**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

Tratamento de sementes de milho com zinco: avaliações do potencial fisiológico das sementes, do rendimento e do valor nutricional dos grãos

Marcella Nunes de Freitas

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em Ciências. Área de concentração: Fitotecnia

**Piracicaba
2016**

Marcella Nunes de Freitas
Engenheira agrônoma

Tratamento de sementes de milho com zinco: avaliações do potencial fisiológico das sementes, do rendimento e do valor nutricional dos grãos

Orientador:
Prof. Dr. **SILVIO MOURE CICERO**

Coorientador:
Prof. Dr. **JOSÉ LAVRES JUNIOR**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em Ciências. Área de concentração: Fitotecnia

Piracicaba
2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Freitas, Marcella Nunes de

Tratamento de sementes de milho com zinco: avaliações do potencial fisiológico das sementes, do rendimento e do valor nutricional dos grãos / Marcella Nunes de Freitas. - - Piracicaba, 2016.

218 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

1. Revestimento de sementes 2. Micronutrientes 3. Armazenamento de sementes
4. Mapeamento elementar 5. Técnica isotópica. I. Título

DEDICO

A Deus, pela sua presença constante na minha vida, pelo auxílio nas minhas escolhas e me confortar nas horas difíceis.

OFEREÇO

Aos meus pais, Maria Conceição e Saulo, pelo apoio incondicional, exemplos de força e dedicação, bases da minha educação, que semearam e cuidaram com atenção e carinho do meu crescimento pessoal e profissional.

Ao meu namorado, Thiago Finotti, por caminhar ao meu lado, torcer pelas minhas vitórias e compreensão.

Aos meus irmãos, Mariana e Saulo Júnior; **minha cunhada** Tamara Prudente, **meu cunhado** Tiago Mendes e **meu sobrinho** Miguel, por todo apoio e momentos de alegrias.

Aos meus amigos, pela força e apoio.

AGRADECIMENTOS

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (USP / Esalq), pela oportunidade valiosa de realizar a Pós-Graduação.

Ao professor Silvio Moure Cicero, pela orientação durante esses anos, pelos ensinamentos e por acreditar em meu potencial.

Ao professor José Lavres Junior, pela coorientação, por todo suporte, pelo exemplo de competência e pelos ensinamentos.

À querida Helena M. C. P. Chamma, pela amizade, carinho, dedicação e apoio nas análises de laboratório de sementes.

Aos funcionários do Departamento de Produção Vegetal e do Laboratório de Tecnologia de Sementes da USP/ESALQ, em especial, ao Francisco G. Gomes Junior, Adilson J. Teixeira, João E. Jabur, Ananias F. Souza, Erreinaldo D. Bortolazzo, Davi, Ticão, Daniel e Edson, pela grande contribuição para a execução deste trabalho.

Aos secretários: Luciane Ap. Lopes Toledo e Luis Claudio P. Souza.

Ao técnico Márcio Arruda Bacchi, do Laboratório de Radioisótopos do CENA.

Aos meus químicos preferidos, que tanto me auxiliaram, Andressa Adame e Marcelo B. Bueno Guerra, muito obrigada pela contribuição e aos valiosos ensinamentos.

Ao professor Francisco José Krug por disponibilizar equipamentos para as análises.

Às funcionárias do laboratório de nutrição mineral de plantas, Cleusa P. Cabral e de química analítica, Aparecida de Fátima Patreze e Sheila R. Wenzel Perdigão.

Ao pesquisador Vitor Vaz Mondo e sua equipe, pela disponibilização do campo experimental na Embrapa e pelo auxílio na condução do experimento.

Ao pesquisador Fernando Bergantini e ao técnico Júnior Vieira, pela disponibilização do campo experimental na APTA em Colina, SP e pelo auxílio na condução do experimento.

Aos agricultores José Marcio Piassa e Juliana Piassa, pela disponibilização do campo experimental em Indianópolis, MG.

Ao pesquisador do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, Carlos A. Pérez pelo esforço, dedicação, exemplo de profissionalismo e por acreditar em meu trabalho.

Ao pesquisador do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, Dalton Belchior Abdala pelo auxílio na condução do trabalho e análises.

Aos queridos amigos que fizeram parte destes anos, em especial, a Crislaine Aparecida, Danielle Otte, Haynna Abud, Natália Arruda e Nayara Gonçalves.

À minha querida amiga, Juliana Joice, pelo exemplo de dedicação e amizade.

À aluna de graduação Natália Piai Ferreira (“Sai de baixo”) pelo auxílio com a condução do experimento.

Ao professor Marco Aurélio Zezzi Arruda do Instituto de Química da Unicamp e ao pós-doutorando Gustavo de Souza Pessôa, pelo auxílio e disponibilização do aparelho ICP-MS para as análises.

Aos professores Ana Dionísia Da Luz Coelho Novembre e Julio Marcos Filho, pelos ensinamentos.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos durante o período de fevereiro de 2013 a maio de 2014.

À FAPESP, pela bolsa de estudos concedida no período de junho de 2014 a fevereiro de 2016.

À empresa Dow AgroSciences, pela cessão das sementes.

À empresa Agrichem do Brasil S.A, pela contribuição com o estudo e todo o suporte técnico, agradeço em especial ao Luis K. Yabase, Leonardo Queiroz Melo, Laiani Fischer di Donato e Gilberto Pozzan.

A todos aqueles que contribuíram para a execução deste trabalho, meus sinceros agradecimentos!

EPIÍGRAFE

Tu te tornas eternamente responsável por aquilo que cativas.

Antoine de Saint-Exupéry

SUMÁRIO

RESUMO	10
INTRODUÇÃO	13
1 POTENCIAL FISIOLÓGICO DE SEMENTES DE MILHO TRATADAS COM ZINCO E DESEMPENHO DURANTE O ARMAZENAMENTO	15
RESUMO	15
ABSTRACT	16
1.1 INTRODUÇÃO	17
1.2 MATERIAIS E MÉTODOS	21
1.2.1 TRATAMENTO E CARACTERIZAÇÃO INICIAL DAS SEMENTES	21
1.2.2 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL FISIOLÓGICO DAS SEMENTES	22
1.2.2.1 Teor de água	23
1.2.2.2 Massa de mil sementes	23
1.2.2.3 Teste de germinação	23
1.2.2.4 Primeira contagem de germinação	23
1.2.2.5 Teste de frio	23
1.2.2.6 Emergência de plântulas em campo	24
1.2.2.7 Emergência de plântulas em areia	24
1.2.2.8 Velocidade de emergência de plântulas em areia	24
1.2.2.9 Análise computadorizada de imagens de plântulas (SVIS®)	24
1.2.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA	25
1.3 RESULTADOS	26
1.3.1 CARACTERIZAÇÃO INICIAL DOS MATERIAIS	26
1.3.2 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL FISIOLÓGICO DE SEMENTES MENORES	30
1.3.3 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL FISIOLÓGICO DE SEMENTES MAIORES	42
1.4 DISCUSSÃO	55
1.5 CONCLUSÕES	62
REFERÊNCIAS	63
2 AVALIAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DE ZN EM SEMENTES E PLÂNTULAS DE MILHO POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X COM RADIAÇÃO SÍNCROTRON (SR μ-XRF)	71
RESUMO	71
ABSTRACT	72
2.1 INTRODUÇÃO	73
2.2 MATERIAIS E MÉTODOS	78
2.2.1 TRATAMENTO DAS SEMENTES DE MILHO	78
2.2.2 PARTE 1	78
2.2.2.1 Preparo das amostras de sementes	78
2.2.3 PARTE 2	80
2.2.3.1 Preparo das amostras de plântulas	80
2.2.4 ANÁLISE POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X COM RADIAÇÃO SÍNCROTRON (SR μ -XRF) ..	82
2.2.5 DIGESTÃO ÁCIDA E ANÁLISE ELEMENTAR POR ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ÓPTICA (ICP- OES)	83
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	85
2.3.1 PARTE 1	85
2.3.1.1 Distribuição de Zn em sementes de milho por análise de SR μ -XRF	85
2.3.1.2 Concentração de Zn nas partes das sementes	91

2.3.1.3 Interação do Zn com P e S nas sementes	100
2.3.2 PARTE 2	102
2.4 CONCLUSÕES.....	116
2.4.1 PARTE 1	116
2.4.2 PARTE 2	116
REFERÊNCIAS.....	117
3 APLICAÇÃO DE ZINCO EM SEMENTES DE MILHO: AVALIAÇÕES DO RENDIMENTO DE GRÃOS E COMPOSIÇÃO DE NUTRIENTES NAS PLANTAS E NOS GRÃOS	127
RESUMO.....	127
ABSTRACT	128
3.1 INTRODUÇÃO	129
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS	133
3.2.1 LOCALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS	133
3.2.2 TRATAMENTO DAS SEMENTES COM ZINCO	133
3.2.3 REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS.....	134
3.2.4 AVALIAÇÕES DO CRESCIMENTO DAS PLANTAS	136
3.2.5 ASPECTOS RELACIONADOS AO RENDIMENTO DA CULTURA	136
3.2.6 ACÚMULO DE NUTRIENTES NAS PLANTAS E GRÃOS	137
3.2.7 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	138
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	139
3.3.1 AVALIAÇÕES DO CRESCIMENTO DAS PLANTAS	139
3.3.2 ASPECTOS RELACIONADOS AO RENDIMENTO DA CULTURA	142
3.3.3 ACÚMULO DE NUTRIENTES NAS PLANTAS DE MILHO E NOS GRÃOS	147
3.4 CONCLUSÕES.....	153
REFERÊNCIAS.....	154
4 CONTRIBUIÇÃO DO ZN APLICADO ÀS SEMENTES DE MILHO PARA A NUTRIÇÃO DAS PLANTAS, UTILIZANDO O ISÓTOPO ⁶⁸Zn	163
RESUMO.....	163
ABSTRACT	164
4.1 INTRODUÇÃO	165
4.2 MATERIAIS E MÉTODOS	168
4.2.1 DESCRIÇÃO E PREPARO DO MATERIAL ⁶⁸ ZnO.....	168
4.2.2 TRATAMENTO DAS SEMENTES.....	169
4.2.3 PARTE 1: AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO TRATAMENTO COM ZN EM PLÂNTULAS DE MILHO.....	170
4.2.4 PARTE 2: AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO TRATAMENTO COM ZN DURANTE TODO O CICLO DE CULTIVO DAS PLANTAS DE MILHO.....	170
4.2.4.1 Preparo da terra e semeadura	170
4.2.4.2 Coleta das amostras	172
4.2.5 DIGESTÃO DAS AMOSTRAS.....	177
4.2.6 ANÁLISES POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS COM FONTE DE PLASMA INDUTIVAMENTE ACOPLADO (ICP-MS) E POR ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ÓPTICA COM FONTE DE PLASMA INDUTIVAMENTE ACOPLADO (ICP-OES)	177
4.2.7 DETERMINAÇÃO DO ZN PROVENIENTE DO TRATAMENTO DE SEMENTES (ZNPTS).....	178
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	180
4.3.1 CONCENTRAÇÕES DE ZN PROVENIENTE DO TRATAMENTO DE SEMENTES (ZNPTS) NAS PLANTAS.....	181
4.3.2 PARTIÇÃO DO ZN PROVENIENTE DO TRATAMENTO DE SEMENTES (PZNPTS) NAS PLANTAS	188
4.3.3 EFICIÊNCIA DO USO DO FERTILIZANTE DISPONIBILIZADO VIA TRATAMENTO DE SEMENTES (FUE)	195
4.3.4 RELAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE ZN TOTAL (ZNTOTAL) E DO ZN PROVENIENTE DO TRATAMENTO DE SEMENTES (ZNPTS) COM OS DEMAIS NUTRIENTES NAS PLANTAS	196

4.3.5 CONCENTRAÇÕES DE ZN PROVENIENTE DO TRATAMENTO DE SEMENTES (ZNPTS) NO SOLO	202
4.4 CONCLUSÕES	204
REFERÊNCIAS	205
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	215
APÊNDICES	217

RESUMO

Tratamento de sementes de milho com zinco: avaliações do potencial fisiológico das sementes, do rendimento e do valor nutricional dos grãos

O Zn é essencial para o metabolismo de plantas, animais e do ser humano. Existe a necessidade de buscar soluções para a baixa disponibilidade de Zn, frequente em solos do Brasil e do mundo, e de melhorar o valor nutricional dos grãos de cereais com este nutriente. O tratamento de sementes pode apresentar-se como uma importante técnica para o fornecimento de Zn na cultura do milho (*Zea mays* L.). Este estudo foi dividido em quatro capítulos, no primeiro, objetivou-se avaliar o potencial fisiológico de sementes de milho tratadas com Zn durante o armazenamento; no segundo, avaliou-se a distribuição do Zn em sementes tratadas durante o armazenamento das sementes por 6 e 12 meses, bem como a absorção do Zn por plântulas; no terceiro capítulo, foram avaliados os reflexos do tratamento de sementes com Zn sobre a produção de biomassa, rendimento e valor nutricional dos grãos e, por fim, no quarto capítulo, determinou-se, pelo uso da marcação do óxido de Zn com o nuclídeo ^{68}Zn , a absorção do Zn pela planta, utilizando o método isotópico. Os resultados demonstram que o tratamento de sementes pode incrementar o vigor das plântulas provenientes de sementes com baixo potencial fisiológico; entretanto, em condições de armazenamento com temperatura e umidade relativa do ar não controladas, plântulas provenientes de sementes maiores tratadas, armazenadas por 12 meses nessas condições, podem apresentar fitotoxicidade, em função do tratamento. O Zn disponibilizado em revestimento, durante o armazenamento das sementes tratadas por 6 e 12 meses, sob condições não controladas, pode penetrar no pericarpo das sementes e encontrar-se acumulado em pontos específicos da semente. O ponto de maior acúmulo de Zn nas sementes é o embrião, acima da camada negra. Quanto à absorção do Zn disponibilizado via tratamento por plântulas, após 72 horas de as sementes terem sido colocadas para germinar, são visíveis os pontos de acúmulo do Zn na raiz primária, evidenciando que tecidos meristemáticos possuem alta demanda pelo elemento. O tratamento de sementes com Zn não propiciou aumento da biomassa da planta, rendimento dos grãos, acúmulo de Zn nas plantas e concentração de Zn nos grãos. Apesar desse resultado, o Zn disponibilizado via tratamento de sementes contribui de forma significativa para a nutrição das plantas de milho, conforme se avaliou por meio da marcação isotópica.

Palavras-chave: *Zea mays* L.; Micronutriente; Qualidade de sementes; Biofortificação agrônômica; Método isotópico

ABSTRACT

Treatment of corn seed with zinc: evaluations of the physiological potential of seeds, yield and nutritional value of the grains

Zn is essential to the metabolism of plants, animals and human being. There is the need for solutions regarding the low availability of Zn, frequent on soils of Brazil and of the world, and for improving the nutritional value of grains with this nutrient. Treatment of seeds may present as an important technique for the provision of Zn in the corn culture (*Zea mays* L.). This study is organized in four chapters, in the first one, the objective is to determine the physiological potential of corn seeds treated with Zn during storage; in the second, the Zn distribution in seeds treated during storage for 6 and 12 months was analyzed, as well as the Zn absorption by plantules; in the third chapter, reflexes of the treatment of seeds with Zn over the production of biomass were evaluated and, lastly, the fourth chapter aims at determining the absorption of Zn by the plant, using the isotope method and marking zinc oxide with the ^{68}Zn nuclide. Results showed that the treatment of the seeds may improve the vigor of plantules coming from seeds with low physiological potential; however, treated plantules coming from bigger seeds, stored for 12 months in uncontrolled conditions of temperature and relative humidity may present phytotoxicity because of the treatment. Zn made available in form of coating, during storage of seeds treated for 6 and 12 months, in uncontrolled conditions, may penetrate the pericarp of seeds and accumulate on specific spots. The biggest Zn accumulation spot Zn in seeds is the embryo, above the black layer. Regarding the absorption of Zn by the plantules made available via treatment, after 72 hours seeds germinated, accumulation spots of Zn in the primary root are visible, showing that the meristematic tissues have a high demand for the element. The treatment of seeds with Zn did not favor increase in the biomass of the plant, grain yield, accumulation of Zn in plants and concentration of Zn in grains. Despite this result, Zn made available via treatment of seeds contributes significantly for the nutrition of corn plants, as evaluated using isotope marking.

Keywords: *Zea mays* L.; Micronutrient; Seed quality; Agronomic biofortification; Isotopic method.

INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é considerado uma das culturas agrícolas de maior importância. Os maiores produtores mundiais de milho são os EUA, seguidos pela China e pelo Brasil. Da produção brasileira, a maior parte desses grãos é destinada à indústria de rações; todavia, em muitos países, o milho constitui a base da alimentação humana.

Agregar valor às sementes, valendo-se de métodos e tecnologias de produção, como o tratamento químico, vem sendo uma exigência do mercado, cada vez mais competitivo. Para a cultura do milho, o tratamento de sementes é uma prática comum de grande importância para os produtores agrícolas, pelos reflexos diretos no desempenho da cultura, empregando-se produtos, tais como inseticidas, fungicidas e polímeros para o tratamento. Atualmente, do total de sementes de milho produzidas e comercializadas, a maioria é vendida aos produtores com o tratamento químico industrial fornecido pela empresa. Este aspecto oferece praticidade e segurança ao agricultor, que adquire um produto com ingredientes ativos que permitem a proteção contra pragas e fungos durante o armazenamento e nos estádios iniciais de crescimento das plantas.

Considerando os baixos teores de Zn frequentemente encontrados nos solos brasileiros e a alta demanda da cultura do milho por este nutriente, o tratamento de sementes com Zn configura-se como uma importante técnica, no sentido de aumentar a produtividade da cultura e também pode contribuir com o aumento do valor nutricional dos grãos de milho destinados ao consumo humano.

No entanto, informações que permitam a utilização do tratamento de sementes com Zn relacionadas ao potencial fisiológico de sementes tratadas, bem como a contribuição do Zn em fatores relacionados à produção e ao aumento do valor nutricional dos grãos são escassas na literatura. Dessa maneira, existe a necessidade de informações mais amplas a respeito das particularidades da absorção e da redistribuição do Zn utilizado no tratamento de sementes, para permitir o entendimento da interferência do elemento na fisiologia da planta.

Nesta pesquisa objetivou-se realizar um estudo amplo com relação ao tratamento de sementes com Zn, com este propósito, o trabalho foi dividido em 4 capítulos; no primeiro, deu-se enfoque à avaliação do potencial fisiológico das sementes tratadas de diferentes tamanhos e vigor durante o armazenamento por 12 meses, sob condições controladas e não controladas. No segundo capítulo, avaliou-se a distribuição do Zn nas partes das sementes tratadas e não tratadas (pericarpo, endosperma e embrião) e em plântulas de milho após a germinação por 48, 72, 96 e 120 horas. No terceiro capítulo, realizou-se um estudo para avaliar o efeito do Zn aplicado via

sementes sobre os aspectos relacionados ao crescimento das plantas, rendimento da cultura e composição química da planta e dos grãos. Por fim, no quarto capítulo, utilizou-se a técnica da marcação isotópica com ^{68}Zn para avaliar a contribuição do Zn aplicado via tratamento de sementes na nutrição das plantas.

