



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ÍTALA MENEGON CASTILHO

**DESEMPENHO GERMINATIVO DE SEMENTES DE MILHO
SUPER DOCE EM RESPOSTA AO ÁCIDO GIBERÉLICO E A
DOADOR DE ÓXIDO NÍTRICO NANOENCAPSULADO**

Londrina
2022

ÍTALA MENEGON CASTILHO

**DESEMPENHO GERMINATIVO DE SEMENTES DE MILHO
SUPER DOCE EM RESPOSTA AO ÁCIDO GIBERÉLICO E A
DOADOR DE ÓXIDO NÍTRICO NANOENCAPSULADO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Agronomia

Orientadora: Profa. Dra. Inês Cristina Batista Fonseca.

Coorientador: Prof. Dr. Claudemir Zucareli.

Londrina
2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

C352d Castilho, Ítala Menegon .
Desempenho germinativo de sementes de milho super doce em resposta ao ácido giberélico e a doador de óxido nítrico nanoencapsulado / Ítala Menegon Castilho. - Londrina, 2022.
42 f. : il.

Orientador: Inês Cristina Batista Fonseca.
Coorientador: Claudemir Zucareli.
Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2022.
Inclui bibliografia.

1. Zea mays saccharata sturt - Tese. 2. Estresse abiótico - Tese. 3. Quitosana - Tese. 4. Nanotecnologia - Tese. I. Fonseca, Inês Cristina Batista . II. Zucareli, Claudemir . III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. IV. Título.

CDU 63

ÍTALA MENEGON CASTILHO

**DESEMPENHO GERMINATIVO DE SEMENTES DE MILHO
SUPER DOCE EM RESPOSTA AO ÁCIDO GIBERÉLICO E A
DOADOR DE ÓXIDO NÍTRICO NANOENCAPSULADO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Agronomia

BANCA EXAMINADORA

Coorientador: Prof. Dr. Claudemir Zucareli.
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. José Henrique Bizzarri Bazzo
Centro Universitário Filadélfia – UniFil

Prof. Dr. Thiago Alberto Ortiz
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 18 de julho de 2022.

*Dedico este trabalho á minha mãe Dolores
(in memoriam) e ao meu irmão Pablo.*

AGRADECIMENTO

Ao programa de Pós Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, pela oportunidade de realizar o mestrado, juntamente à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela bolsa cedida durante os dois anos de estudo.

Agradeço meus orientadores Inês Cristina de Batista Fonseca e Claudemir Zucareli, pelos ensinamentos transmitidos desde o começo dessa jornada, pelos momentos de turbulência em que sempre estiveram ao meu lado, ao professor Halley Caixeta de Oliveira pelo fornecimento das suspensões utilizadas no trabalho e pelo apoio, muito obrigada!

À Marinara Fereda e Gabriel Shimizu pela amizade e pelo auxílio na estatística.

À todos os amigos que me acompanharam ao longo destes dois anos, e que de alguma forma contribuíram para este trabalho.

Agradeço meu irmão por estar sempre ao meu lado me apoiando e me ajudando sempre que precisei e a minha mãe que de alguma forma sempre esteve comigo.

Agradeço à Deus, pela oportunidade e por todas as bênçãos recebidas, e principalmente pela força.

RESUMO

CASTILHO, Ítala Menegon. **Desempenho germinativo de sementes de milho super doce em resposta ao ácido giberélico e a doador de óxido nítrico nanoencapsulado.** 2022. 47 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

Os genes brittle (bt) ou shrunken (sh) na forma homozigota recessiva são responsáveis pelo alto teor de sacarose e baixo teor de amido no endosperma em milho do grupo super doce que, conseqüentemente, resultam em sementes com menor potencial fisiológico. O uso de nanocarreadores de ácido giberélico e óxido nítrico pode auxiliar no processo de conservação e germinação destas sementes, principalmente em situações de estresse abiótico, favorecendo a implantação da cultura. Neste sentido, objetivou-se avaliar o efeito da aplicação de formulações e doses de ácido giberélico e de doadores de óxido nítrico nanoencapsulados sobre o potencial fisiológico de sementes de milho super doce. No artigo A utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial $5 \times 4 + 1$, com quatro repetições. Foram avaliados cinco suspensões aplicadas nas sementes, sendo essas: nano alginato/quitosana (ALG/CS) sem e com GA₃, nano de quitosana/tripolifosfato (CS/TPP) sem e com GA₃ e ácido giberélico livre, em quatro concentrações: 0,05 mg/ml (formulação estoque), 0,005 mg/ml (1:10), 0,0005 mg/ml (1:100) e 0,00005 mg/ml (1:1000) e testemunha adicional. Para o artigo B, foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 3x5, com quatro repetições, separadamente para as temperaturas de 20°C, 25°C e 30°C. Foram testadas três suspensões, sendo essas: nano de quitosana mais óxido nítrico (NO/CS) apenas quitosana (CS) vazio e apenas o doador de óxido nítrico (NO), nas doses de 0, 2, 4, 6 e 8 mmol. Nos dois artigos, os tratamentos foram aplicados via embebição das sementes e, posteriormente, foram analisadas as seguintes variáveis: primeira contagem, germinação, plântulas anormais e sementes mortas, comprimento de parte aérea e raiz e massa seca da parte aérea e raiz de plântulas. O uso de nanocarreadores de ALG/CS/GA₃, nas maiores concentrações favorecem o desempenho germinativo de sementes de milho super doce, quando comparadas ao GA₃ livre. No artigo B, nas três temperaturas, o aumento das doses de NO reduzem o desempenho fisiológico das sementes de milho doce.

Palavras-chave: *zea mays* saccharata sturt; estresse abiótico; quitosana; nanotecnologia; potencial fisiológico.

ABSTRACT

CASTILHO, Itala Menegon. **Germination performance of super super sweet corn seeds in response to gibberellic acid and nanoencapsulated nitric oxide donor**. 2022. 47 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

The brittle (bt) or shrunken (sh) genes in the homozygous recessive form are responsible for the high sucrose content and low starch content in the endosperm in corn of the super sweet group, which consequently result in seeds with lower physiological potential. The use of nanocarriers of gibberellic acid and nitric oxide can help in the process of conservation and germination of these seeds, mainly in situations of abiotic stress, favoring the implantation of the culture. In this sense, the objective was to evaluate the effect of the application of formulations and doses of gibberellic acid and nanoencapsulated nitric oxide donors on the physiological potential of super sweet corn seeds. In article A, a completely randomized design was used, with a $5 \times 4 + 1$ factorial scheme with four replications. Five nanoparticle suspensions applied to the seeds were evaluated, namely: nano ALG/CS without and with GA3, nano CS/TPP without and with GA3 and free gibberellic acid, with four concentrations of 0.05 mg/ml (stock formulation), 0.005 mg/ml (1:10), 0.0005 mg/ml (1:100) and 0.00005 mg/ml (1:1000) and additional control. The treatments were applied via seed imbibition, which were later analyzed by the following variables: first count, germination, abnormal seedlings and dead seeds, shoot and root length and shoot and root dry mass of seedlings. For article B, a completely randomized design was used in a 3×5 factorial scheme, with four replications, separately for temperatures of 20°C, 25°C and 30°C. Three suspensions were tested, namely: nano of NO CS / MAS, only empty CS and only the NO donor, at doses of 0, 2, 4, 6 and 8. . The variables analyzed were the same as in article A. The use of ALG/CS/GA3 nanocarriers, in the highest concentrations, favors the germination performance of super sweet corn seeds, when compared to free GA3. In article B, the NO donors, in general, at the three temperatures, the increase in NO doses reduces the physiological performance of sweet corn seeds.

Keywords: zea mays saccharata sturt ; abiotic stress; chitosan; nanotechnology; physiological potential.

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO A

- Figura 1** – Valores médios da primeira contagem da germinação (%) de sementes de milho super doce tratadas com nano CS/TPP/GA₃, nano CS/TPP, nano ALG/CS/GA₃, nano ALG/CS, GA₃, em concentrações de 0,05 mg/ml (formulação estoque) diluições de 0,005 mg/ml (10), 0,0005 mg/ml (100) e 0,00005 mg/ml (1000). Médias seguidas de mesma letra minúsculo entre tratamentos de uma mesma diluição e maiúsculo entre diluições de um mesmo tratamento não diferem pelo teste de Tukey, a 5% de significância..... 20
- Figura 2** – Valores médios do comprimento de parte aérea (cm) de sementes de milho super doce tratadas com nano CS/TPP/GA₃, nano CS/TPP, nano ALG/CS/GA₃, nano ALG/CS, GA₃, em concentrações de 0,05 mg/ml (formulação estoque) diluições de 0,005 mg /ml (10), 0,0005 mg/ml (100) e 0,00005 mg/ml (1000). Médias seguidas de mesma letra minúsculo entre tratamentos de uma mesma diluição e maiúsculo entre diluições de um mesmo tratamento não diferem pelo teste de Tukey, a 5% de significância..... 20
- Figura 3** – Valores médios do comprimento de raiz (cm) de sementes de milho super doce tratadas com nano CS/TPP/GA₃, nano CS/TPP, nano ALG/CS/GA₃, nano ALG/CS, GA₃, em concentrações de 0,05 mg/ml (formulação estoque) diluições de 0,005 mg/ml (10), 0,0005 mg/ml (100) e 0,00005 mg/ml (1000). Médias seguidas de mesma letra minúsculo entre tratamentos de uma mesma diluição e maiúsculo entre diluições de um mesmo tratamento não diferem pelo teste de Tukey a, 5% de significância..... 21
- Figura 4** – Valores médios da massa seca da parte aérea (mg) de plântulas oriundas de sementes de milho super doce tratadas com nano CS/TPP/GA₃, nano CS/TPP, nano ALG/CS/GA₃, nano ALG/CS, GA₃, em concentrações de 0,05 mg /ml (formulação estoque) diluições de 0,005 mg/ml (10), 0,0005 mg /ml (100) e 0,00005 mg/ml (1000). Médias seguidas de mesma letra minúsculo entre tratamentos de uma mesma diluição e maiúsculo entre

diluições de um mesmo tratamento não diferem pelo teste de Tukey, a 5% de significância..... 22

Figura 5 – Valores médios da massa seca da raiz (mg) de plântulas oriundas de sementes de milho super doce tratadas com nano CS/TPP/GA₃, nano CS/TPP, nano ALG/CS/GA₃, nano ALG/CS, GA₃, em concentrações de 0,05 mg/ml (formulação estoque) diluições de 0,005 mg /ml (10), 0,0005 mg/ml (100) e 0,00005 mg/ml (1000). Médias seguidas de mesma letra minúsculo entre tratamentos de uma mesma diluição e maiúsculo entre diluições de um mesmo tratamento não diferem pelo teste de Tukey, a 5% de significância..... 22

ARTIGO B

Figura 1 – Germinação (A) e plântulas anormais (B) em relação a doses..... 28

Figura 2 – Comprimento da parte aérea (A), comprimento da raiz (B), massa seca da raiz (C) e massa seca da parte aérea (D) de plântulas de milho em resposta ao tratamento de sementes com diferentes suspensões e doses de NO em função das NPs e doses 29

Figura 3 – Primeira contagem, germinação e sementes mortas (%) em função de doses 31

Figura 4 – Comprimento de parte aérea, comprimento de raiz e massa seca da parte aérea em função de diferentes NPs e doses 32

Figura 5 – Primeira contagem de germinação em função de diferentes tratamentos e doses 33

Figura 6 – Comprimento de parte aérea (A), comprimento de raiz (B), massa seca de parte aérea (C) e massa seca de raiz (D) em função de diferentes NPs e doses 34

LISTA DE TABELAS

ARTIGO A

Tabela 1 – Caracterização de umidade e do potencial fisiológico inicial (germinação e vigor) do lote de sementes de milho super doce utilizado no experimento 19

ARTIGO B

Tabela 1 – Resumo da análise de variância para NPs , dose e interação entre NPs e dose para as variáveis primeira contagem (PC), germinação (G), plântulas anormais (ANOR), sementes mortas (MORT), comprimento de parte aérea e de raiz (CPA e CR), massa seca de parte aérea e raiz (MSPA e MSR) para milho super doce em resposta a suspensões e doses de doadores de óxido nítrico 28

Tabela 2 – Médias das variáveis comprimento de raiz e massa seca de parte aérea 28

Tabela 3 – Resumo da análise de variância para NPs , dose e interação entre NPs e dose para as variáveis primeira contagem (PC), germinação (G), plântulas anormais (ANOR), sementes mortas (MORT), comprimento de parte aérea e de raiz (CPA e CR), massa seca de parte aérea e raiz (MSPA e MSR) para milho super doce em resposta a suspensões e doses de doadores de óxido nítrico 30

Tabela 4 – Médias das variáveis primeira contagem, plântulas anormais e sementes mortas em relação as NPs 32

Tabela 5 – Resumo da análise de variância para NPs , dose e interação entre NPs e dose para as variáveis primeira contagem (PC), germinação (G), plântulas anormais (ANOR), sementes mortas (MORT), comprimento de parte aérea e de raiz (CPA e CR), massa seca de parte aérea e raiz (MSPA e MSR) para milho super doce em resposta a suspensões e doses de doadores de óxido nítrico 32

Tabela 6 – Médias das variáveis comprimento de parte aérea em relação as NPs 33

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	4
2	REVISÃO DE LITERATURA	6
2.1	ASPECTOS GERAIS DA CULTURA E CARACTERÍSTICAS DO MILHO DOCE	6
2.2	IMPORTÂNCIA DO MILHO DOCE	6
2.3.	SEMENTES DE MILHO SUPER DOCE X QUALIDADE	7
2.4	ESTRESSE TÉRMICO	9
2.5	HORMÔNIOS VEGETAIS E REGULADORES VEGETAIS	10
2.5.1	Ácido Giberélico	11
2.6	ÓXIDO NÍTRICO	11
2.7	NANOTECNOLOGIA E SEUS EFEITOS EM VEGETAIS	12
3.	ARTIGO A. DESEMPENHO GERMINATIVO DE SEMENTES DE MILHO SUPER DOCE EM RESPOSTA AO ÁCIDO GIBERÉLICO NANOENCAPSULADO	14
3.1.	RESUMO	14
3.2	INTRODUÇÃO	14
3.3	MATERIAL E MÉTODOS	15
3.3.1	Preparo de Nanopartículas	16
3.3.1.1.	Nanopartículas ALG/CS	16
3.3.1.2.	Nanopartículas CS/TPP	16
3.4	CARACTERIZAÇÃO DA QUALIDADE FISIOLÓGICA INICIAL DAS SEMENTES	16
3.5	TRATAMENTO DAS SEMENTES COM GA ₃	18
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	18
3.4	RESULTADOS	18
3.5	DISCUSSÃO	22
3.5	CONCLUSÃO	23
4.	ARTIGO B. NANOPARTÍCULAS LIBERADORES DE ÓXIDO NÍTRICO NO DEEMPENHO GERMINATIVO DE SEMENTES DE MILHO SUPER DOCE EM DIFERENTES TEMPERATURAS	24
4.1	RESUMO	24
4.2	INTRODUÇÃO	24

4.3	MATERIAL E MÉTODOS	25
4.3.1	Síntese das Nanopartículas Liberadoras de NO	25
4.3.1.1	Nitrosação do ácido mercaptosuccínico formando ácido S-nitroso- mercaptosuccínico	26
4.3.2	Tratamento de Sementes	26
4.3.3	Desempenho germinativo	27
4.4	RESULTADOS	27
4.5	DISCUSSÃO	34
4.6	CONCLUSÃO	35
	REFERÊNCIAS	35

1 INTRODUÇÃO

O milho doce (*Zea mays* convar, *Saccharata*) tem sua produção destinada ao consumo humano na forma de milho verde em conserva, *in natura* e processado. Considerado uma hortaliça, o milho doce se destaca em produção quando comparado a outras espécies da mesma classe.

