increases production, and productivity of chickpea. *Journal of Plant Nutrition*, 42(1), 40–57. <https://doi.org/10.1080/01904167.2018.1544258>

Romanyà, J., & Casals, P. (2020). Biological Nitrogen Fixation Response to Soil Fertility Is Species-Dependent in Annual Legumes. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 20(2), 546–556. <https://doi.org/10.1007/s42729-019-00144-6>

Rousk, K., Degboe, J., Michelsen, A., Bradley, R., & Bellenger, J. P. (2017). Molybdenum and phosphorus limitation of moss-associated nitrogen fixation in boreal ecosystems. *New Phytologist*, 214(1), 97–107. <https://doi.org/10.1111/nph.14331>

Rybiński, W., Banda, M., Bocianowski, J., Starzycka-Korbas, E., Starzycki, M., & Nowosad, K. (2019). Estimation of the physicochemical variation of chickpea seeds (*Cicer arietinum* L.). *International Agrophysics*, 33(1), 67–80. <https://doi.org/10.31545/intagr/103889>

Santos, M. S., Nogueira, M. A., & Hungria, M. (2019). Microbial inoculants: reviewing the past, discussing the present and previewing an outstanding future for the use of beneficial bacteria in agriculture. *AMB Express*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0932-0>

Schwarz, G., & Mendel, R. R. (2006). Molybdenum cofactor biosynthesis and molybdenum enzymes. *Annual Review of Plant Biology*, 57, 623–647. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105437>

Shcherbakova, E. N., Shcherbakov, A. V., Andronov, E. E., Gonchar, L. N., Kalenskaya, S. M., & Chebotar, V. K. (2017). Combined pre-seed treatment with microbial inoculants and Mo nanoparticles changes composition of root exudates and rhizosphere microbiome structure of chickpea (*Cicer arietinum* L.) plants. *Symbiosis*, 73(1), 57–69. <https://doi.org/10.1007/s13199-016-0472-1>

Shridhar, K., Dhillon, P. K., Bowen, L., Kinra, S., & Bharathi, A. V. (2014). *Estimate of vegetarians in india*. 1–9.

Silva, K. F., de Moraes, D. H. M., Mesquita, M., de Oliveira, H. F. E., Nascimento, W. M., Battisti, R., & Flores, R. A. (2021). Water requirement and crop coefficient of three chickpea cultivars for the edaphoclimatic conditions of the Brazilian savannah biome. *Irrigation Science*, 39(5), 607–616. <https://doi.org/10.1007/s00271-021-00737-z>

Simranjit, K., Ranjan, K., Prasanna, R., Ramakrishnan, B., Kanchan, A., & Shivay, Y. S. (2019). Exploring Crop–Microbiome Interactions Towards Improving Symbiotic Performance of Chickpea (*Cicer arietinum*) Cultivars Using Cyanobacterial Inoculants. *Journal of Plant Growth Regulation*, 38(1), 55–69. <https://doi.org/10.1007/s00344-018-9809-8>

Sousa, D. M. G. de; E. L. (2004). Cerrado. In *Correção do solo e adubação* (Vol. 4, Número 1).

Tejada-Jiménez, M., Gil-Díez, P., León-Mediavilla, J., Wen, J., Mysore, K. S., Imperial, J., & González-Guerrero, M. (2017). Medicago truncatula Molybdate Transporter type 1 (MtMOT1.3) is a plasma membrane molybdenum transporter required for nitrogenase activity in root nodules under molybdenum deficiency. *New Phytologist*, 216(4), 1223–1235. <https://doi.org/10.1111/nph.14739>

Wallace, T. C., Murray, R., & Zelman, K. M. (2016). The nutritional value and health benefits of chickpeas and hummus. *Nutrients*, 8(12), 1–10. <https://doi.org/10.3390/nu8120766>

Werner, A. K., & Witte, C. P. (2011). The biochemistry of nitrogen mobilization: Purine ring catabolism. *Trends in Plant Science*, 16(7), 381–387. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.03.012>

Woodward, G. L., Peacock, C. L., Otero-Fariña, A., Thompson, O. R., Brown, A. P., & Burke, I. T. (2018). A universal uptake mechanism for cobalt(II) on soil constituents: Ferrihydrite, kaolinite, humic acid, and organo-mineral composites. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 238, 270–291. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2018.06.035>

Younis, M. (2011). Soil applied cobalt and copper alter the rhizobium symbiosis and growth status of lablab purpureus (L.) sweet. *Journal of Plant Nutrition*, 34(11), 1736–1745. <https://doi.org/10.1080/01904167.2011.592746>

Yu, M., Hu, C. Xiao, Sun, X. Cheng, & Wang, Y. Hua. (2010). Influences of Mo on Nitrate Reductase, Glutamine Synthetase and Nitrogen Accumulation and Utilization in Mo-Efficient and Mo-Inefficient Winter Wheat Cultivars. *Agricultural Sciences in China*, 9(3), 355–361. [https://doi.org/10.1016/S1671-2927\(09\)60104-8](https://doi.org/10.1016/S1671-2927(09)60104-8)

Zaborowska, M., Kucharski, J., & Wyszowska, J. (2016). Biological activity of soil contaminated with cobalt, tin, and molybdenum. *Environmental Monitoring and Assessment*, 188(7). <https://doi.org/10.1007/s10661-016-5399-8>

CAPÍTULO 2 – CONTRIBUIÇÃO DA UTILIZAÇÃO DE COBALTO E MOLIBDÊNIO EM CULTIVARES DE GRÃO-DE-BICO

Resumo – O tratamento de sementes de leguminosas com Co (cobalto) e Mo (molibdênio) proporcionam mudanças no desempenho fisiológico e consequentemente aumentam o acúmulo de nitrogênio na parte aérea da planta e aumento da matéria seca. O objetivo desse estudo foi identificar genótipos de grão-de-bico mais responsivo no tratamento de sementes com Co e Mo. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3x2, com quatro repetições. Os tratamentos consistiram em 3 genótipos de grão-de-bico: BRS Aleppo, BRS Cristalino e BRS Toro; e no tratamento de sementes com ou sem Co+Mo, nas doses de 45 mg kg⁻¹ Co e 450 mg kg⁻¹ Mo. Plantas de grão-de-bico oriundas de sementes tratadas com Co+Mo apresentaram aumento na altura, no diâmetro do caule, na área foliar, na concentração de clorofila a+b (16%) e de carotenoides (7%), em comparação às plantas controle. O tratamento de sementes de grão-de-bico com Co+Mo aumentou o acúmulo de nitrogênio e massa seca da parte aérea e da raiz nas cultivares 'BRS Cristalino' e 'BRS Aleppo'. Os genótipos 'BRS Cristalino' e 'BRS Aleppo' foram mais responsivos ao tratamento de sementes com Co e Mo. Experimentos futuros devem ser conduzidos para averiguar a dose ideal de Co e Mo com os genótipos mais responsivos para verificar o potencial de aumento da produção grão-de-bico.

Palavras-chave: *Cicer arietinum*, genótipos, tratamento de sementes, nitrogênio.

1 Introdução

O grão-de-bico (*Cicer arietinum* L) é uma das culturas mais importantes no mundo como fonte de proteína diretamente na alimentação humana. É uma boa fonte de carboidratos e sua proteína é considerada de melhor qualidade, quando comparada à de outras leguminosas (Jukanti et al., 2012). Além disso, o grão-de-bico é rico em ácidos graxos insaturados nutricionalmente importantes, como os ácidos linoleico e oleico. As sementes de grão-de-bico são ricas minerais como Ca, Mg, P e, principalmente, K; vitaminas, como riboflavina, niacina, tiamina, folato e o precursor da vitamina A, o β -caroteno (Jukanti et al., 2012). Diante disso, tem sido considerada uma cultura importante na segurança alimentar e nutricional (Merga & Haji, 2019).

No Brasil, o cultivo do grão-de-bico tem aumentado, sobretudo no bioma Cerrado. Em virtude das pesquisas e da disponibilidade de cultivares mais produtivas e adaptadas às condições edafoclimáticas do país, as cultivares do grupo kabuli - BRS Aleppo, BRS Cristalino e BRS Toro, lançadas pela Embrapa hortaliças, possuem produtividade média de 2500 kg ha⁻¹, enquanto que a produtividade média mundial é de 900 kg ha⁻¹ (Nascimento and Silva 2019).

Um dos fatores que limitam a produtividade de grão-de-bico é a nutrição, uma vez que a cultura normalmente é cultivada em regiões com solo de baixa fertilidade (Merga & Haji, 2019). No Brasil, as maiores áreas de cultivo estão no Mato Grosso e Goiás (N. and Silva, 2019), regiões de Cerrado, que possuem solos altamente intemperizados, com baixa fertilidade natural, acidez acentuada e baixa disponibilidade de nutrientes (Lopes & Guimarães Guilherme, 2016), sendo necessárias práticas de correção.

Além disso, para otimização do aproveitamento de elementos requeridos em pequenas quantidades pelas plantas, como os micronutrientes e elementos benéficos, o tratamento de sementes mostra-se viável, pois é uma prática barata e eficiente, podendo melhorar a emergência, estabelecimento das plântulas e aumento na produtividade da cultura (Frimpong et al., 2009).

O Co é considerado um elemento benéfico para plantas leguminosas, pois compõe a vitamina B12 (cobalamina), que tem função de impedir a inativação da enzima nitrogenase, regulando a entrada de oxigênio (Gopalakrishnan et al., 2018).

Os efeitos benéficos do Co também incluem retardamento da senescência foliar, inibição da biossíntese de etileno e estimulação da biossíntese de alcalóides (Palit et al., 1994).

O Mo faz parte do grupo prostético de duas metaloenzimas: a nitrogenase, que auxilia as bactérias dos nódulos das leguminosas a fixar o nitrogênio atmosférico, e a redutase do nitrato, enzima de relevante importância na assimilação do N na planta (Gopal et al., 2016). A capacidade de fixação biológica de N nas plantas leguminosas é severamente prejudicada pela ausência de Mo e Co. A deficiência de Mo em grão-de-bico, pode ocorrer a redução na produção e tamanho de flores e em alguns casos não abrirem ou amadurecerem, levando a um menor rendimento de sementes grãos (Ahlawat et al. 2007). Antes disso, sua deficiência acarreta sintomas de deficiência de N, devido ao acúmulo de nitrato, forma de N não assimilável pelas plantas, prejudicando seu desenvolvimento (Broadley, 2012).

A hipótese desse estudo é que o tratamento de sementes de grão-de-bico com doses combinadas de cobalto e molibdênio proporcionam mudanças no desempenho fisiológico e conseqüentemente aumentariam o acúmulo de nitrogênio na parte área de genótipos da planta e aumento da matéria seca. Desta forma, o objetivo desse estudo foi identificar genótipos de grão-de-bico mais responsivo no tratamento de sementes com cobalto e molibdênio.

2 Material e Métodos

2.1 Descrição do local de realização do estudo e design experimental

O experimento foi realizado em casa de vegetação, com temperatura ($25^{\circ} \pm 5$) e umidade ($65^{\circ} \pm 5$) controladas, no período de maio a agosto de 2020, na Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (Unesp/FCAV), campus Jaboticabal, São Paulo, Brasil.

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3x2, com quatro repetições. Os tratamentos consistiram em 3 cultivares de grão-de-bico: BRS Aleppo, BRS Cristalino e BRS Toro; e no tratamento

de sementes com ou sem Co+Mo, nas doses de 45 mg kg⁻¹ e 450 mg kg⁻¹, respectivamente, conforme Tabela 1.

Tabela 1. Resumo da representação esquemática do estudo com cultivares de grão-de-bico, sem e com aplicação de cobalto e molibdênio.

Tratamento	Cultivares	Co+Mo
T1	BRS Aleppo	Sem
T2	BRS Cristalino	Sem
T3	BRS Toro	Sem
T4	BRS Aleppo	Com
T5	BRS Cristalino	Com
T6	BRS Toro	Com

Sem: não adição de Co+Mo no tratamento de sementes. Com: adição de doses combinadas de Co+Mo nas concentrações de 45 mg kg⁻¹ e 450 mg kg⁻¹, respectivamente.

Em 250 g de sementes de grão-de-bico foram aplicadas 1 mL de solução açucarada a 10% (para aumentar a aderência ao inoculante), posteriormente fez-se o tratamento com doses combinadas de Co+Mo nas concentrações de (45 mg kg⁻¹ e 450mg kg⁻¹), respectivamente e em seguida foi aplicada com 5 mL do inoculante “Biomax® Premium Líquido” formulado com a bactéria *Rhizobium tropici*.

Após a inoculação, as sementes foram imediatamente plantadas em vasos contendo 8 dm³ de solo, a uma profundidade de 2 cm. Foi utilizado um Latossolo Amarelo Distrófico (LAd) de acordo com o Sistema Brasileiro de Classificação de Solos (Embrapa, 2018), com teores de 250 g kg⁻¹ de argila, 30 g kg⁻¹ de silte e 720 g kg⁻¹ de areia, determinados de acordo com Embrapa (2011). As características químicas do solo, realizadas antes da instalação do estudo são apresentadas na Tabela 2. Os métodos de determinação seguiram as metodologias estabelecidas por Rajj et al. (2001).

Tabela 2. Caracterização química do solo coletado na camada de 0 a 0,20 cm para a utilização no estudo

pH	MO	P	S	Ca	Mg	K	H+Al	CTC	V	B	Cu	Fe	Mn	Zn
	g dm ⁻³	mg dm ⁻³			----	mmol _c dm ⁻³	-----		%		-----	mg dm ⁻³	-----	
4,9	5	4	6	4	1	0,1	14	19,2	26	0,12	0,2	4	0,1	0,1

pH em CaCl₂ (Raij et al., 2001).

Antes do plantio, o solo foi corrigido aplicando calcário dolomítico com PRNT de 100%, em uma dose de 215 kg ha⁻¹ (0,43g de calcário por vaso), a fim de elevar a saturação de bases do solo à 70%. O solo foi incubado por dez dias e, posteriormente, foi aplicado o equivalente a 100 kg ha⁻¹ de P₂O₅, usando o superfosfato simples. Seis sementes de grão-de-bico foram plantadas em cada vaso. A emergência das plântulas ocorreu quatro dias após a semeadura. Após 15 dias da emergência das plântulas, fez-se o desbaste, mantendo três plantas por vaso. Nesse período também foi aplicado o equivalente a 70 kg ha⁻¹ de K₂O; 190 kg ha⁻¹ de Mg₂SO₄; 24 kg ha⁻¹ de MnCl₂; 12 kg ha⁻¹ de H₃BO₃; 9 kg ha⁻¹ de CuSO₄. As irrigações foram feitas diariamente, com água de torneira, de forma a elevar a umidade do solo até cerca de 70% da capacidade de campo.

2.2 Amostragem das plantas e preparação das amostras

No início da floração, que ocorreu 30 dias após o desbaste das plantas, mediu-se a altura (cm) e o diâmetro (mm) do caule das plantas e a eficiência quântica do fotossistema II. Folhas totalmente desenvolvidas foram coletadas, para avaliação dos teores de açúcares totais e sacarose. Foram retiradas as plantas para a estimação da área foliar. Em seguida, as plantas coletadas foram separadas em parte aérea (PA) e raiz. Fez-se a limpeza com solução de detergente (0,1%), solução de HCl (0,3%) e água deionizada. Posteriormente, foram armazenadas em sacos de papel, devidamente identificados, e secas em estufa de circulação forçada de ar a 65 ± 2 °C até peso constante, para mensuração da massa seca e dos teores de N, Co e Mo.

Nas raízes, fez-se a contagem dos nódulos. Em seguida, os nódulos foram destacados, submetidos a corte histológico para captura de imagens e secos em

estufa de circulação forçada de ar a 65 ± 2 °C até peso constante. Após, as raízes foram lavadas e secas conforme o descrito para a parte aérea.

2.2.1 Determinação da eficiência quântica do fotossistema II (Fv/Fm)

A eficiência quântica do fotossistema II (FSII) foi estimada pela medição da fluorescência da clorofila no sétimo folíolo das plantas, utilizando um fluorômetro de clorofila (Opti-sciences - Os30P), realizando-se as medidas entre as 7 e 8 horas da manhã. As plantas foram deixadas no escuro por pelo menos 30 minutos antes da excitação do pulso de luz vermelha por 1 segundo. Em seguida, foram determinadas a fluorescência inicial (F0), fluorescência máxima (Fm) e eficiência quântica do fotossistema II, dada pela razão entre a fluorescência variável e a fluorescência média (Fv/Fm) (Lichtenthaler et al., 2005).

2.2.2 Conteúdo de clorofila e carotenoides

Para a análise dos pigmentos fotossintéticos, foram coletadas amostras de matéria fresca do terço médio totalmente desenvolvida. As amostras foram pesadas e imersas em acetona 80% contida em frascos previamente cobertos com papel alumínio, permanecendo nesta solução até completa descoloração. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Beckman DU 640) a 663 nm para clorofila a (Chl a), 647 nm para clorofila b (Chl b) e 470 nm para carotenóides. Os valores obtidos foram utilizados para calcular a concentração de pigmento, expressa em mg g⁻¹ de matéria fresca (Lichtenthaler 1987).

2.2.3 Determinação do teor de açúcares totais, sacarose e nitrato

Para determinação de sacarose e açúcares totais, foi utilizado o método proposto por Bieleski e Turner (1966). O extrato foi preparado triturando 1 g de folhas frescas em almofariz de porcelana, em seguida o material foi transferido para tubo Falcon de 15 mL e adicionou-se 10 mL da solução MCW (60% metanol, 25% clorofórmio e 15% água). O material foi homogeneizado em vórtex e, posteriormente

centrifugado a 4 °C por 10 minutos a 10.000 rpm. Adicionou-se a outro tubo 4 mL do sobrenadante do extrato MCW, 1 mL de clorofórmio e 1,5 mL de água. Após a separação das fases, realizou-se a quantificação de sacarose, açúcares totais, aminoácidos, nitrato e ureídeos totais (alantoína+ácido alantônico) na fase aquosa.

A quantificação de açúcares totais foi realizada de acordo com DuBois et al., (1956). Em tubo de ensaio foi adicionado 20 µL do extrato MCW, 500 µL de fenol (5%) e 2 mL de ácido sulfúrico p.a. Homogeneizou-se a mistura em vórtex e após o resfriamento à temperatura ambiente, fez-se leitura da absorbância em espectrofotômetro ajustado para 490 nm. Os resultados foram expressos em mg g⁻¹ de peso fresco (FW).

A quantificação de sacarose foi realizada conforme Van Handel (1967). Em tubo de ensaio foi adicionado 50 µL do extrato MCW, 500 µL de KOH (30%) e 2 mL de ácido sulfúrico concentrado. A mistura foi homogeneizada em vórtex, e em seguida colocada em estufa a 100 °C por 10 minutos. A mistura foi resfriada em temperatura ambiente e em seguida fez-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro ajustado para 490 nm, com resultados expressos em mg g⁻¹ de peso fresco.

A quantificação de açúcares totais e sacarose foram realizadas usando uma curva padrão de sacarose.

Para a determinação do teor de nitrato no tecido foliar, adotou-se o método descrito por Cataldo et al. (1975), usando o extrato MCW. As concentrações foram mensuradas por curva padrão da solução de nitrato de sódio, em espectrofotômetro no comprimento de onda de 410 nm.

2.2.4 Acúmulo de nitrogênio e concentração de cobalto e molibdênio na parte aérea

O teor de N foi determinado na matéria seca das amostras, utilizando o método de Kjeldhal.

A extração de cobalto e molibdênio foi realizada pelo método de Jones & Cases (1990), pesando 0,5 g de material vegetal, seco e bem moído, em cadinho de porcelana. O material foi incinerado em mufla, com o aumento gradual da temperatura até atingir 500 °C, mantendo as amostras nessa temperatura por até 5 h. Após atingir temperatura ambiente, foram pesadas 0,03 g das cinzas em tubo falcon de 50 mL e

adicionado 25 mL de ácido nítrico à 5% (v/v). O teor de Co e Mo nos extratos foi quantificado com auxílio de um espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS).

Com base no teor e matéria seca da parte aérea, obteve-se o acúmulo de cada elemento na parte aérea das plantas para ser utilizado no cálculo das eficiências de uso de N, Co e Mo, conforme a equação: (matéria seca da parte aérea)² / acumulação do elemento na parte aérea.

$$Eficiência = \frac{Materia\ seca\ da\ parte\ aérea^2}{acumulação\ de\ nutrientes\ na\ parte\ aérea}$$

2.3 Análise estatística

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro Wilk ($p \leq 0,05$) e teste de homocedasticidade de Levene ($p \leq 0,05$). Posteriormente, os dados foram submetidos análise variância e ao teste de agrupamento de médias Skott Knott ($p \leq 0,05$), utilizando o software RStudio (R Core Team, 2022).

3 Resultados e discussão

As plantas de grão-de-bico oriundas de sementes tratadas com Co+Mo apresentaram médias superiores de 15%, 12% e 38% de altura, diâmetro do caule e de área foliar, respectivamente, quando comparado as plantas sem o tratamento de sementes (Figura 1). No entanto, não houve interação ente os genótipos e a aplicação de Co+Mo para as variáveis biométricas (Figura 1). O genótipo 'BRS Aleppo' apresentou menor diâmetro e menor porte avaliado aos 30 dias após emergência das plantas (Figura. 1 A). Esse resultado pode ter ocorrido devido a este genótipo ser de ciclo curto e com porte de até 66 cm de altura ao final do seu ciclo de produção (Silva et al. 2021).