1 POTENCIAL FISIOLÓGICO DE SEMENTES DE MILHO TRATADAS COM ZINCO E DESEMPENHO DURANTE O ARMAZENAMENTO

Resumo

O tratamento de sementes possui vantagens que o tornam uma técnica importante para o fornecimento de micronutrientes, como o Zn, para as plantas. Contudo, informações que permitam a utilização desse tratamento com relação ao potencial fisiológico das sementes tratadas de diferentes tamanhos e vigor durante o armazenamento são escassas. Objetivou-se, por meio deste estudo, avaliar o potencial fisiológico de sementes de milho de dois tamanhos e dois níveis de vigor, tratadas com Zn e armazenadas em dois ambientes por 12 meses. Dessa maneira, sementes de milho com tamanhos de 16/64" e 22/64" e de dois lotes foram inicialmente caracterizadas quanto aos atributos físicos e fisiológicos e tratadas com óxido de Zn em quatro doses (50, 100, 150 e 200 g Zn.ha⁻¹) e, após o tratamento, determinou-se a concentração de Zn nas sementes não tratadas e tratadas. As sementes foram armazenadas em ambientes com condições controladas e não controladas. A germinação e o vigor (primeira contagem de germinação, teste de frio, emergência de plântulas em campo, emergência de plântulas em areia, velocidade de emergência de plântulas em areia e análise computadorizada de imagens de plântulas – SVIS) foram avaliados para sementes armazenadas sob condições controladas aos 0, 4, 8 e 12 meses e para as sementes armazenadas sob condições não controladas aos 0, 8 e 12 meses. Concluiu-se que para a semeadura imediata, o tratamento de sementes com Zn propicia em incremento no vigor de sementes maiores e menores, entretanto, durante o armazenamento sob condições não controladas, sementes maiores dos lotes de maior e de menor vigor podem apresentar redução acentuada do potencial fisiológico como efeito nocivo do tratamento. Para sementes maiores de maior e menor potencial fisiológico, o tratamento de sementes com Zn é benéfico ao potencial fisiológico das sementes, quando essas são armazenadas por 12 meses, sob condições controladas. Para sementes menores dos lotes de maior e menor potencial fisiológico, o tratamento favoreceu a manutenção da viabilidade durante o armazenamento, no qual a dose recomendada para o revestimento apresentou os melhores resultados.

Palavras-chave: *Zea mays* L.; Vigor; Revestimento de sementes; Micronutrientes.

Abstract

Treatment of seeds has advantages that make it an important technique for supplying micronutrients, as zinc, for plants. However, information that allow the application of this treatment regarding the physiological potential of treated seed of different sizes and vigor during storage are scares. This work aims to evaluate the physiological potential of corn seeds of two different sizes and two levels of vigor, treated with zinc and stored in two environments for 12 months. Thus, corn seeds of sizes 16/64" and 22/64" and from two lots were initially characterized in terms of their physical and physiological attributes and treated with zinc oxide at four doses (50, 100, 150 e 200 g Zn.ha⁻¹) and, after treatment, concentration of Zn in treated and non-treated seeds were determined. Seeds were stored in controlled and uncontrolled environments. Germination and vigor (first germination count, cold test, seedlings emergence in fields, seedlings emergence in sand, seedlings emergence speed in sand and automated system of seedling image analysis (SVIS)) evaluations of seeds stored in a controlled environment were made at 0, 4, 8 and 12 months. The same germination and vigor evaluations of seeds stored in an uncontrolled environment were made at 0, 8 and 12 months. In conclusion, treatment of seeds with Zn provides a potential improvement in vigor of larger and smaller seeds. However, during storage in uncontrolled environment, larger seeds of higher and lower vigor lots may present a sharp reduction of the physiological potential as a effect harmful of treatment. For larger seeds of higher and lower physiological potential, treatment with zinc is beneficial to physiological potential of seeds, in case they are stored for 12 months, under controlled conditions. For smaller seeds of higher and lower physiological potential, treatment is beneficial to the viability during storage, in which case the recommended dose for coating rendered the best results.

Keywords: *Zea mays* L.; Vigor; Seed coating; Micronutrientes; Seed storage.

1.1 Introdução

Sementes que apresentam uma reserva suficiente em nutrientes minerais são de grande importância para propiciar o desenvolvimento adequado das plântulas, principalmente, quando são cultivadas em solos com baixa disponibilidade de nutrientes (RENGEL; GRAHAM, 1995; HACISALIHOGU; KOCHIAN, 2003). Alguns autores demonstraram que sementes com alto teor de Zn resultaram em plântulas mais vigorosas e com maior capacidade de se estabelecerem em campo (YILMAZ et al., 1998; RENGEL; GRAHAM, 1995; RENGEL, 2002; CAKMAK, 2008; BOONCHUAY et al., 2013), isto porque as concentrações dos elementos minerais nas sementes podem afetar a sua viabilidade e vigor (WELCH, 1986). O conteúdo de Zn nas sementes pode ser aumentado pela imersão em uma solução que contenha o nutriente ou pelo recobrimento das sementes (FAROOQ et al., 2012).

O tratamento de sementes, de maneira geral, é realizado com o objetivo de incorporar produtos fitossanitários, hormônios, nutrientes, agentes biológicos ou polímeros que propiciem melhor desempenho das sementes e plântulas (TAYLOR, 2003). Já o tratamento de sementes com nutrientes, especificamente, objetiva fornecer condições adequadas de micronutrientes às plantas, especialmente em situações em que a presença dos elementos no solo é insuficiente para suprir as exigências das plantas (FAROOQ et al., 2012), ou quando a presença desses elementos é reduzida nas sementes.

O revestimento de sementes com nutrientes proporciona significativo aumento da quantidade de nutrientes da semente tratada, sendo empregado o termo “*seed invigoration*” para esta técnica (FAROOQ et al., 2009). A aplicação de Zn via sementes constitui forma prática e eficaz de correção de deficiências (CHENG, 1985; PARDUCCI et al., 1989; RIBEIRO; SANTOS, 1996), tornando o elemento disponível para as plantas nos estádios iniciais de desenvolvimento, pela maior aproximação da zona de absorção da raiz, tendo vantagens em relação à aplicação foliar ou via solo, tais como a melhor distribuição do elemento no solo e menores custos de aplicação.

Os efeitos favoráveis ao vigor das sementes propiciados pelo tratamento com Zn são inquestionáveis; o revestimento é uma das práticas mais interessantes e benéficas para aprimorar o desempenho das sementes. Alguns autores têm demonstrado que o revestimento com Zn pode favorecer o vigor das sementes tratadas para várias espécies, tais como arroz (FUNGUETTO et al., 2010), sorgo (YAGI et al., 2006), trigo (OHSE et al., 2012), mamona

(OLIVEIRA et al., 2010), canola (PLETSCH et al., 2014), aveia (TAVARES et al., 2013a; OLIVEIRA et al., 2014) e milho (PRADO et al., 2007; DIAS, 2013; MUHAMMAD et al., 2015). Assim, é possível concluir que o alto conteúdo de Zn em sementes pode atuar como um propulsor ao desenvolvimento inicial das plântulas.

Apesar dos efeitos benéficos do Zn disponibilizado via tratamento de sementes, após a protrusão radicular, pode ocorrer rápida absorção de nutrientes e de água e pelo fato de as partículas estarem em contato direto com a raiz primária em crescimento, podem ocorrer efeitos nocivos às plântulas (WANG et al., 2012). Nesse cenário, os efeitos fitotóxicos mais significativos provenientes do tratamento de sementes foram observados nas plântulas, refletindo em redução do crescimento, logo após o revestimento das sementes (OHSE et al., 1997; FRANÇA-NETO et al., 2011; YAGI et al., 2006; OHSE et al., 2012; ZHANG et al., 2015). Scott (1998) atribuiu como causa da fitotoxidez dos produtos utilizados em tratamento o efeito osmótico dos fertilizantes que, em contato com a superfície das sementes, geram um estresse fisiológico por seca causado pelas concentrações elevadas dos micronutrientes que envolvem as sementes, além da entrada de quantidades elevadas de solutos tóxicos.

O princípio do tratamento de sementes com micronutrientes é o transporte dos elementos aplicados à semente para a futura planta (CHENG, 1985). A eficácia desse procedimento depende, em grande parte, da dose do produto utilizado (HALMER, 2008). A recomendação da dosagem de micronutrientes aplicados às sementes é feita com base na necessidade da cultura por hectare, normalmente dada em mL.ha^{-1} ; dessa maneira, para sementes de milho, as quais são comercializadas pelo número de sementes, a massa pode variar de acordo com o tamanho das sementes, assim, sementes menores receberão as mesmas doses aplicadas em sementes maiores, o que pode acarretar em maior fitotoxidade para as primeiras, pois apresentariam concentrações elevadas do produto aplicado. Além disso, sementes pequenas têm maior relação entre a área e o volume do que sementes maiores, o que aumenta a sua exposição, por unidade de volume, ao produto utilizado em tratamento (LEE et al., 2010; ZHANG et al., 2015). Existe grande preocupação na indústria de sementes de que o ingrediente ativo e as formulações utilizadas no tratamento de sementes possam causar fitotoxicidade (TAYLOR et al., 2001).

Outro fator que também poderá influenciar no efeito do tratamento das sementes, após o revestimento e ao longo do armazenamento, refere-se ao potencial fisiológico inicial dos lotes, de modo que plântulas originadas de sementes com menor vigor podem apresentar maior susceptibilidade ao efeito fitotóxico dos micronutrientes, em função das sementes de baixo vigor apresentarem um processo natural de perda da integridade de membranas, como efeito do

processo de deterioração, além de possuírem o comprometimento do sistema de reparo celular e da síntese de ATP (McDONALD, 1999). O excesso da presença de metais pesados nas sementes pode agravar o processo de deterioração das sementes, pois pode alterar a respiração celular (STANKOVIĆ et al., 2011) e quando o Zn acumula-se no citoplasma mitocondrial, o ciclo de Krebs e a cadeia transportadora de elétrons da fosforilação oxidativa são inibidos (MUNZUROGLU; GECKIL, 2002), reduzindo também a formação de ATP. O efeito do tratamento de sementes em lotes com diferentes potenciais fisiológicos foi estudado por Tunes et al. (2015) para sementes de trigo, constatando que tanto para lotes de baixo como para os de alto vigor o tratamento foi benéfico. O mesmo resultado foi verificado por Dias (2013) avaliando lotes de sementes de milho com uma pequena diferença de vigor.

Apesar do tratamento de sementes ser uma técnica favorável para melhorar o desempenho das plântulas, ainda existem dúvidas quanto à manutenção do potencial fisiológico das sementes tratadas durante o armazenamento, um aspecto de grande importância para viabilizar a sua utilização. Em um trabalho mais antigo, Ribeiro et al. (1994) verificaram que o tratamento de sementes de milho com Zn não prejudicou a germinação e o vigor durante o armazenamento das sementes por 8 meses. Dias (2013), avaliando o tratamento de sementes de milho de dois tamanhos com óxido de Zn, armazenadas por 12 meses, concluiu que o potencial fisiológico dos materiais não é afetado pelo tratamento, o mesmo resultado foi encontrado por Tunes et al. (2012), por meio do armazenamento de sementes de trigo tratadas com sulfato de Zn por 6 meses em ambiente não controlado. Cabe ressaltar que a temperatura e a umidade relativa do ar durante o armazenamento são os fatores mais importantes, os quais afetam a taxa de deterioração das sementes (MURTHY et al., 2003), dessa forma, se o tratamento for nocivo às sementes, ele pode ser agravado em situação de armazenamento sob condições não controladas.

A possibilidade de armazenamento das sementes tratadas com Zn abre novas perspectivas, tendo em vista a oportunidade de as empresas produtoras de sementes de milho disponibilizarem no mercado sementes enriquecidas com esse micronutriente, dando garantia de qualidade e o benefício de eliminar possíveis erros na condução da lavoura, pela aplicação de doses e fontes inadequadas. Fatores como o tamanho e o vigor da semente, que podem interferir na toxicidade do tratamento, necessitam de mais estudos para avaliar, com precisão, a ocorrência de efeito fitotóxico para as plântulas com ênfase no comportamento das sementes tratadas durante o armazenamento.

A partir da grande perspectiva do tratamento de sementes em melhorar o desempenho das plântulas, aliada à falta de informações que viabilize a sua utilização pelos agricultores, propôs-se avaliar o potencial fisiológico de sementes de milho de dois tamanhos e de dois níveis de vigor, tratadas com Zn e armazenadas por 12 meses, em ambiente com condições controladas e não controladas.

1.2 Materiais e Métodos

1.2.1 Tratamento e caracterização inicial das sementes

Foram utilizados dois lotes de sementes da peneira “16 curta” (16/64”) com potenciais fisiológicos distintos e dois lotes de sementes da peneira “22 curta” (22/64”) também com potenciais fisiológicos distintos, do híbrido simples 30A37PW (Morgan[®], Dow AgroSciences, Jardinópolis, SP). Os tamanhos das sementes utilizados foram designados no texto como sementes menores (16/64”) e maiores (22/64”); as sementes estavam tratadas com o fungicida Maxim[®] XL (fludioxonil e metalaxil-M) e os inseticidas Actellic[®] 500 CE (pirimifós-metílico) e K- Obiol[®] 25 CE (deltametrina), com dosagens de 0,0375g, 0,0150g, 0,0080g e 0,0020g do ingrediente ativo.kg⁻¹ de sementes, respectivamente. Foi feita a caracterização inicial dos materiais, determinando-se o teor de água, massa de mil sementes, germinação, primeira contagem de germinação, teste de frio, emergência de plântulas em campo, emergência de plântulas em areia e velocidade de emergência de plântulas em areia.

As sementes dos dois tamanhos foram caracterizadas quanto às características físicas, utilizando o equipamento SAS[®] (Sistema de análise de sementes) da empresa Tbit no Laboratório Central de Sementes (LCSEM) pertencente à Universidade Federal de Lavras (UFLA). Realizou-se a captura das imagens das sementes com o equipamento SAS Pro[®] e, em seguida, foi realizada a calibração com o *software* do aparelho. Foram utilizadas 10 repetições de 20 sementes para cada tamanho de semente com a determinação do valor médio por semente para a área, circularidade, diâmetros máximo e mínimo e perímetro.

Em seguida, procedeu-se com o tratamento de sementes. A fonte utilizada foi uma suspensão líquida contendo óxido de Zn, com 100% de ZnO e densidade 2 g.cm⁻³ (Maxi Zinc[®], Agrichem, Ribeirão Preto, SP, Brasil). Foram utilizadas quatro doses de Zn, iguais a 50, 100, 150 e 200 mL ZnO.ha⁻¹, as quais correspondem a 50, 100, 150 e 200 g Zn.ha⁻¹ e o tratamento testemunha; as doses foram estabelecidas considerando uma taxa de semeadura de sessenta mil sementes por hectare e tendo como base a dose recomendada pelo fabricante do produto (100 g Zn.ha⁻¹), utilizando o mesmo volume de calda para todas as dosagens de 12 ml.kg de sementes⁻¹ (KRZYZANOWSKI et al., 2014). As sementes foram tratadas em equipamento do tipo “panela rotatória” (“*pan coater*”), contendo um motor Leroy-Somer rotativo (modelo LS71 0,75 Kw), que permitiu a cobertura do pericarpo das sementes de milho.

Após a aplicação do produto, foi realizada a determinação da concentração de Zn nas sementes; para isso, duas amostras de 100 sementes dos dois tamanhos avaliados, tratadas com

cada dose de ZnO e não tratadas, foram moídas em moinho de facas do tipo Willey (Marconi®, Piracicaba, SP, Brasil). A digestão e a análise do material em espectrômetro de emissão óptica (ICP-OES) foram realizadas no Laboratório de Química Analítica pertencente ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo (USP / CENA).

As amostras de sementes foram submetidas à digestão ácida assistida por radiação micro-ondas (ETHOS 1600, Milestone, Italy) pesando-se 250 mg do material previamente moído, em triplicata, o qual foi transferido para frascos de digestão de teflon TFM® e, em seguida, foram adicionados 6,0 mL de HNO₃ 20% v.v⁻¹ e 2,0 mL de H₂O₂ 30% v.v⁻¹. O programa de aquecimento foi conduzido como descrito em Campos et al. (2015). Os digeridos foram transferidos para balões volumétricos e o volume foi completado para 20 mL com água deionizada (resistividade de 18.2 MΩ cm). As soluções finais foram analisadas por ICP-OES (iCAP 6500 Duo, Thermo, Waltham, USA) com as condições operacionais descritas em Peruchi et al. (2014).

Para a verificação da exatidão do método, foram utilizados materiais de referência certificados (CRMs) do Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (NIST) (Gaithersburg, MD, EUA) que passaram pelo mesmo procedimento de digestão das amostras. Os resultados dos CRMs encontram-se no APÊNDICE A. Foram utilizados os seguintes CRMs: colmos de milho (CRM 8412), cereais de café da manhã fortificado (CRM 3233), folhas de macieira (CRM 1515) e folhas de pessegueiro (CRM 1547).

Após o tratamento, as sementes foram avaliadas quanto à germinação e o vigor e acondicionadas em sacos de papel “Kraft”, das quais uma amostra de cada tratamento foi armazenada em ambiente controlado (C), sob temperatura de 20°C e umidade relativa do ar de 50% e outra em ambiente com condições não controladas de temperatura e umidade relativa do ar (NC), sendo ambas mantidas em armazenamento por um período de 12 meses, com avaliações em quatro épocas, 0, 4, 8 e 12 meses para amostras armazenadas sob condições controladas e em três épocas, 0, 8 e 12 meses para amostras armazenadas sob condições não controladas. A temperatura e a umidade relativa do ar do ambiente não controlado foram monitoradas diariamente e os resultados estão no APÊNDICE B.

1.2.2 Avaliação do potencial fisiológico das sementes

Os testes realizados para a caracterização inicial dos materiais e a avaliação do potencial fisiológico das sementes logo após o tratamento e durante o armazenamento foram conduzidos nos Laboratórios de Análise de Sementes e de Análise de Imagens do Departamento

de Produção Vegetal, pertencentes à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo (USP/ESALQ) e estão descritos a seguir.

1.2.2.1 Teor de água

Conduzido pelo método da estufa a 105°C, com duas repetições por tratamento, seguindo os critérios estabelecidos nas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009). Duas amostras por tratamento, contendo aproximadamente 5 g de sementes, foram colocadas em recipientes metálicos e mantidas em estufa a 105 ± 3 °C, durante 24 horas. Decorrido este período, os recipientes foram retirados e acondicionados em dessecadores até atingirem temperatura ambiente, sendo posteriormente pesados para obtenção do teor de água (em %), baseados nas diferenças entre as quantidades iniciais e finais de água nas sementes.