O milho doce se diferencia do milho comum quanto a composição, qualidade e aparência da semente. A ação de genes recessivos individuais ou associados modificam a composição química do endosperma proporcionando alto teor de açúcares e o baixo teor de amido. Essa alteração resulta em menor concentração de reservas e diminuição do vigor das sementes. Além disto, o pericarpo mais fino e delicado, para atender o consumo humano direto, deixa as sementes mais suscetíveis às injúrias mecânicas e entrada de patógenos prejudicando ainda mais a qualidade das mesmas.

Devido a menor qualidade fisiológica das sementes de milho super doce, torna-se necessário a utilização de algumas estratégias que favoreçam a germinação e o vigor de sementes, visando o estabelecimento do estande plantas no campo, como alternativa, temos os reguladores de crescimento

O uso de reguladores de crescimento são alternativas que visam melhorar o desempenho germinativo, dentre eles se encontram a aplicação agrícola do ácido giberélico que atua na superação de dormência das sementes, na mobilização das reservas do endosperma, no processo de fechamento estomático, sendo também associado ao crescimento do caule pelo alongamento nos entrenós. O ácido giberélico apresenta rápida degradação quando exposto ao meio externo.

Aqui poderiam ser inseridas informações sobre nanotecnologia (conceito, vantagens, etc.) antes de associar a nanotecnologia ao GA.

Estudos mostraram que a associação de ácido giberélico e nanocarreadores de quitosana gerou um sistema de liberação sustentada, aumentando a solubilidade do agente ativo e protegendo contra a degradação térmica e fotolítica em diferentes valores de pH. No entanto ainda são necessários mais estudos em outras culturas.

Devido a essas características, outros fatores se tornam prejudiciais como os fatores externos sendo esses os estresses abióticos e bióticos que podem acentuar as dificuldades no estabelecimento do estande de plantas em campo e reduzir a produtividade; dentre esses fatores, a temperatura do solo no momento da implantação da lavoura é um dos fatores determinantes para o estabelecimento da cultura quando a disponibilidade da água é ideal, pois

interfere na velocidade e uniformidade de emergência das plântulas.

O estresse térmico faz com que as plantas desenvolvam reações defensivas que aumentam a expressão de enzimas que levam à produção excessiva de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), causando estresse oxidativo e, conseqüentemente, danos na membrana celular e proteínas, causando a morte celular.

Estudos recentes demonstram que a capacidade das plantas de superar essas condições estressantes estão ligadas a eventos de sinalização, sendo o óxido nítrico (NO) uma peça-chave na modulação da expressão gênica e da atividade proteica, interagindo com EROs e controlando as ações hormonais.

Dessa forma pesquisas têm demonstrados que a aplicação exógena de NO melhora a tolerância a estresse abiótico, incluindo o estresse térmico, contudo os doadores de NO são instáveis e possuem uma alta degradação, assim uma alternativa é a nanoencapsulação dos doadores de NO, que visa proteger a molécula da degradação e permitir uma liberação controlada, estendendo assim seu período de ação.

Estudos envolvendo o uso de nanocarreadores vem se tornando frequente e se mostrando eficiente, pois estes têm a capacidade de envolver o ingrediente ativo e diminuir sua degradação, facilitando a aplicação e acarretando maior estabilidade físico-química, estes são capazes de envolver as moléculas químicas formando uma cápsula ou esfera de proteção ao ingrediente ativo.

A nanoencapsulação do ácido giberélico como do óxido nítrico pode agregar propriedades aos agroquímicos, tornando-os adequados para o uso em campo que pode sofrer com as variações externas, assim estas permitem acarretar maior estabilidade.

Neste contexto este trabalho tem como objetivos avaliar o efeito de doses e formulações de ácido giberélico (GA3) nanoencapsulado no processo germinativo de sementes de milho doce (Artigo A) e, o efeito de doses de doadores de óxido nítrico nanoencapsulado no processo germinativo de sementes do cereal submetidos a estresse térmico (Artigo B).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ASPECTOS GERAIS DA CULTURA E CARACTERÍSTICAS DO MILHO DOCE

O milho doce (*Zea mays* L. grupo *saccharata*) é uma olerícola pertencente à família das *Poáceas*, tribo *Maydeae*, gênero *Zea*, sendo sua origem e domesticação na América Central e do Sul, principalmente na região onde se situa o México (KWIATKOWSKI; CLEMENTE, 2007). Com características botânicas e reprodutivas idênticas ao milho comum, o milho doce possui cultivo anual sendo sua propagação feita via sementes com cultivo diretamente no campo (ARAGÃO, 2002; KUROZAWA, 2007).

A planta possui em média de 1,30 a 2,50 m de altura, um colmoereto, fibroso, recoberto por uma parte da folha denominada bainha. As folhas possuem um tamanho que varia de médio a grande, com coloração verde escura a verde clara, possuindo nervuras centrais e flexíveis (KWIATKOWSKI; CLEMENTE, 2007; PEREIRA FILHO; TEIXEIRA, 2016).

O que difere o milho doce do milho comum é a presença de alelos modificados que bloqueiam a conversão de açúcares em amido no endosperma, conferindo assim o caráter doce e fazendo com que a semente após a maturidade fisiológica perca água lentamente e, ao atingir em torno de 13%, apresente uma aspecto vítreo e enrugado (KWIATKOWSKI; CLEMENTE, 2007; STOR; LOVATO, 1991).

As cultivares mais utilizadas em cultivos comerciais podem ser divididas em dois grupos básicos: super doce e doce (SBRUSSI; ZUCARELI, 2014). O milho comum desenvolvido e maduro tem em média 3% de açúcares e entre 60 a 70% de amido, enquanto o doce apresenta entre 9% a 14% de açúcares e 30 a 35% de amido e o super doce cerca de 15% e 25% de açúcares e 15 a 25% de amido (SILVA, 1994; TEIXEIRA et al., 2014).

Os genes *sugary-1*, *brittle* (*bt1*, *bt2*, *bt3*) ou *shrunken-2* (*sh2*), que determinam o fenótipo doce são recessivos e se manifestam individualmente ou associados em combinações duplas ou triplas, bloqueando a transformação de açúcares em amidos (CARVALHO, 2018; ARAUJO et al., 2006).

2.2 IMPORTÂNCIA DO MILHO DOCE

O cultivo de milho doce ocorre em diversos países, pois possui uma diversificação de uso. Pode ser utilizado em conserva, congelado, na forma de espigas ou grãos, desidratado, colhido antes da polinização e usado como “baby corn” ou minimilho e, ainda, após

a colheita, a palhada da cultura pode ser utilizada para ensilagem (PEDROTTI et al., 2003).

O milho doce, destinado ao consumo humano, destaca-se pela sua alta palatabilidade, decorrente da maior proporção de açúcares em relação ao teor de amido nos grãos. Entretanto, esse maior teor de açúcar causa algumas limitações na produção de pratos tradicionais, como a pamonha e o curau, que requerem maior teor de amido. Além disso, devido suas características físico-químicas, há uma dificuldade de manter a qualidade pós colheita (PEREIRA FILHO; TEIXEIRA, 2016; SBRUSSI; ZUCARELI, 2014).

No Brasil o milho doce possui destaque na sua produção sendo a exploração da cultura realizada o ano todo, principalmente em áreas próximas as indústrias. Contudo, o milho doce possui uma maior popularidade em países como os Estados Unidos e o Canadá (KWIATKOWSKI; CLEMENTE, 2007; CONAB, 2016).

De acordo com a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação, em 2018 foram produzidas 9,1 milhões de toneladas de milho doce no mundo em uma área de 1,04 milhões de hectares.

Os Estados Unidos apresentavam uma área cultivada de 225 mil ha e, por ser tratar de uma hortaliça, este valor tem uma alta significância para o setor (USDA, 2016). Segundo dados de 2015, o Brasil possuía uma área de cultivo de 36 mil ha, sendo a maior concentração no estado de Goiás, apresentando 90% da área total cultivada no país (LUZ et al., 2015).

A exploração da cultura é uma alternativa rentável em relação ao milho comum, principalmente em regiões localizadas próximas de indústrias de processamento e por agricultores familiares (ZÁRATE et al., 2009 FRANCO et al. 2015), porém a baixa disponibilidade de genótipos adaptados para as condições do país, faz com que se seu cultivo seja limitado (BRITO et al., 2013). Além disto, os produtores normalmente seguem os mesmos manejos prescritos para o milho comum, que nem sempre são os mais adequados para esse tipo de cultivo (SOUZA et al., 2013).

2.3. SEMENTES DE MILHO SUPER DOCE X QUALIDADE

Dentre os parâmetros necessários para a implantação de uma cultura, o uso de sementes de alta qualidade é imprescindível, sendo estas capazes de conduzir ao campo características genéticas determinantes para o desempenho da cultivar, ligadas diretamente a obtenção de altas produtividades (MARCOS FILHO, 2015).

A qualidade das sementes é definida como o somatório dos atributos genéticos,

físicos, fisiológicos e sanitários, que estão relacionados com o elevado desempenho agrônômico, base fundamental para uma lavoura tecnicamente instalada (FRANÇA NETO; KRZYZANOWSKI; HENNING, 2010).

Segundo Marcos Filho (2015), dentre os atributos da qualidade, o potencial fisiológico, representado pela germinação e vigor das sementes, é o que se destaca, em especial em pesquisas, visto que o estabelecimento de estande adequado de plantas é a forma mais utilizada para a avaliação da qualidade das sementes e do desempenho das práticas de semeadura.

Entretanto, devido a grande quantidade de açúcares em relação ao amido, na maturação fisiológica as sementes de milho doce apresentam em relação ao milho comum baixas quantidades de matéria seca, que podem interferir na qualidade fisiológica (STORK; LOVATO, 1991). Sementes de milho doce possuem potencial fisiológico inferior quando comparadas às sementes de milho comum, o que pode afetar o estabelecimento de um estande ideal de plantas no campo. Essa baixa qualidade pode estar relacionada, entre outros fatores, a menor quantidade de amido presente no endosperma, a cristalização do açúcar no interior das células, aliados a presença de espaços vazios entre a camada da aleurona e o pericarpo (NASCIMENTO et al., 1994).

Os genes responsáveis por modificar a composição do milho doce são os genes sugary-1, brittle (bt1, bt2, bt3) ou shrunken-2 (sh2), que sozinhos ou em conjunto alteram a composição do endosperma e causam a formação de sementes leves e angulares. Os principais genes responsáveis pela característica doce são o sugary-1, brittle e shruke. O gene sugary-1 é encontrado nas cultivares do grupo doce e apresenta como limitação o curto período de permanência dos grãos no ponto de colheita e, conseqüentemente, perda do sabor adocicado. Já cultivares do grupo super doce são portadoras do gene brittle2 ou do gene shruke2 na forma homocigota recessiva, desta forma apresentam aumento do teor de sacarose no endosperma das sementes imaturas. Outro fator presente nas sementes de milho doce é a espessura do pericarpo reduzida que combinado com os altos teores de açúcar presentes no endosperma, fazem com que as sementes se tornem mais suscetíveis aos danos mecânicos, à entrada de patógenos e a deterioração, quando comparadas ao milho comum (WATER; BLANCHETTE, 1983).

Além das características apresentadas, outros aspectos que devem ser considerados são a alta sensibilidade a danos por embebição e a fragilidade durante o processo de secagem (GUISCHEM; NAKAGAWA; ZUCARELI, 2001).

A porcentagem de germinação das sementes de milho do doce, quando comparada às do milho comum, é menor devido à maior sensibilidade e suscetibilidade à

incidência de patógenos, a danos físicos e aqueles decorrentes das suas alterações bioquímicas (PEREIRA et al., 2008). Diante do exposto, em comparação ao milho comum, o milho doce é considerado como problemático, a medida que para ser considerado “semente” e receber sua certificação o limite tolerado de germinação é de 60% comparado com 85% do milho comum (BRASIL, 2013). Essas alterações fazem com que se aumente, assim, a exigência quanto ao controle dos fatores externos que afetam o processo de germinação, emergência de plântulas e o estabelecimento da cultura no campo.

2.4 ESTRESSE TÉRMICO

A germinação das sementes é um fator crítico para o estabelecimento das plantas sob condições naturais. O processo de germinação está associado a vários fatores extrínsecos, ou seja relacionados ao ambiente externo (água, temperatura, luz e composição dos gases atmosféricos) e a fatores intrínsecos, relacionados com as características fisio-metabólicas das sementes (BEWLEY; BLACK, 1994; SANTOS et al., 2005).

O processo de entrada de água nas sementes é considerado um processo físico, que varia de acordo com a espécie, permeabilidade do tegumento, disponibilidade hídrica, temperatura, pressão hidrostática, composição química e condições fisiológicas das sementes (HADAS, 1982). Dentre todos esses fatores a temperatura é um fator que interfere na porcentagem de germinação, pois influencia a absorção de água pela semente e as reações bioquímicas que regulam todo o processo metabólico (BEWLEY; BLACK, 1994).

A temperatura é importante para o processo de germinação tanto no aspecto de germinação, como na velocidade de germinação, quando se tem disponibilidade de água suficiente a temperatura e a luz, acabam por ser fatores importantes para que se inicie o processo de germinação, para algumas espécies a temperatura predominante no solo que determina a quantidade de sementes germinadas, como a velocidade em que esse processo ocorre (ANDRADE; 1994; CARVALHO; NAKAGAWA, 1999).

Em resposta ao fator temperatura de germinação esse foi resumido em três temperaturas, sendo a subótima, ótima e supraótima. A temperatura ótima é determinada pela combinação de maior porcentagem de germinação em menor período de tempo (MARCOS FILHO, 2015). Nas outras faixas de temperatura (subótima e supraótima) a taxa de germinação apresenta resposta linear, chegando em um período onde não ocorre mais a germinação (GRUNDY; MEAD, 2000).

Em condições onde a temperatura não é favorável pode fazer com que corra um atraso no estabelecimento o estande, além de acarretar alterações na velocidade do desenvolvimento e crescimento da cultura, ou seja, temperaturas baixas fazem com que se alongue o processo de desenvolvimento e temperaturas mais elevadas aceleram. (EMBRAPA, 2015; MARCOS FILHO, 2015)

Essa variação de temperatura faz com que ocorra uma série de reações bioquímicas e metabólicas que causam desequilíbrio entre a produção e degradação de espécies reativas de oxigênio, esses compostos possuem maior facilidade em reagir com outras substâncias, acarretando oxidação de proteínas, lipídeos, membranas e até mesmo o DNA molecular, tais alterações causam efeitos negativos em processos metabólicos essenciais podendo levar a morte celular (MITTLER, 2002).

Poderia elaborar um último parágrafo fazendo a ligação com os próximo assuntos (GA e NO), os quais são alternativas para favorecer a germinação de sementes em condições de estresse abiótico.

2.5 HORMÔNIOS VEGETAIS E REGULADORES VEGETAIS

Os hormônios vegetais ou fitohormônios são moléculas produzidas naturalmente pelas plantas que influenciam os processos bioquímicos e fisiológicos nos vegetais. Atualmente, são reconhecidos nove principais grupos de hormônios vegetais: auxinas, giberelinas, citocininas, ácido abscísico, etileno, brassinoesteróides, jasmonatos, salicilatos, poliaminas e, mais recentemente, as estrigolactonas (RODRIGUES; FIOREZE, 2015).