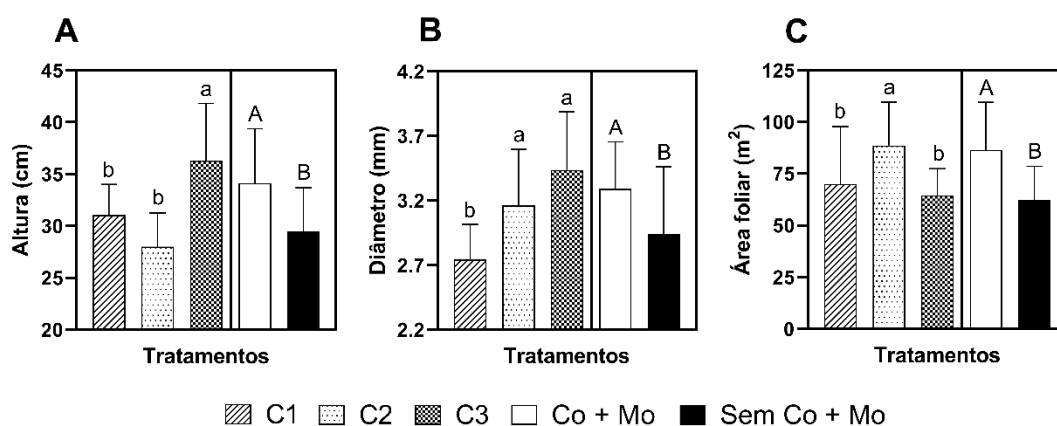


Figura 1. Componentes de crescimento de três genótipos de grão-de-bico oriundos do tratamento de sementes com Co + Mo. Cultivares - C1: BRS Aleppo. C2: BRS Cristalino. C3: BRS Toro. Barras seguidas de letras diferentes, maiúsculas para presença ou ausência de Co + Mo e minúsculas para os genótipos, diferem estaticamente pelo teste Skott Knott ($p \leq 0,05$).

As plantas do genótipo 'BRS Cristalino' foram as que apresentaram maior diâmetro do caule e maior área foliar, quando comparadas aos outros genótipos estudados (Figura 1 b, c). Além disso, os genótipos "BRS Aleppo" e 'BRS Cristalino' apresentaram maior porcentagem de emergência das plantas (dados não apresentados).

A eficiência quântica do fotossistema II não foi afetada pela adição de Co+Mo (Figura 2A), no entanto, o tratamento de sementes com Co+Mo elevou, em média, 3% a eficiência quântica do fotossistema II. Houve interação entre os genótipos e o tratamento de sementes com Co+Mo para a massa seca da parte aérea e das raízes (Figura 2 B, C). Sendo observado que a massa seca da parte aérea e da raiz para os genótipos "BRS Aleppo" e 'BRS Cristalino' tratados com Co+Mo aumentaram em média 60% e 71%, respectivamente (Figura 2 B, C).

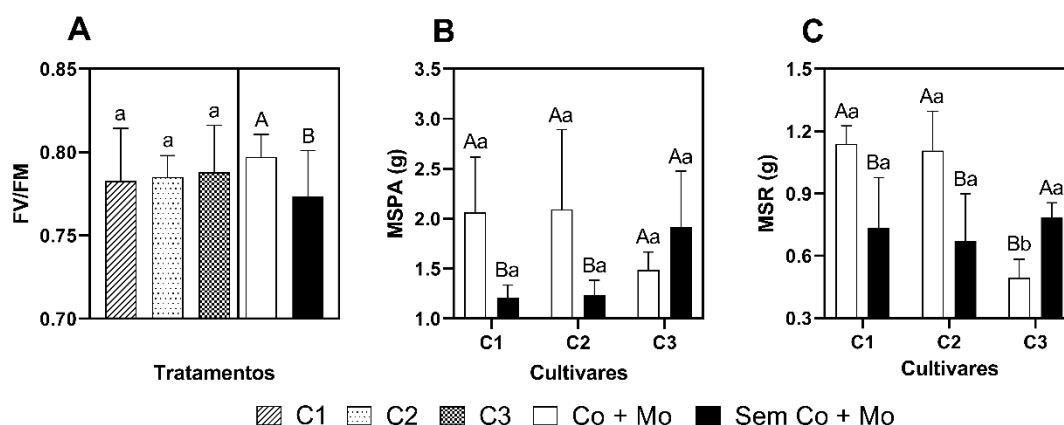


Figura 2. Eficiência quântica do fotossistema II (A), matéria seca da parte aérea (MSPA; B) e das raízes (MSR; C) dos genótipos de grão-de-bico com e sem o tratamento de sementes com Co + Mo. Cultivares - C1: BRS Aleppo. C2: BRS Cristalino. C3: BRS Toro. Barras seguidas de letras diferentes, maiúsculas para presença ou ausência de Co + Mo e minúsculas para os genótipos, diferem estaticamente pelo teste Skott Knott ($p \leq 0,05$).

Os genótipos não diferiram estatisticamente entre si em relação às concentrações dos pigmentos fotossintéticos. Entretanto, o tratamento das sementes contribuiu para elevar as concentrações tanto de clorofila A+B, quanto de carotenoides nas cultivares 'BRS Cristalino' e 'BRS Toro' (Figura 3 C, D).

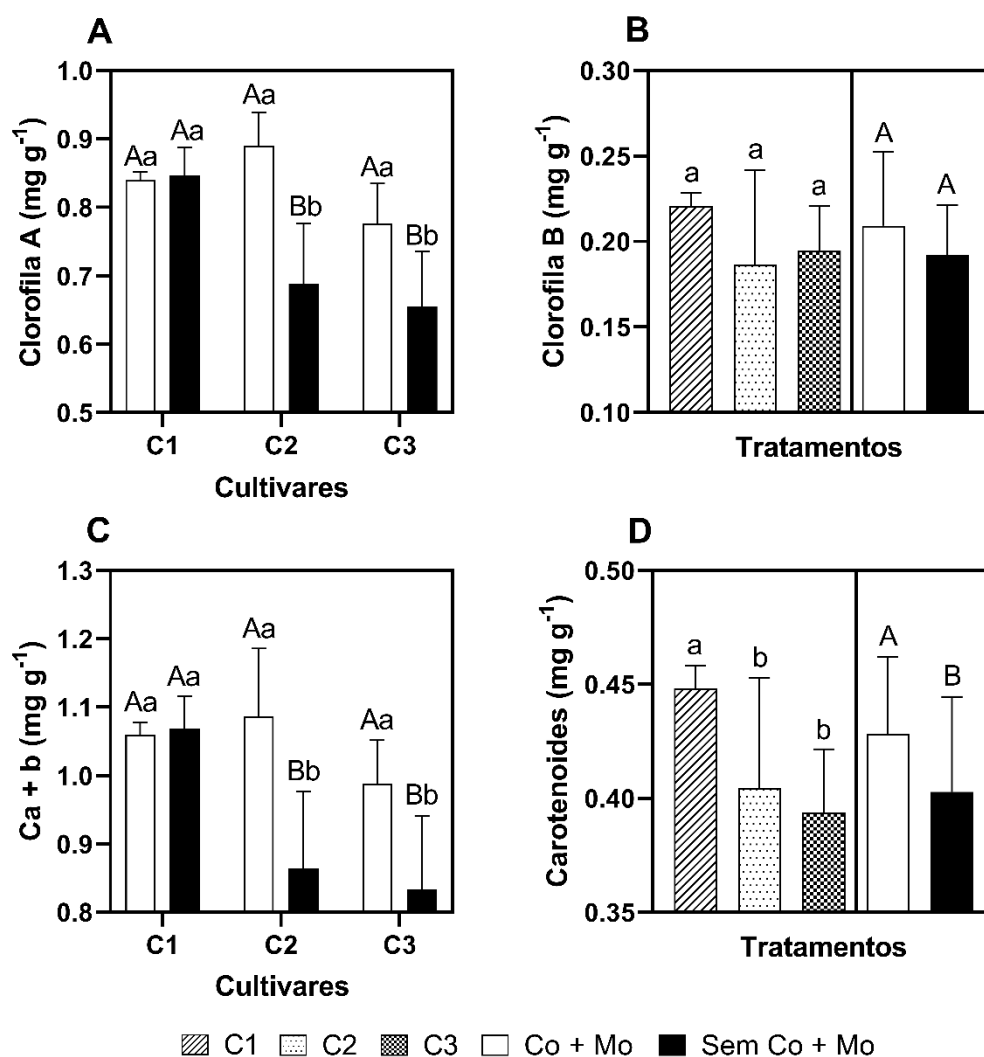


Figura 3. Atividade dos pigmentos dos genótipos de grão-de-bico cultivados após o tratamento de sementes com Co + Mo. C1: BRS Aleppo. C2: BRS Cristalino. C3: BRS Toro. Barras seguidas de letras diferentes, maiúsculas para presença ou ausência de Co + Mo e minúsculas para os genótipos, diferem estaticamente pelo teste Skott Knott ($p \leq 0,05$).

O aumento nas concentrações de clorofila A+B deve ter contribuído para o aumento do acúmulo de nitrogênio na parte aérea das plantas (Figura 3C). Houve interação entre os genótipos e o tratamento de sementes com Co+Mo para o nitrogênio acumulado na PA das plantas (Fig. 3 B). O tratamento de sementes com Co+Mo refletiu no aumento de 89% e 32% no acúmulo de nitrogênio na parte aérea dos genótipos 'BRS Aleppo' e 'BRS Cristalino', respectivamente. Entretanto, não

houve diferença entre os genótipos em relação à eficiência de utilização dos elementos estudados.

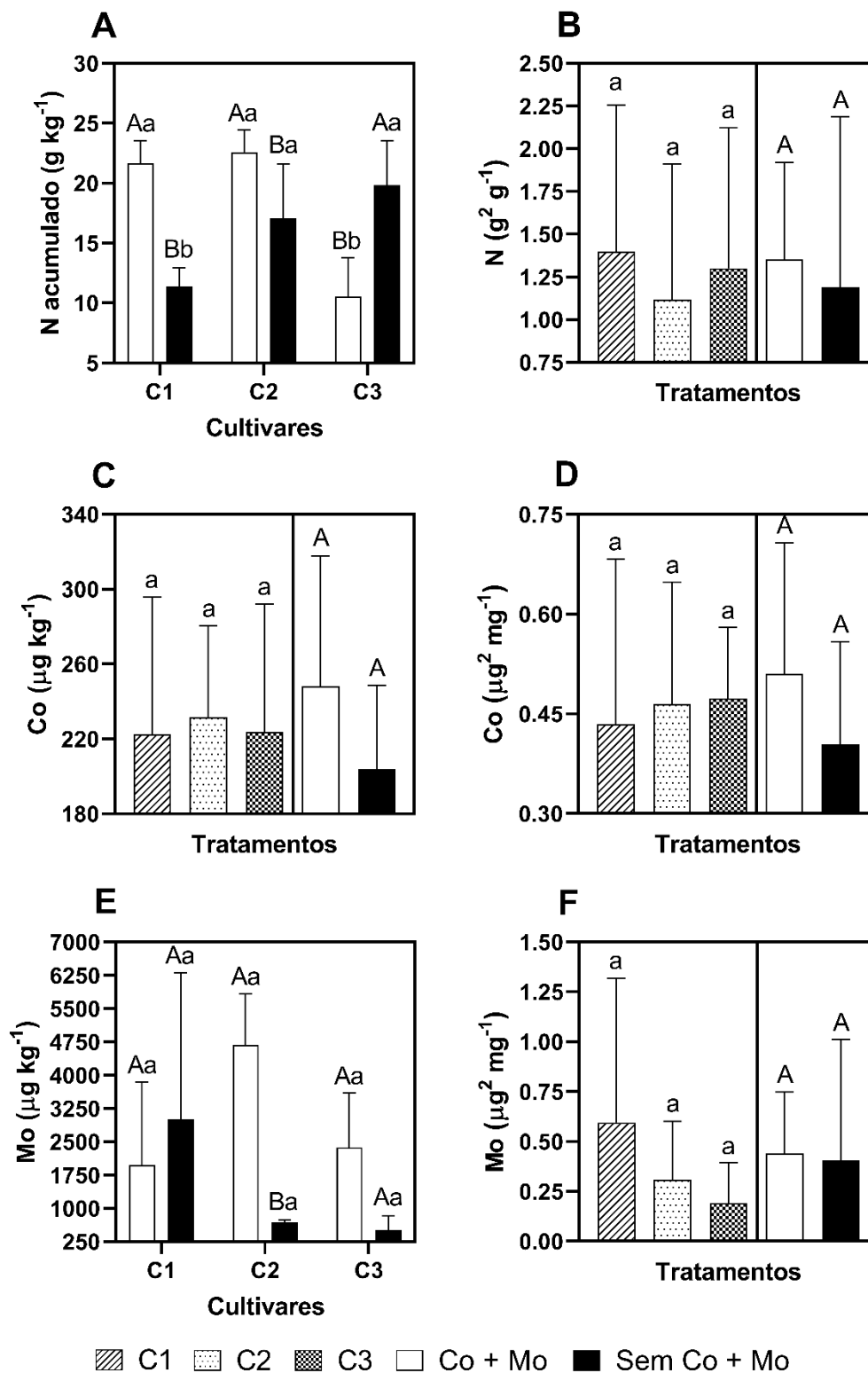


Figura 4. Acúmulo de N (A), eficiência de uso de N (B), teores de Co (C) e Mo (E) e eficiência de uso de Co (D) e Mo (F) em genótipos de grão-de-bico tratados com Co + Mo nas sementes. Cultivares C1: BRS Aleppo. C2: BRS Cristalino. C3: BRS Toro. Barras seguidas de letras diferentes, maiúsculas para presença ou ausência de Co + Mo e minúsculas para os genótipos, diferem estaticamente pelo teste Skott Knott ($p \leq 0,05$).

Com relação à eficiência de utilização de N, Co e Mo, as plantas oriundas de sementes tratadas com Co+Mo não diferiram das plantas controle (Figura 4 B, D e F).

Os teores de açúcares totais, sacarose e nitrato não diferiram estatisticamente entre as cultivares e tratamento de sementes com Co+Mo (Figura 5).

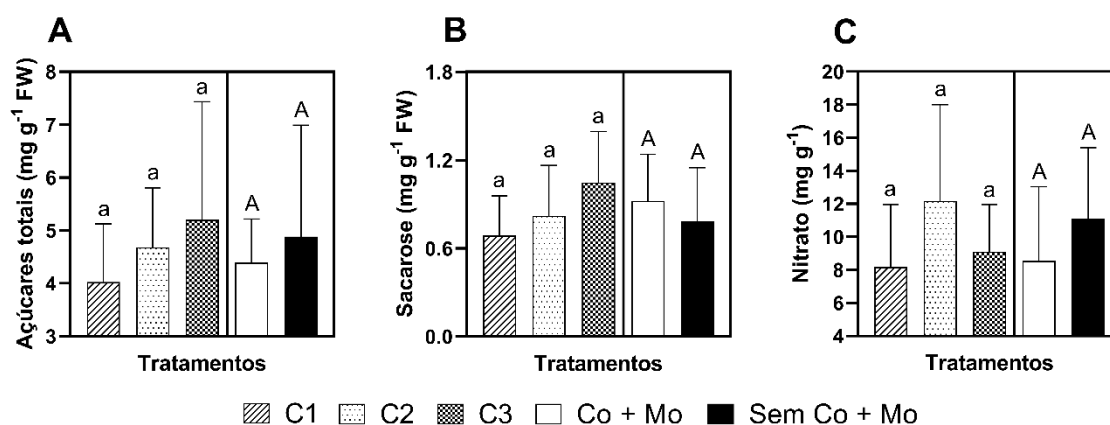


Figura 5. Teores de açúcares totais (A), sacarose (B) e nitrato (C) em genótipos de grão-de-bico com e sem o tratamento de sementes com Co + Mo trinta dias após a semeadura. Cultivares - BRS Aleppo. C2: BRS Cristalino. C3: BRS Toro. Barras seguidas de letras diferentes, maiúsculas para presença ou ausência de Co + Mo e minúsculas para os genótipos, diferem estaticamente pelo teste Skott Knott ($p \leq 0,05$).

A aplicação de Co+Mo no tratamento de sementes elevou a concentração desses elementos na parte área (Figura 4C e 4E), além disso, também aumentou o acúmulo de N na parte aérea das plantas (Figura 4 A). A eficiência de uso de

nitrogênio e de molibdênio correlacionaram-se positivamente com o aumento da massa seca da parte aérea e massa seca das raízes das plantas (Figura 6).

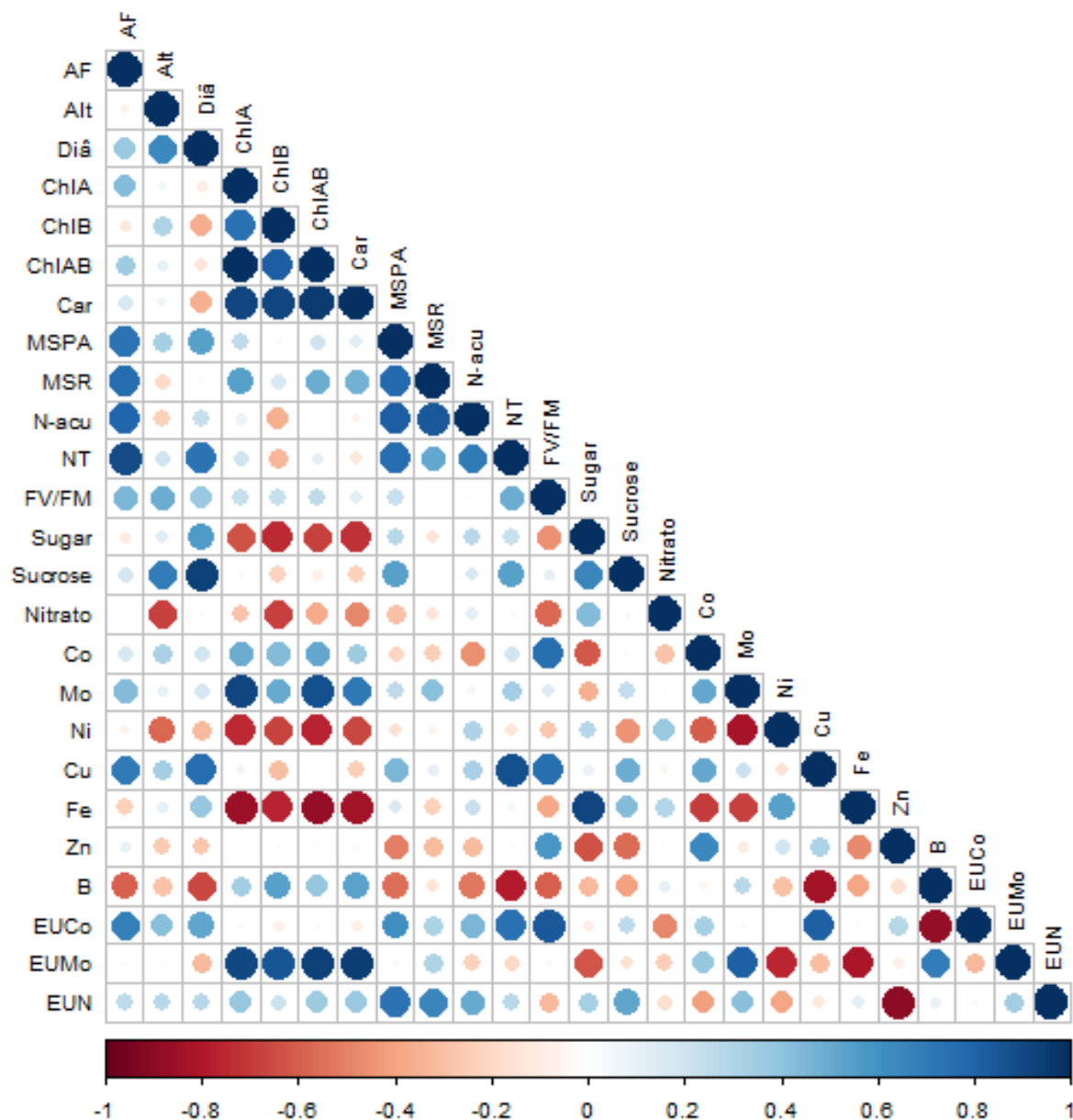


Figura 6. Mapa de calor dos coeficientes de correlação de Pearson obtidos a partir de variáveis extraídas de plantas de grão-de-bico. A intensificação das cores indica correlação significativa ($p < 0,05$). Abreviaturas: Área foliar (AF), altura (Alt), diâmetro (Diâ), clorofila A (ChIA), clorofila B (ChIB), clorofila A+B (ChIAB), carotenoide (car), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR), nitrogênio acumulado (Nacc), nitrogênio total (NT), eficiência

quântica do fotossistema II (FV/FM), açúcar total (sugar), sacarose (sucrose), nitrato, cobalto (Co), molibdênio (Mo), níquel (Ni), cobre (Cu), ferro (Fe), zinco (Zn), boro (B), eficiência de uso do Co (EUCo), eficiência de uso do Mo (EUMo), eficiência de uso do N (EUN).