1.2.2.2 Massa de mil sementes

Determinada a partir da média de oito repetições contendo 100 sementes, sendo o valor calculado posteriormente para mil sementes, conforme procedimento descrito nas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

1.2.2.3 Teste de germinação

Foi realizado com quatro repetições de 50 sementes, em rolos de papel-toalha umedecidos com quantidade de água equivalente a 2,5 vezes a massa do papel, a 25°C, por sete dias. As contagens foram realizadas ao quarto e sétimo dia da semeadura. A interpretação foi efetuada de acordo com as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009) e os resultados expressos em percentagem média de plântulas normais para cada tratamento.

1.2.2.4 Primeira contagem de germinação

Foi determinado computando-se a percentagem de plântulas normais no quarto dia após a semeadura do teste de germinação.

1.2.2.5 Teste de frio

O método utilizado foi o teste de frio com terra (MIGUEL; CICERO, 1999), em caixas de plástico (0,47 x 0,30 x 0,11 m), preenchidas com mistura de terra (cultivada anteriormente com milho) e areia na proporção 1:3. Para tal, foram semeadas quatro repetições de 50 sementes por tratamento. A disponibilidade de água do substrato foi ajustada para 60% da capacidade de

retenção. Em seguida, as caixas foram colocadas em câmara fria a 10°C por sete dias. Decorrido esse prazo, as caixas permaneceram em sala fechada com temperatura de ambiente não controlado, sendo a contagem de plântulas emersas realizada no sétimo dia.

1.2.2.6 Emergência de plântulas em campo

O teste foi realizado com quatro repetições de 50 sementes por tratamento, distribuídas em sulcos de 2,5 m de comprimento, espaçadas 0,5 m entre linhas e com profundidade de 0,03 m, baseado em metodologia adotada por Fessel et al. (2000). Ao décimo quarto dia do teste, foi realizada a contagem do número de plântulas emersas e os resultados expressos em porcentagem.

1.2.2.7 Emergência de plântulas em areia

O teste foi conduzido com quatro repetições de 50 sementes. Foram utilizadas caixas de plástico de 47 x 30 x 11 cm; em cada caixa, foram distribuídas quatro repetições de 50 sementes. A disponibilidade de água na areia foi ajustada para 70% da sua capacidade de retenção. Ao décimo quarto dia do teste, foi realizada a contagem do número de plântulas emersas e os resultados expressos em porcentagem.

1.2.2.8 Velocidade de emergência de plântulas em areia

O teste foi realizado concomitantemente com o teste de emergência de plântulas em areia, contabilizando as plântulas emersas diariamente e empregando-se a fórmula apresentada a seguir (MAGUIRE, 1962), na qual N é o número de plantas emersas por dia e D é o número de dias após a instalação do teste.

$$IVE = \frac{N_1}{D_1} + \frac{N_2}{D_2} + \dots + \frac{N_n}{D_n}$$

1.2.2.9 Análise computadorizada de imagens de plântulas (SVIS®)

Conduzido com dez repetições de 20 sementes para cada tratamento, utilizando-se como substrato a vermiculita, a qual foi umedecida com 70% da capacidade de retenção e uniformemente espalhada no papel-toalha, umedecido com água equivalente a 2,5 vezes a massa do papel seco; a quantidade de vermiculita foi de 30 gramas para cada repetição; em seguida, as sementes foram colocadas para germinar em duas fileiras situadas no terço superior do papel-toalha e coberta com outra folha do papel. Os rolos contendo as sementes foram

colocados em germinador a 25°C. Após três dias, foi realizada a aquisição das imagens das plântulas por meio de um escâner HP Scanjet 2004, montado de maneira invertida no interior de uma caixa de alumínio com 60 cm x 50 cm x 12 cm, operado pelo *software* Photosmart, com resolução de 100 dpi. As imagens *escaneadas* foram armazenadas em pasta específica do disco rígido e, em seguida, analisadas pelo *software* “Seed Vigor Imaging System” (SVIS®).

As imagens foram processadas e gerados os índices de vigor (IV) e de uniformidade de crescimento (IU) e o comprimento de plântulas (CP), com proporção ajustada no *software* de 30% para uniformidade e 70% para crescimento (MONDO et al., 2011) e com tamanho máximo de plântulas de 7,5 polegadas. Os dados de comprimento de plântulas (CP), gerados em pixels, foram posteriormente convertidos para centímetros.

1.2.3 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância em fatorial, tendo como fator as doses (0, 50, 100, 150 e 200 g Zn.ha⁻¹) e as épocas de avaliação. As avaliações foram realizadas isoladamente para cada tamanho de semente (sementes menores e maiores), dentro de cada nível de vigor estudado (lotes 1 e 2, com maior e menor vigor, respectivamente) e de cada ambiente de armazenamento, em condições controladas (C), com quatro épocas de avaliação (0, 4, 8 e 12 meses) e não controladas (NC), com três épocas de avaliação (0, 8 e 12 meses). A análise foi realizada utilizando o sistema computacional SAS Institute Inc., Cary. NC., USA 2010, versão 9.3. Para a avaliação da influência do tratamento de sementes no potencial fisiológico, foram analisadas, por meio de regressão, as variáveis em que as doses ou sua interação com as épocas de avaliação foram significativas pelo teste de F, além disso, em alguns casos, também foi aplicado o teste de Tukey.

1.3 Resultados

1.3.1 Caracterização inicial dos materiais

A caracterização inicial das sementes dos lotes 1 e 2 indicou que, para ambos os tamanhos de sementes, o lote 1 possuía qualidade fisiológica superior ao lote 2, para as variáveis germinação, primeira contagem de germinação, teste de frio e índice de velocidade de emergência de plântulas em areia. Não houve diferença entre os lotes 1 e 2 para a emergência de plântulas em campo para sementes menores e maiores (Tabelas 1 e 2) e emergência de plântulas em areia para sementes menores (Tabela 1).

Tabela 1. Testes iniciais de avaliação do potencial fisiológico das sementes: médias do teor de água (TA), massa de mil sementes (MMS), germinação (G), primeira contagem de germinação (PCG), teste de frio (TF), emergência de plântulas em campo (EC) e em areia (EA) e índice de velocidade de emergência de plântulas em areia (IVE) de lotes de sementes menores de milho do híbrido 30A37PW.

Lotes	TA --%--	MMS -- g --	G ----- % -----	PCG	TF	EC	EA	IVE
1	7,7	181,09	96 a ¹	90 a	90,4 a	94,8 ^{ns}	96,6 ^{ns}	8,1 a
2	7,9		92 b	83 b	83,0 b	91,4	94,4	7,8 b
CV (%)			4,25	5,60	6,25	4,87	3,48	3,49
DMS			3,74	4,55	5,09	4,26	3,12	0,26

¹Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05). ^{ns} Não significativo pelo Teste F (p<0,05). CV: coeficiente de variação. DMS: Diferença Mínima Significativa.

Tabela 2. Testes iniciais de avaliação do potencial fisiológico das sementes: médias do teor de água (TA), massa de mil sementes (MMS), germinação (G), primeira contagem de germinação (PCG), teste de frio (TF), emergência de plântulas em campo (EC) e em areia (EA) e índice de velocidade de emergência de plântulas em areia (IVE) de lotes de sementes maiores de milho do híbrido 30A37PW.

Lotes	TA --%--	MMS -- g --	G ----- % -----	PCG	TF	EC	EA	IVE
1	8,0	282,38	98 a ¹	93 a	88,2 a	93,6 ^{ns}	99,2 a	8,4 a
2	7,9		94 b	83 b	77,4 b	92,4	92,8 b	7,6 b
CV (%)			3,51	6,61	8,35	4,89	4,07	3,75
DMS			3,16	5,47	6,49	4,28	3,67	0,28

¹Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05). ^{ns} Não significativo pelo Teste F (p<0,05). CV: coeficiente de variação. DMS: Diferença Mínima Significativa.

Quanto à caracterização dos atributos físicos das sementes realizadas no SAS®, observa-se que a área das sementes maiores (peneira 22/64") é quase o dobro da área das sementes menores (peneira 16/64"). Sementes maiores também possuem valores de diâmetros

máximo e mínimo e perímetros superiores em relação às sementes menores. No aspecto circularidade, no qual quanto mais próximo a 1 mais circulares são as sementes, as sementes maiores apresentam maior circularidade do que as sementes menores (Tabela 3). Acrescentando aos dados apresentados, pela imagem, é possível verificar que as sementes das peneiras 16/64" e 22/64" são bem distintas com relação aos aspectos de tamanho (Figura 1) e de massa de mil sementes, a qual para a peneira 22 é de, aproximadamente, 102 g maior do que a da peneira 16 (Tabelas 1 e 2).

Tabela 3. Caracterização dos atributos físicos das sementes menores e maiores de milho do híbrido 30A37 PW: área (ARE), circularidade (CIR), diâmetros máximo (DMA) e mínimo (DMI) e perímetro (PER).

Tamanho da semente ²	ARE -- cm ² --	CIR	DMA ----- cm -----	DMI ----- cm -----	PER
Menor	0.39 b ¹	0.83 b	0.77 b	0.62 b	2.39 b
Maior	0.72 a	0.86 a	1.03 a	0.88 a	3.24 a
CV (%)	2,34	1,91	1,48	1,30	1,22
DMS	0,01	0,02	0,01	0,01	0,03

¹Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). CV: coeficiente de variação. DMS: Diferença Mínima Significativa. ²Tamanho da semente: menor (peneira 16/64") e maior (peneira 22/64").

Figura 1. Caracterização das sementes menores e maiores do milho híbrido 30A37PW, tratadas com ZnO. Para cada tamanho, as sementes da esquerda para direita correspondem ao tratamento controle e as doses de 50, 100, 150 e 200 g Zn.ha⁻¹.

O produto óxido de Zn (ZnO) utilizado para o tratamento das sementes possui coloração branca e o tratamento industrial de sementes realizado pela empresa que as forneceu possui coloração rosa. Avaliando a massa de sementes tratadas com a suspensão concentrada de ZnO, é possível observar o recobrimento das sementes; à medida que as doses de Zn aumentaram, o tom de rosa é modificado pelo produto (Figura 2).

Figura 2. Caracterização das **sementes menores**, a esquerda e **maiores**, a direita do milho híbrido 30A37PW, tratadas com ZnO nas doses de 50, 100, 150 e 200 g Zn.ha⁻¹, identificadas pelos números 1, 2, 3 e 4, respectivamente.

Sementes menores e maiores apresentavam teores iniciais de Zn de 0,05 e 0,07 mg Zn.semente⁻¹, respectivamente; com o recobrimento, este conteúdo foi aumentado, chegando às concentrações de 1,674 e 1,423 mg Zn.semente⁻¹ para sementes menores e maiores, respectivamente, na maior dose de Zn aplicada de 200 g Zn.ha⁻¹, a qual corresponde a 2,0 mg Zn.semente⁻¹. O resultado da concentração de Zn nas sementes tratadas demonstra que o recobrimento das sementes com o produto não é 100% efetivo. A tendência é que ocorram perdas do produto se as doses aplicadas no tratamento de sementes forem muito pequenas, mesmo utilizando o mesmo volume de calda para todos os tratamentos. Por exemplo, ocorrem perdas de 77% e 84% para as sementes menores e maiores, respectivamente, quando é aplicada a dose 1 referente a 50 g Zn.ha⁻¹, a qual corresponde a 0,5 mg Zn.semente⁻¹; na maior dose aplicada, as perdas são menores, 16% e 29%, para sementes menores e maiores, respectivamente (Figura 3A).

Figura 3. Concentrações de Zn nas **sementes menores (S1)** e **maiores (S2)** de milho de acordo com as doses de Zn no tratamento de sementes, em mg Zn.semente⁻¹ (A), em g Zn.kg de sementes⁻¹ (B) e em mg Zn.cm², considerando a área da semente determinada pelo SAS (C). Os valores na “Dose 0” representam os teores de Zn iniciais nas sementes; nas demais doses (Doses 1, 2, 3 e 4) os teores de Zn foram descontados dos teores iniciais. Os percentuais representam a concentração de Zn que não foi efetiva no recobrimento das sementes, em relação a dose de Zn aplicada.

Os conteúdos de Zn na massa de sementes, avaliada em kg, para sementes de tamanho menor são maiores do que para sementes de tamanho maior (Figura 3B); entretanto, para as concentrações de Zn por unidade de semente (mg Zn.semente⁻¹), os valores foram semelhantes entre os dois tamanhos avaliados (Figura 3A). Quando se divide a concentração de Zn nas sementes menores e maiores (mg Zn.semente⁻¹) pela área (cm²) da Tabela 3, é notável que a concentração em mg Zn.cm² no pericarpo das sementes menores é maior do que para sementes maiores, ao passo que se aumentam as doses do produto (Figura 3C).

O revestimento com Zn não interferiu no grau de umidade das sementes, em nenhuma das doses avaliadas; mesmo quando as sementes foram armazenadas sob condições não controladas (NC), não houve alteração acentuada no teor de água. As diferenças entre o teor de água de sementes armazenadas em ambiente controlado e não controlado não ultrapassaram 2,9% (Tabela 4), o que não interfere na análise dos dados.

Tabela 4. Resultados de teor de água das sementes para diferentes materiais do milho híbrido 30A37 PW, nas épocas de avaliação e respectivas doses de Zn utilizadas no tratamento de sementes.

Materiais	Épocas (meses)	Ambiente de armazenamento	0	50	100	150	200	
			- - - g Zn.ha ⁻¹ - - -					
Sementes menores ¹	Lote 1	0	C ³	8,4	8,4	8,5	8,5	8,5
		4	C	9,3	9,4	9,4	9,3	9,2
		8	C	9,5	9,5	9,9	9,1	9,8
			NC ⁴	11,3	10,4	10,3	10,6	10,3
		12	C	9,2	9,2	9,2	9,1	9,4
			NC	10,1	10,0	10,4	10,0	9,8
	Lote 2	0	C	8,5	8,5	8,2	8,4	8,4
		4	C	9,0	9,1	9,4	9,4	9,6
		8	C	9,9	10,1	9,8	9,7	9,8
			NC	11,0	10,9	10,7	10,5	10,4
		12	C	9,3	9,0	8,9	9,1	8,8
			NC	9,4	9,7	9,9	9,4	9,7
Sementes maiores ²	Lote 1	0	C	7,8	8,0	8,0	8,5	8,0
		4	C	9,0	9,0	8,7	8,8	9,1
		8	C	9,8	9,3	9,1	9,7	9,4
			NC	10,0	9,9	10,0	10,7	10,4
		12	C	8,5	8,4	8,3	8,6	8,9
			NC	9,3	9,2	9,1	9,4	9,1
	Lote 2	0	C	7,9	7,9	8,1	8,2	8,4
		4	C	9,2	9,0	9,2	9,1	9,2
		8	C	9,1	9,4	9,0	8,9	9,6
			NC	10,3	10,3	10,2	10,2	9,9
		12	C	8,7	8,8	8,8	8,4	8,2
			NC	9,6	9,2	9,3	9,2	9,6

¹Sementes menores (peneira 16/64"); ²sementes maiores (peneira 22/64"). ³C: ambiente controlado; ⁴NC: ambiente não controlado.

1.3.2 Avaliação do potencial fisiológico de sementes menores

Avaliando o efeito do tratamento de sementes com Zn para sementes menores do lote 1, armazenadas sob condições controladas, verifica-se que não houve efeito do tratamento sobre a germinação. Com relação ao vigor, houve efeito das doses para a primeira contagem de germinação e índice de uniformidade de crescimento e da interação doses X épocas para o índice de velocidade de emergência de plântulas em areia, índice de vigor e comprimento de plântulas (Tabela 5).

Tabela 5. Resumo da análise de variância dos testes fisiológicos: germinação (G), primeira contagem de germinação (PCG), teste de frio (TF), emergência de plântulas em campo (EC) e em areia (EA), índice de velocidade de emergência de plântulas em areia (IVE) e índices de vigor (IV) e de uniformidade (IU) e comprimento das plântulas (CP), obtidos pelo software SVIS, para sementes menores de milho do lote 1, segundo as doses de Zn em tratamento de sementes e as épocas de armazenamento em ambiente controlado.

Doses (D)¹	G	PCG	TF	EC	EA	IVE	IV	IU	CP
	----- % -----								- cm -
0	96	87	90	89	94	12,0	569	887	8,1
50	97	91	93	89	97	12,5	634	886	9,6
100	96	91	93	90	95	12,4	656	887	10,4
150	95	90	93	90	96	12,4	648	877	10,1
200	97	93	92	88	96	12,4	674	870	10,9
Teste de F	1,9 ^{ns}	5,3**	1,5 ^{ns}	0,3 ^{ns}	2,2 ^{ns}	2,7*	20,5**	4,5**	21,6**
Regressão linear	0,2 ^{ns}	12,8**	2,0 ^{ns}	0,1 ^{ns}	1,4 ^{ns}	4,5*	63,6**	13,8**	70,8**
Regressão quadrática	1,0 ^{ns}	0,3 ^{ns}	2,8 ^{ns}	0,6 ^{ns}	2,4 ^{ns}	3,7*	10,4**	3,5 ^{ns}	7,9**
Épocas (E)²									
0	96	90	91	93	97	17,0	705	888	11,5
4	95	94	93	82	94	15,3	837	892	15,2
8	95	87	92	93	95	8,1	503	877	6,3
12	98	92	93	89	96	9,0	499	869	6,2
Teste de F	3,2*	12,7**	1,5 ^{ns}	29,1**	3,8**	1792,7**	431,1**	9,9**	469,7**
Regressão linear	2,4 ^{ns}	0,5 ^{ns}	0,8 ^{ns}	0,2 ^{ns}	0,5 ^{ns}	4398,8**	719,9**	23,5**	760,8**
Regressão quadrática	6,8**	0,5 ^{ns}	1,2 ^{ns}	15,1**	8,6**	160,4**	71,8**	3,3 ^{ns}	83,3**
Interação D * E	1,1 ^{ns}	1,8 ^{ns}	1,4 ^{ns}	1,2 ^{ns}	1,7 ^{ns}	2,0*	4,8**	1,7 ^{ns}	5,0**
CV (%)	2,76	4,25	4,13	5,02	2,96	3,80	8,83	2,58	14,57

¹ Doses: 0, 50, 100, 150 e 200 g Zn.ha⁻¹. ² Épocas: 0, 4, 8 e 12 meses. ^{ns} Não significativo. * e ** Significativo pelo teste de F a 0,05 e 0,01 de probabilidade, respectivamente.

O Zn disponibilizado via tratamento de sementes promoveu o aumento da velocidade de germinação das plântulas (Figura 4A), da velocidade de emergência de plântulas em areia, aos 0 meses (Figura 4B) e o seu efeito foi mais evidente na análise de imagens do comprimento de plântulas ao terceiro dia de germinação, o qual promoveu maior crescimento de plântulas e índice de vigor aos 4, 8 e 12 meses de armazenamento (Figura 5A e B), embora o índice de uniformidade tenha reduzido com o aumento das doses de Zn (Figura 5C).

Figura 4. Primeira contagem de germinação (PCG) (A) e índice de velocidade de emergência de plântulas em areia (IVE) (B) para **sementes menores** de milho do **lote 1**, armazenadas em ambiente com **condições controladas**, segundo as doses de Zn em tratamento de sementes.