Os hormônios atuam como sinalizadores na planta criando uma comunicação entre as raízes e a parte aérea e auxiliam no funcionamento do organismo vegetal, pois estão relacionados com os processos que vão desde a germinação até a formação de todas as estruturas da planta (SHABALA et al., 2016). Eles também auxiliam em processos fisiológicos em resposta a estresses abióticos e bióticos (DURBAK; YAO; MCSTEEN, 2012).

Devido a essas ações nas plantas, conferindo-lhes defesa a fatores abióticos e bióticos, os hormônios vegetais começaram a ser produzidos para aplicação agrícola visando maior qualidade e produção, sendo denominados então de reguladores vegetais (PEREIRA, 2017).

Os reguladores de crescimento vegetal são utilizados na agricultura para obter vantagens específicas como diminuição da suscetibilidade ao estresse biótico e abiótico, estrutura morfológica aprimorada, facilitação da colheita, aumentos quantitativos e qualitativos

no rendimento e modificação dos constituintes das plantas (RADEMACHE, 2015).

Relatos na literatura, mostram que os incrementos nos níveis endógenos de auxinas e giberelinas (COLEBROOK et al., 2014) em plantas cultivadas com deficiência hídrica, mitigaram os efeitos causados no crescimento vegetal. Estes reguladores vegetais atuam em nível celular resultando em desenvolvimento radicular, na manutenção das trocas gasosas e na atividade antioxidante, em condições de déficit hídrico.

2.5.1 Ácido Giberélico

As giberelinas foram descobertas nos anos de 1950, pelos japoneses, devido uma doença que atingiu a cultura do arroz, denominada de bakanae, que causava a perda de sementes e o alongamento de plantas. Estudos mostraram que esta doença estava relacionada com o fungo *Giberella fujikuroi* (HEDDEN; SPONSEL, 2015).

Após sua descoberta, a giberelina passou a ser produzida industrialmente por meio de processos fermentativos, possuindo importância para a agricultura devido seus efeitos no vegetal (HAMAYUN et al., 2010; GÖKDERE; ATEŞ, 2014).

O uso das giberelinas é comum na superação de dormência de sementes; no processo de germinação funciona como um sinalizador para a produção de alfa amilase pelas células, que são liberadas no endosperma das sementes. Os produtos da hidrólise enzimática do amido são usados como fonte de energia pelo embrião (MEDEIROS et al., 2015).

A giberelina possui efeitos morfológicos e bioquímicos como aumento do peso dos órgãos vegetais e frutos, aumento do crescimento vegetativo incluindo área foliar, massa fresca, massa seca, conteúdo de clorofila -nível de clorofila a e b e aumento do número de sementes férteis (ZANG et al., 2016).

Carmo et al. (2021) notaram que existe efeito positivo do uso de bioestimulantes quando em condições adversas, como déficit hídrico e altas temperaturas.

Quando avaliados lotes de sementes de milho doce de menor vigor, submetidos a pré-imersão com 0,4 g L⁻¹ de ácido giberélico, verificou-se melhor desempenho das sementes em todas as avaliações fisiológicas (MARINHO et al., 2021).

Em alguns casos, o tratamento com GA₃ altera a deposição de lignina, que desempenha um papel importante na regulação do conteúdo de água através de alterações na elasticidade da parede celular. Contudo o GA₃ possui uma instabilidade química por fatores como fotólise, hidrólise e mudanças de temperatura quando aplicado em campo o que reduz sua atividade biológica, sendo uma das atuais soluções para estes problemas o uso de sistemas de

liberação controlada (LIU et al., 2013).

2.6 ÓXIDO NÍTRICO

O óxido nítrico (NO) é um radical livre gasoso apresentando propriedades hidrofóbicas que se difunde rapidamente através das membranas, devido ao seu baixo peso molecular e qualidades lipofílicas (DELLEDONNE, 2005). O NO atua como uma importante molécula sinalizadora, que participa de uma variedade de processos fisiológicos nas plantas, que inclui germinação, superação de dormência nas sementes, florescimento, fechamento estomático e respostas de defesa (BESSON-BARD et al., 2008).

Os efeitos protetores do NO, sob plantas submetidas a estresse abiótico são induzidos por baixas concentrações dessa molécula variando de nano a micro molar, quando estas quantidades são elevadas pode se ocasionar toxicidade levando a morte celular (SANTISEREE et al., 2013).

2.7 NANOTECNOLOGIA E SEUS EFEITOS EM VEGETAIS

A nanoencapsulação de ingredientes ativos possui aplicações amplas e notáveis em diversas áreas, como na produção de fármacos, cosméticos, ciência alimentar e no setor agrícola (SHARON et al., 2010). As nanopartículas envolvem as moléculas químicas formando uma cápsula ou esfera de proteção ao ingrediente ativo, aumentando sua estabilidade, reduzindo sua degradação e fazendo com que sua liberação possa ocorrer de forma gradativa (EZHILARASI et al., 2012 SHAIK; KORSAPATI; PANATI, 2012). Sendo assim, a nanoencapsulação prolonga o tempo de ação de um ativo químico resultando no aumento da sua atividade química e biológica (TING et al., 2014).

A nanoencapsulação pode agregar propriedades aos agroquímicos, tornando-os adequados para o uso em campo, acarretando uma maior estabilidade físico-química, tempo de ação, distribuição foliar, aumento da atividade biológica, redução da concentração de uso, toxicidade e contaminação ambiental (KHOT et al., 2012; NAIR et al., 2010). O efeito esperado com o uso deve ser a redução na quantidade de substâncias químicas ativas incorporadas nas plantas e nos solos, atenuando o impacto negativo no ambiente (PÉREZ-DE-LUQUE, 2017).

Por meio de suas características como morfologia, tamanho, a carga de superfície e a concentração do material, determina a interação destes com o vegetal, podendo resultar em diferentes respostas biológicas (ABRAHAM et al., 2013; ZHU et al., 2012).

Um outro fator importante é que o material que compõe as partículas produza metabólicos não-tóxicos e seja degradado facilmente, daí a preocupação para formulações obtidas a partir de polímeros biodegradáveis naturais, como quitosana (QS) e alginato (ALG). Liu et al. (2013) mostraram que a associação de ácido giberélico à nanocarreadores de quitosana gerou um sistema de liberação sustentada, aumentando a solubilidade do agente ativo e protegendo contra a degradação térmica e fotolítica em diferentes valores de pH.

A quitosana é um amino polissacarídeo derivado da desacetilação da quitina, a qual se constitui na maior parte dos exoesqueletos dos insetos, crustáceos e da parede celular dos fungos. Por ser um produto natural, de baixo custo, renovável, abundante e atóxico, tem sido proposto como material potencialmente atraente para usos diversos, inclusive na agricultura (AZEVEDO et al., 2007). Pesquisas tem sido realizadas no sentido de determinar sua habilidade no aumento da tolerância de plantas a estresses.

Já os alginatos são polímeros polianiônicos extraídos de algas marrons, que ao entrarem em contato com alguns cátions divalentes (por exemplo, Ca^{+2}) e polímeros catiônicos (quitosana) causam uma gelificação ionotrópica, formando junções intercadeias gerando nanopartículas, que permite a incorporação de algumas moléculas bioativas (como fármacos, herbicidas, fungicidas) em sua matriz polimérica através de interações eletrostáticas.

Estudos demonstraram que o uso de sistemas nanoparticulados para ácido giberélico poderia garantir maior atividade biológica e eficiência no campo, resultando em maior qualidade, aumento da produção e maior valor econômico dos produtos agrícolas (PEREIRA, 2017).

Entretanto são poucos os estudos com base no uso de nanopartículas de ácido giberélico, fazendo se necessários pesquisas para difundir essa nova tecnologia (JIMÉNES-ARIAS et al., 2020).

3. ARTIGO A. DESEMPENHO GERMINATIVO DE SEMENTES DE MILHO SUPER DOCE EM RESPOSTA AO ÁCIDO GIBERÉLICO NANOENCAPSULADO.

3.1. RESUMO

O milho super doce possui sementes com baixo potencial fisiológico, devido a diversos fatores, sobretudo às concentrações maiores de açúcar. A utilização de reguladores de crescimento como as giberelinas é uma alternativa para uniformizar e incrementar o desempenho germinativo e minimizar os efeitos de estresse abióticos. Além disso, para aumentar a eficácia dessas moléculas, é possível associar às nanopartículas, pois estas atuam protegendo contra efeitos externos. Assim, o objetivo do trabalho foi avaliar o efeito dos nanocarreadores de ácido giberélico (GA_3) no desempenho germinativo das sementes de milho super doce. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial $5 \times 4 + 1$, com quatro repetições. Foram avaliados cinco suspensões de nanopartículas aplicadas nas sementes, sendo essas: nano alginato/quitosana (ALG/CS) sem e com GA_3 , nano quitosana/tripolifosfato (CS/TPP) sem e com GA_3 e ácido giberélico livre, com quatro diluições 0,05 mg/ml (formulação estoque), 0,005 mg/ml (1:10), 0,0005 mg/ml (1:100) e 0,00005 mg/ml (1:1000) e testemunha adicional. Os tratamentos foram aplicados via embebição das sementes, que posteriormente foram analisadas pelas seguintes variáveis: primeira contagem, germinação, plântulas anormais e sementes mortas, comprimento e massa seca de parte aérea e de raiz de plântulas. Com base nas variáveis analisadas o uso de nanocarreadores de ALG/CS/ GA_3 , nas maiores concentrações, favorecem o desempenho germinativo de sementes de milho super doce, quando comparadas ao GA_3 livre.

Palavra chave: Alginato; Germinação; Milho doce; Nanotecnologia; Quitosana; *Zea mays* saccharata Sturt

3.2 INTRODUÇÃO

Sementes de milho super doce possuem baixo potencial fisiológico, devido a vários fatores como os espaços internos existentes entre a camada de aleurona e o pericarpo das sementes, assim a reduzida massa seca e a menor quantidade de amido, fazem com que esses tenham um aspecto enrugado, tornando-as mais sensíveis a estresses bióticos e abióticos. Essas características estão vinculadas a composição das sementes do milho doce, pois este possui elevado teor de açúcar e baixo teor de amido (NASCIMENTO et al., 1994; ZUCARELI et al., 2014). Segundo Mondo et al. (2012), o uso de sementes de baixo potencial fisiológico afeta negativamente o estabelecimento e a uniformidade do estande de plantas no campo, acarretando em baixa produtividade.

Como intuito de minimizar esses efeitos, estratégias têm sido empregadas para melhorar o desempenho fisiológico das sementes e, conseqüentemente, aumentar a tolerância ao estresse abiótico em plantas (HUSSAIN et al., 2016). Uma das estratégias que vem sendo muito

difundida é a aplicação exógena de reguladores de crescimento no tratamento pré-semeadura, que tem demonstrado ser uma abordagem para alcançar uma emergência rápida e uniforme de forma eficaz e prática (MARTA et al., 2016).

Dentre os reguladores de crescimento, a giberelina possui papel importante para o processo de germinação, pois promove o alongamento e a divisão celular, tem efeito na superação de dormência e na mobilização das reservas do endosperma. O ácido giberélico estimula a alfa-amilase e outras enzimas hidrolíticas, promovendo hidrólise de reservas armazenadas na semente. Além da alfa-amilase, existem outras enzimas hidrolíticas (protease, N-redutases), as quais são produzidas em resposta ao GA₃ (TAIZ; ZEIGER, 2010).

A nanotecnologia pode ser uma aliada para potencializar os efeitos da aplicação de reguladores vegetais, sobretudo as nanocápsulas, devido a sua ampla aplicabilidade, estabilidade físico-química de agroquímicos e liberação modificada para ingredientes ativos, disponibilizando de forma gradativa no momento e alvo adequados e reduzindo, desta forma, a ação de agentes externos, perdas por degradação, lixiviação e volatilização, devido a essas preocupações se dá o uso da quitosana (CS) e alginato (ALG) como polímeros (FRACETO et al., 2016).

Segundo Aragão et al. (2003), a pré-umbebição de sementes de milho armazenadas com solução de 50 mg L⁻¹ de ácido giberélico, levou à sua maior atividade metabólica e, assim, maior germinação e vigor. Marinho et al. (2021) avaliaram que a pré-umbebição com ácido giberélico à 0,4 g L⁻¹, no lote de menor vigor, favoreceu o desempenho fisiológico das sementes.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de nanocarreadores de ácido giberélico (GA₃) no desempenho germinativo das sementes de milho super doce.

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Fitotecnia da Universidade Estadual de Londrina – UEL, Londrina, Paraná, Brasil. Foi utilizado um lote de sementes híbridas do milho super doce SV9298SN da Seminis®.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 5 × 4 + 1, com quatro repetições. Foram testadas cinco formulações sendo quatro suspensões de nanopartículas aplicadas nas sementes, sendo essas: nano ALG/CS sem e com GA₃, nano CS/TPP sem e com GA₃ e ácido giberélico livre, em quatro concentrações: 0,05

mg/ml (formulação estoque), 0,005 mg/ml (1:10), 0,0005 mg/ml (1:100) e 0,00005 mg/ml (1:1000) e testemunha adicional tratada com água destilada.

3.3.1 Preparo de Nanopartículas

3.3.1.1.Nanopartículas ALG/CS

As nanopartículas de ALG/CS foram preparadas por meio do método de pré-gelificação ionotrópica (SARMENTO et al., 2006). Primeiramente, com o auxílio de bomba peristáltica, foi adicionado pelo período de 60 minutos, 3,75 ml de uma solução de CaCl_2 à 59 ml de uma solução de ALG (0,063%, pH de 4,9), que se manteve sobre forte agitação magnética. Durante esta etapa do processo ocorre a reticulação do CaCl_2 sobre o ALG através de interações iônicas formando uma estrutura denominada “eggbox”. Após este processo foi adicionado o hormônio vegetal GA_3 de forma que a concentração final fosse de 50 $\mu\text{g/ml}$. Manteve-se esta solução sobre forte agitação e com auxílio da bomba peristáltica foi adicionado 12,5 ml de solução de quitosana (0,07%, pH 4,6) preparada em solução aquosa contendo 5,7% de ácido acético pelo período de 90 minutos formando um complexo polieletrólítico entre os polímeros. O mesmo procedimento foi realizado sem a presença do hormônio.

3.3.1.2.Nanopartículas CS/TPP

Uma solução aquosa de 10 ml de CS (0,2%, pH 4,5) contendo 0,6% de ácido acético foi mantida sob agitação vigorosa. GA_3 foi adicionado, com agitação até a dissolução completa, seguido de adição lenta de 6 ml de solução de TPP (0,1%, pH 4,5 a 4°C), usando pipeta. A formulação final foi uma dispersão coloidal que foi mantida sob agitação por mais 20 minutos

3.4 CARACTERIZAÇÃO DA QUALIDADE FISIOLÓGICA INICIAL DAS SEMENTES

Primeiramente o lote foi homogeneizado e submetido as seguintes análises preliminares para determinação da qualidade fisiológica inicial das sementes:

Determinação do grau de umidade: o teor de água inicial das sementes foi determinado pelo método da estufa a $105^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, durante 24 horas, de acordo com as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

Teste de germinação: conduzido com quatro repetições de 50 sementes, colocadas para germinar em rolo de papel germitest, umedecidos com quantidade de água equivalente a 2,5 vezes a massa do papel seco, e levados a germinador tipo BOD a temperatura constante de 25°C . Foram realizadas avaliações do número de plântulas normais, anormais e sementes não germinadas, aos sete dias após a semeadura, segundo os critérios estabelecidos pelas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009) e os resultados expressos em porcentagem.