Outro ponto importante é que o tratamento de sementes com Co+Mo elevou a concentração de pigmentos fotossintéticos (Figura 6). Além disso, a eficiência de uso do Mo pelas plantas correlacionou-se positivamente com as concentrações de pigmentos fotossintéticos (Figura 6).

O Mo está intimamente ligado ao ciclo do nitrogênio, sendo importante na atividade da nitrogenase, da nitrito redutase e da nitrato redutase. Devido a isso, a presença de Mo em concentrações adequadas estimula a atividade da nitrato redutase, que leva à transformação do N-nitrato para formas assimiláveis pela planta, causando diminuição do teor de nitrato e aumento do acúmulo de N-orgânico na planta (Lavres et al., 2016). Dessa forma, à medida em que se observou redução das concentrações de nitrato na folha, houve aumento da concentração de pigmentos no tecido foliar (Figura 6). A menor disponibilidade de Mo nas plantas controle (sem o tratamento das sementes com Co+Mo) induziu teor de nitrato nas folhas 25% maior que nas folhas das plantas oriundas de sementes tratadas com Co+Mo (Figura 5 C). Além disso, o Mo participa da enzima xantina desidrogenase, que atua na mobilização e translocação do nitrogênio fixado nos nódulos (Werner & Witte, 2011).

A disponibilidade de Co+Mo favoreceu o aumento da concentração de pigmentos fotossintéticos nas folhas de grão-de-bico (Figura 7). Isso porque o Co participa da cobalamina que atua na oxidação de ácidos graxos (Gad, 2012) produzindo o succini-CoA, que é um composto necessário para a síntese de porfirinas, que são estruturas constituintes das clorofilas (Ge et al., 2014).



Figura 7. Imagem de folhas de grão-de-bico da cultivar ‘BRS Cristalino’ cultivadas sem (A) e com (B) doses combinadas de Co+Mo aplicado via semente. Foto obtida quarenta e cinco dias depois da emergência das plantas. Foto: da autora.

As cultivares de grão-de-bico estudadas responderam positivamente ao tratamento de sementes com Co+Mo. AS cultivares ‘BRS Aleppo’ e ‘BRS Cristalino’, se destacaram por apresentar maiores acúmulos de nitrogênio. No entanto, é necessário entender qual a dose ideal desses elementos a ser aplicado via semente, que maximiza os efeitos positivos sem causar intoxicação ou outros efeitos adversos na planta.

4 Conclusões

O tratamento de sementes de grão-de-bico com Co+Mo aumentou o acúmulo de nitrogênio e massa seca da parte aérea e da raiz nas cultivares ‘BRS Cristalino’ e ‘BRS Aleppo’.

As plantas do genótipo BRS Toro foram pouco responsivas ao tratamento de sementes com cobalto e molibdênio.

5 Referências

Bieleski RL, and Turner TA (1966) Separation and estimation of amino acids in crude plant extracts by thinlayer electrophoresis and chromatography. *Analytical Biochemistry* 17 (2):278–93.

Cataldo DA, Maroon M, Schrader LE, Youngs VL (1975) Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 6 (1):71–80.

Frimpong, A., Sinha, A., Tar'an, B., Warkentin, T. D., Gossen, B. D., & Chibbar, R. N. (2009). Genotype and growing environment influence chickpea (*Cicer arietinum* L.) seed composition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(12), 2052–2063. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3690>

Gad, N. (2012). Role and importance of cobalt nutrition on groundnut (*Arachis hypogaea*) production. *World Applied Sciences Journal*, 20(3), 359–367. <https://doi.org/10.5829/idosi.wasj.2012.20.03.2819>

Ge, F., Huang, W., Chen, Z., Zhang, C., Xiong, Q., Bowler, C., Yang, J., Xu, J., & Hu, H. (2014). Methylcrotonyl-CoA carboxylase regulates triacylglycerol accumulation in the model diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant Cell*, 26(4), 1681–1697. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.124982>

Gopal, R., Sharma, Y. K., & Shukla, A. K. (2016). Effect of molybdenum stress on growth, yield and seed quality in black gram. *Journal of Plant Nutrition*, 39(4), 463–469. <https://doi.org/10.1080/01904167.2015.1016176>

Gopalakrishnan, S., Srinivas, V., Vemula, A., Samineni, S., & Rathore, A. (2018). Influence of diazotrophic bacteria on nodulation, nitrogen fixation, growth promotion and yield traits in five cultivars of chickpea. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 15(May), 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.05.006>

Jones JB, Case VW (1990). Sampling, handling, and analyzing plant tissue samples. *Soil testing and plant analysis*, 3, 389-427.

Jukanti, A. K., Gaur, P. M., Gowda, C. L. L., & Chibbar, R. N. (2012). Nutritional quality and health benefits of chickpea (*Cicer arietinum* L.): A review. *British Journal of Nutrition*, 108(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1017/S0007114512000797>

Lavres, J., Franco, G. C., & de Sousa Câmara, G. M. (2016). Soybean seed treatment with nickel improves biological nitrogen fixation and urease activity. *Frontiers in Environmental Science*, 4(MAY), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2016.00037>

Lichtenthaler HK, Buschmann C, Knapp M (2005) How to correctly determine the different chlorophyll fluorescence parameters and the chlorophyll fluorescence decrease ratio R Fd of leaves with the PAM fluorometer. *Photosynthetica* 43: 379-393.

Lopes, A. S., & Guimarães Guilherme, L. R. (2016). A career perspective on soil management in the Cerrado region of Brazil. In *Advances in Agronomy* (Vol. 137). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.agron.2015.12.004>

Merga, B., & Haji, J. (2019). Economic importance of chickpea: Production, value, and world trade. *Cogent Food and Agriculture*, 5(1), 1–12. <https://doi.org/10.1080/23311932.2019.1615718>

Nascimento, W. M.; Silva, P. P (2019). Grão-de-bico: nova aposta do agronegócio brasileiro. *Seed News*, v. 23, n. 3, p. 18-22.

Nascimento, Warley Marcos. *Hortaliças leguminosas*. Brasília, DF: Embrapa, 2016.

Palit, S., Sharma, A., & Talukder, G. (1994). Effects of cobalt on plants. *The Botanical Review*, 60(2), 149–181. <https://doi.org/10.1007/BF02856575>

Raij B, Andrade JC, Cantarella H, Quaggio JÁ (2001) *Análise Química para Avaliação da Fertilidade de Solos Tropicais*, 1st ed.; IAC: Campinas, Brasil, 2001.

R Core Team (2022). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

Santos HG, Jacomine PKT, Anjos LHC, Oliveira VA, Lumbrreras JF, Coelho MR, Almeida JA, Araujo Filho JC, Oliveira JB, Cunha TJF (2018) *Sistema Brasileiro de Classificação de Solos* (Embrapa). 5^a ed., revista e ampliada. – 356 p.

Silva, K. F., de Moraes, D. H. M., Mesquita, M., de Oliveira, H. F. E., Nascimento, W. M., Battisti, R., & Flores, R. A. (2021). Water requirement and crop coefficient of three chickpea cultivars for the edaphoclimatic conditions of the Brazilian savannah biome. *Irrigation Science*, 39(5), 607–616. <https://doi.org/10.1007/s00271-021-00737-z>

Van Handel E (1967) Determination of fructose and fructose-yielding carbohydrates with cold anthrone. *Analytical Biochemistry* 19 (1):193–4.

Werner, A. K., & Witte, C. P. (2011). The biochemistry of nitrogen mobilization: Purine ring catabolism. *Trends in Plant Science*, 16(7), 381–387. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.03.012>

CAPÍTULO 3 - BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO DE PLANTAS NA NODULAÇÃO, METABOLISMO DE UREÍDEOS E CRESCIMENTO DE GRÃO-DE-BICO

RESUMO – As bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) podem exercer vários mecanismos que auxiliam no desenvolvimento da planta, como a fixação biológica de nitrogênio. O objetivo com esse trabalho foi verificar o efeito da inoculação de sementes de grão-de-bico com *Rhizobium leguminosarum* bv. Vicea LMR-14904, *Mesorhizobium ciceri* LMG-14989, *Rhizobium leguminosarum* bv. Vicea (Semia 396); *Bacillus subtilis*; *Bradyrhizobium* ssp no aumento da eficiência do processo de fixação biológica de nitrogênio. Os tratamentos foram compostos pela inoculação das bactérias nas sementes, e o tratamento controle (sem inoculação). Os efeitos da inoculação das sementes com essas bactérias foram avaliados analisando o perfil de compostos nitrogenados (alantoína, ácido alantóico, nitrato, amônia e aminoácidos), pigmentos fotossintéticos, açúcares nas folhas, variáveis biométricas das plantas e a nodulação das raízes. As sementes inoculadas com *Mesorhizobium ciceri* resultaram em plantas com maior altura, maior diâmetro, e maior massa seca da parte aérea e das raízes, seguido de *Rhizobium leguminosarum*. Plantas oriundas de sementes inoculadas com *Rhizobium leguminosarum* e *Mesorhizobium ciceri* foram as únicas que produziam nódulos, sendo que os tratamentos com *Mesorhizobium ciceri* tiveram plantas com 82% de nódulos ativos, enquanto as plantas oriundas de sementes tratadas com *Rhizobium leguminosarum* apresentaram 4,3% de nódulos ativos. A bactéria *Mesorhizobium ciceri* foi identificada como o melhor tratamento para promover maior fixação biológica de nitrogênio em grão-de-bico.

Palavras-chave: *Cicer arietinum* L., fixação biológica de nitrogênio, *Mesorhizobium ciceri*, inoculação, *Rhizobium leguminosarum*, tratamento de sementes.

1 Introdução

O grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) pertence à família Fabaceae e os grãos são ricos em proteínas. Dependendo do tipo de semente, Kabuli ou Desi, os teores de proteína podem variar entre 14% e 18% (Rybiński et al., 2019). Em comparação a outras leguminosas, o grão-de-bico possui baixo teor de óleo (3,8 – 10%), porém o óleo do grão-de-bico é rico em compostos medicinais e nutricionais como tocoferóis, esteróis e tocotrienóis (Jukanti et al., 2012). Devido ao seu alto valor nutricional e medicinal decorrente dos teores de proteínas, carboidratos, minerais, vitaminas, β -caroteno e ácidos graxos, é parte integrante da dieta alimentar de milhões de pessoas (Merga & Haji, 2019).

O nitrogênio é um elemento limitante para a produtividade das culturas, uma vez que desempenha funções metabólicas e estruturais na célula vegetal ((Moretti et al., 2018). A planta do grão-de-bico, por sua vez, necessita de grandes quantidades de nitrogênio, aproximadamente 80 kg ha⁻¹ para manter uma produtividade mínima para que seu cultivo seja economicamente viável (Nascimento, et al., 2016).

A maior parte do N utilizado na agricultura é oriundo de fertilizantes sintéticos, que além de onerar os custos de produção, podem causar impactos ambientais pois cerca de 50% da quantidade aplicada perdida por lixiviação no solo e volatilização para a atmosfera (Rocha et al., 2019). Além disso, o processo de fabricação desses fertilizantes demandam muita energia e grandes quantidades de gases de efeito estufa, principalmente CO₂ (Sá et al., 2017). Em contrapartida, leguminosas como o grão-de-bico têm a capacidade de obter o nitrogênio gasoso da atmosfera, por meio da fixação biológica de nitrogênio (FBN), graças à enzima nitrogenase presente nos nódulos das raízes (Abd-Alla et al., 2019). Isso reforça a relevância das leguminosas na segurança alimentar e no desenvolvimento de uma agricultura sustentável.

A FBN, no entanto, é afetada por vários fatores que interferem no desenvolvimento e funcionamento dos nódulos e no crescimento vegetal, tais como o pH do solo, o teor de N disponível no solo, a temperatura, a umidade e o metabolismo bacteriano (Palmero et al., 2022). Além disso, no caso da cultura do grão-de-bico, existem evidências de que essa planta, além de interagir simbioticamente com o *Mesorhizobium ciceri*, também parece interagir com uma vasta gama de outros

microrganismos presentes na sua rizosfera (Shcherbakova et al., 2017). Bactérias promotoras de crescimento de plantas, dos gêneros *Azotobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Paenibacillus*, *Rhizobium*, *Serratia* e *Enterobacter* também foram isolados do grão-de-bico, com indicações de que modificam a arquitetura radicular, aumentando a biomassa radicular o crescimento e rendimento da cultura (Fierro-Coronado et al., 2014). No entanto, existe a hipótese que a nodulação da cultura pode não ser muito eficiente se não houver gêneros de bactérias específicos para a cultura. Embora outras bactérias também sejam capazes de nodular a cultura, há evidências de que a co-inoculação com bactérias promotoras de crescimento aumentam a concentração de flavonoides, o que pode tornar a planta mais suscetível a infecções por rizóbio (Elkoca et al., 2008).

No Brasil, o cultivo de grão-de-bico não é muito expressivo, provavelmente devido à escassez de informações gerais sobre a cultura, principalmente no que tange a nutrição de plantas e a falta de conhecimentos específicos sobre sua capacidade de fixação biológica de nitrogênio. Além disso, comercialmente não existe inoculante específicos para a cultura.

Diante disso, o objetivo com este estudo foi verificar se a inoculação de sementes de grão-de-bico com *Rhizobium leguminosarum* bv. Vicea LMR-14904; *Mesorhizobium ciceri* LMG-14989; *Rhizobium leguminosarum* bv. Vicea (Semia 396); *Bacillus subtilis*; *Bradyrhizobium* ssp. Cepas (Semia 5080/ Semia 5079 – B. *Japonicum*, Semia 587 – B. *Elkanii*) aumentariam a eficiência do processo de FBN.

2 Material e métodos

2.1 Descrição do local de realização do estudo e design experimental

O experimento foi realizado de setembro a novembro de 2020, na Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (Unesp/FCAV), Campus Jaboticabal, Brasil, em casa de vegetação (temperatura $28^{\circ}\text{C} \pm 5$) (Figura1). A umidade do solo foi mantida a aproximadamente 70% da capacidade de campo.

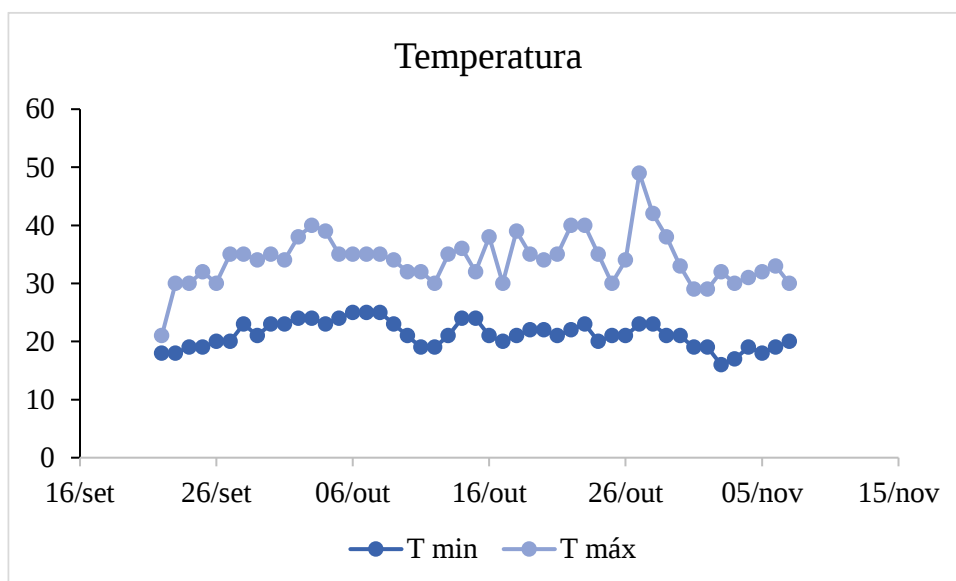


Figura 1: Temperatura mínima e máxima (°C) durante o experimento no município de Jaboticabal, São Paulo, Brasil

O estudo foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com seis tratamentos e seis repetições. Os tratamentos consistiram em cinco inoculantes com bactérias promotoras de crescimento, sendo B1: *Rhizobium leguminosarum* bv. Vicea LMR-14904; B2: *Mesorhizobium ciceri* LMG-14989; B3: *Rhizobium leguminosarum* bv. Vicea (Semia 396); B4: *Bacillus subtilis*; B5: *Bradyrhizobium* ssp. Cepas (Semia 5080/ Semia 5079 – *B. Japonicum*, Semia 587 – *B. Elkanii*) e tratamento controle (sem inoculação).

As sementes de grão-de-bico da cultivar BRS Cristalino, obtidas da Embrapa hortaliças, foram tratadas com 1 mL de solução açucarada a 10% (para aumentar a aderência ao inoculante) e 5 mL dos respectivos inoculantes para cada 100 g de semente, com exceção do tratamento controle que, em substituição ao inoculante, recebeu 5 mL de água destilada. Os inoculantes líquidos contendo as cepas das citadas bactérias, foram preparadas em concentração de 7×10^9 unidades formadoras de colônia (UFC) por mL.

Após a inoculação, as sementes foram imediatamente plantadas em solo a 2 cm de profundidade. O solo utilizado no experimento foi coletado da camada de 0-20 cm de profundidade e classificado como Latossolo Amarelo Distrófico (LAd) de acordo com o sistema Brasileiro de Classificação de Solos (Embrapa 2018), com teores de

250 g kg⁻¹ de argila, 30 g kg⁻¹ de silte e 720 g kg⁻¹ de argila, determinados de acordo com Embrapa, 2011. As características químicas do solo no período de avaliação são apresentadas na Tabela 1. Os métodos de determinação dos elementos seguiram os padrões de Van Raij et al. (2001).

Tabela 1: Caracterização química do solo coletado na camada de 0,00 a 0,20 m para a utilização no estudo

pH	MO	P	S	Ca	Mg	K	H+Al	CTC	V	B	Cu	Fe	Mn	Zn
	g dm ⁻³	mg dm ⁻³							%					
6,3	13	8	22	10	4	0,9	11	26	57	0,28	0,7	5	0,9	4,3

pH em CaCl₂.

O solo foi corrigido dez dias antes do plantio, utilizando calcário dolomítico com PRNT de 100%, em uma dose de 220 kg ha⁻¹, de forma a elevar a saturação de bases do solo à 65%. O solo corrigido foi acondicionado em vasos com capacidade para 2 dm³, onde foram plantadas cinco sementes de grão-de-bico por vaso. Quinze dias após a emergência das plântulas, fez-se o desbaste, mantendo três plantas por vaso. No momento da semeadura do grão-de-bico, foi feita a aplicação de 100 kg ha⁻¹ de P₂O₅ e 67 kg ha⁻¹ de K₂O. Vinte dias após a emergência das plântulas, fez-se a adubação com 30 kg ha⁻¹ de Mg (MgSO₄); 12 kg ha⁻¹ de Mn (MgCl₂), 12 kg ha⁻¹ de Zn (ZnSO₄); 4 kg ha⁻¹ de B (ácido bórico), 4 kg ha⁻¹ de Cu (CuSO₄) e 4 kg ha⁻¹ de Fe (FeSO₄), 6 g ha⁻¹ de Co (CoCl₂) e 50 g ha⁻¹ de Mo (molibdato de amônio).

2.2 Descrição da amostragem das plantas e das análises

No início da floração das plantas, folhas totalmente desenvolvidas foram coletadas para avaliar as concentrações de pigmentos fotossintéticos, açúcares totais e sacarose, nitrato, amônia, aminoácidos e ureídeos totais.

Mediu-se a altura e o diâmetro do caule das plantas e, posteriormente, as plantas foram coletadas, separadas em parte aérea e raiz. A parte aérea foi lavada com solução de detergente (0,1%), solução de HCl (0,3%) e água deionizada e seca em estufa de circulação forçada de ar a 65 °C ± 2 até peso constante, para a determinação da massa seca e do teor de proteína.

Nas raízes, fez-se a contagem dos nódulos. Os nódulos foram destacados, e alguns submetidos a corte histológico para captura de imagens através de microscópio óptico acoplado a microcâmera Olympus DP 11 com lente objetiva de 40x. Posteriormente, as raízes foram lavadas e secas nas mesmas condições descritas para a parte aérea.

2.2.1 Quantificação de clorofila e carotenoides

A extração dos pigmentos fotossintéticos (clorofila a, clorofila b e carotenoides), foi realizada com armazenamento das folhas frescas, em extrato de acetona a 80% e solução tamponada tris ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,8). A quantificação foi realizada pelo método espectrofotométrico proposto por Lichtenthaler (1987), com leitura em espectrofotômetro Beckman DU 640, nos comprimentos de onda de 663 nm para clorofila a, 647 nm para clorofila b e 470 nm para carotenoides.

2.2.2 Eficiência quântica do FSII (F_v/F_m)

A eficiência quântica do fotossistema II foi estimada pela medida da fluorescência da clorofila no sétimo folíolo, utilizando um fluorômetro de clorofila (Optisciences - Os30P), entre as 7 e 8 horas da manhã. As plantas foram deixadas a adaptar-se no escuro durante um mínimo de 30 minutos antes da excitação do pulso de luz vermelha de 1s. Foram determinadas a fluorescência inicial (F_0), fluorescência máxima (F_m) e eficiência quântica do fotossistema II, dada pela razão F_v / F_m (Lichtenthaler et al., 2005).