Figura 5. Comprimento de plântulas (CP) (A), índice de vigor (IV) (B) e índice de uniformidade (IU) (C) para **sementes menores** de milho do **lote 1**, armazenadas em ambiente com **condições controladas**, segundo as doses de Zn em tratamento de sementes. CP¹ e IV¹: eixo para 0 e 4 meses e CP² e IV²: eixo para 8 e 12 meses.

Sementes menores do lote 2 armazenadas sob condições controladas e dos lotes 1 e 2 armazenadas em ambiente não controlado foram as mais favorecidas pelo Zn disponibilizado via tratamento.

A análise de variância demonstrou que, para sementes do lote 1 armazenadas em ambiente não controlado, houve efeito significativo da interação doses X épocas para as variáveis germinação, primeira contagem de germinação e teste de frio; efeito de doses para a emergência de plântulas em areia, índice de velocidade de emergência de plântulas em areia, índices de vigor e de uniformidade e comprimento de plântulas (Tabela 6).

Tabela 6. Resumo da análise de variância dos testes fisiológicos: germinação (G), primeira contagem de germinação (PCG), teste de frio (TF), emergência de plântulas em campo (EC) e em areia (EA), índice de velocidade de emergência de plântulas em areia (IVE) e índices de vigor (IV) e de uniformidade (IU) e comprimento das plântulas (CP), obtidos pelo software SVIS, para sementes menores de milho do lote 1, segundo as doses de Zn em tratamento de sementes e as épocas de armazenamento em ambiente não controlado.

Doses (D) ¹	G	PCG	TF	EC	EA	IVE	IV	IU	CP
	----- % -----								- cm -
0	92	75	77	89	89	10,0	461	857	5,4
50	96	87	86	88	94	10,9	506	861	6,3
100	95	83	87	86	96	11,0	523	864	6,9
150	92	78	77	85	92	10,4	485	833	5,9
200	92	82	83	89	90	10,6	522	843	6,9
Teste de F	3,5**	9,2**	9,7**	0,7 ^{ns}	11,1**	10,2**	7,8**	5,5**	7,2**
Regressão linear	1,3 ^{ns}	0,4 ^{ns}	0,4 ^{ns}	0,2 ^{ns}	0,2 ^{ns}	3,7 ^{ns}	11,2**	9,7**	11,8**
Regressão quadrática	7,7**	8,5**	7,0**	2,2 ^{ns}	37,7**	21,1**	4,0*	1,1 ^{ns}	2,9 ^{ns}
Épocas (E)²									
0	96	90	91	93	97	17,0	705	888	11,5
8	93	74	80	85	88	6,9	409	851	3,9
12	91	78	75	83	92	7,8	384	816	3,4
Teste de F	12,3**	45,8**	49,2**	8,9**	47,3**	3514,6**	604,1**	68,4**	623,3**
Regressão linear	24,6**	65,8**	98,1**	17,4**	48,6**	5881,3**	1126,7**	132,2**	1153,4**
Regressão quadrática	0,0 ^{ns}	25,8**	0,2 ^{ns}	0,3 ^{ns}	45,9**	1147,8**	81,5**	4,6*	93,2**
Interação D * E	3,1**	3,4**	3,5**	1,7 ^{ns}	1,5 ^{ns}	0,8 ^{ns}	1,1 ^{ns}	1,5 ^{ns}	1,0 ^{ns}
CV (%)	3,63	6,76	6,33	9,16	3,08	4,01	10,31	3,62	20,68

¹ Doses: 0, 50, 100, 150 e 200 g Zn.ha⁻¹. ² Épocas: 0, 8 e 12 meses. ^{ns} Não significativo. * e ** Significativo pelo teste de F a 0,05 e 0,01 de probabilidade, respectivamente.

Sementes do lote 1 tratadas com as doses de 50 e 150 g Zn.ha⁻¹, correspondentes a D1 e D3 no gráfico, e armazenadas sob condições não controladas, não reduziram a germinação durante o armazenamento (Figura 6B); aos 8 e 12 meses de armazenamento em condições não

controladas, sementes tratadas com doses intermediárias apresentaram maior germinação (Figura 6A).

Além do melhor desempenho de germinação de sementes tratadas do lote 1, durante o armazenamento sob condições não controladas, houve também melhoria do vigor de sementes; aos 8 e 12 meses, sementes tratadas com cerca de 100 g de Zn.ha^{-1} apresentaram maior velocidade da germinação (Figura 6C) e sementes não tratadas apresentaram maior redução da velocidade da germinação ao longo do armazenamento (Figura 6D).

Figura 6. Germinação (A) e (B) e primeira contagem de germinação (PCG) (C) e (D) para sementes **menores** de milho do **lote 1** armazenadas em **ambiente com condições não controladas**, as quais Test, D1, D2, D3 e D4 correspondem as doses 0, 50, 100, 150 e 200 g Zn.ha^{-1} . nsNão significativo pelo Teste F ($p < 0,05$). *Significativo pelo Teste F ($p < 0,05$).

Sementes tratadas com a dose recomendada (100 g Zn.ha^{-1}) também apresentaram melhores resultados com relação ao vigor durante o armazenamento em ambiente não controlado, com maior emergência de plântulas pelo teste de frio aos 12 meses de armazenamento (Figura 7A e 7B) e de emergência de plântulas em areia e velocidade da

emergência de plântulas em areia, independentemente da época de armazenamento (Figuras 7C e 7D).

Figura 7. Teste de frio (TF) (A) e (B), emergência de plântulas em areia (EA) (C) e índice de velocidade de plântulas em areia (IVE) (D) para sementes **menores** de milho do **lote 1** armazenadas em **ambiente com condições não controladas**, as quais Test, D1, D2, D3 e D4 correspondem as doses 0, 50, 100, 150 e 200 g Zn.ha⁻¹. nsNão significativo pelo Teste F (p<0,05). *Significativo pelo Teste F (p<0,05).

O tratamento promoveu o aumento do comprimento de plântulas e índice de vigor, independentemente da época de avaliação para sementes do lote 1 armazenadas sob condições não controladas (Figura 8A e 8B). Em contrapartida, a uniformidade de crescimento das plântulas foi reduzida pelo tratamento (Figura 8C).

Figura 8. Comprimento de plântulas (CP) (A), índice de vigor (IV) (B) e índice de uniformidade (IU) (C) para **sementes menores** de milho do **lote 1**, armazenadas em **ambiente com condições não controladas**, segundo as doses de Zn em tratamento de sementes.

Para sementes menores do lote 2, armazenadas sob condições controladas, a interação doses X épocas foi significativa para a primeira contagem de germinação, emergência de plântulas em areia, índice de velocidade de emergência de plântulas em areia, índice de vigor e comprimento de plântulas, e houve efeito apenas das doses para as variáveis teste de frio e índice de uniformidade de desenvolvimento de plântulas (Tabela 7).

Tabela 7. Resumo da análise de variância dos testes fisiológicos: germinação (G), primeira contagem de germinação (PCG), teste de frio (TF), emergência de plântulas em campo (EC) e em areia (EA), índice de velocidade de emergência de plântulas em areia (IVE) e índices de vigor (IV) e de uniformidade (IU) e comprimento das plântulas (CP), obtidos pelo software SVIS, para sementes menores de milho do lote 2, segundo as doses de Zn em tratamento de sementes e as épocas de armazenamento em ambiente controlado.

Doses (D)¹	G	PCG	TF	EC	EA	IVE	IV	IU	CP
	----- % -----								- cm -
0	94	83	84	86	93	11,1	514	848	6,5
50	94	83	88	85	92	11,4	507	856	6,4
100	95	84	88	84	93	11,4	523	861	6,8
150	93	83	85	86	91	11,1	533	861	7,1
200	92	83	83	86	91	11,3	570	838	8,0
Teste de F	1,1 ^{ns}	0,4 ^{ns}	3,5**	0,3 ^{ns}	2,0 ^{ns}	1,5 ^{ns}	12,1**	4,8**	10,3**
Regressão linear	2,7 ^{ns}	0,1 ^{ns}	0,9 ^{ns}	0,1 ^{ns}	4,1*	0,0 ^{ns}	38,2**	1,2 ^{ns}	33,7**
Regressão quadrática	1,1 ^{ns}	0,8 ^{ns}	12,1**	0,7 ^{ns}	0,8 ^{ns}	1,5 ^{ns}	9,0**	15,9**	6,5**
Épocas (E)²									
0	92	82	84	91	94	15,5	595	866	8,7
4	95	89	89	74	90	14,0	652	856	10,0
8	94	81	84	91	92	7,4	418	854	4,2
12	93	80	85	86	92	8,1	453	836	5,1
Teste de F	2,0 ^{ns}	13,1**	4,4**	46,0**	4,0**	1288,3**	305,9**	9,0**	261,2**
Regressão linear	0,5 ^{ns}	7,8**	0,2 ^{ns}	0,5 ^{ns}	1,9 ^{ns}	3179,9**	533,8**	24,5**	462,8**
Regressão quadrática	5,2*	11,0**	2,3 ^{ns}	28,9**	6,5**	96,8**	3,1 ^{ns}	0,8 ^{ns}	1,3 ^{ns}
Interação D * E	1,7 ^{ns}	2,7**	1,8 ^{ns}	1,8 ^{ns}	2,0*	2,9**	3,9**	1,3 ^{ns}	3,4**
CV (%)	3,88	6,25	5,89	6,19	3,82	4,49	8,54	3,38	17,63

¹ Doses: 0, 50, 100, 150 e 200 g Zn.ha⁻¹. ² Épocas: 0, 4, 8 e 12 meses. ^{ns} Não significativo. * e ** Significativo pelo teste de F a 0,05 e 0,01 de probabilidade, respectivamente.

O tratamento de sementes propiciou incremento do potencial fisiológico das sementes do lote 2 armazenadas sob condições controladas. Aos 8 e 12 meses de armazenamento, sementes tratadas tiveram um aumento linear da velocidade de germinação com o aumento das doses de Zn (Figuras 9A). Sementes tratadas com a dose recomendada (100 g Zn.ha⁻¹) apresentaram maior emergência de plântulas em areia aos 4 meses de armazenamento (Figura 9C) e emergência de plântulas pelo teste de frio, independentemente da época de avaliação (Figura 9B). Sementes não tratadas apresentaram redução da emergência de plântulas em areia aos 4 e 8 meses de armazenamento (Figura 9D).

Figura 9. Primeira contagem de germinação (PCG) (A), teste de frio (TF) (B) e emergência de plântulas em areia (EA) (C) e (D) para **sementes menores** de milho do **lote 2** armazenadas em ambiente com **condições controladas**, as quais Test, D1, D2, D3 e D4 correspondem as doses 0, 50, 100, 150 e 200 g Zn.ha⁻¹. ^{ns}Não significativo pelo Teste F ($p < 0,05$). *Significativo pelo Teste F ($p < 0,05$).

Aos 0 meses, a dose de 200 g Zn.ha⁻¹ promoveu maior comprimento de plântulas e índice de vigor e aos 4 meses houve aumento linear destes parâmetros (Figura 10A e 10B). O índice de uniformidade de desenvolvimento das plântulas foi maior na dose de cerca 100 g Zn.ha⁻¹, independentemente da época de avaliação (Figura 10C).

Figura 10. Comprimento de plântulas (CP) (A), índice de vigor (IV) (B) e índice de uniformidade (IU) (C) para **sementes menores** de milho do **lote 2** armazenadas em ambiente com **condições controladas**, segundo as doses de Zn em tratamento de sementes. ^{ns}Não significativo pelo Teste F ($p < 0,05$). *Significativo pelo Teste F ($p < 0,05$).

O tratamento de sementes com Zn também influenciou o vigor de sementes do lote 2; quando essas foram armazenadas sob condições não controladas, houve efeito da interação doses X épocas para as variáveis emergência de plântulas em campo e em areia, índice de velocidade de emergência de plântulas em areia e para as variáveis determinadas pela análise de imagem de plântulas (Tabela 8).

Tabela 8. Resumo da análise de variância dos testes fisiológicos: germinação (G), primeira contagem de germinação (PCG), teste de frio (TF), emergência de plântulas em campo (EC) e em areia (EA), índice de velocidade de emergência de plântulas em areia (IVE) e índices de vigor (IV) e de uniformidade (IU) e comprimento das plântulas (CP), obtidos pelo software SVIS, para sementes menores de milho do lote 2, segundo as doses de Zn em tratamento de sementes e as épocas de armazenamento em ambiente não controlado.

Doses (D)¹	G	PCG	TF	EC	EA	IVE	IV	IU	CP
			----- % -----						- cm -
0	90	72	63	82	86	9,3	425	820	4,3
50	92	71	69	81	86	9,5	403	803	4,0
100	89	69	69	80	88	9,4	403	832	3,9
150	90	68	67	82	86	9,3	429	829	4,5
200	87	67	66	82	82	9,3	438	790	4,9
Teste de F	1,8 ^{ns}	0,9 ^{ns}	1,5 ^{ns}	0,3 ^{ns}	2,3 ^{ns}	0,2 ^{ns}	5,3**	7,1**	5,7**
Regressão linear	3,5 ^{ns}	3,6 ^{ns}	0,5 ^{ns}	0,1 ^{ns}	3,5 ^{ns}	0,1 ^{ns}	5,8*	2,5 ^{ns}	9,3**
Regressão quadrática	2,3 ^{ns}	0,1 ^{ns}	4,3*	0,6 ^{ns}	4,5*	0,3 ^{ns}	11,8**	9,2**	12,1**
Épocas (E)²									
0	92	82	84	91	94	15,5	595	866	8,7
8	90	73	63	82	82	6,1	343	822	2,3
12	86	54	53	71	81	6,5	320	756	2,0
Teste de F	9,3**	77,9**	102,1**	95,8**	38,2**	1648,4**	812,7**	111,9**	809,1**
Regressão linear	17,3**	135,2**	204,1**	178,9**	69,7**	2863,1**	1520,0**	203,3**	1489,3**
Regressão quadrática	1,3 ^{ns}	20,6**	0,1 ^{ns}	12,8**	6,6**	433,7**	105,5**	20,4**	128,8**
Interação D * E	1,4 ^{ns}	1,4 ^{ns}	1,4 ^{ns}	2,4*	2,6*	3,1**	9,7**	3,4**	9,5**
CV (%)	5,11	10,44	10,58	5,46	6,14	6,23	9,01	4,52	21,81

¹ Doses: 0, 50, 100, 150 e 200 g Zn.ha⁻¹. ² Épocas: 0, 8 e 12 meses. ^{ns} Não significativo. * e ** Significativo pelo teste de F a 0,05 e 0,01 de probabilidade, respectivamente.

De forma geral, o vigor das sementes menores do lote 2, armazenadas em condições não controladas é reduzido tanto para sementes tratadas, bem como para aquelas não tratadas; porém, mesmo com este comportamento, sementes tratadas apresentaram os melhores resultados de vigor quando comparadas às sementes não tratadas.

Aos 12 meses de armazenamento em condições não controladas, houve aumento linear da emergência de plântulas em campo com aumento do fornecimento de Zn às sementes do lote 2 (Figura 11A); as sementes tratadas com as doses 50, 100 150 g Zn.ha⁻¹ apresentaram maiores valores de emergência de plântulas em areia e do índice de velocidade de emergência de plântulas em areia (Figuras 11B e 11C).

Figura 11. Emergência de plântulas em campo (EC), emergência de plântulas em areia (B) e índice de velocidade de emergência de plântulas em areia (C) para **sementes menores** de milho do **lote 2** armazenadas em ambiente com **condições não controladas**. ^{ns}Não significativo pelo Teste F ($p < 0,05$). *Significativo pelo Teste F ($p < 0,05$). ¹Valores seguidos de letras minúsculas iguais, dentro de cada dose de Zn, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

O tratamento de sementes propiciou o aumento do comprimento e do índice de vigor de plântulas na maior dose (200 g Zn.ha⁻¹), na primeira época de avaliação (Figura 12A e 12B); para o índice de uniformidade, aos 12 meses, houve efeito do tratamento, entretanto, a maior dose de Zn não foi adequada (Figura 12C).

Figura 12. Comprimento de plântulas (CP) (A), índice de vigor (IV) (B) e índice de uniformidade (IU) (C) para **sementes menores** de milho do **lote 2** armazenadas em ambiente com **condições não controladas**, segundo as doses de Zn em tratamento de sementes. CP¹ e IV¹: eixo para 0 e 4 meses e CP² e IV²: eixo para 8 e 12 meses. ^{ns}Não significativo pelo Teste F ($p < 0,05$). *Significativo pelo Teste F ($p < 0,05$).

1.3.3 Avaliação do potencial fisiológico de sementes maiores

Para sementes maiores do lote 1, armazenadas sob condições controladas, o tratamento de sementes com Zn não teve efeito sobre a germinação, entretanto o vigor foi influenciado. Pela análise de variância, houve efeito da interação doses X épocas para as seguintes variáveis: primeira contagem de germinação, teste de frio, emergência de plântulas em areia, índice de velocidade de plântulas em areia, índice de vigor e comprimento de plântulas e efeito isolado de doses para as variáveis emergência de plântulas em campo e índice de uniformidade de desenvolvimento de plântulas (Tabela 9).

Tabela 9. Resumo da análise de variância dos testes fisiológicos: germinação (G), primeira contagem de germinação (PCG), teste de frio (TF), emergência de plântulas em campo (EC) e em areia (EA), índice de velocidade de emergência de plântulas em areia (IVE) e índices de vigor (IV) e de uniformidade (IU) e comprimento das plântulas (CP), obtidos pelo software SVIS, para sementes maiores de milho do lote 1, segundo as doses de Zn em tratamento de sementes e as épocas de armazenamento em ambiente controlado.

Doses (D)¹	G	PCG	TF	EC	EA	IVE	IV	IU	CP
	----- % -----								--- cm ---
0	99	92	90	90	98	12,2	598	884	9,0
50	99	94	94	91	97	12,6	679	897	11,4
100	99	96	93	93	99	12,7	614	890	9,4
150	99	94	93	95	99	12,5	593	879	8,9
200	99	97	93	93	98	12,8	702	888	11,8
Teste de F	0,7 ^{ns}	6,7**	3,0*	4,6**	2,1 ^{ns}	3,9**	55,7**	6,4**	53,7**
Regressão linear	0,9 ^{ns}	17,0**	2,1 ^{ns}	13,9**	4,7 ^{ns}	9,5**	33,6**	1,6 ^{ns}	27,3**
Regressão quadrática	1,0 ^{ns}	0,1 ^{ns}	5,5**	2,6 ^{ns}	0,7 ^{ns}	2,3 ^{ns}	15,4**	0,92 ^{ns}	11,0**
Épocas (E)²									
0	99	95	91	95	100	17,5	742	897	12,9
4	99	98	95	80	97	15,5	828	895	15,4
8	99	91	90	98	98	8,2	461	883	5,3
12	99	94	94	97	98	9,0	519	875	6,9
Teste de F	1,0 ^{ns}	18,7**	7,2**	97,3**	7,8**	1931,4**	857,7**	19,9**	782,8**
Regressão linear	0,6	14,3**	2,0 ^{ns}	39,2**	6,2*	4811,0**	1496,2**	56,6**	1344,6**
Regressão quadrática	1,2 ^{ns}	0,1 ^{ns}	0,1 ^{ns}	67,5**	8,1**	168,6**	5,2*	1,3 ^{ns}	8,28**
Interação D * E	0,8 ^{ns}	2,7**	3,2**	1,2 ^{ns}	2,6**	2,1*	17,4**	1,7 ^{ns}	18,9**
CV (%)	1,47	3,25	4,11	4,19	1,85	3,75	6,65	1,89	11,95

¹ Doses: 0, 50, 100, 150 e 200 g Zn.ha⁻¹. ² Épocas: 0, 4, 8 e 12 meses. ^{ns} Não significativo. * e ** Significativo pelo teste de F a 0,05 e 0,01 de probabilidade, respectivamente.