Primeira contagem: foi realizado em conjunto com o teste de germinação, utilizando a mesma metodologia, computando a porcentagem de plântulas normais obtidas no quarto dia após a semeadura.

Emergência de plântulas em areia: realizado com quatro repetições de 50 sementes, semeadas em caixas de areia a 5 cm de profundidade. Após 14 dias da semeadura foi contabilizado o número de plântulas emersas, sendo o resultado expresso em porcentagem.

Índice de velocidade de emergência em areia: conduzido em conjunto com o teste de emergência de plântulas em areia, com avaliações diárias do número de plântulas emersas a partir do início da emergência do coleóptilo até o momento da última contagem, aos 14 dias após a semeadura. Ao final do teste, o IVE foi calculado empregando-se a fórmula de Maguire (1962).

Envelhecimento acelerado: foi conduzido de acordo com a metodologia proposta pela AOSA (2009), utilizando caixas plásticas (11 cm x 11 cm x 3,5 cm) com compartimento individual onde as sementes de cada subamostra foram colocadas, sem sobreposição, evitando contato com as sementes, no fundo são colocadas 40 ml de água destilada, posteriormente estas foram tampadas e mantidas em estufa incubadora, a 42°C , durante 72 horas (DIAS; BARROS, 1995). Após este período as sementes foram submetidas ao teste de germinação e determinação do teor de água, conforme metodologias já descritas anteriormente.

Comprimento de plântula: utilizou-se a metodologia proposta por Nakagawa (1999), que consiste em distribuir quatro repetições de 10 sementes, com a extremidade da radícula voltada para baixo, dispostas no terço superior do papel de germinação previamente umedecido na proporção de 2,5 vezes a massa do papel seco. Posteriormente estes foram colocados em germinador tipo BOD para germinação no escuro, durante sete dias. Após este

período, com o auxílio de régua milimetrada, foram medidas a parte aérea e a raiz primária das plântulas normais, sendo os resultados expressos em cm por plântula.

Massa seca de plântula: realizado em conjunto com o teste de comprimento, as plântulas foram separadas em duas porções, parte aérea e sistema radicular, sendo estas levadas a estufa de circulação e secadas a 65°C por 72 horas, posteriormente a este período foi realizado a pesagem em balança analítica, sendo os resultados expressos em miligrama por plântula

3.5 TRATAMENTO DAS SEMENTES COM GA₃

Após a caracterização inicial, as sementes foram separadas em porções de 40 gramas para o teste de germinação e 20 gramas para o teste de comprimento, estas foram colocadas em potes de PVC com tampa e tratadas via embebição de sementes com 5 ml, na solução estoque e diluições de 1:10, 1:100 e 1:1000 (v/v), equivalentes a concentrações de 0,05, 0,005, 0,0005 e 0,00005 mg/ml respectivamente por um período de seis horas, sendo este agitado a cada 30 minutos. Após este período foi realizada a avaliação do desempenho germinativo por meio dos testes de primeira contagem de germinação e germinação, avaliando plântulas normais, anormais e sementes mortas, comprimento de parte aérea e raiz e massa seca da parte aérea e raiz das plântulas, utilizando as metodologias já descritas anteriormente.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As pressuposições de normalidade dos erros, homogeneidade das variâncias e independência dos erros foram testados por Shapiro-Wilk, Levene e Durbin-Watson, respectivamente. Os dados foram submetidos a análise de variância ($p \leq 0,05$) e se significativo, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Todas as análises foram realizadas com o auxílio do software R (R Core Team, 2021).

3.4 RESULTADOS

O lote de sementes utilizado apresentou germinação superior ao mínimo estabelecido para a comercialização (Tabela 1).

Tabela 1 – Caracterização de grau de umidade e do potencial fisiológico inicial (germinação e vigor) do lote de sementes de milho super doce utilizado no experimento

Variáveis	Valores Observados
Grau de umidade	8,7%
Germinação	76%
Primeira contagem	32%
Plântulas anormais	19%
Sementes mortas	5%
Envelhecimento acelerado	40%
Comprimento da parte aérea	6,5 cm/plântula
Comprimento da raiz	9,4 cm/planta
Massa seca da parte aérea	12 mg/planta
Massa seca da raiz	9,2 mg/planta
Emergência de plântulas em areia	82%
Índice de velocidade de emergência	5,2

No teste de primeira contagem de germinação (Figura 1), os tratamentos CS/TPP e CS/TPP/GA₃ apresentaram os melhores resultados na diluição de 100. Para a ALG/CS, na diluição de 1000, houve incremento na germinação quando comparado ao controle. A diluição de 1000 do ALG/CS foi superior as demais doses dele e também em relação a todos os demais tratamentos nesta mesma diluição.

Na diluição de 1:100, todos, exceto o ALG/CS, aumentaram a germinação em relação ao controle e ao GA₃. Já na diluição de 10, somente o ALG/CS/GA₃ aumentou em relação ao controle e GA₃. Na concentração estoque, CS/TPP, ALG/CS e ALG/CS/ GA₃ foram superiores aos demais. No teste de germinação, não houve efeito significativo das formulações e concentrações.

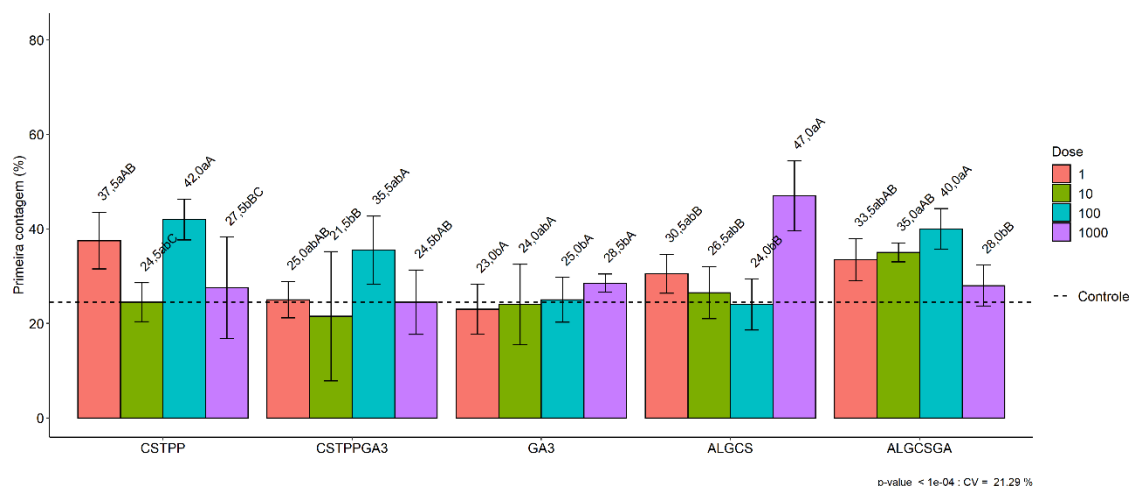


Figura 1 - Valores médios da primeira contagem da germinação (%) de sementes de milho super doce tratadas com nano CS/TPP/GA₃, nano CS/TPP, nano ALG/CS/GA₃, nano ALG/CS, GA₃, em concentrações de 0,05 mg/ml (formulação estoque) diluições de 0,005 mg/ml (10), 0,0005 mg/ml (100) e 0,00005 mg/ml (1000). Médias seguidas de mesma letra minúsculo entre tratamentos de uma mesma diluição e maiúsculo entre diluições de um mesmo tratamento não diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Para plântulas anormais não houve efeito significativo ($p > 0,05$) dos fatores isolados e da interação, bem como em relação ao controle. O mesmo comportamento foi observado para a variável sementes mortas.

Para a variável comprimento da parte aérea (Figura 2) nota-se que não houve diferença entre as diluições para o tratamento com ALG/CS/GA₃. Para o ALG/CS obteve-se melhor resposta na diluição de 1000. Já no GA₃ isolado, nas diluições de 10 e 100 observou-se as menores respostas. No tratamento com CS/TPP/GA₃, na diluição de 1000 ocorreu um decréscimo nos valores, sem diferir entre as demais diluições. Já para o CS/TPP, o menor resultado se deu na diluição de 10, com as demais concentrações superando o controle.

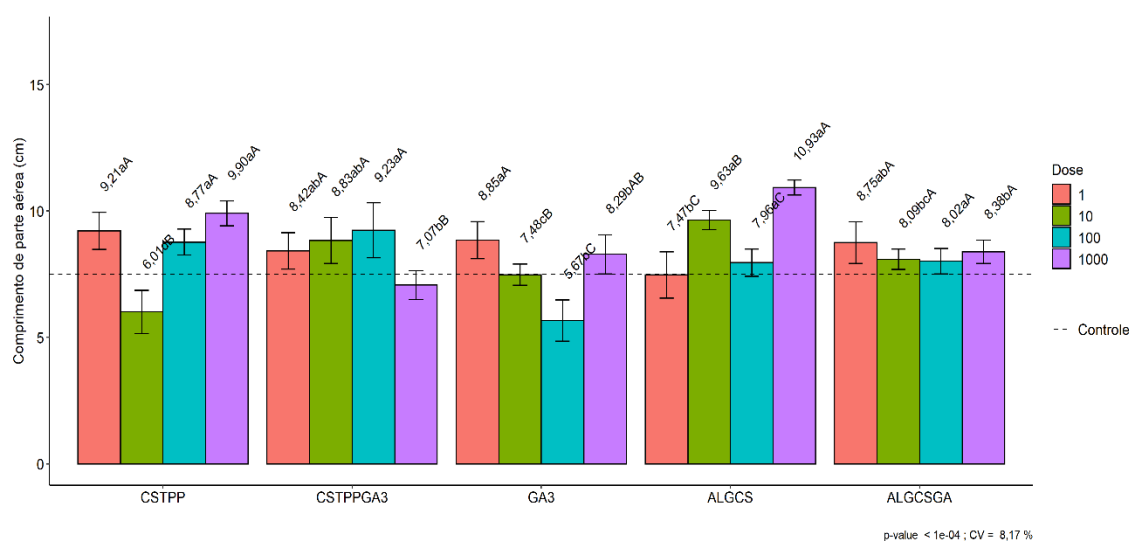


Figura 2 - Valores médios do comprimento de parte aérea (cm) de sementes de milho super doce tratadas com nano CS/TPP/GA₃, nano CS/TPP, nano ALG/CS/GA₃, nano ALG/CS, GA₃, em concentrações de 0,05 mg/ml

(formulação estoque) diluições de 0,005 mg /ml (10), 0,0005 mg / ml (100) e 0,00005 mg / ml (1000). Médias seguidas de mesma letra minúsculo entre tratamentos de uma mesma diluição e maiúsculo entre diluições de um mesmo tratamento não diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Ao analisar a variável comprimento de raiz, nota-se que para o tratamento com CS/TPP não houve diferença entre as diluições analisadas. Contudo, para o CS/TPP/GA₃, a diluição de 1:1000 apresentou respostas inferiores, assim como as diluições de 1:10 e 1:100, do tratamento com GA₃. O tratamento ALG/CS, na diluição de 1:100, apresentou comprimento de raiz inferior em relação as demais diluições do mesmo tratamento. O ALG/CS/GA₃ foi inferior aos demais na diluição de 10. Dentro das diluições, a de 100, dos tratamentos CS/TPP/GA₃ e ALG/CS/GA₃ apresentou aumento em relação ao GA₃. Para as diluições de 10, o ALG/CS, CS/TPP e CS/TPP/ GA₃ foram superiores ao GA₃. (Figura 3)

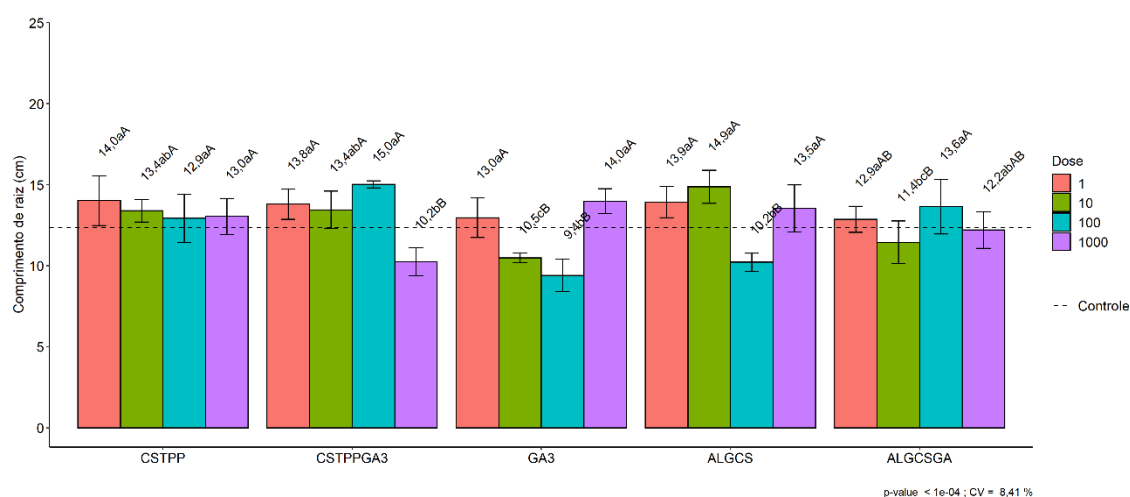


Figura 3 - Valores médios do comprimento de raiz (cm) de sementes de milho super doce tratadas com nano CS/TPP/GA₃, nano CS/TPP, nano ALG/CS/GA₃, nano ALG/CS, GA₃, em concentrações de 0,05 mg / ml (formulação estoque) diluições de 0,005 mg /ml (10), 0,0005 mg / ml (100) e 0,00005 mg / ml (1000). Médias seguidas de mesma letra minúsculo entre tratamentos de uma mesma diluição e maiúsculo entre diluições de um mesmo tratamento não diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância.

A massa seca da parte aérea (Figura 4), nos tratamentos utilizando CS/TPP, CS/TPP/GA₃, ALG/CS/GA₃ e ALG/CS nas diluições de 1000, 100 e 10, foi inferior quando comparada com os resultados do controle e aos demais tratamentos, com exceção do uso apenas do GA₃. Para o tratamento com ALG/CS/GA₃, ao avaliar as diluições a de 1 e 10 vezes obtiveram melhores respostas quando comparadas ao controle. Contudo para o ALG/CS na diluição de 100 vezes, ALG/CS/GA₃, CS/TPP e CS/TPP/GA₃ nas diluições estoque e de 10 foi possível ter o melhor resultado.