2.2.3 Açúcares totais e sacarose

Para as determinações de sacarose e açúcares totais, o material foi extraído de acordo com o método proposto por Bialeski e Turner (1966). O extrato foi preparado triturando 1 g de folhas frescas em almofariz de porcelana, em seguida o material foi transferido para tubo Falcon de 15 mL e adicionaram-se 10 mL da solução MCW (60% metanol, 25% clorofórmio e 15% água). O material foi homogeneizado em vórtex e,

posteriormente centrifugado por 10 minutos a 10.000 rpm. Adicionaram-se a outro tubo 4 mL do sobrenadante do extrato MCW, 1 mL de clorofórmio e 1,5 mL de água. Após a separação das fases, realizou-se a quantificação de sacarose, açúcares totais, aminoácidos, nitrato, amônia e ureídeos na fase aquosa.

A quantificação de açúcares totais foi realizada de acordo com Du Bois et al., (1956). Em tubo de ensaio foi adicionado 20 μ L do extrato MCW, 500 μ L de fenol (5%) e 2 mL de ácido sulfúrico concentrado. Homogeneizou-se a mistura em vórtex e após o resfriamento à temperatura ambiente e, em seguida, fez-se a leitura em espectrofotômetro com a absorbância a 490 nm. Os resultados foram expressos em mg g^{-1} de peso fresco.

A quantificação de sacarose foi realizada conforme Van Handel (1967). Em tubo de ensaio foram adicionados 50 μ L do extrato MCW, 500 μ L de KOH (30%) e 2 mL de ácido sulfúrico concentrado. A mistura foi homogeneizada em vórtex, e em seguida colocada em estufa a 100 °C por 10 minutos. A mistura foi resfriada em temperatura ambiente e em seguida fez-se a leitura em espectrofotômetro na absorbância de 490 nm, com resultados expressos em mg g^{-1} de peso fresco. A quantificação de açúcares e sacarose foram realizadas usando uma curva padrão de sacarose.

2.2.4 Nitrato e amônio

Para a determinação do teor de nitrato no tecido foliar, adotou-se o método descrito por Cataldo et al. (1975), usando o extrato MCW. As concentrações foram mensuradas por curva padrão da solução de nitrato de sódio, em espectrofotômetro no comprimento de onda de 410 nm. A quantificação da concentração de amônio, foi realizada conforme método proposto por McCullough (1967), com leituras em espectrofotômetro ($\lambda = 630 \text{ nm}$). A concentração de amônio foi estimada por meio da curva padrão de sulfato de amônio. Ambos resultados foram expressos em $\mu\text{mol g}^{-1}$ de peso fresco.

2.2.5 Aminoácidos livres totais

Na quantificação de aminoácidos livres, seguiu-se o método proposto por Moore (1968), usando a curva padrão de leucina a 0,2 mM em solução tampão de acetato de lítio (pH 5,0), com medida da absorbância a 570 nm.

2.2.6 Ureídeos

A determinação de ureídeos totais (alantoína e ácido alantóico) no tecido foliar foi feita usando o método de Vogels e Van der Drift (1970). Esse método consiste em duas fases. Na primeira fase foram aquecidos em estufa a 100 °C por 8 min uma alíquota de 250 µL do sobrenadante MCW, 250 µL de NaOH (0,5 M) e 1 gota de fenil-hidrazina. Posteriormente a mistura foi resfriada a temperatura ambiente. Nesta fase, hidrólise alcalina, a alantoína é hidrolisada a ácido alantóico. Na segunda fase, 250 µL de HCl 0,65 mol L⁻¹ foram adicionados e aquecido novamente a 100 °C por 4 minutos (hidrólise ácida); isso é, quando ocorre a hidrólise ácida da alantoína em glioxilato. O ensaio foi resfriado à temperatura ambiente, e então foram adicionados 250 µL de tampão fosfato (0,4M) pH 7,0 e 250 µL de solução de fenil-hidrazina 0,33% (m/v). Após 5 minutos à temperatura ambiente, o ensaio foi incubado em banho de gelo durante 5 minutos e posteriormente homogeneizados em vórtex. Em seguida, adicionaram-se nas amostras 1,25 mL de HCl (37% (m/m)) pré-congelado e 250 µL de solução de ferrocianeto de potássio 1,65% (m/v). Após 15 minutos à temperatura ambiente, os ureídeos foram determinadas por leitura da absorbância em espectrofotômetro ajustado a 535 nm. A determinação do ácido alantóico foi realizada seguindo processo semelhante, porém omitindo a adição de 250 µL de NaOH 0,5 M, 20 µL de 0,33% de fenil-hidrazina e 8 minutos de secagem em estufa. Para quantificar a alantoína e o ácido alantóico, foi usada uma curva de alantoína padrão. Os resultados foram expressos como µmol g⁻¹ de peso fresco.

2.2.7 Acúmulo de nutrientes e eficiência de utilização

O teor dos nutrientes na matéria seca das amostras foi realizado seguindo o descrito em Batáglio et al., (1983). Sendo assim, o teor de N foi determinado pelo método de Kjeldhal. O teor dos demais nutrientes foi determinado após digestão nítrico-perclórica, em cujo extrato o teor de P foi determinado por espectrofotometria do molibdato-vanadato; o S por turbidimetria do BaSO₄, e os demais por espectrofotometria de absorção em chama de ar-acetileno. O acúmulo dos nutrientes na planta foi obtido pela multiplicação do teor de cada elemento na matéria seca pelo total de massa seca da parte aérea. Com base no acúmulo e no teor de cada elemento foi determinado a eficiência de uso dos nutrientes na parte aérea, conforme indicações de Siddiqi e Glass (1981).

2.3 Análise estatística

Os dados foram submetidos aos testes de normalidade de Shapiro Wilk ($p < 0,05$) e teste de homocedasticidade de Levene ($p \leq 0,05$). Posteriormente, os dados com distribuição normal e variâncias homogêneas foram submetidos a análise de variância pelo teste F ($p < 0,05$) e, quando significativo, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o software Rstudio (R Core Team, 2022).

3 Resultados

As sementes de grão-de-bico tratadas com as bactérias *Mesorhizobium ciceri* LMG 14989 (B2), resultaram em plantas com altura superior de 24,91% e 23,15%, quando comparado as plantas oriundas de sementes tratadas com *Bacillus subtilis* (B4) e ao tratamento controle, respectivamente, sendo que as dos demais tratamentos apresentaram alturas intermediárias (Figura 1 A). O tratamento de sementes com as bactérias *Mesorhizobium ciceri* (B1) e *Rhizobium leguminosarum* bv. Vicea (Semia 396) (B3), resultou em plantas com diâmetro de caule 12% superior, quando

comparado aos tratamentos controle e B5, com as dos demais tratamentos (B1 e B4) apresentando valores intermediários (Figura 1 B).

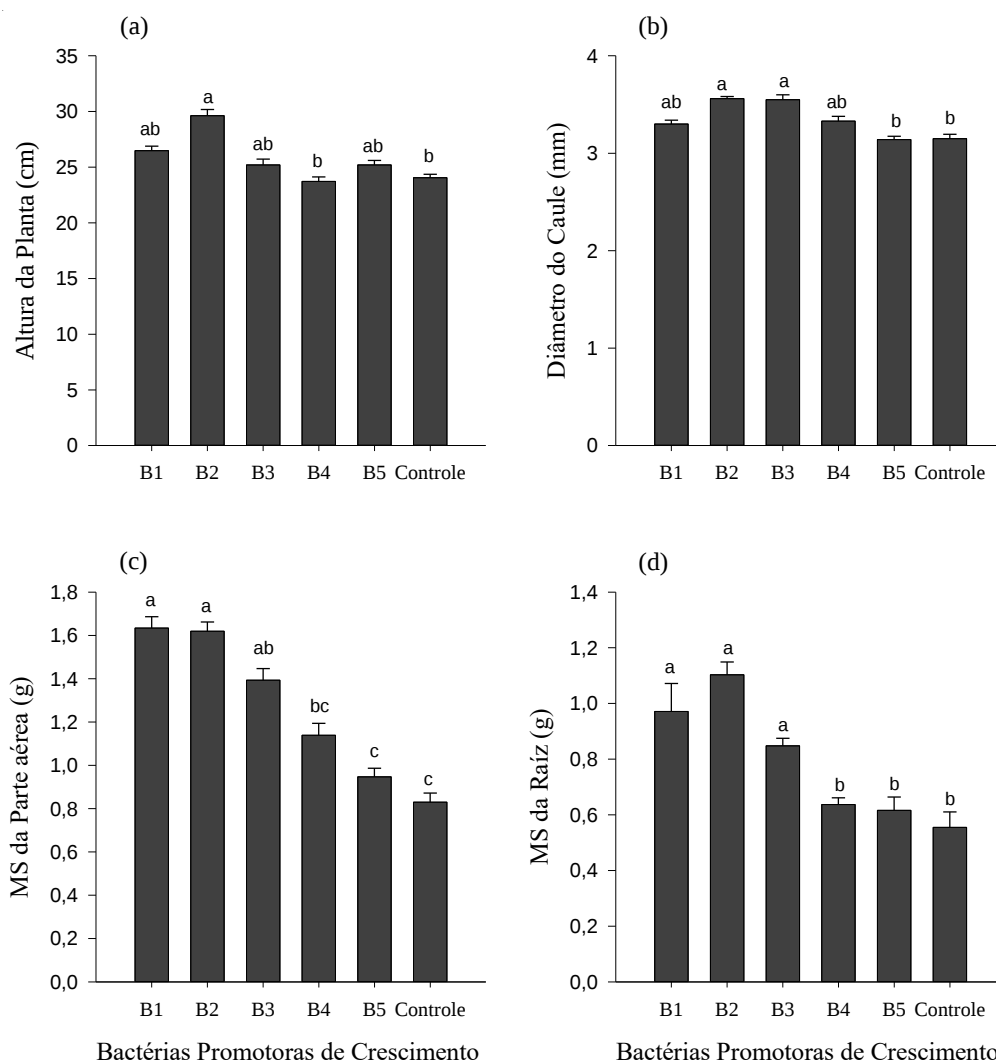


Figura 1. Altura (a), diâmetro (b), massa seca da parte aérea (c) e massa seca da raiz (d) em plantas de grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) em função do tratamento de sementes com bactérias promotoras de crescimento (B1: *Rhizobium leguminosarum* bv. Vicea LMR-14904; B2: *Mesorhizobium ciceri* LMG-14989; B3: *Rhizobium leguminosarum* bv. Vicea (Semia 396); B4: *Bacillus subtilis*; B5: *Bradyrhizobium* ssp) e controle (sem inoculação). Diferentes letras minúsculas mostram diferenças significativas entre os inoculantes pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

As plantas que resultaram do tratamento de sementes com os inoculantes constituídos por bactérias *Rhizobium leguminosarum* bv. Vicea LMR-14904 (B1), *Mesorhizobium ciceri* LMG-14989 (B2) e *Rhizobium leguminosarum* bv. Vicea (Semia 396) (B3) apresentaram maior massa seca da parte aérea e da raiz, quando comparadas aos demais tratamentos (Figura 1 C, 1 D).

Apenas as raízes das plantas que tiveram as sementes tratadas com as bactérias *Rhizobium leguminosarum* bv. Vicea LMR-14904 (B1), *Mesorhizobium ciceri* LMG-14989 (B2) e *Rhizobium leguminosarum* bv. Vicea (Semia 396) (B3) apresentaram nódulos viáveis (Figura 2). Sendo que as raízes das plantas tratadas com *Mesorhizobium ciceri* LMG-14989 (B2) tiveram em média 82% mais nódulos viáveis (com coloração avermelhada), quando comparado ao tratamento B3.

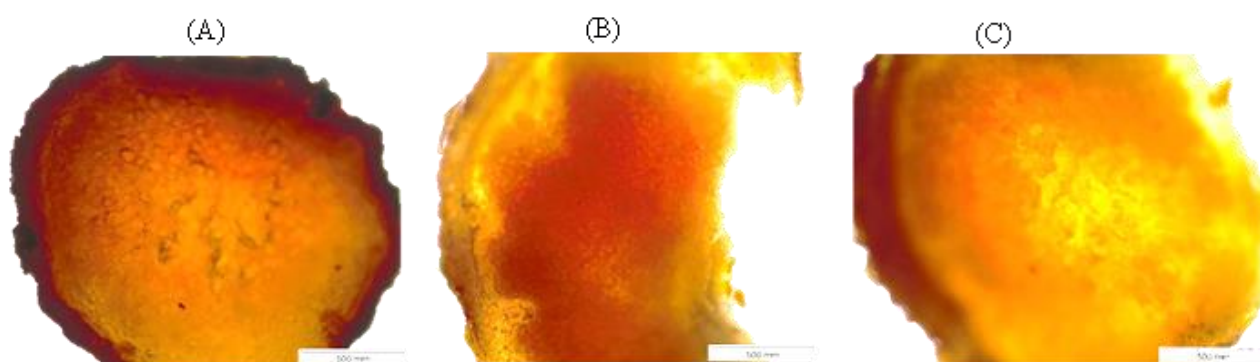


Figura 2. Fotografia do interior de nódulos de grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.), obtido das plantas tratadas com inoculantes com A - *Rhizobium leguminosarum* bv. Vicea LMR-14904 (B1), B- *Mesorhizobium ciceri* LMG-14989 (B2) e C - *Rhizobium leguminosarum* bv. Vicea (Semia 396) (B3). A coloração vermelha indica a presença de leg-hemoglobina e a viabilidade do nódulo. (Com a captura de imagens realizada através de microscópio óptico acoplado a microcâmera Olympus DP 11 com lente objetiva de 40x).

Observou-se maior concentração de clorofila a e clorofila b nas folhas de plantas com a inoculação de sementes com *Rhizobium leguminosarum* bv. Vicea LMR-14904 (B1), *Mesorhizobium ciceri* LMG-14989 (B2) e *Rhizobium leguminosarum* bv. Vicea (Semia 396) (B3), em comparação aos demais tratamentos (Figura 3A, B),

com aumentos de mais de 50%. Em relação aos teores de carotenoides, observou-se que as sementes inoculadas com as B1 e B2 resultaram em plantas com concentração de carotenoides de 53% e 52%, respectivamente, superior ao tratamento controle (Figura 3C). De forma semelhante, a maior eficiência quântica do fotossistema II também foi observada nesses dois tratamentos, quando comparada aos demais (Figura 3D)

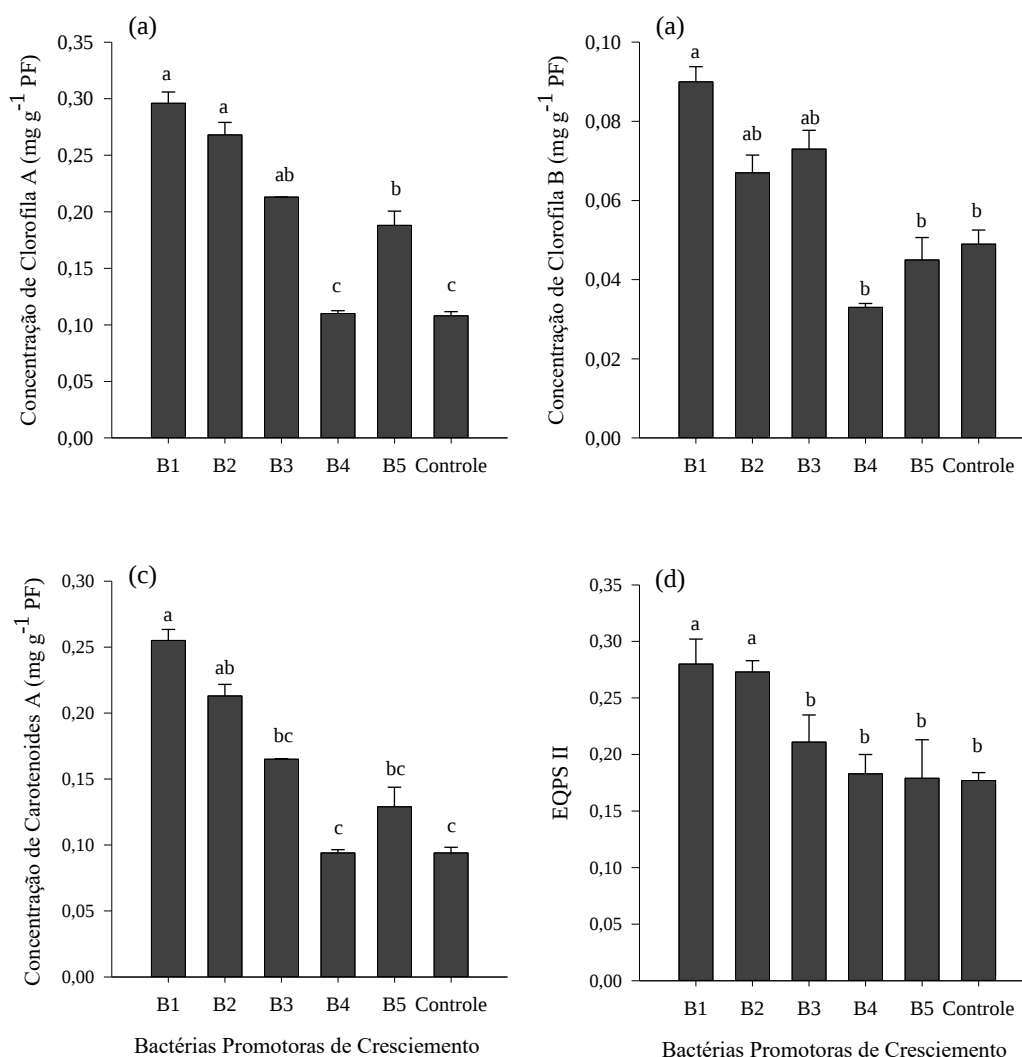


Figura 3. Concentração de clorofila A (a), clorofila B (b), carotenoides (c) e eficiência quântica do fotossistema II (d) nas folhas de grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) em função do tratamento de sementes com bactérias promotoras de

crescimento (B1: *Rhizobium leguminosarum* bv. Vicea LMR-14904; B2: *Mesorhizobium ciceri* LMG-14989; B3: *Rhizobium leguminosarum* bv. Vicea (Semia 396); B4: *Bacillus subtilis*; B5: *Bradyrhizobium* ssp) e controle (sem inoculação). Diferentes letras minúsculas mostram diferenças significativas entre os inoculantes pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Os teores de açúcares solúveis e sacarose nos tecidos foliares não apresentaram diferenças significativas entre as plantas oriundas de sementes inoculadas com as diferentes bactérias (Figura 4 A, B). No entanto, observou-se teores de açúcar total de 4,95% e 9,06% superiores nos tratamentos B2 e B4, comparativamente ao tratamento controle (Figura 4 A). E os teores de sacarose, nos tratamentos B1, B2, B4 e B5 foram 13,62%, 21,46%, 31,37% e 29,16% superiores, quando comparados a controle (Figura 4B).