O Zn proporcionou efeito benéfico ao vigor das sementes do lote 1 armazenadas sob condições controladas. Verifica-se que sementes tratadas apresentaram maior velocidade de germinação aos 0, 8 e 12 meses (Figura 13B) e as doses de 100 e 200 g Zn.ha⁻¹ apresentaram melhores resultados, pois não tiveram variação durante o armazenamento (Figura 13A). Houve também aumento linear da emergência de plântulas no teste de frio aos 0 meses (Figura 13C), da emergência de plântulas em campo, independentemente da época de armazenamento com aumento das doses de Zn (Figura 13D) e da emergência de plântulas em areia e do índice de velocidade de emergência de plântulas em areia, aos 4 meses de armazenamento (Figura 14A e 14B).

Figura 13. Primeira contagem de germinação (PCG) (A) e (B), teste de frio (TF) (C) e emergência de plântulas em campo (EC) (D) de **sementes maiores** de milho do **lote 1** armazenadas em ambiente com **condições controladas**, as quais Test, D1, D2, D3 e D4 correspondem a testemunha e as doses 50, 100, 150 e 200 g Zn.ha⁻¹, respectivamente. ^{ns}Não significativo pelo Teste F (p<0,05). *Significativo pelo Teste F (p<0,05).

Figura 14. Emergência de plântulas em areia (EA) (A), índice de velocidade de emergência de plântulas em areia (IVE) (B), comprimento de plântulas (CP) (C) e índice de vigor (IV) (D) de **sementes maiores** de milho do **lote 1** armazenadas em ambiente com **condições controladas**. nsNão significativo pelo Teste F ($p < 0,05$). *Significativo pelo Teste F ($p < 0,05$).

Pelos resultados dos testes de vigor, observa-se que o tratamento na maior dose avaliada pode promover o incremento no vigor de sementes do lote de maior qualidade (lote 1) quando armazenadas em condições controladas por 12 meses, o que pode ser verificado também pela análise de imagens de plântulas, na qual sementes tratadas com a dose de 200 g Zn.ha⁻¹ apresentaram maior comprimento de plântulas e índice de vigor, aos 0 e 12 meses de armazenamento (Figura 14C e 14D). O índice de uniformidade não se ajustou aos modelos de regressão linear e quadrático.

Embora o Zn tenha ocasionado efeitos notáveis, favorecendo o vigor das sementes maiores do lote de melhor qualidade (lote 1), para sementes do lote 2, as quais possuíam qualidade inferior, o efeito do tratamento de sementes no vigor, ao longo do armazenamento em condições controladas, foi quase nulo. Houve efeito do tratamento apenas para os testes de primeira contagem de germinação, emergência de plântulas em campo e dos parâmetros avaliados na análise computadorizada de imagens de plântulas (Tabela 10).

Tabela 10. Resumo da análise de variância dos testes fisiológicos: germinação (G), primeira contagem de germinação (PCG), teste de frio (TF), emergência de plântulas em campo (EC) e em areia (EA), índice de velocidade de emergência de plântulas em areia (IVE) e índices de vigor (IV) e de uniformidade (IU) e comprimento das plântulas (CP), obtidos pelo software SVIS, para sementes maiores de milho do lote 2, segundo as doses de Zn em tratamento de sementes e as épocas de armazenamento em ambiente controlado.

Doses (D)¹	G	PCG	TF	EC	EA	IVE	IV	IU	CP
	----- % -----								-- cm --
0	91	80	79	85	88	10,5	561	847	7,7
50	94	86	85	87	89	10,9	522	834	6,6
100	92	87	79	84	91	11,1	560	846	7,5
150	92	83	82	84	89	10,8	525	839	6,8
200	91	83	81	85	90	11,1	618	848	9,4
Teste de F	1,6 ^{ns}	5,6**	2,4 ^{ns}	1,0 ^{ns}	1,1 ^{ns}	2,4 ^{ns}	18,4**	1,3 ^{ns}	21,6**
Regressão linear	1,2 ^{ns}	1,2 ^{ns}	0,3 ^{ns}	0,6 ^{ns}	2,2 ^{ns}	4,2 ^{ns}	16,9**	0,1 ^{ns}	23,5**
Regressão quadrática	2,5 ^{ns}	14,6**	0,8 ^{ns}	0,1 ^{ns}	0,6 ^{ns}	1,4 ^{ns}	32,5**	1,6 ^{ns}	41,3**
Épocas (E)²									
0	94	85	79	91	93	15,3	637	861	9,6
4	94	89	86	73	85	12,9	661	834	10,2
8	91	84	78	87	89	7,2	424	840	4,2
12	89	78	81	88	90	8,1	508	836	6,4
Teste de F	6,3**	16,7**	6,1**	54,1**	10,0**	686,8**	190,5**	6,9**	178,9**
Regressão linear	17,1**	25,1**	0,2 ^{ns}	1,1 ^{ns}	0,5 ^{ns}	1707,8**	298,4**	10,6**	281,6**
Regressão quadrática	0,7 ^{ns}	20,7**	1,6 ^{ns}	71,6**	18,7**	125,2**	13,5**	6,2**	13,3**
Interação D * E	0,4 ^{ns}	1,1 ^{ns}	1,5 ^{ns}	2,3*	1,2 ^{ns}	1,7 ^{ns}	16,0**	2,1*	17,0**
CV (%)	4,29	5,62	7,35	5,73	5,62	6,05	10,24	3,96	19,54

¹ Doses: 0, 50, 100, 150 e 200 g Zn.ha⁻¹. ² Épocas: 0, 4, 8 e 12 meses. ^{ns} Não significativo. * e ** Significativo pelo teste de F a 0,05 e 0,01 de probabilidade, respectivamente.

O tratamento de sementes com Zn proporcionou aumento na velocidade de germinação de sementes do lote 2, armazenadas sob condições controladas, independentemente da época de armazenamento (Figura 15A) e redução da emergência de plântulas em campo, aos 4 meses; entretanto, aos 8 meses, o tratamento ocasionou aumento, com a dose de cerca de 100 g Zn.ha⁻¹ apresentando os melhores resultados (Figura 15B).

Figura 15. Primeira contagem de germinação (PCG) (A) e emergência de plântulas em campo (EC) (B) para **sementes maiores** de milho do **lote 2** armazenadas em ambiente com **condições controladas**. ^{ns}Não significativo pelo Teste F ($p < 0,05$). *Significativo pelo Teste F ($p < 0,05$).

Quando se avalia o crescimento das plântulas, sementes do lote 2 revestidas com 200 g Zn.ha⁻¹ aos 0 e 4 meses de armazenamento em condições controladas, apresentaram maior comprimento de plântulas e índice de vigor; aos 4 meses, para esta mesma dose, o índice de uniformidade foi maior; entretanto, aos 12 meses o tratamento reduziu o comprimento das plântulas e o vigor, embora a uniformidade do crescimento das plântulas tenha sido mantido (Figura 16A, 16B, 16C e 16D).

Figura 16. Comprimento de plântulas (CP) (A), índice de vigor (IV) (B) e índice de uniformidade de plântulas (IU) (C) e (D) de **sementes maiores** de milho do **lote 2** armazenadas em ambiente com **condições controladas**, as quais Test, D1, D2, D3 e D4 correspondem a testemunha e as doses 50, 100, 150 e 200 g Zn.ha⁻¹, respectivamente. ^{ns}Não significativo pelo Teste F ($p < 0,05$). *Significativo pelo Teste F ($p < 0,05$).

O tratamento afetou negativamente o vigor de sementes maiores dos lotes 1 e 2 armazenadas sob condições não controladas. Para o lote 1, houve efeito do tratamento para os testes de frio, de emergência de plântulas, índice de velocidade de emergência de plântulas em areia e para as variáveis avaliadas pela análise de imagens de plântulas – índice de vigor e comprimento de plântulas (Tabela 11); a emergência de plântulas no teste de frio e em areia foi reduzida pelo tratamento (Figuras 17A e 17B), embora sementes tratadas tenham apresentado comportamento semelhante à testemunha com relação ao índice de velocidade de emergência de plântulas em areia (Figura 17C).

Tabela 11. Resumo da análise de variância dos testes fisiológicos: germinação (G), primeira contagem de germinação (PCG), teste de frio (TF), emergência de plântulas em campo (EC) e em areia (EA), índice de velocidade de emergência de plântulas em areia (IVE) e índices de vigor (IV) e de uniformidade (IU) e comprimento das plântulas (CP), obtidos pelo software SVIS, para sementes maiores de milho do lote 1, segundo as doses de Zn em tratamento de sementes e as épocas de armazenamento em ambiente não controlado.

Doses (D)¹	G	PCG	TF	EC	EA	IVE	IV	IU	CP
	-----	-----	% -----	-----	-----				-- cm --
0	96	78	78	90	95	10,7	496	845	6,3
50	96	80	81	90	92	10,6	492	840	6,2
100	96	79	82	93	91	10,6	496	844	6,3
150	94	77	75	92	91	10,2	471	823	5,6
200	95	83	77	92	91	10,5	539	840	7,5
Teste de F	0,6 ^{ns}	2,4 ^{ns}	2,6*	0,8 ^{ns}	4,3**	1,7 ^{ns}	16,1**	2,6*	21,9**
Regressão linear	0,8 ^{ns}	3,0 ^{ns}	2,2 ^{ns}	1,9 ^{ns}	9,2**	3,3 ^{ns}	11,1**	2,4 ^{ns}	16,3**
Regressão quadrática	0,0 ^{ns}	1,5 ^{ns}	1,5 ^{ns}	0,9 ^{ns}	7,6**	0,7 ^{ns}	25,4**	0,8 ^{ns}	31,7**
Épocas (E)²									
0	99	95	91	95	100	17,5	742	897	12,9
8	96	76	74	92	91	7,1	365	827	2,9
12	92	68	71	87	85	7,0	389	791	3,4
Teste de F	23,0**	116,5**	61,2**	17,1**	99,7**	2852,0**	1954,9**	165,8**	2384,5**
Regressão linear	41,5**	232,9**	117,8**	29,9**	196,6**	5109,2**	3346,2**	331,5**	4111,18**
Regressão quadrática	4,6 ^{ns}	0,1 ^{ns}	4,7*	4,3*	2,9 ^{ns}	594,7**	563,6**	0,0 ^{ns}	657,74**
Interação D * E	0,8 ^{ns}	2,0 ^{ns}	5,1**	1,7 ^{ns}	4,6**	2,4*	12,5**	0,9 ^{ns}	15,0**
CV (%)	3,45	7,34	7,73	4,82	3,67	4,79	6,76	3,55	12,72

¹ Doses: 0, 50, 100, 150 e 200 g Zn.ha⁻¹. ² Épocas: 0, 8 e 12 meses. ^{ns} Não significativo. * e ** Significativo pelo teste de F a 0,05 e 0,01 de probabilidade, respectivamente.

Figura 17. Teste de frio (TF) (A), emergência de plântulas em areia (EA) (B) e índice de velocidade de emergência de plântulas em areia (IVE) (C) para **sementes maiores** de milho do **lote 1** armazenadas em ambiente com **condições não controladas**, as quais Test, D1, D2, D3 e D4 correspondem a testemunha e as doses 50, 100, 150 e 200 g Zn.ha⁻¹. ^{ns}Não significativo pelo Teste F (p<0,05). *Significativo pelo Teste F (p<0,05). ¹Valores seguidos de letras minúsculas iguais na dentro de cada época de armazenamento não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

Aos 0 e 12 meses de armazenamento em condições não controladas, doses intermediárias reduziram o comprimento de plântulas e o índice de vigor de sementes do lote 1, com a dose de 200 g Zn.ha⁻¹ apresentando os melhores resultados; entretanto, aos 8 meses, o efeito foi contrário, a maior dose propiciou redução acentuada do crescimento de plântulas (Figura 18A e 18B). O índice de uniformidade não se ajustou aos modelos de regressão linear e quadrático.

Figura 18. Comprimento de plântulas (CP) (A) e índice de vigor (IV) (B) de **sementes maiores** de milho do **lote 1** armazenadas em ambiente com **condições não controladas**. CP¹ e IV¹: eixo para 0 e 4 meses e CP² e IV²: eixo para 8 e 12 meses. ^{ns}Não significativo pelo Teste F ($p < 0,05$). *Significativo pelo Teste F ($p < 0,05$).

O efeito adverso do tratamento foi mais severo para sementes do lote 2, de qualidade inferior, armazenadas sob condições não controladas (Tabela 12). Houve redução da germinação e do vigor influenciados pelo tratamento. Apesar da dose de cerca de 100 g Zn.ha⁻¹ ter favorecido a germinação das sementes, a maior dose avaliada (200 g Zn.ha⁻¹) foi prejudicial (Figura 19A).

Tabela 12. Resumo da análise de variância dos testes fisiológicos: germinação (G), primeira contagem de germinação (PCG), teste de frio (TF), emergência de plântulas em campo (EC) e em areia (EA), índice de velocidade de emergência de plântulas em areia (IVE) e índices de vigor (IV) e de uniformidade (IU) e comprimento das plântulas (CP), obtidos pelo software SVIS, para sementes maiores de milho do lote 2, segundo as doses de Zn em tratamento de sementes e as épocas de armazenamento em ambiente não controlado.

Doses (D)¹	G	PCG	TF	EC	EA	IVE	IV	IU	CP
	-----		%	-----					-- cm --
0	82	56	60	77	79	8,7	441	785	4,7
50	82	62	59	75	73	8,2	387	768	3,6
100	86	65	60	80	78	8,7	439	782	4,6
150	82	65	61	81	81	8,9	420	769	4,4
200	76	59	56	77	74	8,4	449	722	5,3
Teste de F	4,6**	4,6**	1,0 ^{ns}	1,8 ^{ns}	3,3*	2,6*	16,6**	8,8**	22,3**
Regressão linear	4,4*	2,0 ^{ns}	0,8 ^{ns}	1,0 ^{ns}	0,0 ^{ns}	0,0 ^{ns}	6,5**	21,7**	21,7**
Regressão quadrática	10,7**	16,2**	0,9 ^{ns}	1,4 ^{ns}	0,3 ^{ns}	0,2 ^{ns}	17,6**	7,4**	32,6**
Épocas (E)²									
0	94	85	79	91	93	15,3	637	861	9,6
8	80	61	54	76	71	5,3	313	731	1,8
12	70	38	44	66	66	5,2	333	704	2,2
Teste de F	84,7**	286,3*	138,8*	78,5**	98,9**	1807,4*	1486,2*	164,0*	1871,3*
Regressão linear	167,2*	556,4*	277,0*	155,9*	193,0*	3235,2*	2544,8*	318,0*	3237,0*
Regressão quadrática	2,1 ^{ns}	16,2**	0,6 ^{ns}	1,1 ^{ns}	4,8*	379,6**	427,7**	9,9**	505,7**
Interação D * E	1,0 ^{ns}	3,4**	2,6*	2,1 ^{ns}	1,8 ^{ns}	1,7 ^{ns}	27,3**	2,2**	33,8**
CV (%)	7,14	9,96	11,62	8,09	8,34	7,08	7,78	6,06	15,90

¹ Doses: 0, 50, 100, 150 e 200 g Zn.ha⁻¹. ² Épocas: 0, 8 e 12 meses. ^{ns} Não significativo. * e ** Significativo pelo teste de F a 0,05 e 0,01 de probabilidade, respectivamente.

Figura 19. Germinação (A), primeira contagem de germinação (PCG) (B) e teste de frio (TF) (C) para **sementes maiores** de milho do **lote 2** armazenadas em ambiente com **condições não controladas**. ^{ns}Não significativo pelo Teste F ($p < 0,05$). *Significativo pelo Teste F ($p < 0,05$). ¹Valores seguidos de letras minúsculas iguais, dentro de cada dose para o teste de PCG, e de cada época de armazenamento para o teste de TF, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Assim como para a germinação, o vigor das sementes maiores do lote 2 também diminuiu pelo tratamento de sementes com Zn, durante o armazenamento em condições não controladas. Ao longo do armazenamento, sementes tratadas apresentaram maior redução da velocidade da germinação em relação à testemunha (Figura 19B); o mesmo comportamento foi verificado aos 8 meses de armazenamento para a emergência de plântulas no teste de frio (Figura 19C). Os resultados obtidos para os testes de emergência e índice de velocidade de emergência de plântulas em areia não se ajustaram aos modelos de regressão linear e quadrático.

Aos 0 meses, o tratamento de sementes na maior dose ocasionou o aumento do comprimento e vigor de plântulas; aos 8 meses, a dose recomendada é melhor; porém, aos 12 meses, sementes tratadas reduzem o comprimento, índice de vigor e uniformidade de desenvolvimento das plântulas (Figura 20A, 20B e 20C).

Figura 20. Comprimento de plântulas (CP) (A), índice de vigor (IV) (B) e índice de uniformidade de plântulas de **sementes maiores** de milho do **lote 2** armazenadas em ambiente com **condições não controladas**. CP¹ e IV¹: eixo para 0 e 4 meses e CP² e IV²: eixo para 8 e 12 meses. ^{ns}Não significativo pelo Teste F (p<0,05). *Significativo pelo Teste F (p<0,05).

1.4 Discussão

Com relação a influência do efeito do tratamento em sementes de diferentes tamanhos, para sementes menores, não houve redução do potencial fisiológico ocasionado pelo tratamento de sementes; pelo contrário, o tratamento apresentou efeito benéfico às sementes menores dos dois lotes. Tal resultado contraria o que era esperado, pois as maiores concentrações de Zn na massa de sementes menores (Figura 3B) e por unidade de área (Figura 3C) não estão associadas ao efeito nocivo do tratamento ao potencial fisiológico, indicando que outros aspectos, possivelmente, causam este comportamento. Por outro lado, sementes maiores dos dois lotes, quando armazenadas sob condições não controladas, apresentaram toxidez pelo tratamento (Figuras 17, 18, 19 e 20), o que pode estar relacionado com a alteração da dinâmica de absorção do nutriente disponibilizado via tratamento de sementes durante a germinação.

Isto pode ser explicado pelo fato de sementes menores absorverem água mais rapidamente e de forma mais eficiente do que os tamanhos de sementes médias e grandes, como foi observado para sementes de milho sob condições de estresse hídrico (MUCHENA; GROGAN, 1977) e expostas ao tratamento com soluções de polietilenoglicol (PEG) (MURUNGU et al., 2005). Em ambos os trabalhos, sementes pequenas apresentaram maior percentual de germinação do que as sementes grandes, quando expostas à baixos potenciais hídricos. Neste contexto, sementes menores pela menor necessidade de água, possuem vantagens sob as sementes maiores pela maior eficiência de embebição devido à sua maior área por unidade de volume (BECKERT et al., 2000).