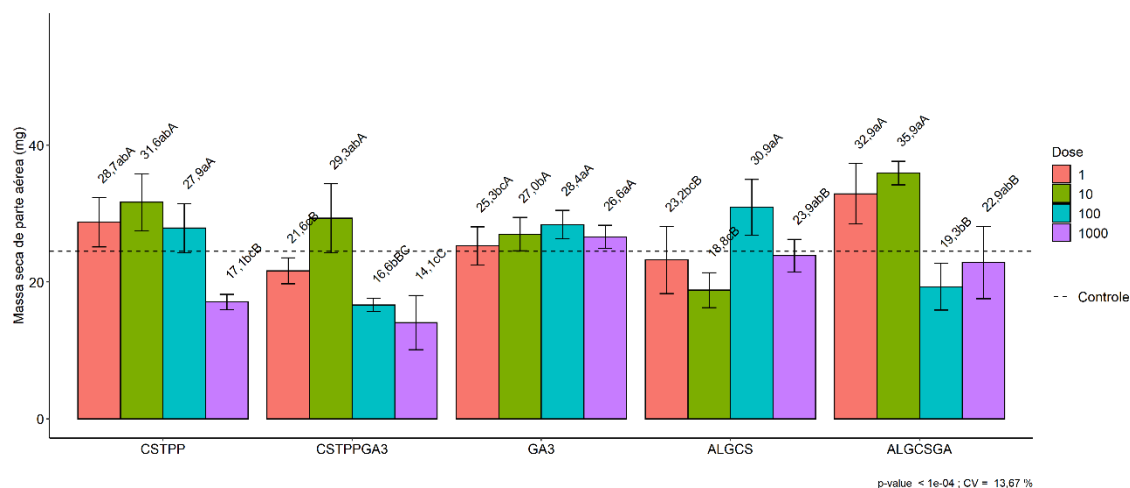


Figura 4 - Resultados médios da massa seca da parte aérea (mg) de plântulas oriundas de sementes de milho super doce tratadas com nano CS/TPP/GA₃, nano CS/TPP, nano ALG/CS/GA₃, nano ALG/CS, GA₃, em concentrações de 0,05 mg / ml (formulação estoque) diluições de 0,005 mg / ml (10), 0,0005 mg / ml (100) e 0,00005 mg / ml (1000). Médias seguidas de mesma letra minúsculo entre tratamentos de uma mesma diluição e maiúsculo entre diluições de um mesmo tratamento não diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância.

O tratamento CS/TPP apresentou melhor resultado de massa seca da raiz nas diluições de 1, 10 e 100, assim como o CS/TPP/GA₃ na diluição de 100, com valores acima do controle. Os demais tratamentos das sementes em todas as diluições avaliadas demonstraram resultados abaixo do controle.

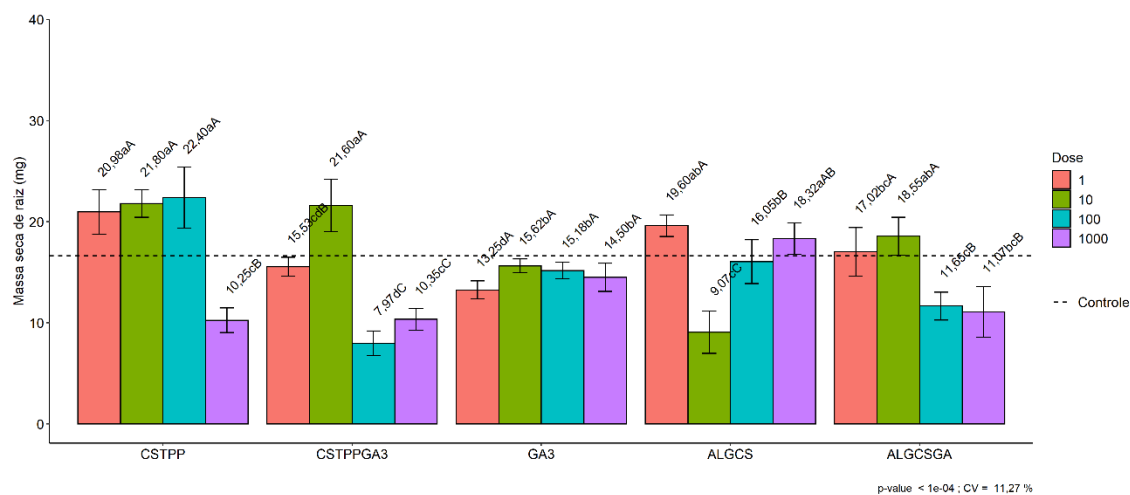


Figura 5 - Valores médios da massa seca da raiz (mg) de plântulas oriundas de sementes de milho super doce tratadas com nano CS/TPP/GA₃, nano CS/TPP, nano ALG/CS/GA₃, nano ALG/CS, GA₃, em concentrações de 0,05 mg / ml (formulação estoque) diluições de 0,005 mg / ml (10), 0,0005 mg / ml (100) e 0,00005 mg / ml (1000). Médias seguidas de mesma letra minúsculo entre tratamentos de uma mesma diluição e maiúsculo entre diluições de um mesmo tratamento não diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância.

3.5 DISCUSSÃO

Os pré-tratamentos de sementes são utilizados para melhorar a sincronia da germinação e aumentar o vigor das sementes devido à ativação de processos metabólicos (PAPARELLA et al., 2015).

A estimativa de produtividade em larga escala indicou que as nanopartículas de quitosana contendo GA₃ apresentam excelente potencial para aplicações na agricultura. Os polímeros usados para fabricar as nanopartículas são de baixo custo e são produzidos essencialmente com água. Além disso, a metodologia de tratamento de sementes permite que as sementes estejam prontas para a semeadura no campo, evitando a aplicação das nanopartículas no solo e a possível contaminação do meio ambiente (PAPARELLA et al., 2015).

Os polímeros sintéticos e naturais também podem alterar o metabolismo das sementes, melhorando os mecanismos de defesa contra patógenos e aumentando o vigor das plântulas (ZENG et al., 2012).

Os dois sistemas nanocarreadores baseados em CS apresentaram características físico-químicas diferentes, que conseqüentemente influenciaram a liberação de GA₃ durante o condicionamento das sementes. Ensaio *in vitro* mostraram que a liberação do sistema ALG/CS-GA₃ foi inicialmente mais lenta, enquanto quase 100% do agente ativo presente no sistema foi liberado em 24 horas. O sistema CS/TPP/GA₃ apresentou liberação inicial mais rápida, mas 54% do hormônio ficou retido dentro das partículas após 24 horas. Uma consideração importante é que as condições de pH e temperatura podem alterar o mecanismo e a duração da liberação de GA₃, portanto, mais estudos são necessários para elucidar a natureza da liberação de GA₃ em plantas, bem como para determinar como os sistemas nanocarreadores se comportam dentro das plantas (PEREIRA et al., 2017).

3.5 CONCLUSÃO

O uso de nanocarreadores de ALG/CS/GA₃, nas concentrações maiores, obtiveram melhores resultados, quando comparados com o GA₃ livre.

4. ARTIGO B. NANOPARTÍCULAS LIBERADORES DE ÓXIDO NÍTRICO NO DESEMPENHO GERMINATIVO DE SEMENTES DE MILHO SUPER DOCE EM DIFERENTES TEMPERATURAS

4.1 RESUMO

O milho doce possui um baixo potencial fisiológico que dificulta sua germinação e o estabelecimento do estande, principalmente em condições de ambiente não favoráveis. Uma alternativa é o uso exógeno de protetores como o óxido nítrico (NO), porém sua alta degradação dificulta a aplicação prática. As nanocápsulas podem viabilizar essa aplicação, reduzindo a degradação e aumentando a eficiência. Diante disso, o trabalho teve por objetivo avaliar o efeito de doses de óxido nítrico nanoencapsulado no desempenho germinativo de sementes de milho super doce em diferentes temperaturas. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 3x5, com quatro repetições. Foram testadas três suspensões, sendo essas: nano de quitosana mais doador de óxido nítrico (NP NO), apenas quitosana vazia (NP vazia) e apenas o doador de NO (NO LIVRE), nas doses 0, 2, 4, 6 e 8 mmol. Os tratamentos foram submetidos a germinação nas temperaturas de 20°C, 25°C e 30°C. As variáveis analisadas foram: primeira contagem, germinação, plântulas normais e sementes mortas, comprimento e massa seca de parte aérea e de raiz de plântula. Nas três temperaturas, o aumento das doses de NO reduz o desempenho fisiológico das sementes de milho doce.

Palavra-chave: Estresse abiótico; Nanotecnologia; Quitosana; *Zea mays* saccharata Sturt.

4.2 INTRODUÇÃO

A produção e comercialização do milho super doce é realizada o ano todo, principalmente em áreas próximas as indústrias. Isto faz com que a cultura comumente sofra com condições climáticas adversas, como variações de temperatura, que interferem na germinação, crescimento e desenvolvimento da cultura, afetando sua produção (KWIATKOWSKI; CLEMENTE, 2007). Além disso, as sementes de milho doce apresentam menor potencial fisiológico, quando comparadas as de milho comum, devido a menor quantidade de amido no endosperma, a cristalização do açúcar no interior das células e a presença de espaços vazios entre a camada da aleurona e o pericarpo (NASCIMENTO et al., 1994).

O milho para germinar necessita de umidade adequada e de temperatura do solo superior a 10 °C, com emergência de plântulas de 4 a 7 dias após a semeadura, sendo a temperatura considerada ótima de 25°C. Entretanto, o uso de sementes de pior qualidade, aliado a ocorrência de condições ambientais adversas por ocasião da semeadura, pode resultar em baixa percentagem de germinação e menor velocidade de emergência das plântulas (FANCELLI; DOURADO NETO, 2000).

Para cada espécie existe uma faixa de temperatura, na qual ocorrem germinação e emergência, quando o suprimento de umidade for adequado e outros estresses

forem mínimos. Na maioria das espécies a temperatura ótima de germinação, na qual a maior germinação é alcançada em menor tempo, encontra-se entre 15 e 30°C, a máxima varia entre 35 e 40°C, podendo a mínima chegar ao ponto de congelamento (MAYER; POLJAKOFF-MAYBER, 1989).

Com o intuito de minimizar os efeitos de estresses abióticos, como o estresse térmico, e melhorar o desempenho germinativo das sementes sem prejudicar a produção, o uso de doadores de óxido nítrico vem sendo aplicado de forma exógena. Este atua como uma molécula sinalizadora, agindo na superação de condições ambientais estressantes, sendo uma peça-chave na modulação da expressão gênica, interagindo com as espécies reativas de oxigênio e controlando as ações hormonais (SIMONTACCHI et al., 2015; FRACH, 2013).

Contudo os doadores de NO são instáveis, e as taxas de decomposição aumentam conforme a exposição a luz e altas temperaturas. Diante disso, o desenvolvimento de nanocápsulas de doadores de NO apresentaram uma taxa de redução significativa (SEABRA, 2001).

As nanopartículas são capazes de melhorar a estabilidade físico-química dos produtos, além de fornecer uma liberação lenta e gradativa e minimizar perdas por degradação, lixiviação e volatilização (PÉREZ-DE-LUQUE, 2017).

Diante do exposto o presente trabalho objetivou-se avaliar o efeito de doadores de óxido nítrico nanoencapsulado no desempenho germinativo de sementes de milho super doce em diferentes temperaturas.

4.3 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Fitotecnia na Universidade Estadual de Londrina, sendo utilizado um lote de sementes do milho híbrido super doce SV9298SN da Seminis.

O delineamento foi inteiramente casualizado com esquema fatorial 3 x 5 com quatro repetições. Foram testadas três suspensões, sendo essas: doador NO LIVRE, NP NO, NP vazia, sobre as doses 0, 2, 4, 6 e 8 mmol. Os tratamentos foram submetidos ao teste de germinação nas temperaturas de 20°C (subótima), 25°C (ótima) e 30°C (supraótima).

4.3.1 Síntese das Nanopartículas Liberadoras de NO

As soluções com as nanopartículas de quitosana/tripolifosfato de sódio, contendo ácido mercaptosuccínico (disponibilizador de NO nanoencapsulado), bem como as soluções contendo somente ácido mercaptosuccínico (MSA) (disponibilizador livre de NO), foram fornecidas pelo Centro de Ciências Naturais e Humanas (CCNH) pertencente à Universidade Federal do ABC, São Paulo.

As nanopartículas foram preparadas por gelificação ionotrópica (ELGADIR et al., 2015; TRIPATHY et al., 2012). Resumidamente, quitosana (CS) (2.6 mg.ml^{-1}) e ácido mercaptosuccínico (MSA) (2.7 mM) foram misturados através de agitação magnética numa solução aquosa de ácido acético ($0,175 \text{ M}$) durante 90 minutos. A solução aquosa de tripolifosfato de sódio (TPP) foi adicionada gota a gota na suspensão CS/MSA, obedecendo à proporção volumétrica de 3 CS/MSA: 1 TPP. A mistura final foi agitada durante mais 45 minutos à temperatura ambiente, produzindo uma suspensão de nanopartículas (NPs) contendo MSA na concentração final de 1000 mM .

4.3.1.1 Nitrosação do ácido mercaptosuccínico formando ácido S-nitroso-mercaptosuccínico

Os grupos tiol livres de MSA encapsulado (1000 mM) em nanopartículas de quitosana foram nitrosados adicionando quantidades equimolares de nitrito de sódio (NaNO_2) (1000 mM) em meio acidificado ($\text{pH} = 3$), levando à formação de NP CS-MSA-NO. A solução final foi protegida da luz com papel alumínio e levada à geladeira por 1 hora. Da mesma forma, o ácido S-nitroso-mercaptosuccínico (MSA-NO) (não encapsulado) foi preparado através da nitrosação do MSA livre, adicionando uma quantidade equimolar de NaNO_2 . A formação ácido S-nitroso-mercaptosuccínico livre ou encapsulado em nanopartículas foi confirmada pela aparência das bandas de absorção de grupo S-NO características a 336 nm ($\epsilon = 980.0 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) ou a 545 nm ($\epsilon = 18.4 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) usando o espectrofotômetro Uv-vis Agilent 8453.

4.3.2 Tratamento de Sementes

As sementes foram separadas em porções de 40 g para o teste de germinação e 20 g para o teste de comprimento, estas foram colocadas em potes de PVC com tampa e tratadas via embebição de sementes com 5 e $2,5 \text{ ml}$ de solução respectivamente, nas doses 0 (apenas água destilada), 2 , 4 , 6 , 8 e 10 mmol , por um período de seis horas, sendo este agitado a cada trinta minutos.

4.3.3 Desempenho germinativo

Após passado o período do tratamento foi realizado a montagem dos testes.

Teste de germinação: realizado de acordo com a metodologia descrita nas Regras de Análise de Sementes (BRASIL, 2009), nas temperaturas preestabelecidas. As avaliações foram realizadas aos 7 dias após o início do teste, contabilizando as plântulas normais, anormais e sementes não germinadas, com resultados expressos em porcentagem.

Primeira contagem de germinação: conduzido em conjunto com a germinação, sendo realizada a contagem das plântulas normais no quarto dia após a montagem do teste, sendo os resultados expressos em porcentagem.

Comprimento de plântula: utilizando a metodologia proposta por Nakagawa (1999), que consiste em distribuir quatro repetições de 10 sementes, com a extremidade da radícula voltada para baixo, dispostas no terço superior do papel germiteste previamente umedecido na proporção de 2,5 vezes a massa do papel seco, posteriormente estes foram colocados em germinador tipo BOD sendo utilizadas as temperaturas de 20, 25 e 30°C para germinação no escuro, durante 7 dias. Após este período com o auxílio de uma régua milimetrada foram medidas a parte aérea e a raiz primária das plântulas normais, sendo os resultados expressos em cm por plântula.

Massa seca de plântula: realizado em conjunto com o teste de comprimento, as plantas foram separadas em duas porções, parte aérea e radicular, sendo estas levadas a estufa de circulação e secadas a 65°C por 72 horas. Posteriormente a este período foi realizado a pesagem em balança analítica, sendo os resultados expressos em miligrama por plântula.

4.4 RESULTADOS

Temperatura 20°

Com base na análise de variância, foi observado interação significativa apenas para a variável comprimento de plântulas (CPA). Para as variáveis germinação, plântulas anormais, comprimento de raiz e massa seca da parte aérea e raiz houve efeito isolado de doses, sendo que para as duas últimas também foi constatado efeito isolado de tratamento (Tabela 1).