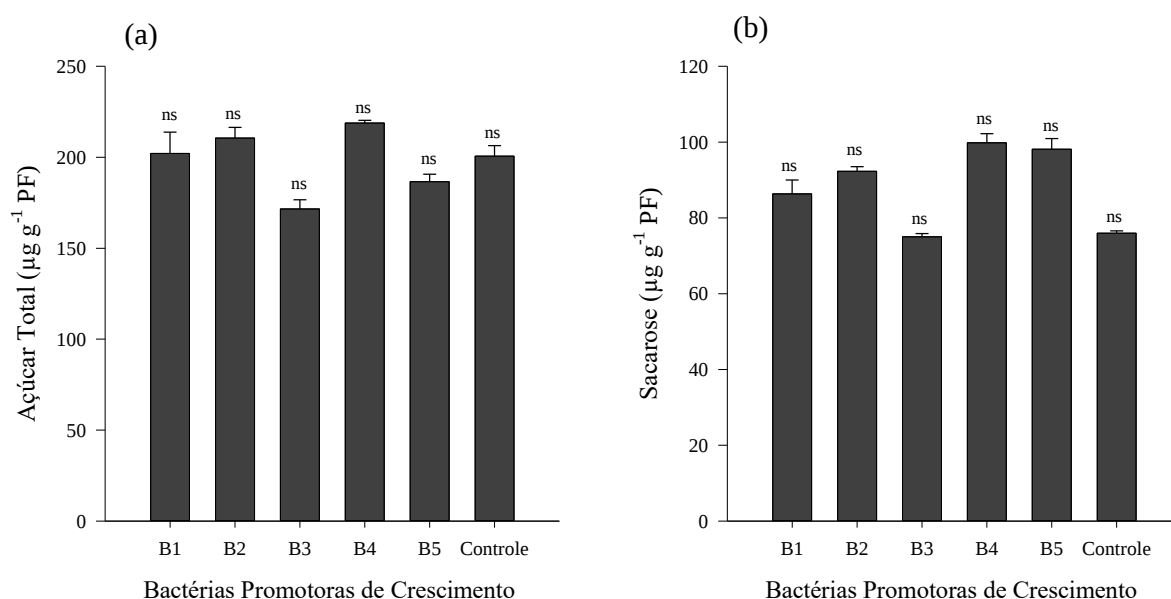


Figura 4. Concentração de açúcar total (A), e sacarose (B) em plantas de grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) em função do tratamento de sementes com bactérias promotoras de crescimento (B1: *Rhizobium leguminosarum* bv. Vicea LMR-14904; B2: *Mesorhizobium ciceri* LMG-14989; B3: *Rhizobium leguminosarum* bv. Vicea (Semia 396); B4: *Bacillus subtilis*; B5: *Bradyrhizobium* ssp) e

controle (sem inoculação). Diferentes letras minúsculas mostram diferenças significativas entre os inoculantes pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Os teores de nitrato e amônio no tecido foliar não diferiram estatisticamente entre os tratamentos (Figura 5 A, B). A presença das BPCP *Rhizobium leguminosarum* (LMR 14904) (B1) *Mesorhizobium ciceri* (B2), *Rhizobium leguminosarum* (Semia 390) (B3) e *Bacillus subtilis* (B4), em relação ao *Bradyrhizobium* ssp (B5) e ao controle, aumentaram a concentração de N acumulado em 34,3%, 34,0%, 47,5% e 33,4%, respectivamente (Figura 5 C)

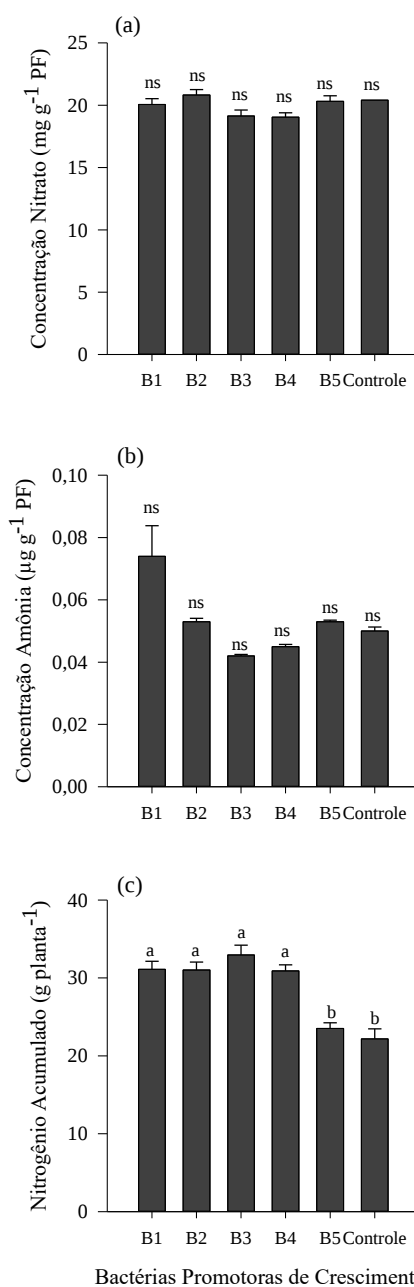


Figura 5. Concentração de nitrato (a), concentração de amônia (b) e nitrogênio acumulado (c) em plantas de grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) em função do tratamento de sementes com bactérias promotoras de crescimento (B1: *Rhizobium leguminosarum* bv. Vicea LMR-14904; B2: *Mesorhizobium ciceri* LMG-14989; B3: *Rhizobium leguminosarum* bv. Vicea (Semia 396); B4: *Bacillus subtilis*; B5: *Bradyrhizobium* ssp) e controle (sem inoculação). Diferentes letras minúsculas mostram diferenças significativas entre os inoculantes pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

As plantas que tiveram as sementes tratadas com-*Mesorhizobium ciceri* (B2) e *Bacillus subtilis* (B4), apresentaram concentração de 54,5% e 66,1%, respectivamente, superior ao tratamento controle. A concentração de ureídeos totais não diferiu estatisticamente entre os tratamentos (Figura 6 B).

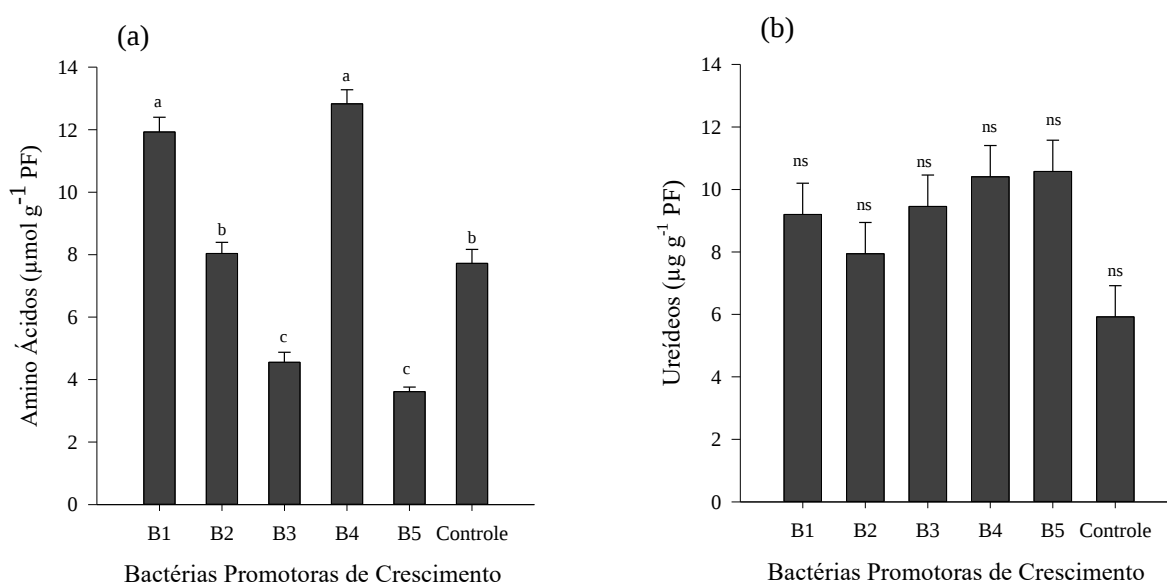


Figura 6. Concentração de aminoácido livres totais (a) e concentração de amônia (b) em plantas de grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) em função do tratamento de sementes com bactérias promotoras de crescimento (B1: *Rhizobium leguminosarum* bv. Vicea LMR-14904; B2: *Mesorhizobium ciceri* LMG-14989; B3: *Rhizobium leguminosarum* bv. Vicea (Semia 396); B4: *Bacillus subtilis*; B5: *Bradyrhizobium* ssp) e controle (sem inoculação). Letras minúsculas diferentes mostram diferenças significativas entre os inoculantes pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

A presença das bactérias B1, B2 e B3 contribuíram para o aumento na massa seca da parte aérea das plantas, comparativamente aos demais tratamentos (Tabela 2). No entanto, não interferiram significativamente na massa seca da raiz, porém, *Mesorhizobium ciceri* (B2) aumentou 56% a massa seca das raízes, quando comparado ao controle.

O acúmulo de fósforo, enxofre e potássio na parte aérea foi maior nas plantas que foram inoculadas com *Rhizobium leguminosarum* e *Mesorhizobium ciceri* (Tabela 2). Por sua vez, o acúmulo de Ca, Mg, Cu, Fe e Zn foi positivamente influenciado pelas B1, B2 e B3. A incubação com o *Bacillus subtilis* (B4) também influenciou no acúmulo de Fe nas plantas, não diferindo das demais bactérias, exceto do *Bradyrhizobium* ssp.

Tabela 2: Acúmulo de nutrientes na parte aérea de plantas de grão-de-bico, (*Cicer arietinum* L.) em função do tratamento de sementes com diferentes bactérias promotoras de crescimento (B1: *Rhizobium leguminosarum* bv. Vicea LMR-14904; B2: *Mesorhizobium ciceri* LMG-14989; B3: *Rhizobium leguminosarum* bv. Vicea (Semia 396); B4: *Bacillus subtilis*; B5: *Bradyrhizobium* ssp) e controle (sem inoculação). Letras minúsculas diferentes mostram diferenças significativas entre os inoculantes pelo teste Scott Knott ($p \leq 0,05$).

Bactérias promotoras de crescimento de plantas	Acúmulo de Macronutrientes na Parte Aérea				
	P	S	K	Ca	Mg
	g Planta ⁻¹				
<i>Rhizobium leguminosarum</i> LMR 14904	3,2 a	2,6 a	2,6 a	1,4 a	0,4 a
<i>Mesorhizobium ciceri</i>	3,3 a	2,8 a	2,7 a	1,4 a	0,4 a
<i>Rhizobium leguminosarum</i> Semia 390	2,3 b	2,3 a	2,1 b	1,2 a	0,4 a
<i>Bacillus subtilis</i>	1,9 b	1,9 b	1,7 b	0,9 b	0,3 b
<i>Bradyrhizobium</i> SSP.	1,6 b	1,5 b	1,5 b	0,7 b	0,3 b
Controle	1,6 b	1,4 b	1,5 b	0,8 b	0,2 b

Bactérias promotoras de crescimento de plantas	Acúmulo de Macronutrientes na Parte Aérea		
	Cu	Zn	Fe
	mg Planta ⁻¹		
<i>Rhizobium leguminosarum</i> LMR 14904	10,5 a	67,7 a	294,3 a
<i>Mesorhizobium Ciceri</i>	7,8 a	69,9 a	287,5 a
<i>Rhizobium leguminosarum</i> Semia 390	6,2 b	57,8 a	268,6 a
<i>Bacillus subtilis</i>	5,2 b	44,9 b	217,4 a
<i>Bradyrhizobium</i> SSP.	4,3 b	36,9 b	143,1 b
Controle	4,6 b	39,3 b	131,7 b

A inoculação das sementes com *Bradyrhizobium* ssp aumentou a eficiência de uso dos macronutrientes (N, P e K), mas não diferiu em relação ao controle (Tabela

3). As demais bactérias não aumentaram a eficiência de uso dos macronutrientes. Os tratamentos não influenciaram na eficiência de uso dos micronutrientes pelas plantas.

Tabela 3: Eficiência de utilização de nutrientes em grão-de-bico, (*Cicer arietinum* L.) em função do tratamento de sementes com bactérias promotoras de crescimento. Letras minúsculas diferentes mostram diferenças significativas entre os inoculantes pelo teste Scott Knott ($p \leq 0,05$).

Bactérias promotoras de crescimento de plantas	Eficiência de utilização de nutriente na planta				
	P	S	K	Ca	Mg
	g ² g ⁻¹				
<i>Rhizobium leguminosarum</i> LMR 14904	181,1 b	3,5 b	1,4 a	2,1 b	3,0 a
<i>Mesorhizobium Ciceri</i>	179,6 b	3,5 b	1,4 a	2,1 b	1,9 b
<i>Rhizobium leguminosarum</i> Semia 390	173,1 b	5,0 b	1,2 a	2,8 b	1,7 b
<i>Bacillus subtilis</i>	177,9 b	6,0 a	0,9 a	3,4 b	1,5 b
<i>Bradyrhizobium</i> SSP.	246,0 a	7,5 a	0,9 a	4,3 a	1,1 b
Controle	245,1 a	6,5 a	1,0 a	3,4 a	1,4 b
Bactérias promotoras de crescimento de plantas	Eficiência de utilização de nutriente na planta				
	Cu	Zn	Fe		
	g ² mg ⁻¹				
<i>Rhizobium leguminosarum</i> LMR 14904	245,3 a	42,2 a	18,1 a		
<i>Mesorhizobium Ciceri</i>	170,0 a	36,3 a	17,8 a		
<i>Rhizobium leguminosarum</i> Semia 390	203,4 a	40,0 a	15,3 a		
<i>Bacillus subtilis</i>	130,0 a	31,9 a	13,6 a		
<i>Bradyrhizobium</i> SSP.	123,2 a	26,0 a	13,7 a		
Controle	195,2 a	39,9 a	16,5 a		

4 Discussão

As sementes de grão-de-bico inoculadas com *Mesorhizobium ciceri* resultaram em plantas com maior altura e diâmetro (Figura 1 a, 1 b), e conseqüentemente maior massa seca da parte aérea e das raízes (Figura 1 c, 1d), seguido de *Rhizobium leguminosarum*.

Isso ocorreu, devido esses dois gêneros terem resultado em plantas com maior número de nódulos, sendo que as plantas oriundas de sementes tratadas com *Mesorhizobium ciceri* tiveram quantidade de nódulos ativos superior a mais de 82%, quando comparado as plantas oriundas de sementes tratadas com *Rhizobium leguminosarum*. Ainda, os nódulos de *Mesorhizobium ciceri* apresentaram coloração mais avermelhada (Figura 2 b), devido a leg-hemoglobina presente nos nódulos, indicando maior atividade. No entanto, ambos inoculantes com as bactérias *Mesorhizobium ciceri* e *Rhizobium leguminosarum* propiciaram benefícios fisiológicos as plantas, como aumento nas concentrações de pigmentos fotossintéticos, carotenoides e maior eficiência do fotossistema II (Figura 3), podendo ter elevado a fotossíntese e refletindo no aumento da síntese de proteínas. Tal fato justifica o elevado acúmulo de nitrogênio na parte aérea (Figura 5c).

Plantas oriundas de sementes tratadas com *Mesorhizobium ciceri* e *Rhizobium leguminosarum* também tiveram maior acúmulo de todos os nutrientes testados (tabela 3). Verma et al. (2013) consideraram que cepas de *Mesorhizobium ciceri* são altamente eficazes para aumento do crescimento, teor de nutrientes e rendimento do grão-de-bico. Nesse estudo, os autores relatam que *Mesorhizobium* inoculado sozinho já possibilitou aumento significativo na solubilização de fosfatos. E esse efeito foi intensificado adicionando bactérias solubilizadoras de fosfatos.

Um indicativo de fixação biológica de nitrogênio em leguminosas é a concentração de ureídeos (alantoína + ácido alantóico) (Baral et al., 2016), que por sua vez são derivados da degradação oxidativa das purinas (Carter & Tegeder, 2016). Algumas leguminosas como o grão-de-bico, podem transportar o nitrogênio fixado da FBN na forma de ureídeos (Simranjit et al., 2019). Em nosso trabalho, a concentração de ureídeos não diferiu entre os tratamentos, no entanto, as concentrações obtidas nos tratamentos com bactérias promotoras de crescimento foram superiores ao tratamento controle.

É relatado na literatura que bactérias de diversos gêneros são capazes de estabelecer simbiose com grão-de-bico e favorecer a sua nodulação (Elkoca et al., 2008; Gopalakrishnan et al., 2017). No presente estudo, para a cultivar BRS Cristalino, apenas *R. Leguminosarum*, *Mesorhizobium Ciceri* e *R. Leguminosarum* Semia 390, contribuíram para a nodulação do grão-de-bico. Elkoca et al. (2008) verificaram que

o tratamento de semente com *Bacillus subtilis* favoreceu a nodulação das plantas de grão-de-bico por intensificar a atividade de rizóbios nativos do solo. Sendo assim, o uso de *Bacillus sp.* com cepas de *Rhizobium* aumentaram o número e peso dos nódulos de grão-de-bico. Além disso, a presença de *Bacillus sp* aumenta a concentração de flavonoides na rizosfera, tornando a planta mais suscetível a infecção por rizóbios presentes no solo.

No nosso estudo, a concentração de aminoácidos livres total foi maior nas plantas inoculadas com *Bacillus sp* e *Rhizobium leguminosarum* (LMR 14904) (Figura 6 a). Isso pode ter ocorrido devido as bactérias promotoras de crescimento de plantas estarem envolvidas na produção do hormônio responsável pelo crescimento da raiz (auxina), como ácido indol acético, que é sintetizado a partir do triptofano (Olanrewaju et al., 2017).

O acúmulo de nitrogênio e de ferro nas plantas foi maior que as do controle, mas não diferiram entre si, com exceção do *Bradyrhizobium spp*, que teve característica semelhante ao controle (Tabela 2). Isso ocorreu provavelmente devido ao *Bacillus sp* apresentar a capacidade de produção de amônio e agentes sideróforos quelantes de ferro (Pandey et al., 2019).

As plantas inoculadas com bactérias obtiveram maiores acúmulos de nitrogênio em comparação às do tratamento controle (Figura 5). Para o P, as plantas oriundas de tratamento de sementes com bactérias *Rhizobium leguminosarum* (B1) e *Mesorhizobium Ciceri* (B2), tiveram maior acúmulo de P. Nas plantas oriundas de sementes tratadas com as B1, B2 e B3 foi observado maior acúmulo de enxofre, cálcio, magnésio e zinco. No entanto, a eficiência de utilização quando comparada ao controle foi baixa (Tabela 3). A eficiência de utilização, foi testada para verificar quanto do nutriente absorvido refletiu em massa seca da planta. Essa eficiência, é dependente de vários fatores, como a eficiência da própria planta em utilizar os recursos disponíveis para o seu desenvolvimento, em condições de baixa disponibilidade de nutrientes.

5 Conclusões

A inoculação de sementes de grão-de-bico com *Rhizobium leguminosarum* bv. Vicea LMR-14904 e *Mesorhizobium ciceri* LMG-14989 afetaram positivamente a eficiência da fixação biológica de nitrogênio da planta, aumentando a concentração de pigmentos fotossintéticos e eficiência quântica do fotossistema II.

O *Mesorhizobium ciceri* foi o gênero que produziu maior quantidade de nódulos ativos e viáveis.

6 Referências

Abd-Alla, M. H., Nafady, N. A., Bashandy, S. R., & Hassan, A. A. (2019). Mitigation of effect of salt stress on the nodulation, nitrogen fixation and growth of chickpea (*Cicer arietinum* L.) by triple microbial inoculation. *Rhizosphere*, 10(March), 100148. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2019.100148>

Baral, B., Teixeira da Silva, J. A., & Izaguirre-Mayoral, M. L. (2016). Early signaling, synthesis, transport and metabolism of ureides. *Journal of Plant Physiology*, 193, 97–109. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2016.01.013>

Bataglia OC, Furlani AMC, Teixeira JPF, Furlani PR, Gallo JR (1983). Métodos de análise química de plantas. Instituto Agrônômico de Campinas, Campinas, 48p. (Boletim Técnico 78).

Buekers, J., Mertens, J., & Smolders, E. (2010). Toxicity of the molybdate anion in soil is partially explained by effects of the accompanying cation or by soil pH. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29(6), 1274–1278. <https://doi.org/10.1002/etc.162>

Carter, A. M., & Tegeder, M. (2016). Increasing Nitrogen Fixation and Seed Development in Soybean Requires Complex Adjustments of Nodule Nitrogen Metabolism and Partitioning Processes. *Current Biology*, 26(15), 2044–2051.

<https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.06.003>

Cataldo DA, Maroon M, Schrader LE, Youngs VL (1975) Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 6 (1):71–80.

Elkoca, E., Kantar, F., & Sahin, F. (2008). Influence of nitrogen fixing and phosphorus solubilizing bacteria on the nodulation, plant growth, and yield of chickpea. *Journal of Plant Nutrition*, 31(1), 157–171. <https://doi.org/10.1080/01904160701742097>

Fierro-Coronado, R. A., Quiroz-Figueroa, F. R., García-Pérez, L. M., Ramírez-Chávez, E., Molina-Torres, J., & Maldonado-Mendoza, I. E. (2014). Iaa-producing rhizobacteria from chickpea (*Cicer arietinum* L.) induce changes in root architecture and increase root biomass. *Canadian Journal of Microbiology*, 60(10), 639–648. <https://doi.org/10.1139/cjm-2014-0399>

Gopalakrishnan, S., Srinivas, V., Vemula, A., Samineni, S., & Rathore, A. (2018). Influence of diazotrophic bacteria on nodulation, nitrogen fixation, growth promotion and yield traits in five cultivars of chickpea. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 15(May), 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.05.006>

Jukanti, A. K., Gaur, P. M., Gowda, C. L. L., & Chibbar, R. N. (2012). Nutritional quality and health benefits of chickpea (*Cicer arietinum* L.): A review. *British Journal of Nutrition*, 108(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1017/S0007114512000797>

Merga, B., & Haji, J. (2019). Economic importance of chickpea: Production, value, and world trade. *Cogent Food and Agriculture*, 5(1), 1–12. <https://doi.org/10.1080/23311932.2019.1615718>

Nascimento, Warley Marcos; Cardoso, Antonio Ismael Inácio; Suinaga, Fabio Akiyoshi; Boiteux, Silva Leonardo; Lana, Milza Moreira; Peixoto, N. (2016). Hortaliças Leguminosas. In W. M. Nascimento (Org.), *Embrapa* (1ª, Vol. 13, Número 1).