Outro aspecto que interfere na absorção de água durante a germinação refere-se ao potencial fisiológico das sementes. Sabe-se que a velocidade de embebição de água durante a germinação tem uma relação inversa com o potencial fisiológico das sementes (VILLELA et al., 2003). Durante o processo de germinação, sementes com menor vigor absorvem água mais rapidamente durante a fase I da germinação em comparação com as sementes de maior vigor; esse comportamento é atribuído ao processo de desestruturação das membranas, degradação de proteínas e carboidratos hidrossolúveis dos tecidos de reservas, que sementes de menor vigor apresentam, sendo intensificado em condições de armazenamento em condições não controladas (VILLELA et al., 2007).

Diante disso, sementes de tamanho maior, as quais necessitam naturalmente de quantidades maiores de água para a germinação quando comparadas às sementes menores, quando foram armazenadas sob condições não controladas, apresentaram redução considerável

do vigor durante este período, pelas condições mais desfavoráveis de temperatura e de umidade, especialmente as sementes maiores do lote 2, as quais já estavam com menor potencial fisiológico no início do armazenamento (Tabela 2) e podem ter absorvido maiores quantidades de água e, conseqüentemente, de Zn, o que ocasionou em efeito nocivo à germinação e ao vigor das sementes (Tabela 12), pela alteração na dinâmica de absorção de água.

Estudos anteriores têm demonstrado que sementes maiores deterioram mais rapidamente do que sementes menores (SHARMA et al., 1998, 2001). Uma das possíveis causas pode estar relacionada com a maior área superficial; sementes maiores têm maior área superficial quando comparadas às sementes pequenas e, portanto, teriam uma maior área exposta as condições desfavoráveis de armazenamento. Sharma e Maheshwari (2015), em experimento visando identificar o papel dos genes de reparo do DNA em resposta a condição de *priming* (1% KH_2PO_4) de sementes de grão de bico com 2 tamanhos (maiores e menores), verificaram que o dano após o *priming* não pode ser reparado tão rapidamente em sementes maiores quanto em sementes menores, ou podem haver danos irreparáveis em sementes maiores, levando às diferenças na emergência das plântulas e na germinação entre sementes maiores e menores, condicionadas e não condicionadas.

Salanenka e Taylor (2011), utilizando um composto denominado cumarina aplicado às sementes de feijão e de soja para simular o comportamento de produtos utilizados no tratamento de sementes durante o armazenamento em condições não controladas, também constataram que a fitotoxicidade do tratamento de sementes parece ser consequência do baixo vigor de sementes, resultante do envelhecimento durante o armazenamento e não pelo contato direto do componente com o embrião antes da embebição ou com a radícula.

Durante as primeiras 36 horas da germinação, ocorre alta mobilização do Zn, o qual é acumulado, principalmente, no embrião e camada aleurona das sementes e nas raízes primárias e coleoptilo das plântulas, conforme avaliado por Ozturk et al. (2006) para sementes de trigo. Quando em quantidades excessivas, o Zn pode interferir no metabolismo celular, resultando em ineficiências na diferenciação celular e expansão (LI et al., 2012). Sementes maiores do lote 2 tratadas com 200 g Zn.ha^{-1} , apresentaram percentual médio de germinação de 76% enquanto as não tratadas de 82%, após 12 meses de armazenamento (Tabela 12 e Figura 19A), ambas estão abaixo do padrão estipulado para a comercialização de sementes de milho (BRASIL, 2013), além deste aspecto, sementes tratadas também apresentaram maiores percentuais de sementes mortas (Figura 21), indicando que o efeito nocivo ocorreu, principalmente, durante a embebição de água na germinação, pois durante a execução do teste observou-se que as sementes haviam embebido água e cessado o processo de germinação antes que ocorresse a protrusão radicular.

Figura 21. Percentual de sementes mortas para **sementes maiores** de milho do **lote 2** armazenadas em ambiente com **condições não controladas**.

Outro aspecto que evidencia que a redução da germinação e do vigor de sementes maiores dos dois lotes está aparentemente associada com a redução do potencial fisiológico durante o armazenamento em ambiente não controlado consiste no fato de que efeitos nocivos não foram constatados logo após o tratamento e também para sementes armazenadas sob condições controladas. Alguns autores também não verificaram interferência do tratamento na germinação de sementes de arroz (VIEIRA; MOREIRA, 2005; ROZANE et al., 2008; FUNGUETTO et al., 2010; RUFINO et al., 2013; TAVARES et al., 2013b; BEUTLER et al., 2014), de trigo (OHSE et al., 2012) e de cevada (TAVARES et al., 2015). Entretanto, Yagi et al. (2006) observaram redução da germinação de sementes de sorgo, logo após o tratamento com Zn em doses maiores do que as utilizadas neste trabalho e tendo como fonte o sulfato de Zn, o qual apresenta alta solubilidade.

É importante ressaltar que, quando é abordado o efeito nocivo do tratamento, dois aspectos estão associados a este comportamento, os quais consistem na fonte utilizada para o tratamento e na dose do produto aplicado; fontes de Zn com elevada solubilidade em água estão mais disponíveis às plantas e por isso são mais propensas a causar efeitos fitotóxicos. Por exemplo, foram verificados efeitos nocivos do tratamento no vigor com a redução da massa seca da raiz de plântulas (OHSE et al., 2012; TUNES et al., 2015) e do comprimento de plântulas (TAVARES et al., 2013b; BEUTLER et al., 2014); em ambos os trabalhos, as doses utilizadas foram menores do que as utilizadas neste estudo, entretanto, foram utilizadas fontes de Zn altamente solúveis em água, que consistem no sulfato de Zn ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) e cloreto de Zn (ZnCl_2).

O *priming* de sementes de trigo com ZnCl_2 e ZnSO_4 foi fitotóxico para as sementes (REHMAN et al., 2015). Zhang et al. (2015) avaliaram o efeito da aplicação de ZnO na forma de nanopartículas na germinação de sementes de milho e não encontraram efeitos fitotóxicos, o que indica que formas de Zn menos solúveis em água, tais como o óxido, certamente são mais adequadas. Esse aspecto foi verificado por Prado et al. (2007) que avaliaram o tratamento de sementes de milho com diferentes fontes de Zn ; os autores constataram que o uso do sulfato de Zn na dose de 20 g Zn.kg^{-1} de semente apresentou alta eficiência de absorção pelas plântulas e altos teores do elemento na parte aérea e nas raízes, contudo, foi notada a toxicidade de Zn ; por outro lado, o uso da fonte óxido de Zn proporcionou maior acúmulo de matéria seca da parte aérea e da raiz de plantas de milho e mostrou-se como a fonte mais adequada.

Com relação às doses do nutriente, apesar do pericarpo oferecer uma barreira a absorção de compostos durante a germinação (DIAS et al., 2014; ZHANG et al., 2015), as sementes e plântulas não possuem mecanismo eficiente para evitar a absorção excessiva do elemento que se encontra em alta concentração (OLIVEIRA et al., 2010). Pode ser que doses menores sejam mais indicadas ao tratamento, pelo fato de doses elevadas de Zn tenderem ao acúmulo do elemento nas células, induzindo o dano oxidativo por iniciar a peroxidação lipídica e a degradação de outros compostos (MALAVOLTA et al., 2006). Para sementes menores dos dois lotes, apesar do tratamento não ter apresentado efeito nocivo, a dose recomendada (100 g Zn.ha^{-1}) foi mais adequada para o tratamento e manutenção da viabilidade durante o armazenamento.

Além das sementes maiores dos dois lotes tratadas e armazenadas em condições não controladas apresentarem redução da germinação, houve também redução do crescimento de plântulas determinado pela análise de imagens de plântulas (SVIS), como efeito nocivo do tratamento, conforme foi comentado na Figura 20 e pode ser verificado nas duas imagens comparativas na Figura 22, na qual o índice de vigor para sementes maiores não tratadas do lote 2, armazenadas por 12 meses sob condições controladas, foi de 718 e para sementes tratadas com 200 g Zn.ha^{-1} foi de 553, contudo, para sementes menores do lote 2 o tratamento beneficiou o crescimento das plântulas logo após o tratamento e não teve efeito nas demais épocas (Figura 23). Este aspecto pode estar relacionado ao fato de as sementes com vigor reduzido, ao serem expostas às altas concentrações de Zn próximas as raízes, pela maior sensibilidade, aumentarem o nível de peróxido de hidrogênio, o qual reduz a viabilidade celular (LI et al., 2012).

Figura 22. Comparação de imagens analisadas de uma amostra de plântulas de milho provenientes de **sementes maiores do lote 2** não tratadas a esquerda e tratadas com 200 g Zn.ha⁻¹ a direita, após **armazenamento por 12 meses sob condições não controladas**, gerando dados de índice de vigor (*Vigor index*) e uniformidade de desenvolvimento de plântulas (*Uniformity*).

Figura 23. Comparação de imagens analisadas de uma amostra de plântulas de milho provenientes de **sementes menores do lote 2** não tratadas a esquerda e tratadas com 200 g Zn.ha⁻¹ a direita, logo **após o tratamento** (0 meses), gerando dados de índice de vigor (*Vigor index*) e uniformidade de desenvolvimento de plântulas (*Uniformity*).

Apesar do efeito nocivo do tratamento ao potencial fisiológico de sementes maiores dos dois lotes armazenadas sob condições não controladas, para as mesmas sementes armazenadas sob condições controladas e para sementes menores dos dois lotes armazenadas sob as duas condições ambientais, o tratamento favoreceu o vigor. Assim como neste trabalho, no qual se evidenciou que o tratamento pode auxiliar na manutenção do potencial fisiológico de sementes durante o armazenamento, Arjmand et al. (2014) observaram que sementes de cevada tratadas com pequenas doses de sulfato de Zn (3,2 g Zn.Kg⁻¹ de sementes) apresentaram menor redução da viabilidade durante o armazenamento por seis meses. Contudo, Beutler et al. (2014) observaram que sementes de arroz tratadas com Zn apresentaram valores bem inferiores

do percentual de plântulas normais pelo teste de envelhecimento acelerado quando comparadas às sementes não tratadas, indicando um efeito negativo do tratamento ao potencial fisiológico durante o armazenamento, pois a redução da germinação de sementes expostas ao envelhecimento acelerado é um indício de perda da viabilidade no armazenamento (MARCOS-FILHO, 2015).

O fornecimento apropriado de micronutrientes durante a fase inicial de crescimento das plântulas pode resultar em um melhor estabelecimento das culturas no campo e em reflexos no rendimento de grãos (MONDO et al., 2013; DIAS et al., 2015). Diante desta perspectiva, o tratamento com Zn apresenta-se como uma técnica promissora para o incremento no vigor de sementes, apresentando grande vantagem competitiva para as plantas.

Em função de o Zn possuir o papel de promotor de crescimento, o qual está envolvido na síntese de triptofano, aminoácido precursor do IAA (ácido indolacético), hormônio de crescimento em plantas (EPSTEIN; BLOOM, 2005), a sua aplicação nas sementes, em muitos casos, é associada ao aumento da massa seca de plântulas (YAGI et al., 2006; ROZANE et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2010; OHSE et al., 2012; BEUTLER et al., 2014; TUNES et al., 2015), à emergência de plântulas (OLIVEIRA et al., 2014), bem como ao aumento do comprimento da parte aérea e raiz de plântulas (FUNGUETTO et al., 2010; OHSE et al., 2012). O efeito do tratamento no crescimento inicial das plantas, neste estudo, foi refletido no aumento do comprimento de plântulas e índice de vigor determinados pela análise computadorizada de imagens e demais testes realizados para avaliação do vigor para sementes maiores dos dois lotes armazenadas sob condições controladas e sementes menores dos dois lotes armazenadas sob condições controladas e não controladas.

Embora o Zn tenha propiciado o aumento do crescimento das plântulas, em alguns casos, o índice de uniformidade de desenvolvimento das plântulas não acompanhou este aumento, como, por exemplo, para sementes menores do lote 1 armazenadas em condições controladas e não controladas (Figuras 5 e 8). Este índice é mensurado com base nos desvios do comprimento de cada plântula da amostra em relação ao máximo valor estimado para as plântulas e definida nas configurações do *software* (SAKO et al., 2001). Esses resultados indicam que a absorção do Zn, disponibilizado via tratamento de sementes, pelas plântulas pode não ocorrer de forma uniforme, pois mesmo proporcionando o aumento do comprimento de plântulas, em muitos casos, houve redução do índice de uniformidade de desenvolvimento de plântulas; este aspecto necessita ser melhor investigado em trabalhos futuros.

Além do efeito do Zn, na síntese de auxina resultando em aumento do crescimento das plântulas, este elemento também pode estar associado à ativação das peptidases, intensificando

a hidrólise das proteínas de reserva e, com isso, a suplementação de esqueletos carbônicos ao eixo embrionário, acelerando o crescimento das plântulas. O Zn também é responsável pela ativação das enzimas RNA e DNA polimerases e, conseqüentemente, acelera a síntese de proteínas pelo eixo embrionário, o qual originará a plântula. Com esses processos sendo intensificados nas sementes em germinação, provavelmente o eixo embrionário originará uma plântula mais vigorosa (OHSE et al., 2012).

Sementes tratadas que apresentaram melhor desempenho da emergência de plântulas em areia e em campo demonstram que as plântulas no período de 14 dias, tempo de execução dos testes, já utilizam o nutriente, beneficiando sementes que estão com potencial fisiológico mais baixo como as sementes do lote 2. Resultado semelhante foi observado por Arjmand et al. (2014) para o tratamento de sementes de baixo vigor de cevada com sulfato de Zn. Em outros trabalhos, que apesar de não avaliarem o efeito do tratamento em lotes com diferentes potenciais fisiológicos, também verificaram que houve efeito benéfico à emergência de plântulas de milho (ÁVILA et al., 2006), de arroz (OHSE et al. (2000) e de trigo (RUFINO et al., 2013).

Outro efeito positivo do tratamento com Zn também foi observado para a emergência de plântulas em condições de baixas temperaturas submetidas no teste de frio. Beutler et al. (2014) também observaram que o tratamento de sementes de arroz com sulfato de Zn favoreceu a emergência de plântulas no teste de frio. Este teste associa a resposta das sementes a combinação de três aspectos importantes que consistem na baixa temperatura, elevado conteúdo de água no substrato e a presença de patógenos. Segundo Marcos-Filho (2015) temperaturas subótimas favorecem a liberação de solutos celulares durante a absorção de água pelas sementes devido à desorganização do sistema de membranas. Ainda segundo o autor, em tal situação, o processo de reparo de membranas é relativamente baixo, aumentando a liberação de lixiviados, incluindo açúcares. Portanto, um tratamento que permita o melhor desempenho das sementes sob condições de estresse, tais como baixas temperaturas, é desejável.

Em alguns casos, o efeito do tratamento no vigor das sementes foi quase nulo, conforme observado para sementes menores do lote 1 e maiores do lote 2 armazenadas sob condições controladas (Tabelas 5 e 10). Em alguns outros trabalhos realizados, o tratamento com Zn também não propiciou em incremento no vigor, por exemplo, para sementes de dois cultivares de cevada, os autores não observaram efeitos do tratamento para as variáveis primeira contagem de germinação, germinação, envelhecimento acelerado, teste de frio e emergência de plântulas em campo (TAVARES et al., 2015) e para sementes de trigo (TAVARES et al., 2013c).

1.5 Conclusões

Sementes maiores e menores de lotes de maior e de menor potencial fisiológico podem ser tratadas com Zn nas doses de 50, 100, 150 e 200 g Zn.ha⁻¹ e prontamente utilizadas para a semeadura, sem que ocorram perdas da germinação e do vigor.

Para sementes maiores de maior e de menor potencial fisiológico, o tratamento com Zn nas doses de 50, 100, 150 e 200 g Zn.ha⁻¹ não é prejudicial às sementes armazenadas sob condições controladas e pode propiciar manutenção do vigor durante o armazenamento; entretanto, quando as mesmas sementes são armazenadas sob condições não controladas, podem apresentar redução do potencial fisiológico pelo tratamento de sementes com Zn.

O tratamento na dose recomendada, 100 g Zn.ha⁻¹ para sementes menores, de lotes com maior e menor potencial fisiológico é adequado para a manutenção da germinação e do vigor durante o armazenamento em condições controladas e não controladas.

Referências

- ARJMAND, H.S.; ABARGHOOEI, G.H.B.; GHORBANPOUR, M.; SHARAFI, S. Effect of zinc coated during storage on the seed quality of barley. **International Journal of Farming and Allied Sciences**. v. 3, n. 8, p. 845-850, 2014.
- ÁVILA, M.R.; BRACCHINI, A.L.; SCAPIM, C.A.; MARTORELLI, D.T.; ALBRECHT, L.P.; FACCIOLI, F.S. Qualidade fisiológica e produtividade das sementes de milho tratadas com micronutrientes e cultivadas no período de safrinha. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 28, n. 4, p. 535-543, 2006.
- BECKERT, O.P.; MIGUEL, M.H.; MARCOS-FILHO, J. Absorção de água e potencial fisiológico em sementes de soja de diferentes tamanhos. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 57, n. 4, p. 671-675, 2000.
- BEUTLER, A.N.; SILVA, V.N.; DEAK, E.A.; BURG, G.M.; SCHMIDT, M.R.; TOEBE, M. Zinc doses, sources and application times: seed physiological potential and flooded rice yield. **Australian Journal of Crop Science**, v. 8, n. 11, p. 1517-1525, 2014.
- BOONCHUAY, P.; CAKMAK, I.; RERKASEM, B.; PROM-U-THAI, C. Effect of different foliar zinc application at different growth stages on seed zinc concentration and its impact on seedling vigor in rice. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 59, n. 2, p. 180-188. 2013.
- BRASIL. Instrução Normativa nº 45, de 17 de setembro de 2013. **Padrões para a produção e a comercialização de sementes de milho (*Zea mays* L.) Cultivares híbridas**.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: MAPA/ACS, 2009. 395 p.
- CAKMAK, I. Enrichment of cereal grains with zinc: agronomic or genetic biofortification? **Plant Soil**, v.302, p.1-17, 2008.
- CAMPOS, N.V.; GUERRA, M.B.B.; MELLO, J.W.V.; SCHAEFER, C.E.G.R.; KRUG, F.J. ALVES, E.E.N.; AZEVEDO, A.A. Accumulation and spatial distribution of arsenic and phosphorus in the fern *Pityrogramma calomelanos* evaluated by micro X-ray fluorescence spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 30, p. 2375-2383, 2015.
- CHENG, T. The effect of seed treatment with microelements upon the germination and early growth of wheat. **Scientia Sinica**, v.44, p.129-135, 1985.