Tabela 1 – Resumo da análise de variância para NPs, dose e interação entre NPs e dose para as variáveis primeira contagem (PC), germinação (G), plântulas anormais (ANOR), sementes mortas (MORT), comprimento de plântulas e de raiz (CPA e CR), massa seca de parte aérea e raiz (MSPA e MSR) para milho doce em resposta a suspensões e doses de doadores de óxido nítrico.

Fonte de variação	G.L.	Quadrado médio							
		PC	G	ANOR	MORT	CPA	CR	MSPA	MSR
NPs	2	0	14,87 ^{ns}	11,4 ^{ns}	0,26 ^{ns}	2,75*	6,05*	29,14**	4,41 ^{ns}
DOSE	4	0	291,2*	282,1*	41,2 ^{ns}	128,74*	184,6*	131,9*	6,9**
NPs x DOSE	8	0	27,03 ^{ns}	24,1 ^{ns}	12,27 ^{ns}	0,79**	0,97 ^{ns}	10,9 ^{ns}	2,30 ^{ns}
Resíduo	45	0	36,8	39,16	19,4	0,28	1,19	8,93	1,93
C.V. (%)			16,34	11,74	43,95	7,62	11,02	19	19,26
Média geral			37,72	52,38	9,89	6,58	10,92	15,66	7,378

Analisando o efeito de dose na variável germinação, não foi possível ajustar um modelo de regressão que explique o comportamento dos dados (Figura 1A). Em contrapartida, para as plântulas anormais, os dados se ajustaram ao modelo quadrático, com máxima resposta na dose estimada de 5,56 mmol, com 56% de plântulas anormais (Figura 1B). Para as variáveis comprimento de raiz e massa seca de parte aérea, foi observado que a NP NO apresentou respostas inferiores em relação aos demais tratamentos, não diferindo, entretanto, do DNO LIVRE para a MSPA (Tabela 2).

Figura 1 - Germinação (A) e plântulas anormais (B) em relação a doses.

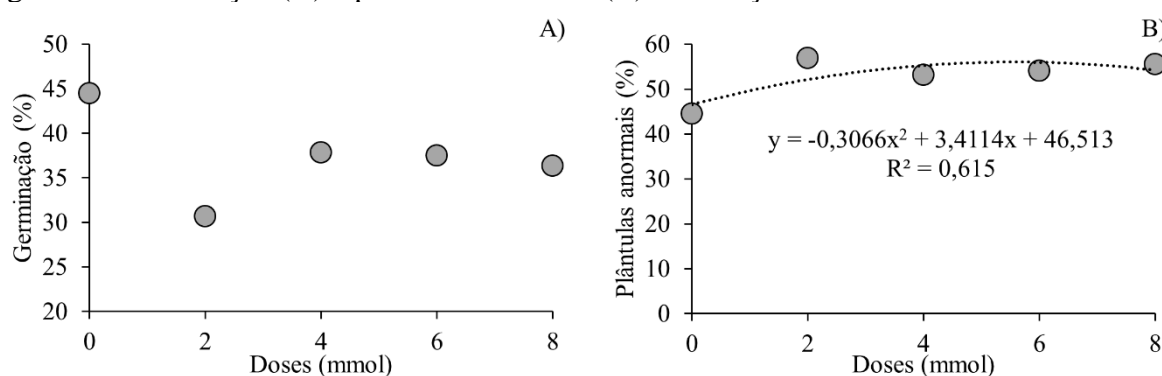


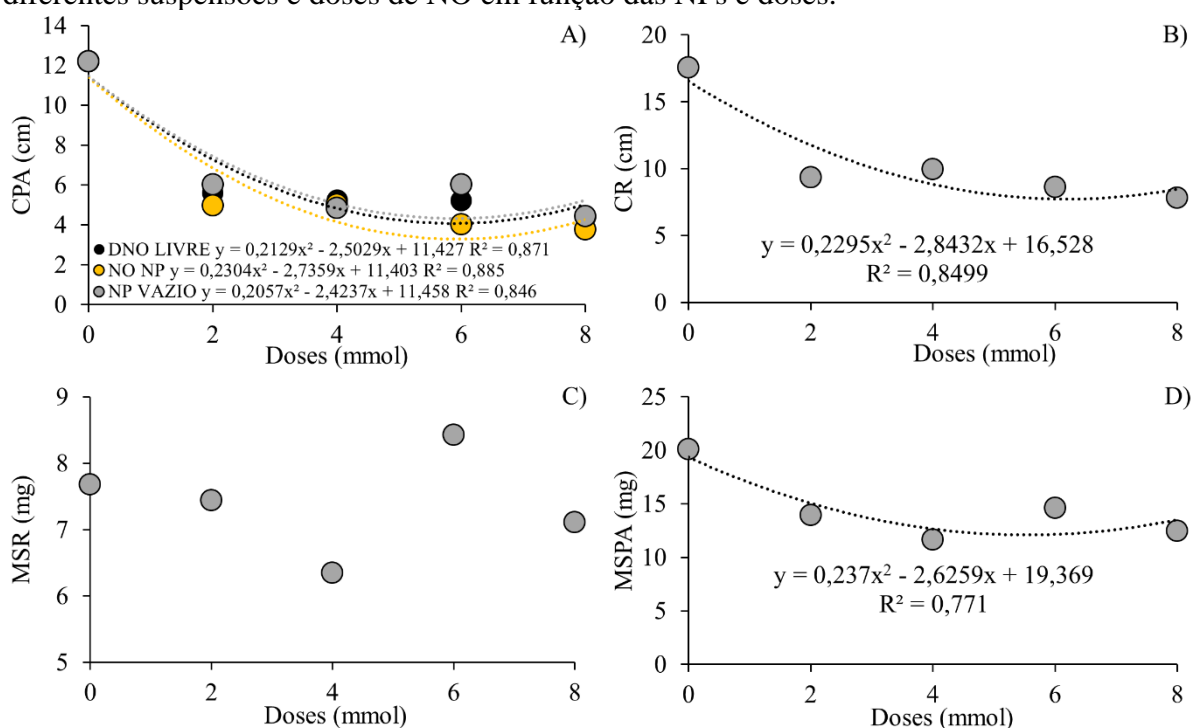
Tabela 2 – Médias das variáveis comprimento de raiz e massa seca de parte aérea.

NPs	CR	MSPA
DNO LIVRE	10,92 a	14,8 ab
NP NO	10,04 b	13,26 b
NP VAZIA	11,05 a	15,67 a

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância.

No desdobramento da interação entre os tratamentos com as doses para a variável CPA (Figura 2) foi possível ajustar modelos de regressão quadráticos, com mínima resposta na dose estimada de 5,88, 5,94 e 5,89, para os tratamentos doador NO LIVRE, NP NO, NP vazia, respectivamente, e resposta de 4,07, 2,67 e 4,32 cm. Na variável CR (figura 2B), houve apenas efeito de doses com ajuste quadrático, com menor resposta na dose de 6,19 e resposta de 7,72 cm. O mesmo ocorreu para a variável MSPA (figura 2D), que obteve menor valor na dose estimada de 5,54, com resposta de 12,1 mg.

Figura 2 - Comprimento da parte aérea (A), comprimento da raiz (B), massa seca da raiz (C) e massa seca da parte aérea (D) de plântulas de milho em resposta ao tratamento de sementes com diferentes suspensões e doses de NO em função das NPs e doses.



Temperatura 25°

Com base na análise de variância, foi observado interação significativa entre os fatores avaliados apenas para a variável comprimento de parte aérea (CPA). Para as variáveis primeira contagem, germinação, sementes mortas, comprimento de raiz e massa seca da parte aérea foi observado efeito isolado de doses, sendo que para a primeira contagem e sementes mortas, também foi observado efeito isolado das NPs (Tabela 3).

Tabela 3: Resumo da análise de variância para NPs, dose e interação entre NPs e dose para as variáveis primeira contagem (PC), germinação (G), plântulas anormais (ANOR), sementes mortas (MORT), comprimento de plântulas e de raiz (CPA e CR), massa seca de parte aérea e raiz (MSPA e MSR) para milho doce em resposta a suspensões e doses de doadores de óxido nítrico.

Fonte de variação	G.L	Quadrado médio							
		PC	G	ANOR	MORT	CPA	CR	MSPA	MSR
NPs	2	184,5*	102,2 ^{ns}	198,9 ^{ns}	68,9**	1,40*	0,09 ^{ns}	3,06 ^{ns}	3,3 ^{ns}
DOSE	4	266,3*	297,6**	124,6 ^{ns}	77,9*	2,7*	50,1*	15,5**	7,3 ^{ns}
NPs x DOSE	8	36,71 ^{ns}	109,1 ^{ns}	58,6 ^{ns}	37,03 ^{ns}	0,64*	5,9 ^{ns}	20,2 ^{ns}	1,31 ^{ns}
Resíduo	45	25,9	96,8	98,6	22,2	0,18	3,9	17,9	3,9
C.V. (%)		20,58	14,97	44,41	39,46	3,59	11,09	16,33	26,32
Média geral		24,77	65,7	22,37	11,93	11,71	17,89	25,89	7,46

Para as variáveis primeira contagem e sementes mortas, foi observado que a DNO LIVRE resultou em menores valores de plântulas normais em relação as demais suspensões, não diferindo, entretanto, do NP NO para a MORT (Tabela 3).

Tabela 4 – Médias das variáveis primeira contagem, plântulas anormais e sementes mortas em relação as NPs.

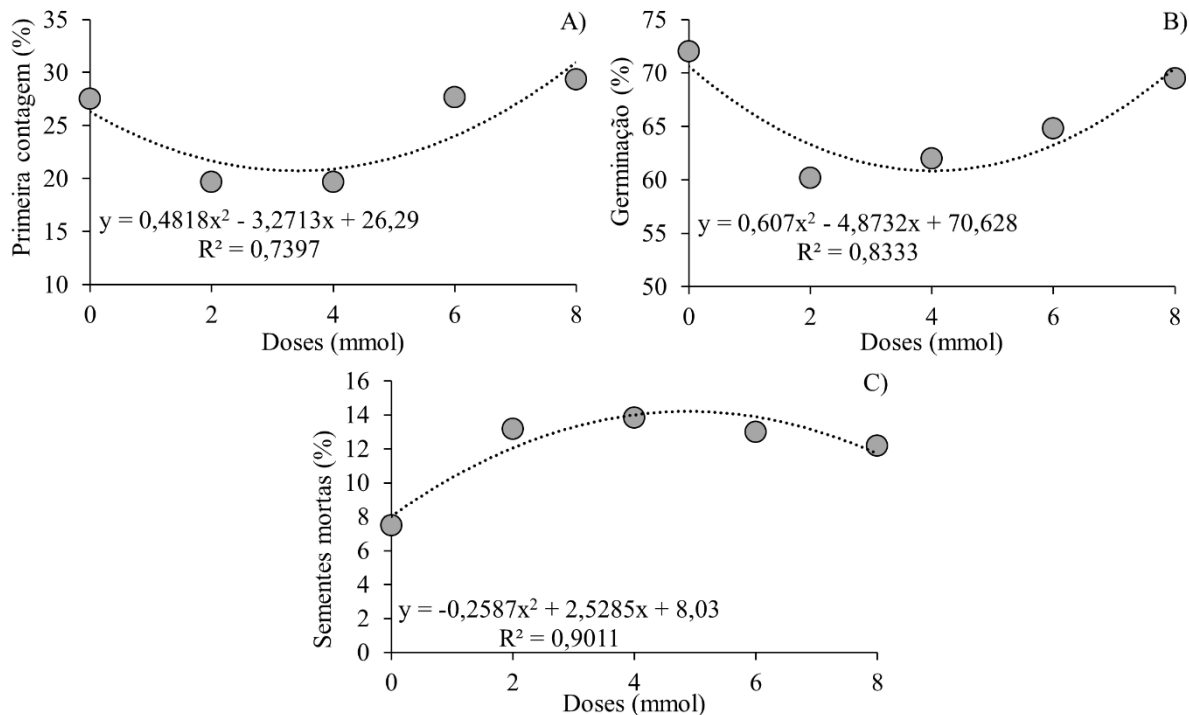
NPs	PC	MORT
DNO LIVRE	21,40 b	10 b
NP NO	25,60 a	12 ab
NP VAZIA	27,30 a	14 a

*Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Na variável PC (Figura 3A), houve ajuste quadrático, com aumento das plântulas germinadas após a dose de 3,39 mmol com reposta de 20,73%. Para a variável germinação (Figura 3B), os dados foram ajustados para o modelo quadrático, com redução na germinação até a dose estimada de 4,01 mmol, com 60,85% de germinação e posteriormente acréscimo. Ao se analisar as sementes mortas (Figura 3C), nota-se também um ajuste quadrático

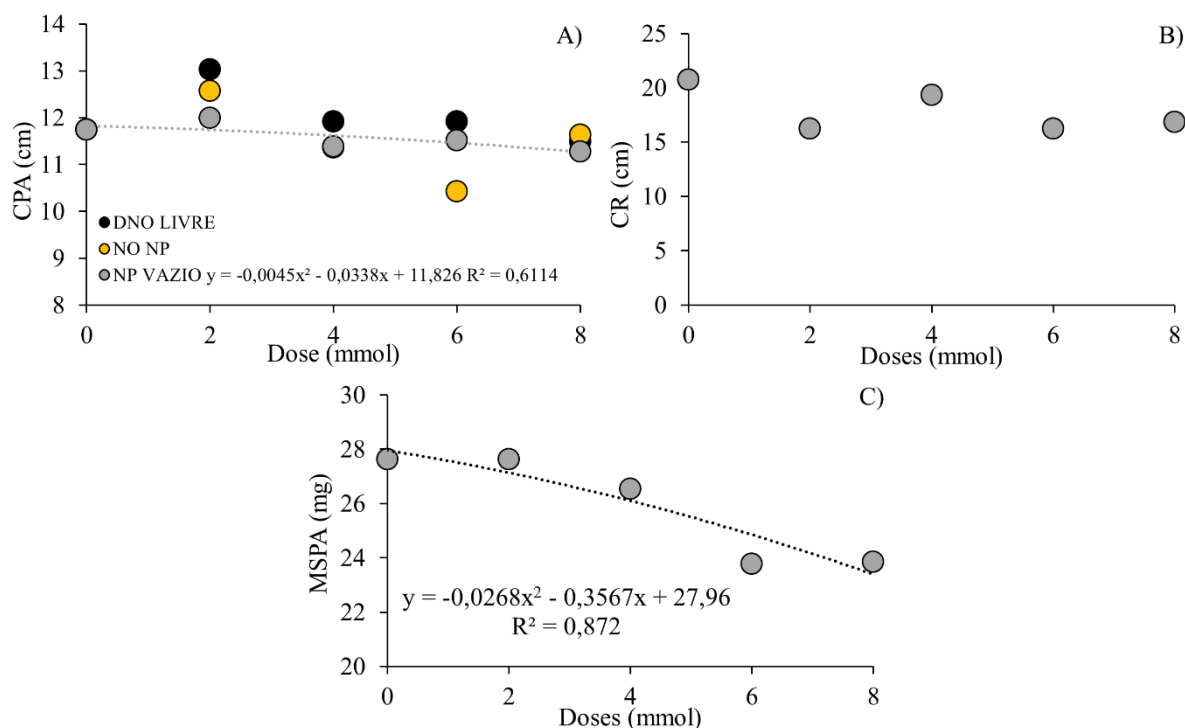
com acréscimo conforme ocorre o aumento da dose, sendo a máxima obtida na dose 4,89 mmol, com resposta de 14,21%.