- Palmero, F., Fernandez, J. A., Garcia, F. O., Haro, R. J., Prasad, P. V. V., Salvagiotti, F., & Ciampitti, I. A. (2022). A quantitative review into the contributions of biological nitrogen fixation to agricultural systems by grain legumes. *European Journal of Agronomy*, 136(April), 126514. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2022.126514>
- Pandey, S., Gupta, S., & Ramawat, N. (2019). Unravelling the potential of microbes isolated from rhizospheric soil of chickpea (*Cicer arietinum*) as plant growth promoter. *3 Biotech*, 9(7), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1809-2>
- Raij B, Andrade JC, Cantarella H, Quaggio JÁ (2001) *Análise Química para Avaliação da Fertilidade de Solos Tropicais*, 1st ed.; IAC: Campinas, Brasil, 2001.
- Rocha, K. F., Mariano, E., Grassmann, C. S., Trivelin, P. C. O., & Rosolem, C. A. (2019). Fate of 15N fertilizer applied to maize in rotation with tropical forage grasses. *Field Crops Research*, 238(April), 35–44. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2019.04.018>
- Rybiński, W., Banda, M., Bocianowski, J., Starzycka-Korbas, E., Starzycki, M., & Nowosad, K. (2019). Estimation of the physicochemical variation of chickpea seeds (*Cicer arietinum* L.). *International Agrophysics*, 33(1), 67–80. <https://doi.org/10.31545/intagr/103889>
- Sá, J. C. de M., Lal, R., Cerri, C. C., Lorenz, K., Hungria, M., & de Faccio Carvalho, P. C. (2017). Low-carbon agriculture in South America to mitigate global climate change and advance food security. *Environment International*, 98(2017), 102–112. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.10.020>
- Shcherbakova, E. N., Shcherbakov, A. V., Andronov, E. E., Gonchar, L. N., Kalenskaya, S. M., & Chebotar, V. K. (2017). Combined pre-seed treatment with microbial inoculants and Mo nanoparticles changes composition of root exudates and rhizosphere microbiome structure of chickpea (*Cicer arietinum* L.) plants. *Symbiosis*, 73(1), 57–69. <https://doi.org/10.1007/s13199-016-0472-1>

Silva, K. F., de Moraes, D. H. M., Mesquita, M., de Oliveira, H. F. E., Nascimento, W. M., Battisti, R., & Flores, R. A. (2021). Water requirement and crop coefficient of three chickpea cultivars for the edaphoclimatic conditions of the Brazilian savannah biome. *Irrigation Science*, 39(5), 607–616. <https://doi.org/10.1007/s00271-021-00737-z>

Simranjit, K., Ranjan, K., Prasanna, R., Ramakrishnan, B., Kanchan, A., & Shivay, Y. S. (2019). Exploring Crop–Microbiome Interactions Towards Improving Symbiotic Performance of Chickpea (*Cicer arietinum*) Cultivars Using Cyanobacterial Inoculants. *Journal of Plant Growth Regulation*, 38(1), 55–69. <https://doi.org/10.1007/s00344-018-9809-8>

Sousa, D. M. G. de; E. L. (2004). Cerrado. In *Correção do solo e adubação* (Vol. 4, Número 1).

Vogels GD and C, Drift V (1970) Differential analyses of glyoxylate derivatives. *Analytical Biochemistry* 33 (1):143–57.

CAPÍTULO 4 - NODULAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE UREÍDEOS EM GRÃO-DE-BICO TRATADO COM COBALTO E MOLIBDÊNIO

RESUMO – O Co (cobalto) e o Mo (molibdênio) são elementos fundamentais para a fixação biológica de nitrogênio em plantas leguminosas. Entretanto ainda não se sabe qual a faixa de concentração segura para se usar no tratamento de sementes de grão-de-bico para se obter máxima eficiência e mínima intoxicação. Diante disso, o objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos da aplicação de doses combinadas de Co e Mo em sementes de grão-de-bico sobre a nodulação e fisiologia da planta. O estudo foi realizado sob esquema fatorial 4x4, com cinco repetições. As sementes de grão-de-bico foram tratadas com quatro doses de Co (0, 30, 60 e 100 mg kg⁻¹) e Mo (0, 100, 450, 650 mg kg⁻¹), inoculadas com *Mesorhizobium ciceri* e semeadas em vasos contendo 4 dm³ de um solo arenoso. Nos resultados foi observado que plantas oriundas de sementes tratadas com doses de Co entre 52 e 77 mg kg⁻¹ e de Mo entre 216 e 400 mg kg⁻¹ de semente, e inoculadas com *Mesorhizobium ciceri*, induziu maior nodulação das raízes, maior massa seca nodular, melhorou a eficiência do fotossistema II (PSII), aumentou a concentração de ureídeos e açúcares totais nas folhas, com pouco prejuízo na permeabilidade das membranas celulares.

Palavras-chave: *Cicer arietinum*, fixação biológica de nitrogênio, nódulos radiculares, tratamento de sementes, superfície resposta.

1 Introdução

O grão-de-bico (*Cicer arietinum*) é uma leguminosa da família Fabacea e foi uma das primeiras plantas a serem domesticadas no Oriente Médio (Jukanti et al., 2012). Devido seu alto teor de fibras, proteínas, vitaminas, gorduras, ácido fólico (Rachwa-Rosiak et al. 2015) e de minerais como ferro e zinco, possui grande relevância na alimentação humana (Merga and Haji 2019). A produção global de grão-de-bico é de cerca de 17,19 milhões de toneladas, com 67% da produção concentrada na Índia (FAOSTAT, 2019), mas com cultivo ainda pouco expressivo no Brasil. Assim como outras leguminosas, o grão-de-bico tem grande relevância na agricultura, sendo economicamente viável e ambientalmente sustentável (Benjelloun et al., 2019), porque essas plantas estabelecem uma relação de simbiose com microrganismos que são capazes de utilizar o nitrogênio atmosférico (N_2), que é inacessível para as plantas, reduzindo o mesmo para a forma amoniacal que é convertida em glutamina pela enzima glutamina sintetase (GS) (Udvardi & Poole, 2013). Todo esse processo ocorre graças à nitrogenase, que é uma enzima localizada no interior do nódulo. A nitrogenase é um complexo enzimático formado por duas metaloproteínas: a proteína ferro-molibdênio (FeMo), que catalisa a redução do N_2 e a de ferro-proteína (Fe) que transfere elétrons para a proteína FeMo (Andrews et al. 2009; Bosse et al. 2021). Por isso a interação do grão-de-bico com microrganismos simbiotes contribui para a melhoria na fertilidade do solo ao fixar nitrogênio, refletindo também em aumentos na produtividade da cultura (Flowers et al., 2010). Como consequência, há redução no uso de fertilizantes minerais, que representam elevados custos. Além disso, a redução da aplicação de adubos nitrogenados no solo também contribui para a redução efeito estufa e contaminação de águas, devido à redução nas formas voláteis-óxido nitroso e diminuição da lixiviação do nitrato no perfil do solo (Bisht et al., 2019).

O grão-de-bico é considerado um hospedeiro restritivo para nodulação, ou seja, poucas espécies de bactérias são capazes de induzir nódulos eficazes e conter genes *nodC* e *nifH* (Benjelloun et al., 2019) que são os responsáveis pela FBN (fixação biológica do nitrogênio). Recentemente Mir et al. (2021) atribuíram a baixa produtividade de grão-de-bico, a solos de baixa fertilidade e a baixa população de rizóbios no solo. Entretanto, já existem estudos demonstrando que algumas cepas de

rizóbios são capazes de promover o crescimento e o desenvolvimento das plantas de grão-de-bico, por aumentar sua nodulação e sua eficiência na fixação biológica de nitrogênio (FBN) (Mir et al., 2021; Zhang et al., 2020). No entanto, são escassos estudos que utilizam a nutrição de plantas visando aumentar a eficiência da FBN em plantas de grão-de-bico, principalmente abordando os mecanismos de assimilação e transporte de nitrogênio, na forma de aminoácidos e ureídeos. Vale também ressaltar que as novas cultivares, lançadas pela Embrapa hortaliça em 2015, tem alto potencial produtivo e por isso demandam mais nutrientes, como o N. O cobalto (Co) e molibdênio (Mo) são elementos fundamentais na FBN, pois são conhecidos por aumentar a nodulação e estimulam a produção de compostos nitrogenados nas plantas (Gericó et al., 2020). Isso por que o Mo está diretamente envolvido na FBN por ser componente da nitrogenase (Alam et al., 2015). O Co, por sua vez, é considerado um elemento benéfico para as plantas leguminosas, pois compõe a cobalamina (vitamina B₁₂ e seus derivados), precursora da leg-hemoglobina que tem função de impedir a inativação da enzima nitrogenase. Sendo assim, a indisponibilidade de Co e Mo para as plantas também pode afetar o desenvolvimento e funcionalidade do nódulo (Ali et al., 2010), o que reflete na diminuição da FBN.

A disponibilidade de Co e Mo para as plantas é limitada por diversos fatores, tais como a baixa concentração no solo, pH fora da faixa de 5,5 a 6,5, baixo teor de matéria orgânica no solo, dentre outros. A concentração desses elementos no solo vem reduzindo ao longo dos anos, devido aos intensos cultivos que os extraem dos solos e os exportam pelas colheitas. Diante disso, mesmo sendo requeridos em pequenas quantidades, é necessária a avaliação das concentrações no solo e, quando necessário, sua reposição no solo ou outra forma de fornecimento para as plantas. Dentre as formas de aplicação destaca-se o tratamento de sementes com Co e Mo, juntamente com o inoculante, como já tem sido feito na cultura da soja (Farooq et al. 2012).

Atualmente, não são encontrados trabalhos que visam verificar o efeito de doses combinadas de Co e Mo via tratamento de sementes em grão-de-bico. Diante disso, este estudo foi idealizado com o objetivo de avaliar os efeitos da aplicação de doses combinadas de Co e Mo em sementes de grão-de-bico sobre a nodulação e sobre a fisiologia das plantas.

2 Material e Métodos

2.1 Descrição do local de realização do estudo e design experimental

O experimento foi realizado em casa de vegetação no período de abril a agosto de 2021, na Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (Unesp/FCAV), campus Jaboticabal, São Paulo, Brasil. A temperatura máxima, mínima e umidade da casa de vegetação foram medidos diariamente com auxílio de um termo-higrômetro, sendo obtidas médias durante o período de estudo de 34,5 °C, 15 °C e 71 %, respectivamente.

Realizou-se o experimento em esquema fatorial 4x4, sob delineamento em blocos casualizados, com dez repetições, perfazendo um total de 160 unidades experimentais. Cada unidade experimental foi composta por um vaso contendo 4 dm³ de solo. O solo utilizado foi um Latossolo Amarelo Distrófico (LAd) de acordo com o Sistema Brasileiro de Classificação de Solos (Embrapa, 2018), com teores de 250 g kg⁻¹ de argila, 30 g kg⁻¹ de silte e 720 g kg⁻¹ de areia, determinados de acordo com Embrapa (2017). A caracterização química do solo foi feita segundo Raij et al. (2001), com os seguintes resultados de pH: 5,7; matéria orgânica do solo (MO): 13 g dm⁻³; P (extraído por resina): 13 mg dm⁻³; S: 9 mg dm⁻³; Ca: 11 mmol_c dm⁻³; Mg: 4 mmol_c dm⁻³; K: 0,9 mmol_c dm⁻³; H+Al: 10 mmol_c dm⁻³; CTC: 26 mmol_c dm⁻³; V: 62%; B: 0,27 mg dm⁻³; Cu: 0,7 mg dm⁻³; Fe: 5 mg dm⁻³; Mn: 1,3 mg dm⁻³; Zn: 3 mg dm⁻³.

Antes da semeadura, o solo foi corrigido pela aplicação de CaCO₃ + MgCO₃ (na proporção de 3:1 em massa) a fim de elevar a saturação de bases do solo à 70%. O solo corrigido foi umedecido (até 70% da capacidade de campo) e incubado por dez dias. Em seguida foi seco ao ar adicionado de 27,75 mg dm⁻³ de superfosfato simples.

As sementes de grão-de-bico da cultivar 'BRS Cristalino' foram tratadas com solução de cloreto de cobalto nas doses 0, 30, 60 e 100 mg kg⁻¹ de Co e com solução de molibdato de sódio nas doses de 0, 100, 450, 650 mg kg⁻¹ de Mo. Em seguida, foram tratadas com 1 mL de solução açucarada a 10% (para aumentar a aderência ao inoculante e fornecer energia para as bactérias) e posteriormente foi aplicado 5 mL do inoculante de *Mesorhizobium ciceri* LMG-14989 para cada 100 g de sementes. O

referido inoculante líquido foi preparado em meio YML em uma concentração de 7×10^9 unidades formadoras de colônia (UFC/mL). As doses de Co e Mo foram estabelecidas com base em experimento preliminar.

A semeadura foi feita logo após o tratamento e a inoculação das sementes, semeando-se 6 sementes em pequenas covas com 2 cm de profundidade. A umidade do solo foi mantida a cerca de 60% pela adição de água destilada, sendo monitorada periodicamente pelo método das pesagens.

A emergência das plântulas ocorreu quatro dias após a semeadura. Após 15 dias da emergência das plântulas, fez-se o desbaste, mantendo quatro plantas por vaso. Logo após o desbaste também foram aplicados 200 mg dm^{-3} de K_2O , 190 mg dm^{-3} de MgSO_4 , 24 mg dm^{-3} de MnCl_2 , 12 mg dm^{-3} de H_3BO_3 e 8 mg dm^{-3} de CuSO_4 (Sousa e Lobato, 2004).

2.2 Amostragem das plantas e preparação das amostras

No início da floração das plantas de grão-de-bico, cinco repetições foram retiradas para realizar as avaliações bioquímicas e das raízes e as demais foram mantidas para avaliação da produção final de grãos (avaliando o número de grãos e a massa seca dos grãos). Na época da floração mediu-se a altura (cm) e diâmetro (mm) das plantas. Folhas totalmente desenvolvidas foram coletadas para avaliar os teores de açúcares totais, sacarose, nitrato, amônio, aminoácidos e ureídeos totais. A seguir as plantas foram coletadas e separadas em parte aérea e raiz. A parte aérea foi lavada com solução de detergente (0,1% v:v), solução de HCl (0,3% v:v) e água deionizada e seca em estufa de circulação forçada de ar a $65 \pm 2^\circ \text{C}$ até peso constante, para determinação da massa seca e do teor de Mo e Co. Para a determinação dos teores de Co e Mo adotou-se o método proposto por Jones & Case (1990), em que 0,25 mg das cinzas da parte aérea foram adicionados 25 mL de ácido nítrico (5%), em cujo extrato foi realizada a quantificação dos teores de Co e Mo utilizando um espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS).

Nas raízes, fez-se a contagem dos nódulos. Em seguida, os nódulos foram destacados, submetidos a corte histológico para captura de imagens e secos em

estufa de circulação forçada de ar a 65 ± 2 °C até peso constante. Após, as raízes foram lavadas e secas conforme o descrito para a parte aérea.

2.2.1 Determinação da eficiência quântica do fotossistema II (Fv/Fm)

A eficiência quântica do fotossistema II (FSII) foi estimada pela medição da fluorescência da clorofila no sétimo folíolo das plantas, utilizando um fluorômetro de clorofila (Opti-sciences - Os30P), realizando-se as medidas entre as 7 e 8 horas da manhã. As plantas foram deixadas no escuro por pelo menos 30 minutos antes da excitação do pulso de luz vermelha por 1 segundo. Em seguida, foram determinadas a fluorescência inicial (F0), fluorescência máxima (Fm) e eficiência quântica do fotossistema II, dada pela razão entre a fluorescência variável e a fluorescência média (Fv/Fm) (Lichtenthaler et al., 2005).

2.2.2 Determinação da integridade da membrana das células

Para avaliação dos danos à integridade das membranas celulares, foi determinado o índice de extravasamento de eletrólitos celulares (IVE). Para isso, foram retirados três discos foliares de 129 mm² cada, da sétima folha da planta. Os discos foram emergidos em 20 ml de água deionizada a temperatura de 25 °C. Após 2 horas, foi medida a condutividade elétrica inicial da solução (EC₁) utilizando condutivímetro portátil (TDS-3 digital meter). Posteriormente, as amostras foram autoclavadas a 121 °C por 20 minutos e obtida a condutividade elétrica final da solução (EC₂). O IVE foi calculado utilizando a fórmula: $(EC_1 / EC_2) \times 100$.

2.2.3 Determinação do teor de açúcares totais e sacarose

Para determinação de sacarose e açúcares totais, foi utilizado o método proposto por Bialeski e Turner (1966). O extrato foi preparado triturando-se 1 g de folhas frescas em almofariz de porcelana, em seguida o material foi transferido para tudo Falcon de 15 mL e adicionou-se 10 mL da solução MCW (60% metanol, 25% clorofórmio e 15% água). O material foi homogeneizado em vórtex e, posteriormente

centrifugado a 4 °C por 10 minutos a 10.000 rpm. Adicionou-se a outro tubo 4 mL do sobrenadante do extrato MCW, 1 mL de clorofórmio e 1,5 mL de água. Após a separação das fases, realizou-se a quantificação de sacarose, açúcares totais, aminoácidos, nitrato e ureídeos totais (alantoína+ácido alantônico) na aquosa.

A quantificação de açúcares totais foi realizada de acordo com DuBois et al., (1956). Em tubo de ensaio foi adicionado 20 µL do extrato MCW, 500 µL de fenol (5%) e 2 mL de ácido sulfúrico p.a. Homogeneizou-se a mistura em vórtex e após o resfriamento à temperatura ambiente, fez-se leitura da absorbância em espectrofotômetro ajustado para 490 nm. As concentrações foram expressas em mg g⁻¹ de peso fresco.

A quantificação de sacarose foi realizada conforme Van Handel (1967). Em tubo de ensaio foi adicionado 50 µL do extrato MCW, 500 µL de KOH (30%) e 2 mL de ácido sulfúrico concentrado. A mistura foi homogeneizada em vórtex, e em seguida mantida em estufa a 100 °C por 10 minutos. A mistura foi resfriada em temperatura ambiente e em seguida fez-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro ajustado para 490 nm, com concentrações expressas em mg g⁻¹ de peso fresco. A quantificação de açúcares totais e sacarose foram realizadas usando uma curva padrão de sacarose.

2.2.4 Determinação de nitrato

Para a determinação de nitrato em folhas de grão-de-bico, adotou-se o método descrito por Cataldo et al. (1975). Em tubo de ensaio, foi adicionado uma alíquota de 100 µL fase aquosa do extrato MCW (conforme descrito no item 2.2.3) e 0,4 mL de ácido salicílico 5% em ácido sulfúrico (m/v). Depois de 20 min em temperatura ambiente, acrescentou-se 9,5 mL de NaOH (2N). Após resfriamento à temperatura ambiente, fez-se a determinação da absorbância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 410 nm. As concentrações foram expressas em µmol g⁻¹ de peso fresco.

2.2.5 Determinação de aminoácidos livres totais e ureídeos totais

Para a quantificação de aminoácidos livres seguiu-se o método proposto por Moore (1968). Em um tubo de ensaio foi adicionado 1 mL do sobrenadante MCW e 1 mL de ninhidrina, agitou-se por 10 segundos e em seguida os tubos foram aquecidos em banho maria ($\pm 100^\circ\text{C}$) por 15 minutos. Após o resfriamento, adicionou-se 5 mL de etanol (50% v/v) e as amostras foram agitadas manualmente por 1 minuto. Em seguida, os aminoácidos livres foram determinados por leitura da absorbância em espectrofotômetro ajustado a 570 nm. As concentrações foram expressas em $\mu\text{mol g}^{-1}$ de peso fresco.

Na quantificação de aminoácidos livres, seguiu-se o método proposto por Moore (1968), usando a curva padrão de leucina a 0,2 mM em solução tampão de acetato de lítio (pH 5,0), com medida da absorbância a 570 nm.

2.2.6 Ureídeos

Para determinação de ureídeos totais (alantoína e ácido alantóico) no tecido foliar foi usado o método de Vogels e Van der Drift (1970). A determinação de alantoína consistiu em aquecer em estufa 100°C por 8 min uma alíquota de 250 μL do sobrenadante MCW, 250 μL de NaOH (0,5 M) e 1 gota de fenil-hidrazina. Posteriormente a mistura foi resfriada a temperatura ambiente e em seguida foram adicionados 250 μL de HCl 0,65 N e aquecida novamente a 100°C por 4 minutos (hidrólise ácida). O ensaio foi resfriado à temperatura ambiente, e então foram adicionados 250 μL de tampão fosfato (0,4M) pH 7,0 e 250 μL de solução de fenil-hidrazina 0,33%. Após 5 minutos à temperatura ambiente, o ensaio foi incubado em banho de gelo durante 5 minutos e posteriormente homogeneizados em vórtex. Em seguida, adicionou-se 1,25 mL de HCl p.a. pré-congelado e 250 μL de solução de ferrocianeto de potássio 1,65%. A mistura foi homogeneizada por agitação em vórtex. Após 15 minutos à temperatura ambiente, os ureídeos foram determinadas por leitura da absorbância em espectrofotômetro ajustado a 535 nm. A determinação do ácido alantóico foi realizada seguindo processo semelhante, porém omitindo a adição de 250 μL de NaOH 0,5 M, 20 μL de 0,33% de fenil-hidrazina e 8 minutos de secagem

em estufa. Para quantificar a alantoína e o ácido alantóico, foi usada uma curva de alantoína padrão. Os resultados foram expressos como $\mu\text{mol g}^{-1}$ de peso fresco.

2.3 Análise estatística

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro Wilk ($p \leq 0,05$) e teste de homocedasticidade de Levene ($p \leq 0,05$). Posteriormente, os dados foram submetidos análise de regressão linear e múltipla, com os coeficientes testados até ($p \leq 0,10$) pelo teste t, utilizando o software RStudio (R Core Team, 2022).

3 Resultados

3.1 Avaliação biométrica das plantas

As plantas de grão-de-bico não apresentaram diferenças significativas quanto a altura e diâmetro do caule em relação ao aumento das doses de Co e Mo (Figura 1a, b). Porém, a aplicação de Mo até 425 mg kg^{-1} elevou a massa seca da parte aérea (Figura 1c).