- DIAS, M.A.N. **Tratamento de sementes de milho com zinco e cobre**. 2013. 61 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.
- DIAS, M.A.N., TAYLOR, A.G., CICERO, S.M. Uptake of systemic seed treatments by maize evaluated with fluorescent tracers. **Seed Science and Technology**, v. 42, p. 101-107, 2014.
- DIAS, M.A.N.; CICERO, S.M.; NOVENBRE, A.D.L.C. Uptake of seed-applied copper by maize and the effects on seed vigor. **Bragantia**, Campinas, v. 74, n. 3, p. 241-246, 2015.
- EPSTEIN, E.; BLOOM, A. J. **Mineral nutrition of plants: principles and perspectives**. 2.ed. Massachussets: Sinauer, 2005. 380 p.
- FAROOQ, M.; BASRA, S.M.A.; WAHID, A.; KHALIQ, A.; KOBAYASHI, N. Rice seed invigoration. In: E. Lichtfouse (ed.). **Sustainable Agriculture Reviews**, p.137-175, 2009.
- FAROOQ, M.; WAHID, A.; SIDDIQUE, K.H.M. Micronutrient application through seed treatments – a review. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v.12, p.125-142, 2012.
- FESSEL, S.A.; RODRIGUES, T.J.D.; FAGIOLI, M.; VIERIA, R.D. Temperatura e período de exposição no teste de envelhecimento acelerado em sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 22, n. 2, p. 163-170, 2000.
- FRANÇA-NETO, J. B.; HENNING, A.A.; KRZYZANOWSKI, F.C.; PEREIRA, O. A. P.; LORINI, I.; PANOFF, B.; BRZEZINSKI, C. R. ; BERGONSI, J. S. . Efeito do tratamento de sementes de soja com micronutrientes e bioestimulantes sobre o desenvolvimento de plântulas. In: XXXI Reunião de Pesquisa de Soja da Região Central do Brasil, 2011, São Pedro, SP. **Resumos....** Londrina, PR: Embrapa Soja, 2011. v. 32. p. 345-347.
- FUNGUETTO, C.I.; PINTO, J.F.; BAUDET, L.; PESKE, S. T. Desempenho de sementes de arroz irrigado recobertas com zinco. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, n 2, p. 117-123, 2010.
- HACISALIHOGU, G.; KOCHIAN, V.L. How do plants tolerate low levels of zinc? Mechanisms of zinc efficiency in crop plants. **New Phytologist**, v. 159, p. 341–350, 2003.
- HALMER, P. Seed technology and seed enhancement. In: XXVII International Horticultural Congress - IHC2006: International Symposium on Seed Enhancement and Seedling Production Technology. **Acta Horticulturae**, p.17-26, 2008.

- KRZYZANOWSKI, F. C.; HENNING, A. A.; HENNING, F. A.; FRANÇA-NETO, J. B.; LORINI, I. Influência do volume de calda e da combinação de produtos usados no tratamento da semente de soja sobre o seu desempenho fisiológico. In: REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA, 34., 2014, Londrina. **Resumos expandidos...** Londrina: Embrapa Soja, 2014. (Embrapa Soja. Documentos, 353).
- LEE, C.W.; MAHENDRA, S.; ZODROW, K.; LI, D.; TSAI, Y.C.; BRAAM, J.; ALVAREZ, P.J.J. Developmental phytotoxicity of metal oxide nanoparticles to *Arabidopsis thaliana*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 29, p. 669-675, 2010.
- LI, X.; YANG, Y.; ZHANG, J.; JIA, L.; QIAOXIA, L.; ZHANG, T.; QIAO, K.; MA, S. Zinc induced phytotoxicity mechanism involved in root growth of *Triticum aestivum* L. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 86, p. 198-203, 2012.
- MAGUIRE, J.D. Speed of germination aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v.2, n.2, p.176-77, 1962.
- MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2006. 638p.
- MARCOS-FILHO, J. Seed vigor testing: an overview of the past, present and future perspective. **Scientia Agricola**, v.72, n.4, p.363-374, 2015.
- McDONALD, M.B. Seed deterioration: physiology, repair and assessment. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 27, n. 1, p. 177-237, 1999.
- MIGUEL, M.H.; CICERO, S.M. Teste de frio na avaliação do vigor de sementes de feijão. **Scientia Agricola**, v.56, n.4, p.1233-1243, 1999.
- MONDO, V.H.V.; CICERO, S.M.; DOURADO-NETO, D.; PUPIM, T.; DIAS, M.A.N.. Effect of seed vigor and intra-specific competition and grain yield in maize. **Agronomy Journal**, v. 105, p. 222-228, 2013.
- MONDO, V.H.V.; DIAS, M.A.N.; McDONALD, M. Seed vigour imaging system for a 2-day-old corn seedling evaluation. **Seed Technology**, Ithaca, v. 33, n. 2, p. 191-196, 2011.
- MUCHENA, S.C.; GROGAN C.O. Effects of seed size on germination of corn (*Zea mays*) under simulated water stress conditions, **Canadian Journal of Plant Science**, p. 921-923, 1977.
- MUHAMMAD, I; KOLLA, M; VOLKER, R; GÜNTER, N. Impact of nutrient seed priming on germination, seedling development, nutritional status and grain yield of maize. **Journal of Plant Nutrition**, v. 38, n.12, p. 1803-1821, 2015.

- MUNZUROGLU O; GECKIL H. Effects of metals on seed germination, root elongation, and coleoptile and hypocotyl growth in *Triticum aestivum* and *Cucumis sativus*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 43, p. 203-213, 2002.
- MURTHY, U.M.N.; KUMAR, P.P.; SUN, W.Q. Mechanisms of seed aging under different storage conditions for *Vigna radiata* (L.) Wilczek: lipid peroxidation, sugar hydrolysis, Maillard reactions and their relationship to glass state transition. **Journal of Experimental Botany**, v. 54, p. 1057-1067, 2003.
- MURUNGU, F.S.; NYAMUGAFATA, P.; CHIDUZA, C.; CLARK, L.J.; WHALLEY, W.R.. Effects of seed priming and water potential on germination of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) and maize (*Zea mays* L.) in laboratory assays. **South African Journal of Plant and Soil**, v. 22, n. 1, p. 64-70, 2005.
- OHSE, S. Germinação e vigor de sementes de arroz irrigado tratadas com zinco, boro e cobre. **Revista Faculdade Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, v. 7, n. 1, p. 73-79, 2000.
- OHSE, S.; CUBIS, J.G.; REZENDE, B.L.A.; CORTEZ, M.G.; OTTO, R.F. Vigor e viabilidade de sementes de trigo tratadas com zinco. **Revista Biotemas**, v. 25, n. 4, p. 49-58, 2012.
- OHSE, S.; SANTOS, O.S.; MENEZES, N.L.; SCHMIDT, D. Efeito de fontes de zinco sobre a germinação e o vigor de sementes de arroz irrigado. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 19, n. 2, p. 369-373, 1997.
- OLIVEIRA, R.H.; SOUZA, M.J.L.; MORAIS, O.M.; GUIMARÃES, B.V.C.; PEREIRA JÚNIOR, H.A. Potencial fisiológico de sementes de mamona tratadas com micronutrientes. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 32, n. 4, p. 701-707, 2010.
- OLIVEIRA, S.; TAVARES, L.C.; LEMES, E.S.; BRUNES, A.P.; DIAS, I.L.; MENEGHELLO, G.E. Tratamento de sementes de Avena sativa l. com zinco: qualidade fisiológica e desempenho inicial de plantas. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 35, n. 3, p. 1131-1142, 2014.
- OZTURK, L.; YAZICI, M.A.; YUCEL, C.; TORUN, A.; CEKIC, C.; BAGCI, A.; OZKAN, H.; BRAUN, H.J.; SAYERS, Z.; CAKMAK, I. Concentration and localization of zinc during seed development and germination in wheat. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 128, p. 144-152, 2006.
- PARDUCCI, S.; SANTOS, O. S.; CAMARGO, R. P.; LEÃO, R.M.A.; BATISTA, R.B. **Micronutrientes Biocrop**, 1989. 101p.

- PERUCHI, L.C.; NUNES, L.C.; CARVALHO, G.G.A.; GUERRA, M.B.B.; ALMEIDA, E.; RUFINI, I.A.; SANTOS JR., D.; KRUG, F.J. Determination of inorganic nutrients in wheat flour by laser-induced breakdown spectroscopy and energy dispersive X-ray fluorescence spectrometry, **Spectrochim. Acta Part B**, v. 100, p. 129-136, 2014.
- PLETSCH, A.; SILVA, V.N.; BEUTLER, A.N. Tratamento de sementes de canola com zinco. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 37, n. 2, p. 241-247, 2014.
- PRADO, R.M.; MOURO, M.C.; NATALE, W. Crescimento inicial e nutrição de milho cultivar P30K75 submetido à fertilização de zinco via semente. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 13, n. 4, p. 495-501, 2007.
- RENGEL, Z: Genetic control of root exudation. **Plant Soil**, v. 245, p. 59-70, 2002.
- RENGEL, Z.; GRAHAM, R.D. Importance of seed Zn content for wheat growth on Zn-deficient soil. **Plant and Soil**, v. 173, p. 267-274, 1995.
- REHMAN, A.; FAROOQ, M.; AHMAD, R.; BASRA, S.M.A. Seed priming with zinc improves the germination and early seedling growth of wheat. **Seed Science and Technology**, v. 43, 262-268, 2015.
- RIBEIRO, N. D.; SANTOS, O. S. Aproveitamento do zinco aplicado na semente na nutrição da planta. **Ciência Rural**, v.26, n.1, p.159-165, 1996.
- RIBEIRO, N.D.; SANTOS, O.S.; MENEZES, N.L. Efeito do tratamento com fontes de zinco e boro na germinação e vigor de sementes de milho. **Scientia Agricola**, v.51, n.3, p.481-485, 1994.
- ROZANE, D.E.; PRADO, R.M.; ROMUALDO, L.M.; SIMÕES, R.R. Resposta de plântulas de arroz cv. BRS-Soberana à aplicação de zinco via sementes. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 3, p. 847-854, 2008.
- RUFINO, C.A.; TAVARES, L.C.; BRUNES, A.P.; LEMES, E.S.; VILLELA, F.A. Treatment of wheat seed with zinc, fungicide, and polymer: seed quality and yield. **Journal of Seed Science**, v.35, n.1, p.106-112, 2013.
- SAKO, Y.; McDONALD, M.B.; FUJIMURA, K.; EVANS, A.F.; BENNETT, M.A. A system for automated seed vigour assessment. **Seed Science and Technology**, Zürich, v. 29, n. 3, p. 625-636, 2001.
- SALANENKA, Y.A.; TAYLOR, A.G. Seedcoat Permeability: Uptake and post-germination transport of applied model tracer compounds. **Hortscience**. v. 46, n. 4, 2011.
- SAS Institute Inc. SAS statistical software, version 9.3. **SAS Institute**, Inc, Cary, NC, 2010.

- SHARMA, S.N.; MAHESHWARI, A. Expression patterns of DNA repair genes associated with priming small and large chickpea (*Cicer arietinum*) seeds. **Seed Science and Technology**, v. 43, 250-261, 2015.
- SCOTT, J.M. **Delivering fertilizers through seed coatings**. In: Nutrient use in crop production, p.197-220, 1998.
- SHARMA, S.N.; GOYAL, K.C.; GUPTA, I.J.; KAKRALYA, B.L.; SHARMA, S.K.; MEHTA, S.M.; RATHORE, A.K.S. Packing material limiting soybean seed quality during storage. **Seed Research**, v. 26, p. 89-91, 1998.
- SHARMA, S.N.; GOYAL, K.C.; RATHORE, A.K.S.; SHRIMALI, M.K.; MODI, B.S. Seed deterioration during post-harvest handling of soybean cultivars. **Seed Research**, v. 29, p. 179-182, 2001.
- STANKOVIĆ, M.; TOPUZOVIĆ, M.; MARKOVIĆ, A.; PAVLOVIĆ, D. Influence of zinc (Zn) on germination of wheat (*Triticum aestivum* L.). **Biotechnology and Biotechnological Equipment**, v. 24, p. 236-239, 2011.
- TAVARES, L.C.; BRUNES, A.P.; RUFINO, C. A.; FONSECA, D.A.R.; GADOTTI, G.I.; VILLELA, F.A. Tratamento de sementes de cevada com zinco: potencial fisiológico e produtividade de sementes. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 36, n. 2, p. 585-594, 2015.
- TAVARES, L.C.; BRUNES, A.P.; TUNES, L.M.; GADOTTI, G.I.; BARROS, A.C.S.A.; VILLELA, F.A. The yield and physiological quality of oat seeds subjected to cover with zinc. **Acta Scientiarum. Agronomy** Maringá, v. 35, n. 3, p. 357-361, 2013a.
- TAVARES, L.C.; FONSECA, D.A.R.; BRUNES, A.P.; RUFINO, C.A.; MENEGUELLO, G.E.; BARROS, A.C.S.A. Performance of rice seeds treated with zinc, boron, and molybdenum. **Journal of Seed Science**, v.35, n.4, p.532-539, 2013b.
- TAVARES, L.C.; RUFINO, C.A.; BRUNES, A.P.; FRIEDRICH, F.F.; BARROS, A.C.S.A.; VILLELA, F. A. Physiological performance of wheat seeds coated with micronutrients. **Journal of Seed Science**, v.35, n.1, p.28-34, 2013c.
- TAYLOR, A.G. Seed treatments. In: THOMAS, B.; D.J. MURPHY; B.G. MURRAY (eds.). **Encyclopedia of applied plant sciences**. Elsevier Acad. Press, Oxford, UK. p. 1291-1298. 2003.
- TAYLOR, A.G.; ECKENRODE, C.J.; STRAUB, R.W. 2001. Seed treatments for onions: Challenges and progress. **HortScience** 36:199–205.

- TUNES, L.M.; MUNIZ, M.F.B.; SALINAS, J.C.T.; CASTELLANOS, C.I.S.; LEMES, E.S. Respuesta de plántulas de trigo (*Triticum aestivum* L.) al zinc aplicado en semillas. **Agrociencia**, v. 49, p. 623-636, 2015.
- TUNES, L.M.; PEDROSO, D.C.; TAVARES, L.C.; BARBIERI, A.P.P.; BARROS, A.C.S.A.; MUNIZ, M.F.B. Tratamento de sementes de trigo com zinco: armazenabilidade, componentes do rendimento e teor do elemento nas sementes. **Ciência Rural**. Santa Maria, v.42, n.7, p. 1141-1146, 2012.
- VIEIRA, E.H.N.; MOREIRA, G.A. Peletização de sementes de arroz. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2p. (**Embrapa Arroz e Feijão. Comunicado Técnico**, 111). 2005.
- VILLELA, F.A.; MARCOS FILHO, J.; NOVEMBRE, A.D.L.C. Estado energético da água na semente de milho no processo de germinação. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 25, n. 1, p.95-100, 2003.
- VILLELA, F.M.; NOVEMBRE, A.D.L.C.; MARCOS-FILHO, J. Estado energético da água na germinação de semente de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 29, n. 1, p.27-34, 2007.
- WANG, Z.Y.; XIE, X.Y.; ZHAO, J.; LIU, X.Y.; FENG, W.Q.; WHITE, J.C.; XING, B.S. Xylem- and phloem-based transport of CuO nanoparticles in maize (*Zea mays* L.). **Environmental Science and Technology**, v. 46, p. 4434-4441, 2012.
- WELCH, R.M. Effects of nutrient deficiencies on seed production and quality. **Advances in Plant Nutrition**, v. 2, p. 205-247, 1986.
- YAGI, R.; SIMILI, F.F.; ARAÚJO, J.C.; PRADO, R.M.; SANCHEZ, S.V.; RIBEIRO, C.E.R.; BARRETTO, V.C.M. Aplicação de zinco via sementes e seu efeito na germinação, nutrição e desenvolvimento inicial do sorgo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.4, p. 655-660, 2006.
- YILMAZ, A.; EKIZ, H.; GULTEKIN, I.; TORUN, B.; BARUT, H.; KARANLIK, CAKMAK, I. Effect of seed zinc content on grain yield and zinc concentration of wheat grown in zinc-deficient calcareous soils. **Journal of Plant Nutrition**, v. 21, p. 2257-2264, 1998.
- ZHANG, R.; ZHANG, H.; TU, C.; HU, X.; LI, L.; LUO, Y.; CHRISTIE, P. Phytotoxicity of ZnO nanoparticles and the released Zn(II) ion to corn (*Zea mays* L.) and cucumber (*Cucumis sativus* L.) during germination. **Environmental Science and Pollution Research**, 2015.

2 AVALIAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DE ZN EM SEMENTES E PLÂNTULAS DE MILHO POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X COM RADIAÇÃO SÍNCROTRON (SR μ -XRF)

Resumo

A permeabilidade do tegumento das sementes a compostos utilizados no tratamento pode interferir na longevidade delas durante o armazenamento. O conhecimento da distribuição de metais em sementes pode fornecer uma série de informações importantes, do ponto de vista fisiológico, relacionadas à estabilidade do nutriente utilizado em revestimento, bem como informações sobre a biodisponibilidade dos elementos nas sementes. Quanto às plântulas, a análise da distribuição dos metais pode auxiliar no entendimento da absorção do Zn disponibilizado via tratamento de sementes. Esse estudo foi dividido em duas partes, na primeira, objetivou-se avaliar a distribuição do Zn em sementes de milho tratadas com ZnO após o armazenamento por 12 meses, bem como visou-se fornecer informações sobre a biodisponibilidade do Zn. Na segunda parte do estudo, objetivou-se avaliar a absorção do Zn aplicado via tratamento de sementes em plântulas de milho. As sementes foram tratadas com ZnO e armazenadas por 0, 6 e 12 meses e avaliou-se a distribuição do Zn e sua correlação com o P e o S, em cada parte da semente (pericarpo, embrião e endosperma). Na segunda parte do estudo, foi avaliada a distribuição do Zn em plântulas de milho provenientes de sementes não tratadas e tratadas com ZnO, após a germinação por 48, 72, 96 e 120 horas. Nas duas partes deste estudo, para avaliar a distribuição do Zn, foi utilizada a microscopia de fluorescência de raios X com radiação síncrotron (SR μ -XRF). Sementes de milho apresentaram maior acúmulo de Zn no escutelo, localizado acima da camada negra, indicando o descarregamento do floema nas sementes. O Zn presente no escutelo está preponderantemente ligado ao P, aparentemente na forma de fitato, contudo, também está associado ao S. Verificou-se que o Zn, fornecido em tratamento de sementes, após o armazenamento das sementes por 6 e 12 meses sob condições não controladas, pode penetrar no pericarpo e acumular-se em pontos específicos da semente. Na avaliação da absorção do Zn fornecido via tratamento, os resultados demonstraram que a região do embrião é um importante local para a entrada do Zn durante a germinação das sementes, e após 72, 96 e 120 horas de germinação, a parte apical da raiz primária, na região meristemática, apresenta-se como um importante ponto de acúmulo de Zn.

Palavras-chave: *Zea mays* L.; Tratamento de sementes; Mapeamento elementar; Biodisponibilidade de Zn.