Figura 3 - Primeira contagem, germinação e sementes mortas (%) em função de doses.



Quando observado o efeito de dose na variável comprimento de raiz, não foi possível ajustar um modelo de regressão que explique o comportamento dos dados (Figura 4B). Ao analisar as variáveis CPA para NP VAZIO houve decréscimo com o aumento das doses; para as demais suspensões foi não significativo. Para a variável MSPA, nota se que ocorre um decréscimo com o aumento das doses.

Figura 4 - Comprimento de parte aérea, comprimento de raiz e massa seca da parte aérea em função de diferentes NPs e doses.



Temperatura 30°

Com base na análise de variância, foi observado interação significativa entre os fatores apenas para as variáveis, primeira contagem (PC), massa seca de parte aérea e raiz (MSPA e MSR). Para as variáveis, CPA e CR foi observado efeito isolado de doses, sendo que para as plântulas anormais e sementes mortas, também foi observado efeito isolado das NPs (Tabela 5).

Tabela 5 – Resumo da análise de variância para NPs, dose e interação entre NPs e dose para as variáveis primeira contagem (PC), germinação (G), plântulas anormais (ANOR), sementes mortas (MORT), comprimento de plântulas e de raiz (CPA e CR), massa seca de parte aérea e raiz (MSPA e MSR) para milho doce em resposta a suspensões e doses de doadores de óxido nítrico.

Fonte de variação	G.L.	Quadrado médio							
		PC	G	ANOR	MORT	CPA	CR	MSPA	MSR
NPs	2	256,2**	245 ^{ns}	305**	60*	4,64 ^{ns}	0,47 ^{ns}	62,23 ^{ns}	35,34**
DOSE	4	344,1*	131,5 ^{ns}	63,57 ^{ns}	24,57 ^{ns}	13,26*	78,31*	76,47 ^{ns}	21,024*
NPs x DOSE	8	154,9**	68,25 ^{ns}	87,17 ^{ns}	15,92 ^{ns}	2,19 ^{ns}	0,93 ^{ns}	123,79*	3,71*
Resíduo	59	65,1	94,8	91,67	15,76	1,97	3,57	35,4	9,54
C.V. (%)		23,67	20,72	21,61	45,62	12,89	7,43	21,94	22,48
Média geral		34,1	47	44,3	8,7	10,9	25,4	27,11	13,74

Ao analisar a variável plântulas anormais, foi observado que a DNO LIVRE apresentou respostas inferiores em relação aos demais tratamentos, já para o comprimento da parte aérea o DNO LIVRE apresentou respostas inferiores, contudo não diferindo do NP NO (Tabela 6).

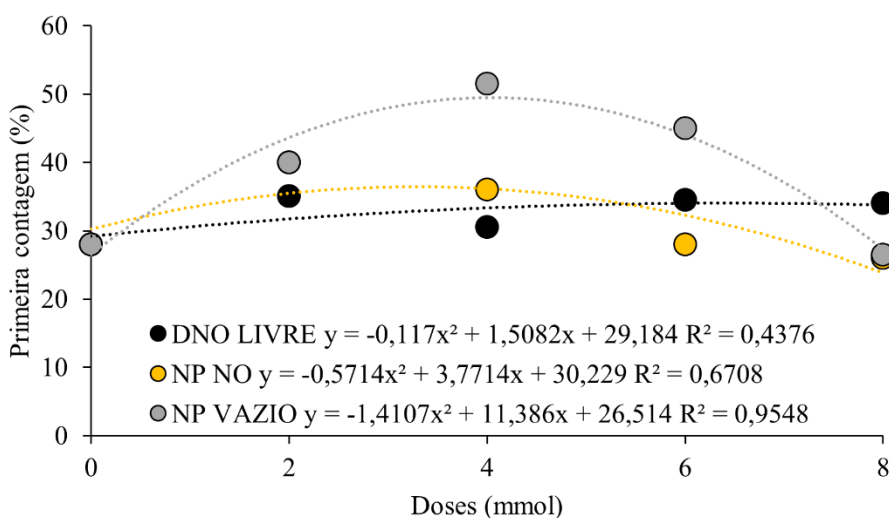
Tabela 6: Médias das variáveis comprimento de parte aérea em relação as NPs.

NPs	ANORM	CPA
DNO LIVRE	21,40 b	10 b
NP NO	25,60 a	12 ab
NP VAZIA	27,30 a	14 a

*Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Quando analisada a primeira contagem (Figura 5), no desdobramento da interação entre os fatores foi possível ajustar modelos de regressão quadráticos, sendo que a máxima resposta foi obtida na dose estimada de 6,45, 6,60 e 4,04 mmol, para os tratamentos DNO LIVRE, NP NO, NP vazia, respectivamente, e resposta de 34,04, 30,23 e 49,49 %.

Figura 5: Primeira contagem de germinação em função de diferentes tratamentos e doses.

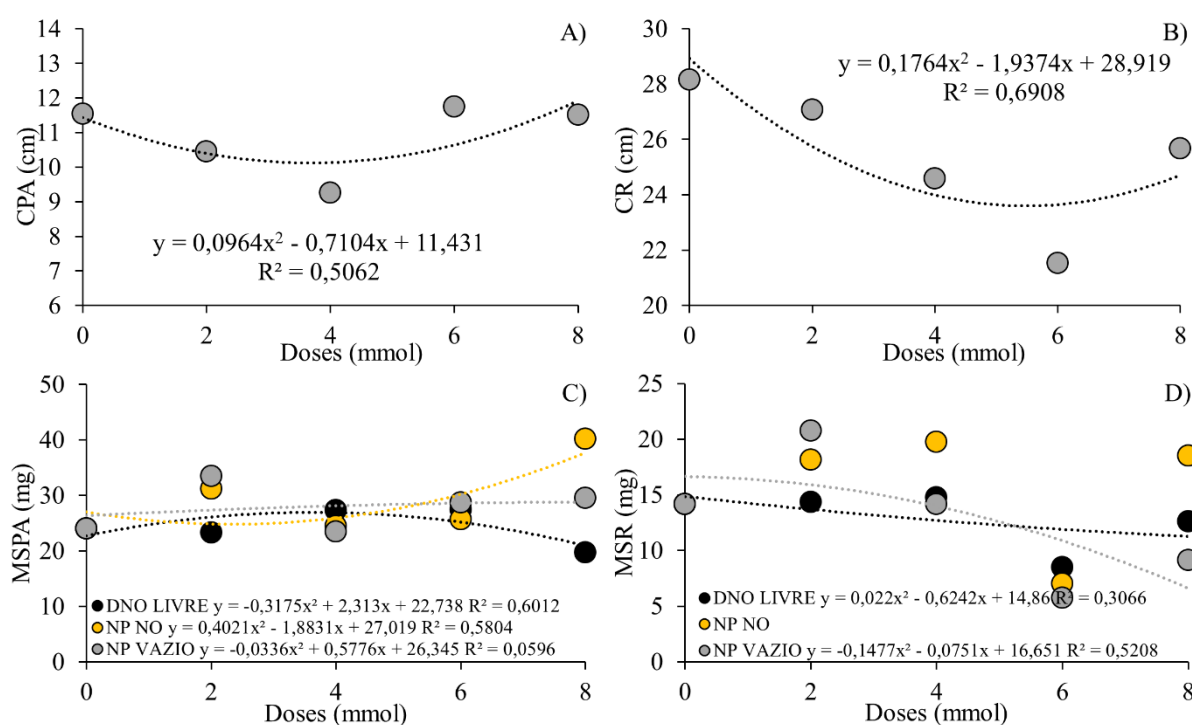


Nas variáveis comprimento de parte aérea e raiz (Figura 6A e B) obteve se ajuste quadrático, apresentando redução conforme ocorre um aumento das doses.

Ao analisar a massa seca da parte aérea (figura 6C), nota-se que houve interação significativa, onde os pontos de máxima foram de 3,64 e 8,59 mmol, para os tratamentos com DNO LIVRE e NP vazia, com resposta de 26,95 e 28,83 mg respectivamente. Já para o tratamento com NP NO, foi observado aumento após a dose estimada de 2,34 com resposta de 24,81 mg.

Para a variável massa seca de raiz nota-se que houve redução conforme o aumento das doses, exceto para o tratamento com NP NO, que não apresentou ajuste significativo. Para o NP vazio foi possível estimar uma dose de máxima resposta, com 0,25 mmol e resposta de 16,66 mg, com redução após essa dose.

Figura 6: Comprimento de parte aérea (A), comprimento de raiz (B), massa seca de parte aérea (C) e massa seca de raiz (D) em função de diferentes NPs e doses.



4.5 DISCUSSÃO

Ao analisar a velocidade de germinação por meio da variável primeira contagem nota-se que quando submetidas a temperatura subótima o NO não apresenta um efeito positivo assim como é relatado por Besson-Bard (2008).

Os mecanismos pelos quais o NO estimula a germinação ainda não foram totalmente esclarecidos, no entanto, alguns estudos confirmam um efeito protetor que auxilia na maior germinação das sementes devido à sinalização que atua nas interações com alvos celulares por meio de redox (ÁVILA et al., 2007; SILVA et al., 2019)

Os efeitos no desempenho germinativo por meio do NO em plantas submetidas a estresse abiótico, como o estresse térmico, são induzidos por meio de baixas concentrações desta molécula, pois quando ocorre um aumento nas doses, estes acabam exercendo efeito fito

tóxico, causando um estresse nitroso, levando a morte celular, sendo assim esta molécula possui duplo efeito, podendo auxiliar na proteção e desenvolvimento das plântulas, mas de acordo com sua concentração pode acabar se tornando letal (SANTISREE et al., 2013).

Correa-Aragunde e colaboradores (2008) verificaram que o óxido nítrico afeta o crescimento de raízes de tomate de forma dose-dependente, sendo que as baixas concentrações, estimulam o crescimento das raízes, enquanto as altas concentrações têm um efeito inibitório sobre o crescimento.

Utilizando nanopartículas doadoras de NO, Oliveira e colaboradores (2016), notaram que estes foram mais eficientes que os doadores de NO livre, para proteção de plantas de milho contra efeitos causados pelo estresse salino, resultando em maiores taxas do crescimento, diferente do observado neste trabalho quando submetido a estresse pelo frio. Essas inferências também podem ser ampliadas: interação com a espécie estudada, com outros tipos de estresses, com adequação de formulações, de formas de aplicação nas sementes. Dessa forma, novos estudos devem ser feitos com o intuito de elucidar os efeitos que o NO, tanto livre como protegido pelas nanocápsulas, atuam no desenvolvimento de plântulas sob condições adversas.

4.6 CONCLUSÃO

A aplicação de óxido livre ou nanoencapsulado, nas doses avaliadas, não favorece o processo germinativo de sementes de milho super doce tanto em temperatura ótima quanto em sub ou supraótima.

REFERÊNCIAS

AOSA – ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSTS. **Seed Vigor Testing Handbook**. Lincoln, p. 105, 2009.

- ABRAHAM, P. M.; BARNIKOL, S.; BAUMANN, T.; KUEHN, M.; IVLEVA, N. P.; SCHAUMANN, G. E. Sorption of silver nanoparticles to environmental and model surfaces. **Environmental Science & Technology**, v.47, n.10, p.5083–5091, 2013.
- ARAGÃO, C.A. **Avaliação de híbridos simples branquíticos de milho super doce (*Zea mays* L.) portadores do gene *shrunken-2* (*sh2sh2*) utilizando o esquema dialético parcial**. 101 f. Tese (Doutorado) Faculdade de Ciências Agronomicas, Universidade Estadual Paulista” Julio de Mesquita Filho”, Botucatu. 2002.
- ARAGÃO, C. A.; DANTAS, B. F.; ALVES, E.; CATANEO, A. C.; CAVARIANI, C.; NAKAGAWA, J. Atividade amilolítica e qualidade fisiológica de sementes armazenadas de milho super doce tratadas com ácido giberélico. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 25, n. 1, p. 43-48, 2003.
- ARAUJO, E. F; ARAUJO, R. F; SOFIATTI, V; SILVA, R. F . Qualidade fisiológica de sementes de milho doce colhidas em diferentes épocas. **Bragantia** v.65 n.4, 687-692, 2006.
- AZEVEDO, V., Chaves, S. A., Bezerra, D. C., Lia Fook, M. V., Costa, A. C. F. M. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista eletrônica de Materiais e processos**, v. 2, n. 3, p. 27-34, 2007
- BOURSIER, P.; LAUCHLI, A. GROWTH. Responses and mineral nutrient relations of salt-stressed sorghum. **Crop Science**, Madison. v.30, p.1226-1233, 1990.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para Análise de Sementes**. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, p. 364, 2009.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n° 45/2013, de 17 de setembro de 2013, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Padrões para produção e comercialização de sementes). Brasília, DF: SNAD/DND/CLAV: Diário oficial da União, Brasília, DF, 17 set. 2013.
- BRITO, M. E.B.; ARAUJO FILHO, G. D.; WANDERLEY, J. A. C.; MELO, A. S.; COSTA, F. B.; FERREIRA, M. G.P. Crescimento, fisiológico e produção de milho doce sob estresse hídrico. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v,29, n.5, 1244-1254, 2013.
- CARMO M. A. P., de Carvalho, M. L. M., dos Santos, H. O., Rocha, D. K., Oliveira, J. A., dos Santos Guaraldo, M. M., & Mesquita, C. A. M.. Bioestimulantes aplicados em sementes e plantas de milho doces sob condições de estresse abiótico. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 3, p. 31727-31741, 2021.
- CARVALHO, L.S. **Levantamento e controle biológico de *Pratylenchus brachyurus* na Cultura do milho doce** – Morrinhos, GO: IF, Goiano, 2018.
- CÍCERO, S.M.; VIEIRA, R.D. Teste de frio. In: VIEIRA, R.D.; CARVALHO, N.M. **Teste de vigor em sementes**. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, p. 151-164,1994.
- COIMBRA, R. D. A.; MARTINS, C. C.; TOMAZ, C. D. A.; NAKAGAWA, J. Testes de vigor utilizados na avaliação da qualidade fisiológica de lotes de sementes de milho-doce (*sh2*). **Ciência Rural**, v. 39, p. 2402-2408, 2009.

- CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. 2016 Projeções do agronegócio – Brasil 2015/2016 a 2025/2026. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, julho 2016.
- COPELAND, L.O.; MCDONALD, M.B. **Principles of seed science and technology**. 3. Ed. New York: Chapman e Hall. 409p., 1995.
- COLEBROOK, E.H.; THOMAS, S.G.; PHILLIPS, A.L.; HEDDEN, P. The role of gibberellin signalling in plant responses to abiotic stress. **J. Exp. Biol.** 217, p.67–75, 2014.
- DIAS, M.C.L.L.; BARROS, A.S.R. **Avaliação da qualidade de sementes de milho**. Londrina: IAPAR, 43p., 1995.
- DURBAK, A.; YAO, H.; MCSTEEN, P. Hormone signaling in plant development. **Current Opinion in Plant Biology**, v.15, n. 1, p.92–96, 2012.
- ELGADIR M.A.; UDDIN M.S.; FERDOSH S.; ADAM A.; CHOWDHURY A. J. K.; SARKER M. Z.I Impact of chitosan composites and chitosan nanoparticle composites on various drug delivery systems: a review. **J Food Drug Anal.** v. 23, n. 4, p. 619–629. 2015.
- EZHILARASI, P. N.; KARTHIK, P.; CHHANWAL, N.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Nanoencapsulation Techniques for Food Bioactive Components: A Review. **Food and Bioprocess Technology**, v.6, n.3, p.628–647, 2012.
- FOUKARAKI, S. G.; COOLS, K.; TERRY, L. A. Differential effect of ethylene 107 supplementation and inhibition on abscisic acid metabolism of potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers during storage. **Postharvest Biology and Technology**, 112, p.87–94, 2016.
- FRACETO, L. F. *et al.* Nanotechnology in agriculture: which innovation potential does it have? **Front. Environ. Sci.** 2016.
- FRANÇA-NETO, J.B.; KRZYŻANOWSKI, F.C.; HENNING, A.A. **A importância do uso de sementes de soja de alta qualidade**. Informativo Abtrates. V.20, n. 1,2 p.0,37-0,37, 2010.
- FRANCO, A.A.N.; VIDIGAL-FILHO, P.S.; SACAPIM, C.A.; MARQUES, O.J.; NUMOTO A.Y.; ORTIZ, A.H.T. Época de semeadura de milho doce na safrinha paranaense. XIII Seminário Nacional de Milho Safrinha. **Associação Brasileira de Milho e Sorgo**. Resumo expandido. Maringá, PR, 2015.
- GARCIA, S.H; ROZZETO, D.S; COIMBRA, J.L.M; GUIDOLIN, A.F. Simulação de estresse hídrico em feijão pela diminuição do potencial osmótico. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages-MG, v. 11, n.1, p. 35-41, 2012.
- GÖKDERE, M.; ATEŞ, S. EXTRACTIVE FERMENTATION OF GIBBERELIC ACID WITH FREE AND IMMOBILIZED *Gibberella fujikuroi*. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v.44 n.1, p.80–89, 2014.
- GUISCHEM, J.M.; NAKAGAWA, J.; ZUCARELI, C. Qualidade fisiológica de sementes de milho doce BR 400 (bt) em função do teor de água na colheita e da temperatura de secagem. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v.23, n. 1, p. 247, 2001.

- HADAS, A. Seed-soil contact germination. In: KHAN, A.A.(Ed). **The physiology and biochemistry of seed development, dormancy and germination**. Amsterdam: Elsevier, p.502-527, 1982.
- HAMAYUN, M.; KHAN, S. A.; IQBAL, I.; AHMAD, B.; LEE, I.-J. Isolation of a gibberellin-producing fungus (*Penicillium* sp. MH7) and growth promotion of Crown daisy (*Chrysanthemum coronarium*). **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.20, n.1, 202–207, 2010.
- HAMPTON, J.G.; TEKRONY, D.M. Controlled deterioration test. In: HAMPTON AND TEKRONY (ed). **Handbook of vigour test methods Zurich**: ISTA.1995. p.70-78.
- HEDDEN, P.; SPONSEL, V. A Century of Gibberellin Research. **Journal of Plant Growth Regulation**, 34(4), 740–760, 2015
- HENDRY, G.A.F. Oxygen, free radical processes and seed longevity. **Seed Science Research**. v.3, p.141-153, 1993
- HUSSAIN, S.; KHAN, F.; HUSSAIN, H. A.; NIE, L. Physiological and Biochemical Mechanisms of Seed Priming-Induced Chilling Tolerance in Rice Cultivars. **Frontiers in plant science** v.7, p. 116, 2016.
- JIMÉNEZ-ARIAS D.; MORALES-SIERRA S.; BORGES A.A.; DÍAZ D. Biostimulant Nanoencapsulation: The New Keystone To Fight Hunger. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. V.68, n.27, p.7083-7085, 2020.
- JOHRI, M. M.; MITRA, D. Action of plant hormones. **Current Science**, v. 80, n. 2, p. 199–205, 2001.
- KUROZAWA, C. Glossário. **Globo Rural**, disponível em <http://globoruralteve.globo.com/GRural/>, acesso em: 20/07/2020.
- KWIATKOWSKI, A.; CLEMENTE, E. característica do milho doce (zea mays) para industrialização. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, Ponta Grossa, v. 1, n.2, p. 93-103, 2007.
- KHOT, L. R., SANKARAN, S., MAJA, J. M., EHSANI, R.; SCHUSTER, E. W. Applications of nanomaterials in agricultural production and crop protection: A review. **Crop Protection**, v.35, p. 64–70, 2012.
- LARCHER, W. *Ecofisiologia vegetal*. São Paulo: Rima Artes e Textos, 2000. 531 p.
- LIU, Y.; SUN, Y.; HE, S.; ZHU, Y.; AO, M.; LI, J.; CAO, Y. Synthesis and characterization of gibberellin–chitosan conjugate for controlled-release applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.57, p. 213–217, 2013.
- LUZ, J. M. Q.; CAMILO, J. S.; BARBIERI, V. H. B.; RANGEL, R. M.; OLIVEIRA, R. C. Produtividade de genótipos de milho doce e milho verde em intervalos de colheita. **Revista Ceres**, v. 62, n. 1, p. 1–8, 2015.
- MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de Sementes de Plantas Cultivadas**. 2. ed. Londrina, PR: ABRATES, 660p., 2015.

- MARCOS FILHO, J. Germinação de Sementes. In CÍCERO S.M.; MARCOS FILHO, J.; SILVA, W.R. (Ed). **Atualização em Produção de Sementes**. Campinas, Fundação Cargill, p.11-39, 1986.
- MARTA, B., SZAFRANSKA, K.; POSMYK, M. M Exogenous Melatonin Improves Antioxidant Defense in Cucumber Seeds (*Cucumis sativus* L.) Germinated under Chilling. **Estresse. Frontiers in plant science** 7. 2016.
- MARINHO, J. L. **Adequação da metodologia do teste de deterioração controlada para avaliação do potencial fisiológico de sementes de milho doce**. 2018. 83 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil. 2018.
- MARINHO, J. L.; DE SOUZA SARTORI, A. V.; RODRIGUES, E. J.; BAZZO, J. H. B.; FERREIRA, A. S.; ZUCARELI, C. Pre-soaking with gibberellin in sweet corn seed lots with different levels of vigor. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 42, n. 2, p. 539-552. 2021.
- MARENCO, R.A.; LOPES, N.F. Fisiologia Vegetal: Fotossíntese, respiração, relações hídricas e nutrição mineral. Viçosa Editora UFV, 2005. 451p.
- MIRANSARI, M.; SMITH, D. L. Plant hormones and seed germination. **Environmental and Experimental Botany**, v.99, p.110–121, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2013.11.005>
- MAGUIRE, J.D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v.2, n.2, p. 176-177, 1962.
- MONDO, V. H. V.; CICERO, S. M.; DOURADO, D.; NETO, PUPIM, T. L.; DIAS, M. A. N. Vigor de sementes e desempenho de plantas de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 34, n. 1, p. 143-155, 2012.
- NAIR, R., VARGHESE, S. H., NAIR, B. G., MAEKAWA, T., YOSHIDA, Y.; KUMAR, D. S. Nanoparticulate material delivery to plants. **Plant Science**, v. 179, n. 3, p.154–163, 2010.
- NASCIMENTO, C.W.A.; BARROS, D.A.S.; MELO, E.E.C.; OLIVEIRA, A.B. Alterações químicas em solos e crescimento de milho e feijoeiro após aplicação de lodo de esgoto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.28, p.385-392, 2004.
- NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados no desempenho de plântulas. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, P.2. 1-2.24, 1999.
- PEDROTTI, A.; HOLANDA, F.S.R.; MANN, E.N.; AGUIAR NETTO, A.O.; BARRETO, M.C.V.; VIEGAS, P.R.A. Parâmetros de produção do milho-doce em sistemas de cultivo e sucessão de culturas no Tabuleiro Costeiro Sergipano. In: SEMINÁRIO DE PESQUISA FAP-SE, Sergipe. **Anais...** Sergipe: FAP, 2003.
- PEREIRA B.L.C, BORGES E.E.L, OLIVEIRA A.C, LEITE H.G E GONÇALVES J.F.C .Influência do óxido nítrico na germinação de sementes de *Plathymenia reticulata* Benth com baixo vigor. **Scientia Forestalis**, v. 38, p. 629-636, 2010.

- PEREIRA, A. F.; MELO, P. G. S.; ASSUNÇÃO, A.; BUENO, L. G. Qualidade fisiológica de sementes e desempenho agrônômico de genótipos de milho doce. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.38, n.4, p.249-261, 2008.
- PEREIRA A.E.S. **Development and evaluation of nanocarriers systems for the plant growth regulator gibberellic acid**. Campinas, SP. 2017.
- PEREIRA FILHO, I.A. e TEIXEIRA, F.F. **O Cultivo do Milho-Doce**. Brasília, DF: Embrapa. 298p. 2016.
- PÉREZ-DE-LUQUE, A. (2017). Interaction of nanomaterials with plants: what do we need for real applications in agriculture? *Front. Environ. Sci.* v. 5 n.12.
- POWELL, A.A. The controlled deterioration test. In: van de VENTER, H.A. (Ed.) **Seed vigour testing seminar**. Copenhagen: ISTA, 1995. p.73-87.
- RADEMACHER, W. Plant Growth Regulators: Backgrounds and Uses in Plant Production. **Journal of Plant Growth Regulation**, v.34, n.4, p. 845–872, 2015.
- RODRIGUES, J. D., FIOREZE, S. L. Reguladores são, para muitos cultivos, indispensáveis ao alcance de bons níveis. **Visão Agrícola**, v. 13, p. 35-39, 2015.
- SILVA, N. Melhoramento de milho doce. In: **Encontro Sobre Temas de Genética e Melhoramento**. Piracicaba. Anais.... ESALQ, 1994. V11. p. 45-49, 1994.
- SEMINIS. **Cultive Milho Doce Performance** ®.
- SEABRA, A. B. Nitric oxide-releasing nanomaterials and skin care. In: BECK R.; POHLMANN A.; GUTERRES S.; Adriana (Eds.) **Nanocosmetics and Nanomedicines**, Heidelberg, 2001, p. 253–268.
- SEABRA, A. B.; DURÁN, N. Nitric oxide releasing vehicles for biomedical applications. **Journal of Materials Chemistry**, v. 20, n.13, p.1624-1637, 2010.
- SOUZA, R.S.; VIDIGAL FILHO, P.S.; SCAPIM, C.A.; MARQUES, O.J.; QUEIROZ, D.C.; OKUMURA, R.S.; RECHE, D.L.; CORTINOVE, R.S. Produtividade e qualidade do milho doce em diferentes populações de plantas, **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.34, n.3, p. 995-1010, 2013.
- SBRUSSI, C.A.G. e ZUCARELI, C. Germinação de sementes de milho com diferentes níveis de vigor em resposta á diferentes temperaturas. **Semina: Ciências Agrarias**, Londrina, v.35, n.1, p. 215-226, 2014.
- SHABALA, S.; WHITE, R. G.; DJORDJEVIC, M. A.; RUAN, Y.-L.; MATHESIUS, U. Root-to-shoot signalling: integration of diverse molecules, pathways and functions. **Functional Plant Biology**, v. 43, n. 2, p. 87–104, 2016.
- SHAIK, M. R.; KORSAPATI, M.; PANATI, D. Polymers in controlled drug delivery systems. **International Journal of Pharma Sciences**, v. 2, n. 4, p. 112–116, 2012
- SHARON, Madhuri; CHOUDHARY, Ajoy Kr; KUMAR, Rohit. Nanotechnology in agricultural diseases and food safety. **Journal of Phytoogy**, v. 2, n. 4, 2010.

STORK, L.; LOVATO, C. Milho doce. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.21, n.2, p.283-292, 1991.

SUNG, JM. Lipid peroxidation and peroxide-scavenging in soybean seeds during aging. **Physiologia Plantarum**. v. 97, p. 85-89, 1996

TEIXEIRA, F. F.; PAES, M. C. D.; GAMA, E. E. G.; PEREIRA FILHO, I. A.; MIRANDA, R. A.; GUIMARÃES, P. E. O.; PARENTONI, S. N.; COTTA, L. V.; MEIRELLES, W. F.; PACHECO, C. A. P.; GUIMARÃES, L. J. M.; SILVA, A. R.; MACHADO, J. R. A. BRS Vivi: single-cross super sweet corn hybrid. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 14, n. 2, p. 124-127, 2014.

TEIXEIRA, F. F.; MIRANDA, R. A.; PAES, M.C.D.; SOUZA, S.M.; GAMA E.E.G. **Melhoramento do milho doce**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 32p. 2013

TING, Y.; JIANG, Y.; HO, C.-T.; HUANG, Q. Common delivery systems for enhancing in vivo bioavailability and biological efficacy of nutraceuticals. **Journal of Functional Foods**, v. 7, p. 112–128, 2014.

TRIPATHY S; DAS S; CHAKRABORTY S. P.; SAHU S.K.; PRAMANIK P; ROY S. Synthesis, characterization of chitosantripolyphosphate conjugated chloroquine nanoparticle and its in vivo anti-malarial efficacy against rodent parasite: a dose and duration dependent approach. **Int J Pharm**. v. 434, p.292–305, 2012.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). Grain: World Markets and Trade. Foreign Agricultural Service/USDA - **Office of Global Analysis**. October. p. 1-56. 2016.

VIEIRA, R. D.; KRZYŻANOWSKI, F. C. Teste de condutividade elétrica. In: KRZYŻANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: Abrates, 1999. cap. 4, p. 1-26.

VILLELA, F. A. et al. Tabela de potencial osmótico em função da concentração de polietileno glicol 6.000 e da temperatura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília**, v. 26, n. 11/12, p. 1957-1968, nov./dez. 1991.

VILLA B.; SANTOS R. F.; SECCO D.; ZANÃO JÚNIOR L. A.; TOKURA L. K.; PRIOR M.; REIS L. S.; SILVA D. R. **Efeito da salinidade no desenvolvimento inicial do milho**. Acta Iguazu, Cascavel, v.8, n.3, p. 42-47, 2019.

WATERS, L.; BLANCHETTE, B. Prediction of sweet corn field emergence by conductivity and cold teste. **Journal of American Society Horticulturascience**, v. 108, n.5, p. 78-781, 1983.

ZANG, Y.X.; CHUN, I.J.; ZHANG, L.L.; HONG, S.B.; ZHENG, W.-W.; XU, K. Effect of gibberellic acid application on plant growth attributes, return bloom, and fruit quality of rabbiteye blueberry. **Scientia Horticulturae**, v.200, p.13–18, 2016.

ZÁRATE, N.A.H.; VIEIRA, M.C.; SOUSA, T.M.; RAMOS, D.D. Produção e renda líquida de milho verde em função da época de amontoa. **Semina: Ciências Agrárias, Londrina**, v.30, n.1, p.95-100, 2009.

ZUCARELI, C. Teste de deterioração controlada para avaliação do vigor de sementes de milho (*Zea mays* L.). 2002. 111f. Dissertação (Mestrado em Agronomia)- Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho" Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2002.

ZUCARELI, C.; BRZEZINSKI, C. R.; GUISTEM, J. M.; HENNING, F. A.; NAKAGAWA, J. Qualidade fisiológica de sementes de milho doce classificadas pela espessura e largura. **Pesquisa Agropecuaria Tropical**, v.44, n.1, p.71-78, 2014

ZHU, Z.J.; WANG, H.; YAN, B.; ZHENG, H.; JIANG, Y.; MIRANDA, O. R.; VACHET, R. W. Effect of surface charge on the uptake and distribution of gold nanoparticles in four plant species. **Environmental Science & Technology**, v.46, n.22, p.12391–12398, 2012.