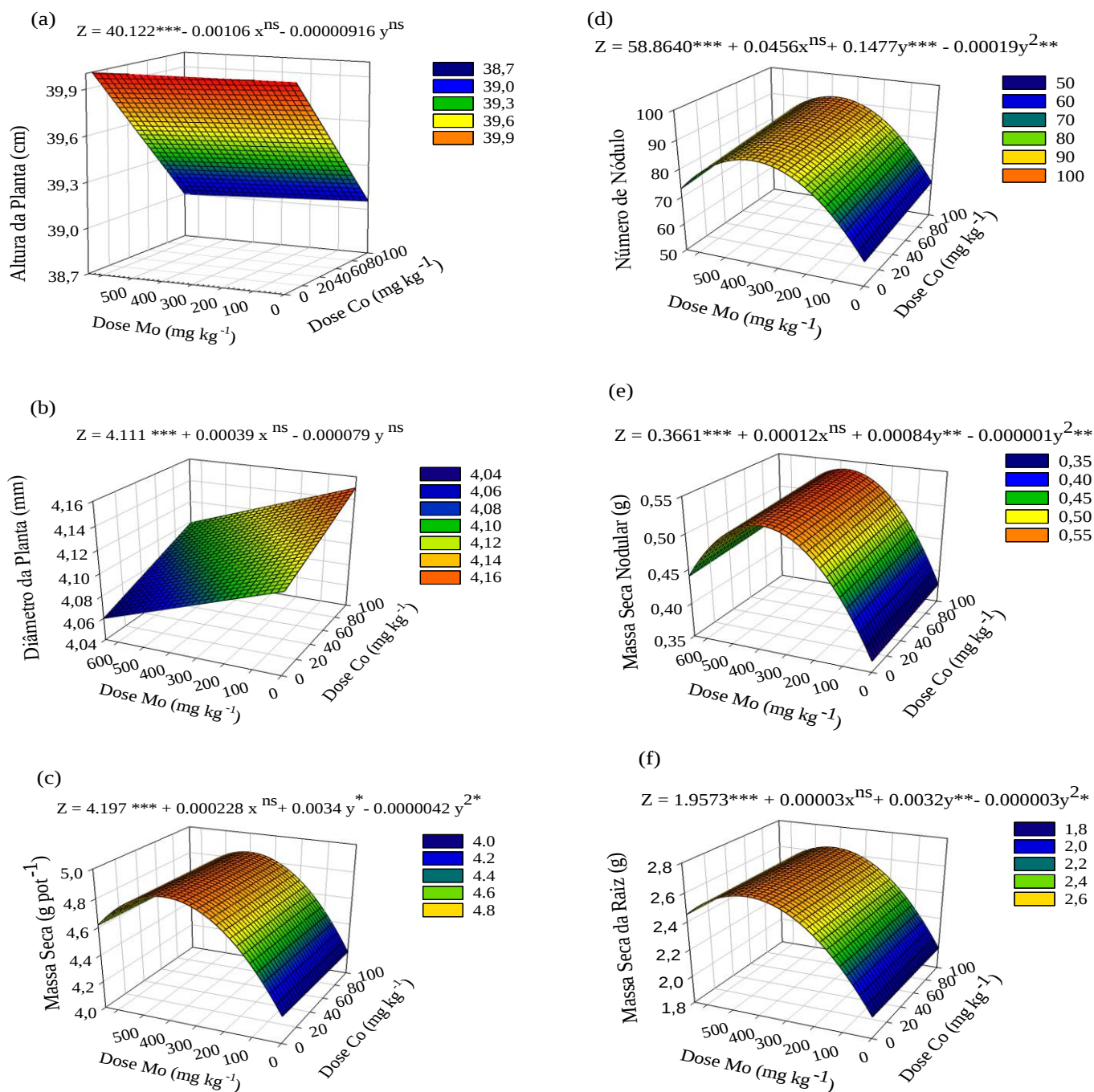


Figura 1. Altura da planta (a), diâmetro do caule (b), massa seca da parte aérea (c), número de nódulos (d), massa seca do nódulo (e) e massa seca da raiz (f) de plantas de grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) em função do tratamento de sementes com doses de cobalto (x) e molibdênio (y). As doses estão expressas em mg do elemento por kg de sementes. Coeficientes

significativos a: *** ($p \leq 0,001$); ** ($p \leq 0,01$); * ($p \leq 0,05$); ° ($p \leq 0,1$); e ^{ns} = não significativo.

3.2 Nodulação e massa seca da raiz

O tratamento das sementes com Co não influenciou no número de nódulo, massa seca dos nódulos e massa seca das raízes (Figura 1d, 1e, 1f). O número de nódulos, massa seca nodular e massa seca das raízes tiveram efeito quadrático, com melhores respostas na dose de 400 mg kg^{-1} Mo (Figura 1d, 1e, 1f).

3.3 Eficiência quântica do fotossistema II e Índice de extravasamento de eletrólitos celulares

O tratamento das sementes com Co aumentou de forma linear a eficiência quântica do fotossistema II (F_v/F_m) (Figura 2a) e reduziu o extravasamento de eletrólitos (Figura 2b). Porém, o tratamento das sementes com Mo aumentou a eficiência quântica do PSII até a dose de 216 mg kg^{-1} (Figura 2 c). As plantas oriundas de sementes tratadas com Mo tiveram redução no extravasamento de eletrólitos até a dose de 364 mg kg^{-1} , no entanto, doses acima desse valor, levaram a aumentos também do extravasamento de eletrólitos (Figura 2 d).

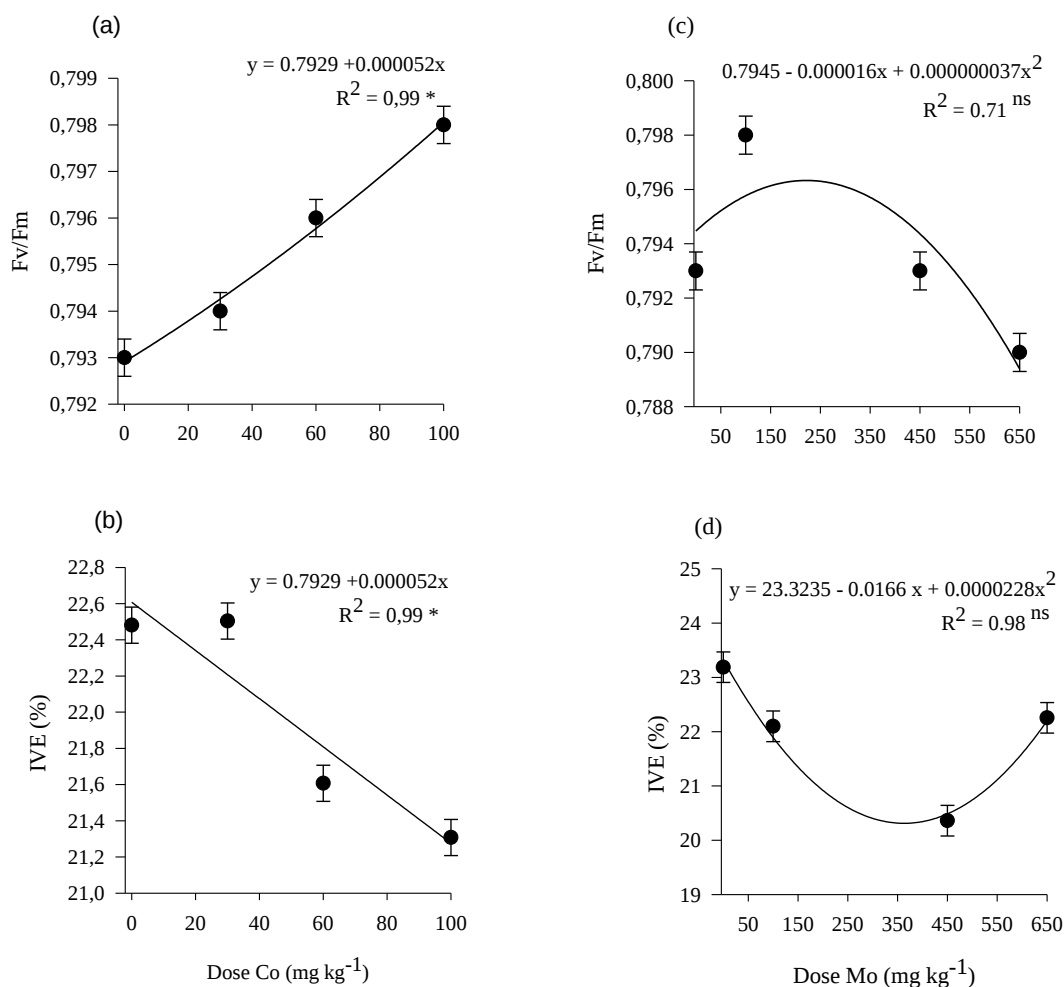


Figura 2. Eficiência quântica do fotossistema II (Fv/Fm) (a, c) e índice de extravasamento de eletrólitos (IVE) (b, e) em plantas de grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) em função do tratamento de sementes com doses de cobalto e molibdênio. * Coeficiente significativo a 0,05; ^{ns} Coeficiente não significativo.

3.4 Açúcar total e sacarose

As doses de 77 e 52 mg kg⁻¹ de Co proporcionaram concentração máxima de 2.17 mg g⁻¹ de açúcar total e 0.73 mg g⁻¹ sacarose (Figura 3a). O mesmo comportamento foi observado para as plantas oriundas de sementes tratadas com Mo. Com as doses de 561 e 196 mg kg⁻¹ de Mo foram observadas as concentrações

máximas de 2.06 e 0.83 mg g⁻¹ de açúcares totais e sacarose, respectivamente (Figura 3b).

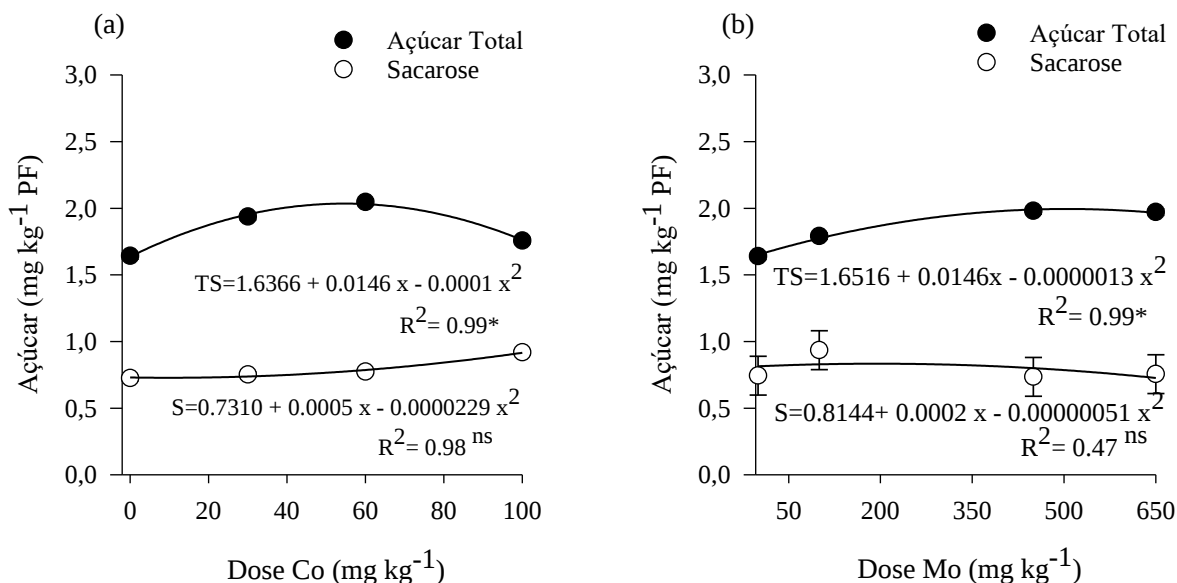


Figura 3 Concentração de açúcares totais e sacarose em plantas de grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) em função do tratamento de sementes com doses de cobalto e molibdênio. * Coeficiente significativo a ($p \leq 0,05$) e ^{ns} Coeficiente não significativo.

3.5 Ureídeos

A fração de alantoína teve maior contribuição na concentração de ureídeos totais em relação ao ácido alantóico (Figura 4 a, b). A concentração de ureídeos nas folhas aumentou com o aumento das doses de Co e Mo (Figura 4 c), com efeito quadrático positivo nas doses de Mo e efeito linear com aumento das doses de Co.

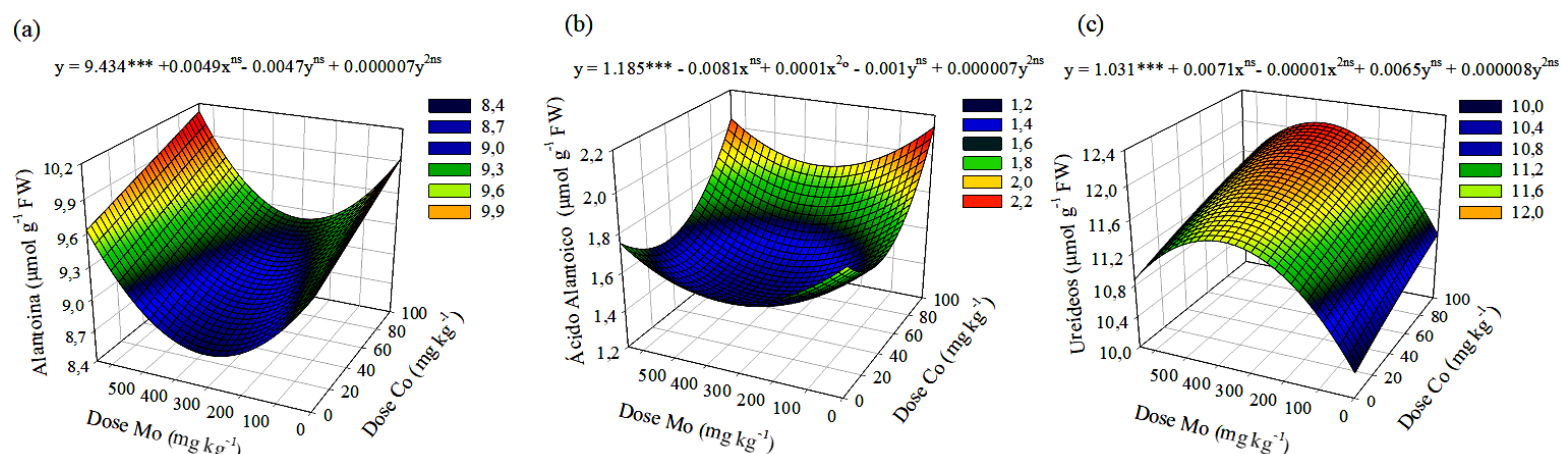


Figura 4 Alantoina (a), ácido alantóico (b), e ureídeos totais (d) em plantas de grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) em função do tratamento de sementes com doses de cobalto (x) e molibdênio (y), respectivamente. Coeficientes significativos: *** ($p \leq 0,001$); ** ($p \leq 0,01$); * ($p \leq 0,05$); ° ($p \leq 0,1$) e ^{ns} não significativo.

3.6 Concentração de Co, Mo, nitrato e aminoácidos livres totais

O tratamento de sementes com Co e Mo elevaram as concentrações desses elementos e de nitrato nas folhas de grão-de-bico (Figura 5a, b, c, d). Porém, com o aumento das doses de Co acima de 70 mg kg^{-1} ocorreu redução da concentração de Co, Mo e nitrato nas folhas.

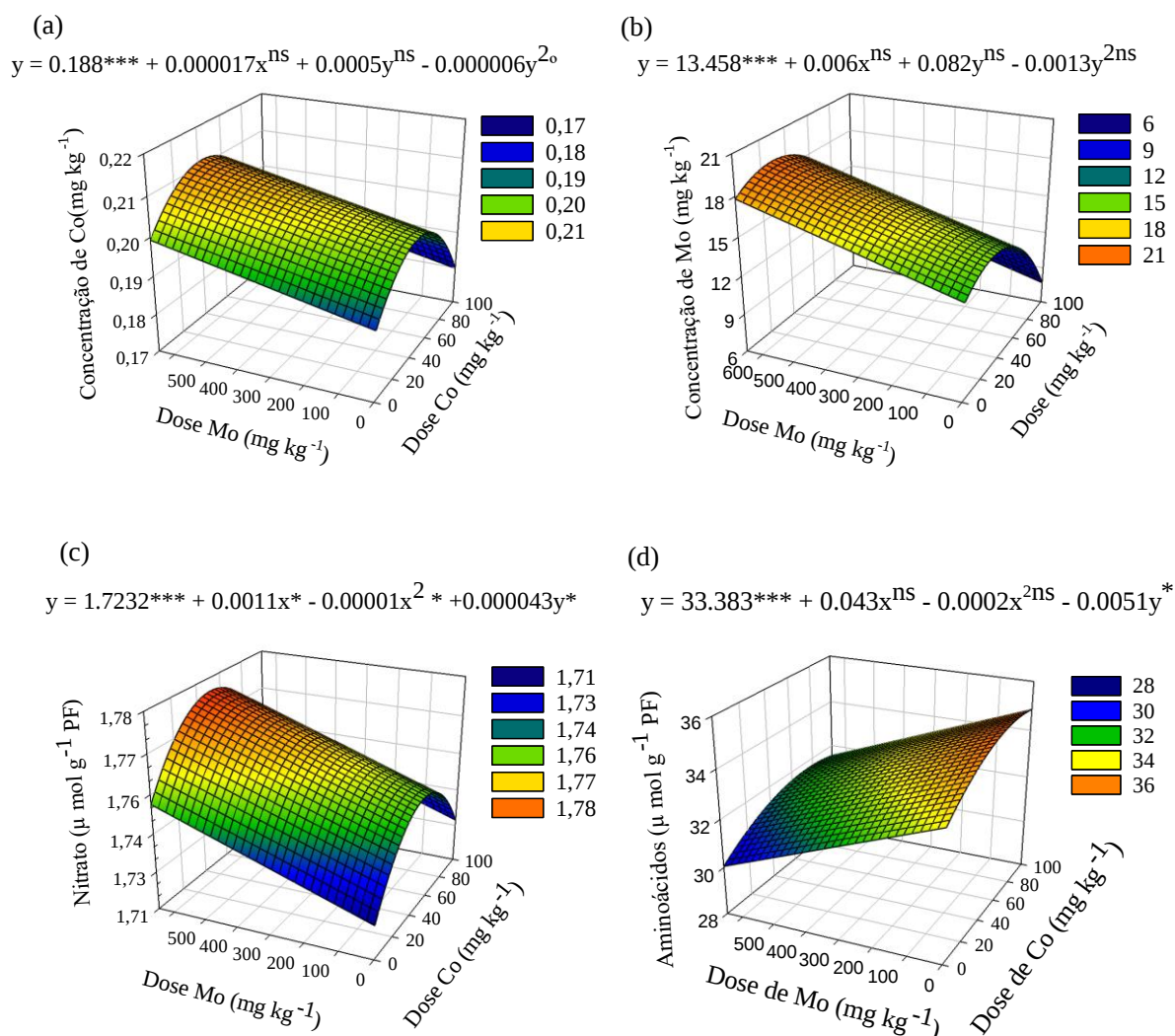


Figura 5. Concentração de Co (a), Mo nas folhas (b), nitrato (c), aminoácido (d) em folhas de grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) em função do tratamento de sementes com doses de cobalto (x) e molibdênio (y). Coeficientes significativos: *** ($p \leq 0,001$); ** ($p \leq 0,01$); * ($p \leq 0,05$); ° ($p \leq 0,1$) e ^{ns} não significativo.

3.6 Rendimento dos grãos secos

Quanto ao rendimento dos grãos por planta, estes foram influenciados pelo tratamento de sementes com cobalto e molibdênio, conforme Figura 7. A massa seca dos grãos tiveram aumento linear, conforme o aumento das doses tanto de Co, quanto de Mo, com massa seca média de 2,8 por planta (Figura 7 a). O número de grãos por

planta aumentou de forma linear com o aumento das doses de Co e Mo, com média de 12 grãos por vaso.

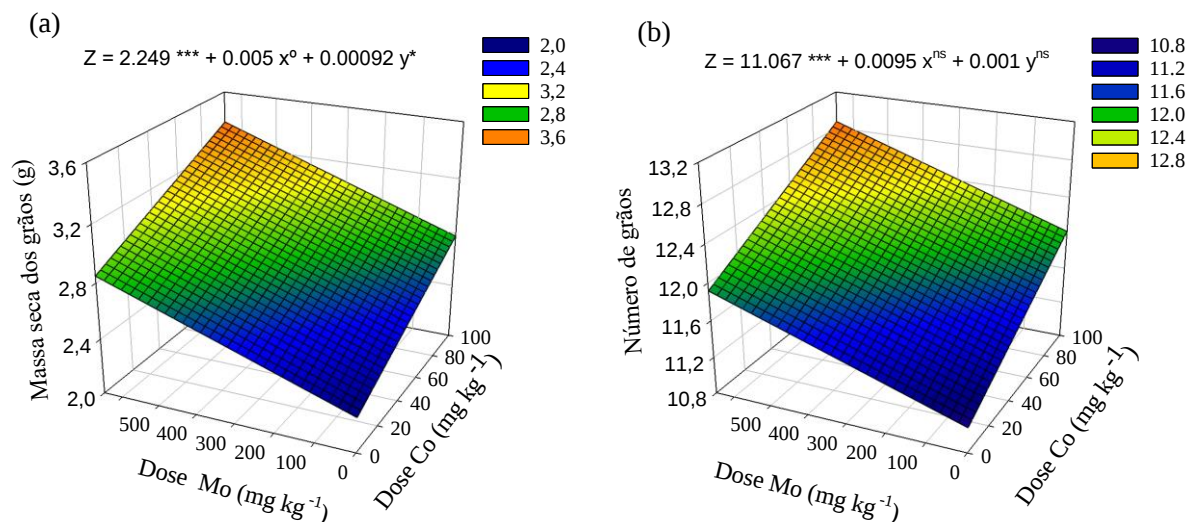


Figura 7 Massa seca dos grãos de grão-de-bico (a) e número de grãos de grão-de-bico (b) em função das doses de cobalto (x) e de molibdênio (y). Coeficientes significativos a: *** ($p \leq 0,001$); ** ($p \leq 0,01$); * ($p \leq 0,05$); ° ($p \leq 0,1$); e ^{ns} = não significativo.

4 Discussão

Os resultados indicam que apesar do tratamento de sementes com Co e Mo não terem contribuído diretamente para aumentar a altura e diâmetro do caule das plantas (Figura 1a, b), a aplicação desses elementos aumentou em 9 % massa seca da parte área, e em média 15 % a quantidade de grãos e a massa seca de grãos produzidos pelas plantas (Figura S1 a, b). Também favoreceu o aumento da eficiência do fotossistema II (PSII) - razão F_v/F_m , a redução do índice de extravasamento de eletrólitos (Figura 2) e o aumento da concentração de açúcares totais (Figura 3). Esses resultados podem indicar baixa toxicidade dos elementos adicionados às sementes, nas doses aplicadas.

O PSII é um dos componentes do aparato fotossintético mais sensíveis a fatores extremos (Feyziyev, 2019). O tratamento de sementes com Co e Mo elevaram a F_v/F_m nas plantas, porém, doses de Mo acima de 216 mg kg⁻¹ reduziram a F_v/F_m , o que pode ter levado à inativação dos centros de reação do fotossistema II, com

prejuízo à fotossíntese (Feyziyev, 2019). Isso pode explicar por que ocorreu a redução no crescimento da planta, com consequente redução da massa seca, nas doses mais elevadas (Figura 1c). O bom funcionamento da fotossíntese garante a formação de metabólitos primários, como os açúcares e aminoácidos, que irão compor várias organelas que desempenham funções vitais na planta (Van Tol et al., 2017).

Nesse estudo, observou-se que o tratamento de sementes com Co e Mo aumentou as concentrações de sacarose e açúcares totais nas folhas de grão-de-bico (Figura 3 a, b). A sacarose é o principal produto da fotossíntese que impulsiona o crescimento das plantas, sinalização e adaptação a estresses ambientais (Mostofa et al., 2017), como por exemplo, a toxicidade dos elementos adicionados nas sementes. Os açúcares que se acumulam podem funcionar como osmólitos, para manter o turgor celular, e têm a capacidade de proteger as membranas e proteínas dos danos causados pelo estresse, mas também atuam como sinais que regulam vários processos associados ao crescimento e desenvolvimento das plantas (Muhammad Farooq et al., 2018; Loreti et al., 2001).

Menor estresse foi observado em plantas que tiveram o suprimento de Co e Mo via semente, por terem apresentado menor índice de extravasamento de eletrólito (Figura 4 b, d). Isso indica que ocorreu menor dano oxidativo causado pelo efeito tóxico de doses relativamente elevadas dos elementos aplicados, o que também afetaria a estabilidade e integridade das membranas celulares (Bisht et al., 2019). Isso pode ser observado com a aplicação de Mo a partir da dose 364 mg kg⁻¹, que tendeu a aumentar o índice de extravasamento de eletrólitos (Figura 2d). Essa explicação é suportada pelo fato de que micronutrientes, como o Mo, e elementos benéficos, como o Co, apresentam uma faixa tênue entre a demanda da planta e toxicidade (Kaur et al., 2016; Wa Lwalaba et al., 2017).

Ao investigar as raízes das plantas de grão-de-bico, observou-se que após a infecção das bactérias *Mesorhizobium ciceri*, os nódulos são de crescimento determinado (Thavarajah & Ball, 2006), com diferentes tamanhos e formatos irregulares (Figura 6 i, j, l, m). O tratamento das sementes com Co e Mo possibilitaram aumento na nodulação (Figura 6 a - h). A formação de nódulos em leguminosas é muito importante, pois ajuda a aumentar a captação de nitrogênio para as plantas (Ditta et al., 2018). Os nódulos viáveis e ativos apresentavam coloração rosácea

(Figura 6 i-m) devido a presença da leg-hemoglobina (Abd-Alla et al., 2019). Isso deve-se a presença do Co (Figura 5a), que é um elemento essencial para os microrganismos envolvidos no processo de nodulação e fixação biológica de nitrogênio pelas plantas leguminosas (Gad, 2012). O Co faz parte do centro de reação da cobalamina (vitamina B12), que é precursora da leg-hemoglobina (Cheng et al., 2016), que por sua vez, tem a função de impedir a inativação da nitrogenase, regulando a entrada de oxigênio no complexo enzimático (Luciński et al., 2002).

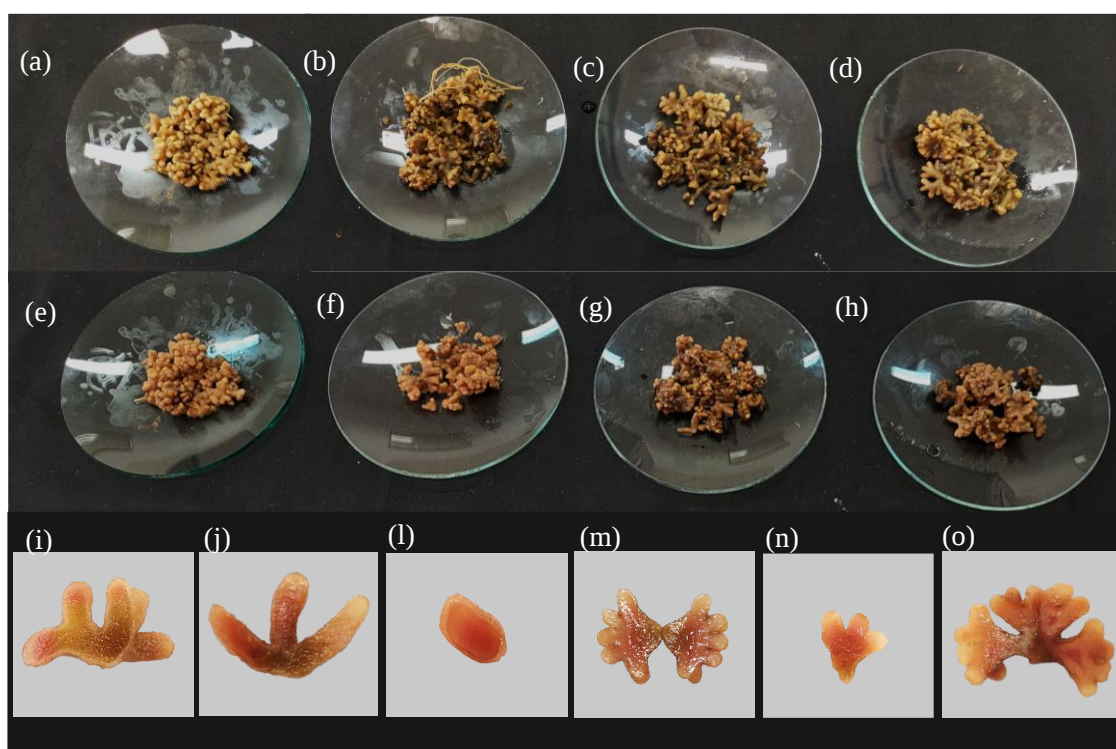


Figura 7. Número de nódulos observados em raízes de grão-de-bico que tiveram as sementes tratadas com doses de 0, 100, 450, 650 mg kg⁻¹ de Mo (a, b c, d) e 0,30,60 e 100 mg kg⁻¹ de Co (e, f, g, h). Corte histológico dos nódulos com diferentes anatomias observados nas raízes de plantas de grão-de-bico independente do tratamento aplicado (i, j, l, m, n, o).

Em relação ao metabolismo do N nas plantas de grão-de-bico, observou-se aumento na concentração de ureídeos com aumento das doses de Co e Mo, sendo observada maior concentração de alantoína nas folhas, do que o ácido alantóico

(Figura 4 a, 4 b). O aumento das doses de Mo reduziu a concentração de alantoína e ácido alantóico e o aumento da dose de Co reduziu a concentração de ácido alantóico. No entanto, em geral, pode ser afirmado que a aplicação de Co e Mo foi benéfica para a produção de ureídeos totais. Os ureídeos (alantoína e ácido alantóico) podem ter papel importante na proteção da planta contra os estresses abióticos (Werner & Witte, 2011), além de ser uma das formas em que as plantas leguminosas podem transportar o N fixado (Thavarajah & Ball, 2006).

No processo de fixação do nitrogênio atmosférico (N_2) pela nitrogenase, o N_2 é convertido a NH_3 no interior do bacteroide. Posteriormente é protonado (NH_4^+) no espaço peribacteroide e então é exportado para o citosol da célula infectada através da membrana simbiossoma (Baral et al., 2016). O amônio é então incorporado na forma de glutamina. As principais formas de transporte de N mais comum em espécies de leguminosas de origem temperada são na forma de glutamina e asparagina (Tegeder, 2014). No entanto, as leguminosas tropicais também exportam o N na forma de ureídeos, que são derivados da degradação oxidativa das purinas, principalmente alantoína e ácido alantóico (Carter & Tegeder, 2016; Valentine et al., 2017). Os ureídeos são geralmente liberados no apoplasto e movem-se em direção à vasculatura localizada na periferia do nódulo (Carter & Tegeder, 2016). E são transportados através do xilema, sendo translocadas para as folhas por fluxo de transpiração (Baral et al., 2016).

As concentrações de nitrato foliar aumentaram de forma linear com o aumento das doses de Mo, e de forma quadrática até a dose de aproximadamente 77 mg kg^{-1} de Co (Figura 5 c). Possivelmente o nitrato foi convertido a amônia que foi rapidamente incorporada a compostos orgânicos, tais como os aminoácidos (Figura 5 d). Os aminoácidos também apresentaram aumento em sua concentração de forma quadrática, com o aumento das doses de Co. As avaliações para determinação dos teores de nitrato foram realizadas, pelo fato do grão-de-bico ser uma leguminosa que realiza FBN de forma não eficiente (Mir et al., 2021), e portanto, também pode absorver o N presente no próprio solo. Além disso, o Mo além de compor a nitrogenase e atuar diretamente na FBN, também atua na enzima nitrato redutase. O Mo também é um cofator que atua na enzima xantina desidrogenase, que é responsável por degradar a xantina em ácido úrico e posteriormente em alantoína, sendo um elemento

chave na mobilização e exportação do N para fora do nódulo das leguminosas, após a fixação.

De forma geral, os resultados demonstraram que a eficiência da FBN em plantas de grão-de-bico pode ser melhorada, levando em consideração fatores limitantes como a fertilização adequada com Co e Mo. A planta de grão-de-bico mostrou-se tolerante a aplicação de cloreto de cobalto, pois mesmo em doses relativamente elevadas não interferiu negativamente na maioria das variáveis investigadas, além de ter aumentado o número de grãos e a massa seca dos grãos.

Sugere-se mais estudos com diferentes fontes de Co e Mo no tratamento de sementes, bem como doses um pouco mais elevadas de cobalto que as usadas neste trabalho, para verificar qual a dose ótima desse elemento a ser recomendada para a cultura.

São necessários também outros estudos para avaliar a dose-resposta de Co e Mo nesta e em outras cultivares de grão-de-bico sob as reais condições de campo, para estabelecer a recomendação ideal visando maior produtividade da cultura.

5 Conclusões

O tratamento de sementes de grão-de-bico com doses de Co entre 52 e 77 mg kg⁻¹ e de Mo entre 216 e 400 mg kg⁻¹ de sementes, e inoculadas com *Mesorhizobium cicer*, induziu maior nodulação das raízes, maior massa seca nodular, melhorou a eficiência do fotossistema II (PSII), aumentou a concentração de ureídeos e açúcares totais nas folhas, com pouco prejuízo na permeabilidade das membranas celulares.

7 Referências

Abd-Alla MH, Nafady NA, Bashandy SR & Hassan AA (2019) Mitigation of effect of salt stress on the nodulation, nitrogen fixation and growth of chickpea (*Cicer arietinum* L.) by triple microbial inoculation. *Rhizosphere*, 10.

Alam F, Kim TY, Kim SY, Alam SS, Pramanik P, Kim PJ & Lee YB (2015) Effect of

molybdenum on nodulation, plant yield and nitrogen uptake in hairy vetch (*Vicia villosa* Roth). *Soil Science and Plant Nutrition*, 61(4), 664–675.

Ali, Barket, Shamsul Hayat, Qaiser Hayat, e Aqil Ahmad (2010) “Cobalt stress affects nitrogen metabolism, photosynthesis and antioxidant system in chickpea (*Cicer arietinum* L.)”. *Journal of Plant Interactions* 5(3): 223–31.

Andrews MPJ, Lea JA, Raven RA, Azevedo (2009) “Nitrogen use efficiency. 3. Nitrogen fixation: Genes and costs”. *Annals of Applied Biology* 155(1): 1–13.

Baral B, Jaime A, Teixeira S, Izaguirre-Mayoral LM (2016) “Early signaling, synthesis, transport and metabolism of ureides”. *Journal of Plant Physiology* 193: 97–109.

Bielecki RL, and Turner TA (1966) Separation and estimation of amino acids in crude plant extracts by thinlayer electrophoresis and chromatography. *Analytical Biochemistry* 17 (2):278–93.

Bisht, Nikita et al (2019) “A multifaceted rhizobacterium *paenibacillus lentimorbus* alleviates nutrient deficiency-induced stress in *Cicer arietinum* L”. *Microbiological Research* 223–225(November 2018): 110–19.

Bosse, Marco Antônio et al. (2021) “Physiological impact of flavonoids on nodulation and ureide metabolism in legume plants”. *Plant Physiology and Biochemistry* 166(June): 512–21.

Carter AM., Mechthild T (2016) “Increasing Nitrogen Fixation and Seed Development in Soybean Requires Complex Adjustments of Nodule Nitrogen Metabolism and Partitioning Processes”. *Current Biology* 26(15): 2044–51.

Cataldo DA, Maroon M, Schrader LE, Youngs VL (1975) Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 6 (1):71–80.

Cheng, Zhuo, Haruki Yamamoto, e Carl E. Bauer (2016) “Cobalamin’s (Vitamin B12) Surprising Function as a Photoreceptor”. *Trends in Biochemical Sciences* 41(8): 647–50.

Ditta, Allah et al. (2018) “Application of rock phosphate enriched composts increases nodulation, growth and yield of chickpea”. *International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture* 7(1): 33–40.

Elena L, Bellis L, Alpi A, and Perata P (2001) "Why and how do plant cells sense sugars?" *Annals of Botany* 88(5): 803–12.

Farooq MA, Wahid, e Kadambot HM, Siddique (2012) "Micronutrient application through seed treatments - a review". *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 12(1): 125–42.

Farooq, Muhammad et al (2018) "Desi chickpea genotypes tolerate drought stress better than kabuli types by modulating germination metabolism, trehalose accumulation, and carbon assimilation". *Plant Physiology and Biochemistry* 126(March): 47–54.

Feyziyev, Yashar M (2019) "Chlorophyll fluorescence and 'Maximum Quantum Efficiency' of photosystem II in plant sciences". *Life Sciences and Biomedicine* 1(1): 18–28.

Merga, B., & Haji, J. (2019). Economic importance of chickpea: Production, value, and world trade. *Cogent Food and Agriculture*, 5(1), 1–12.

Flowers, Timothy J et al. (2010) "Salt sensitivity in chickpea". *Plant, Cell and Environment* 33(4): 490–509.

Gad and Nadia (2012) "Role and importance of cobalt nutrition on groundnut (*Arachis hypogaea*) production". *World Applied Sciences Journal* 20(3): 359–67.

Gericó TG., Tavanti RFR, Lima JP, Ribeiro RP, Santos LCC, Silva MS, Reis AR (2020). Cobalt and molybdenum stimulate compounds of primary metabolism, nitrogen forms, and photosynthetic pigments in peanut plants (*Arachis hypogaea* L.). *Journal of Plant Nutrition*, 43(12), 1907–1922.

Imane B, Alami IT, Douira A,Udupa SM (2019) "Phenotypic and Genotypic Diversity Among Symbiotic and Non-symbiotic Bacteria Present in Chickpea Nodules in Morocco". *Frontiers in Microbiology* 10(September): 1–19.

Jones JB, Case VW (1990). Sampling, handling, and analyzing plant tissue samples. *Soil testing and plant analysis*, 3, 389-427.

Jukanti AK, Gaur PM, Gowda CLL, Chibbar RN (2012). "Nutritional quality and health benefits of chickpea (*Cicer arietinum* L.): A review". *British Journal of Nutrition* 108(SUPPL. 1).

Kaur, Simranjeet, Kaur N, Kadambot HM, Siddique and Nayyar H (2016) “Beneficial elements for agricultural crops and their functional relevance in defence against stresses”. *Archives of Agronomy and Soil Science* 62(7): 905–20.

Lichtenthaler HK, Buschmann C, Knapp M (2005) How to correctly determine the different chlorophyll fluorescence parameters and the chlorophyll fluorescence decrease ratio R Fd of leaves with the PAM fluorometer. *Photosynthetica* 43: 379-393.

Luciński R, Polcin W, Ratajczak L (2002) Nitrate reduction and nitrogen fixation in symbiotic association Rhizobium – Legumes. *Acta biochimica Polonica*, 49 (2):537-46.

Lwalaba W, Jonas Lwalaba et al. (2017) “The effect of cobalt stress on growth and physiological traits and its association with cobalt accumulation in barley genotypes differing in cobalt tolerance”. *Journal of Plant Nutrition* 40(15): 2192–99.

Mechthild T (2014) “Transporters involved in source to sink partitioning of amino acids and ureides: Opportunities for crop improvement”. *Journal of Experimental Botany* 65(7): 1865–78.

Merga B, & Haji J (2019). Economic importance of chickpea: Production, value, and world trade. *Cogent Food and Agriculture*, 5(1), 1–12. <https://doi.org/10.1080/23311932.2019.1615718>

Mir, Mohammad Imran et al. (2021) “Characterization of rhizobia isolated from leguminous plants and their impact on the growth of ICCV 2 variety of chickpea (*Cicer arietinum* L.)”. *Heliyon* 7(11): e08321.

Mostofa, Mohammad Golam et al (2017) “Phenotypical, physiological and biochemical analyses provide insight into selenium-induced phytotoxicity in rice plants”. *Chemosphere* 178: 212–23.

Rachwa-Rosiak, Danuta, Nebesny E, Budryn G (2015) “Chickpeas—Composition, Nutritional Value, Health Benefits, Application to Bread and Snacks: A Review”. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 55(8): 1137–45.

Raij B, Andrade JC, Cantarella H, Quaggio JÁ (2001) *Análise Química para Avaliação da Fertilidade de Solos Tropicais*, 1st ed.; IAC: Campinas, Brasil, 2001.

R Core Team (2022). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

Santos HG, Jacomine PKT, Anjos LHC, Oliveira VA, Lumbreras JF, Coelho MR, Almeida JA, Araujo Filho JC, Oliveira JB, Cunha TJF (2018) Sistema Brasileiro de Classificação de Solos (Embrapa). 5ª ed., revista e ampliada. – 356 p.

Thavarajah D and Rosalind AB (2006) “Drought-induced changes in free amino acid and ureide concentrations of nitrogen-fixing chickpea”. *Canadian Journal of Plant Science* 86(1): 149–56.

Van Handel E (1967) Determination of fructose and fructose-yielding carbohydrates with cold anthrone. *Analytical Biochemistry* 19 (1):193–4.

Van T, Niels et al. (2017) “An Arabidopsis mutant with high operating efficiency of Photosystem II and low chlorophyll fluorescence”. *Scientific Reports* 7(1): 1–15.

Vogels GD and C, Drift V (1970) Differential analyses of glyoxylate derivatives. *Analytical Biochemistry* 33 (1):143–57.

Udvardi, Michael, Philip SP (2013) “Transport and metabolism in legume-rhizobia symbioses”. *Annual Review of Plant Biology* 64: 781–805.

Valentine, Alex J, Kleinert A, Benedito VA (2017) “Adaptive strategies for nitrogen metabolism in phosphate deficient legume nodules”. *Plant Science* 256: 46–52.

Werner, Andrea K, Witte CP (2011) “The biochemistry of nitrogen mobilization: Purine ring catabolism”. *Trends in Plant Science* 16(7): 381–87.

Zhang, Junjie et al. (2020) “Genomic diversity of chickpea-nodulating rhizobia in Ningxia (north central China) and gene flow within symbiotic Mesorhizobium muleiense populations”. *Systematic and Applied Microbiology* 43(4): 126089.