Abstract

The permeability of the seed coat to the compounds used in the treatment may interfere with their longevity during storage. Knowledge of the distribution of metals in seeds can provide a range of physiologically important information related to the stability of the nutrient used in the coating as well as information on the bioavailability of the elements in the seeds. As for the seedlings, the analysis of the distribution of the metals can help in the understanding of the absorption of Zn made available through seed treatment. This study was divided in two parts, in the first, the objective was to evaluate the distribution of Zn in corn seeds treated with ZnO after storage for 12 months, as well as to provide information on the bioavailability of Zn. In the second part of the study, the aim of this study was to evaluate the absorption of Zn applied by seed treatment in corn seedlings. The seeds were treated with ZnO and stored for 0, 6 and 12 months and the distribution of Zn and its correlation with P and S were evaluated in each part of the seed (pericarp, embryo and endosperm). In the second part of the study, the distribution of Zn in maize seedlings from untreated and ZnO treated seeds was evaluated after 48, 72, 96 and 120 hours of germination. In the two parts of this study, X-ray fluorescence microscopy with synchrotron radiation (SR μ -XRF) was used to evaluate the Zn distribution. Corn seeds presented higher accumulation of Zn in the scutellum, located above the black layer, indicating the discharging of the phloem in the seeds. The Zn present in the scutellum is predominantly bound to the P, apparently in phytate form, however, it is also associated with S. Zn, supplied in seed treatment, after storage of the seeds for 6 and 12 months under conditions Uncontrolled, can penetrate the pericarp and accumulate at specific points in the seed. In the evaluation of the absorption of Zn provided by treatment, the results showed that the embryo region is an important place for the entry of Zn during the germination of the seeds, and after 72, 96 and 120 hours of germination, the apical part of the primary root, In the meristematic region, presents as an important point of accumulation of Zn.

Keywords: *Zea mays* L.; Seed treatment; Elementary mapping; Bioavailability of Zn.

2.1 Introdução

A longevidade das sementes, compreende o período em que elas permanecem viáveis durante o armazenamento, esse aspecto depende do teor de água das sementes e das condições de armazenamento, tais como a umidade relativa do ar, a pressão de oxigênio e a temperatura (WALTERS, 1998; GROOT et al., 2012). Em situações em que as condições de armazenamento são inapropriadas, as quais consistem em temperatura e umidade relativa do ar elevadas, ocorre dano celular oxidativo, o qual induz progressivamente a perda do vigor da semente e da capacidade germinativa até a morte do embrião. Para a manutenção da longevidade das sementes alguns aspectos são de fundamental importância, dentre os quais os sistemas de reparo celular e a proteção oferecida pelo tegumento das sementes (SANO et al., 2015).

A perda da longevidade das sementes é frequentemente associada ao acúmulo de lesões no DNA durante o armazenamento (CHEAH; OSBORNE, 1978). Os mecanismos de reparo do DNA têm sido relatados como fundamentais para a manutenção da longevidade das sementes (BALESTRAZZI et al., 2011, WATERWORTH et al., 2015). Em geral, quebras na cadeia do DNA são causadas principalmente pela síntese de espécies reativas de oxigênio “ROS”, acrônimo do inglês, Reactive Oxygen Species (BRAY; WEST, 2005); portanto, sementes requerem sistemas antioxidantes eficientes, de modo a impedir a oxidação excessiva de macromoléculas, incluindo os mecanismos não-enzimáticos e enzimáticos de eliminação das ROS (BAILLY, 2004; KUMAR et al., 2015).

O tegumento das sementes representa a interface por meio da qual o embrião interage com o ambiente externo; assim, o tegumento fornece proteção química e mecânica para as sementes e, em função disso, a resistência mecânica imposta pelo tegumento é associada com a longevidade das sementes (MOHAMED-YASSEEN et al., 1994). Normalmente, quatro tipos principais de macromoléculas estão associados às células do tegumento, polifenóis, polissacarídeos, suberina e cutina, e as suas propriedades conferem resistência física e química. Em sementes de milho, o pericarpo substitui o tegumento, com funções equivalentes, incluindo a permeabilidade. A resistência mecânica das células de revestimento de sementes é determinada por sua composição e pela abundância dos polímeros na parede celular que também influenciam a hidrofobicidade celular e, assim, a capacidade de fatores externos, tais como substâncias utilizadas no tratamento de sementes, em penetrar no embrião e endosperma (SANO et al., 2015).

O pericarpo da semente de milho é considerado semipermeável, conforme avaliado pelo uso de traçadores fluorescentes (DIAS et al., 2014) e para o óxido de Zn (ZHANG et al., 2015). Em outras pesquisas, em que foi avaliada a capacidade do ingrediente ativo sistêmico utilizado no tratamento de sementes em penetrar no tegumento de sementes de feijão preto e soja durante o armazenamento, em condição de umidade relativa do ar de 75%, utilizando um composto denominado cumarina; os resultados obtidos indicaram que após 1 ano de armazenamento, o composto não difundiu através do tegumento das sementes para as duas espécies avaliadas. Ainda, segundo os autores, a capacidade do ingrediente ativo em penetrar o tegumento, durante o armazenamento, está relacionada com a sua lipofilicidade (SALANENKA; TAYLOR, 2011).

A lipofilicidade consiste na medida da afinidade dos compostos para a fase lipídica dos tecidos vegetais, tais como a membrana plasmática, ceras, cutina e suberina. Os compostos moderadamente lipofílicos são sistêmicos porque permeiam a fase lipídica das membranas celulares em comparação com compostos hidrofílicos que não são capazes de passar através das barreiras lipídicas (BRIGGS et al., 1982); por outro lado, os compostos altamente lipofílicos não são sistêmicos porque são fortemente retidos nos constituintes lipídicos (EDGINGTON, 1981) e têm solubilidade limitada em água.

Existe grande preocupação na indústria de sementes com o fato de que o ingrediente ativo de formulações utilizadas no tratamento de sementes possa causar fitotoxicidade, especialmente durante o armazenamento das sementes (TAYLOR et al., 2001) e a capacidade da substância em propiciar efeitos nocivos à germinação das sementes tem sido relacionada com a propriedade sistêmica dessa substância (SALANENKA; TAYLOR, 2011). Ultimamente, tem ocorrido um crescente interesse no uso da técnica de tratamento de sementes para o fornecimento de Zn para as plantas, pelos inúmeros benefícios do uso da técnica na nutrição das plantas (FAROOQ et al., 2012). Contudo, não existem informações sobre a capacidade desse nutriente disponibilizado via tratamento de sementes em penetrar no tegumento e reduzir a longevidade das sementes durante o armazenamento.

Outra questão relativa ao tratamento de sementes, refere-se à capacidade do Zn fornecido em contribuir para a nutrição das plantas, que depende da absorção do elemento pelos tecidos das plantas (CAKMAK, 2008). O nutriente disponibilizado via tratamento de sementes deve ser inicialmente absorvido pelas raízes e transportado para a parte aérea das plântulas; a entrada (absorção) do nutriente pode ocorrer por três vias: 1) absorção pela semente durante a germinação no processo de embebição, com posterior transporte para a parte aérea; 2) absorção

pelas raízes; 3) absorção por meio do coleoptilo (THIELERT et al., 1988; QUEROU et al., 1997; TAYLOR; SALANENKA, 2012).

Compreender o caminho envolvido na absorção de um composto sistêmico, disponibilizado via tratamento de sementes, fornece uma base para as formulações de novos produtos, além de aprimorar o entendimento a respeito da utilização desses nutrientes pelas culturas (THIELERT et al., 1988; TAYLOR; SALANENKA, 2012). Nesse contexto, avaliar a dinâmica de absorção do ZnO disponibilizado via tratamento de sementes pode auxiliar na compreensão do aproveitamento do nutriente pelas plantas. Em plantas de trigo a absorção dos compostos por meio do pericarpo é uma das mais importantes vias (THIELERT et al., 1988).

Técnicas de análise de imagens, que permitam avaliar a distribuição dos elementos minerais em tecidos vegetais podem auxiliar na compreensão da dinâmica do nutriente disponibilizado no tratamento de sementes, bem como na avaliação da absorção do nutriente pelas plântulas. Nesse sentido, tem sido frequentemente empregada a microscopia de fluorescência de raios X (XRF) para determinar a localização exata dos elementos em tecidos biológicos (ZHAO et al., 2014).

A microscopia de fluorescência de raios X utilizando luz síncrotron como fonte de radiação (SR XRF), consiste na emissão de luz (fótons) por elétrons acelerados em um anel de armazenamento de alta energia. Os fótons são emitidos a uma intensidade 10 vezes mais brilhante do que aqueles gerados por tubos convencionais de raios X (LOMBI; SUSINI, 2009; SARRET et al., 2013). Por ser uma fonte de raios X de alta intensidade as técnicas são altamente sensíveis e podem ser utilizadas para detecção de uma ampla gama de elementos com alta resolução espacial.

A microscopia de fluorescência de raios X (SR XRF), utilizando como fonte a luz síncrotron, envolve a irradiação da amostra com raios X de energia definida, o que propicia a excitação e a ejeção dos elétrons do núcleo dos átomos com uma energia de ligação menor do que a energia incidente dos raios X. Como resultado, é criada uma vacância no núcleo orbital, a qual é então preenchida por um elétron de um orbital de energia mais alta, liberando o excesso de energia na forma de fluorescência. A energia desse sinal de fluorescência é característica para cada elemento. Ao rastrear uma amostra utilizando um feixe de raios X, os espectros de fluorescência podem ser registrados em cada posição e utilizados para gerar mapas elementares de XRF da distribuição de metais nas amostras (DONNER et al., 2013). Em geral, quando é utilizado um feixe micrométrico de raios X para coletar informações, a análise é denominada por micro fluorescência de raios X (SR μ -XRF) (ZHAO et al., 2014).

A utilização da técnica de SR μ -XRF tem propiciado a compreensão da homeostase de minerais em tecidos de plantas e, particularmente, como os diferentes genes atuam na distribuição, complexação e armazenamento dos minerais (ZHAO et al., 2014). Em plantas, a SR μ -XRF tem fornecido informações importantes a cerca da distribuição do Zn em tecidos biológicos de espécies hiperacumuladoras desse metal (SARRET et al., 2009; 2013; LU et al., 2014) ou em plantas de cereais, tais como arroz (MOORE et al., 2014) e em sementes de plantas hiperacumuladoras (KIM et al., 2006; PUNSHON et al., 2012; RAMOS et al., 2013).

Em outras pesquisas, ênfase tem sido dada para a utilização da técnica de SR μ -XRF no estudo da absorção de nanopartículas de óxido de zinco por plântulas; nesse sentido, a distribuição de Zn foi avaliada em plântulas de soja cultivadas em solo tratado com nanopartículas de ZnO (HERNANDEZ-VIEZCAS et al., 2013). Lv et al. (2015) e Zhao et al. (2015) utilizaram SR μ -XRF para avaliar a absorção de nanopartículas de ZnO por plântulas de milho e concluíram por meio das imagens, que as raízes apresentaram maior concentração de Zn. Ainda para plantas de milho, a técnica também foi utilizada para investigar a absorção de óxido de cério (ZHAO et al., 2012) e a distribuição de Zn nas raízes após o cultivo das plantas em solo com elevado teor de Zn, após a inoculação com bactérias (ADEDIRAN et al., 2014).

Em grãos de cereais, o uso da SR μ -XRF tem permitido avaliar a distribuição e disponibilidade de metais, fornecendo informações para o enriquecimento dos grãos de arroz (IWAI et al., 2012), trigo (MOORE et al., 2012; NEAL et al., 2013; EAGLING et al., 2014; BRIER et al., 2015) e cevada (LOMBI et al., 2011a). Além do Zn, o uso da técnica de SR μ -XRF tem propiciado a identificação de metais potencialmente tóxicos, tais como As em grãos de arroz (MEHARG et al., 2008; LOMBI et al., 2009; CAREY et al. 2010) e Pb em sementes de milho durante a germinação em solo contaminado (LING; QIANG, 2014), bem como a avaliação de elementos benéficos, como o Se (WILLIAMS et al., 2009). O grande desafio do uso da técnica de SR μ -XRF em sementes é o tempo necessário para análises, pelo fato da área a ser mapeada ser consideravelmente grande (sementes de culturas); esse aspecto limita a sua utilização (LOMBI et al., 2011b; ZHAO et al., 2014), sendo possível o mapeamento total de sementes pequenas como a de *Arabidopsis* (YOUNG et al., 2006).

O conhecimento da distribuição dos metais nos grãos, pode auxiliar no desenvolvimento de estratégias relacionadas à biofortificação, em função da dinâmica desses elementos fornecer informações a respeito da biodisponibilidade de metais (WHITE; BROADLEY, 2011; CLEMENS, 2014; PERSSON et al., 2016). A biodisponibilidade de Zn nos grãos está relacionada com a presença de um composto denominado ácido fítico ou myo-inositol hexafósforico (InsP6) que consiste em um componente natural dos grãos de cereais e

possui como função primordial o armazenamento do fosfato nos grãos. O ácido fítico possui 6 cargas negativas de grupos fosfatos, podendo se ligar fortemente aos cátions (Mg^{2+} , K^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} e Zn^{2+}) e formar sais insolúveis, denominado por fitato (WU et al., 2009). A síntese de ácido fítico começa após o florescimento das plantas e sua acumulação nos grãos ocorre durante o desenvolvimento (BOHN et al., 2008; WU et al., 2009). O local de acumulação do ácido fítico nos grãos varia de acordo com a espécie (RAES et al., 2014).

Grãos de cereais são utilizados para a alimentação humana e de animais, contudo, para ambos, os elementos na forma de fitato não estão prontamente disponíveis, devido à baixa quantidade da enzima fitase que é responsável pela degradação do fitato; tal aspecto dificulta a absorção dos metais pelos animais e seres humanos (WU et al., 2009). Nesse sentido, Clemens (2014) ressaltou a importância de se estudar a distribuição de elementos minerais em grãos, o que pode auxiliar na verificação da biodisponibilidade dos nutrientes, especialmente do Zn, e para a condução de estratégias visando ao aumento da biodisponibilidade desse elemento.

Embora o fitato seja considerado um anti-nutriente, em fisiologia de sementes, existe uma preocupação em manter elevadas concentrações desse componente (MURGIA et al., 2012; SHAHZAD et al., 2014), em razão do desempenho agrônômico das plantas cultivadas ser afetado negativamente, por causa das funções essenciais do fitato nas plantas. Os resultados sobre a interferência da concentração de fitato nas sementes são divergentes (RAWAT et al., 2013). Em alguns estudos foram relatadas menores taxas de germinação, baixa tolerância das plântulas a estresses, perda parcial da resistência à doenças e rendimentos reduzidos (RABOY, 2009), enquanto que em outros estudos não foram encontrados efeitos negativos pelo decréscimo do teor de fitato nas sementes (CAMPION et al., 2013). Assim, pode-se sugerir que o teor de fitato nas sementes tem um importante papel em promover o desempenho das plantas em campo.

Nesse contexto, o presente estudo foi dividido em duas partes, na primeira objetivou-se avaliar em sementes de milho tratadas com ZnO, se o Zn disponibilizado em revestimento, penetrou o pericarpo após o armazenamento das sementes tratadas por 0, 6 e 12 meses, em condições de ambiente não controlado, bem como visou fornecer informações sobre a distribuição de Zn e sua associação com P e S. Na segunda parte do estudo, objetivou-se avaliar a absorção do Zn aplicado via tratamento de sementes de milho durante a germinação por 48, 72, 96 e 120 horas, para entender como o nutriente disponibilizado está distribuído na plântula e como ocorre a sua absorção. Para as duas partes da pesquisa foi utilizada a técnica de SR μ -XRF.

2.2 Materiais e métodos

2.2.1 Tratamento das sementes de milho

Sementes do milho híbrido (30A37 PW, Morgan[®], Dow AgroSciences, Jardinópolis, SP) da peneira "22/64", foram tratadas com óxido de Zn (Max Zinc[®], Agrichem, Ribeirão Preto, Brasil) na dose de 200 mL ZnO.ha⁻¹, a qual corresponde a 200 g Zn. ha⁻¹. O produto utilizado consiste em uma suspensão concentrada, na qual as partículas de ZnO apresentam D90 de 1.9 µm, de acordo com a análise realizada por difração de laser utilizando o equipamento MicroTec Plus Analysette 22 (Fritsch, Germany), com o ultrassom no modo desligado e utilizando o índice de refração do ZnO de 2,008. As partículas do produto foram dispersas em água pelo agitador do aparelho e transportadas para a célula de medição, com a suspensão fluindo a 6 L.min⁻¹ e analisada por meio do feixe de laser. As medições foram feitas em triplicadas.

2.2.2 Parte 1

2.2.2.1 Preparo das amostras de sementes

As sementes foram tratadas e armazenadas sob condições não controladas de umidade relativa do ar e temperatura, as quais foram monitoradas diariamente e os dados encontram-se no APÊNDICE B. Após o armazenamento pelo período de 24 horas (consideradas como o tempo 0 meses) e 6 e 12 meses, as sementes tratadas foram submetidas ao procedimento de lavagem para a remoção do ZnO, o qual estava em revestimento. O procedimento de lavagem foi realizado colocando-se uma semente tratada em contato com 5 mL de uma solução de HNO₃ a 10 % v.v⁻¹ em um tubo de ensaio de vidro com capacidade para 15 mL. Os tubos foram sonicados por 7 ciclos de 30 segundos cada, em banho ultrassônico (Quimis[®], Diadema, SP, Brasil), esse procedimento foi realizado colocando-se 4 tubos na parte central do banho. Após a última lavagem (sétima), as sementes foram lavadas 3 vezes com água deionizada (resistividade de 18.2 MΩ cm) e secas em capela de fluxo laminar por 24 horas. Para avaliar a eficiência da lavagem, determinou-se a concentração de Zn por Espectrometria de Absorção Atômica com Chama na solução ácida obtida após cada uma das 7 lavagens e comprou-se com o valor obtido para o branco, ou seja, a solução obtida pela lavagem das sementes não tratadas, as quais foram lavadas conforme o procedimento descrito, apenas para a comparação com o extrato das sementes tratadas.

Após a lavagem, as sementes tratadas e não tratadas foram seccionadas longitudinalmente na parte central, utilizando um micrótomo rotativo (Leica®, Buffalo Grove, EUA) permitindo a exposição das estruturas anatômicas internas das sementes. As partes seccionadas foram padronizadas com cerca de 1 mm de espessura e, em seguida, colocadas em porta-amostra de acrílico com um filme Ultralene® de 4 µm de espessura e reservadas para análise. Na Figura 1 é possível verificar o corte transversal da semente.

Figura 1. Sementes de milho: números 1 e 2 correspondem a seção vertical em 2 planos, adaptado de COE (2001) e o número 3 consiste no corte realizado no micrótomo rotativo. O arranjo de órgãos e tecidos em 2 e 3, caracterizam: a: cicatriz; b: pericarpo; c: camada de aleurona; d: endosperma; e: escutelo; f: camada glandular do escutelo; g: coleoptilo; h: folhas primárias (plúmula); i: primeiro internódio; j: região das raízes adventícias seminais; k: nódulo escutelar; l: raiz primária; m: coleorriza; n: células condutoras basais do endosperma; o: camada de abscisão negra; p: pedicelo.

Uma amostra contendo 50 sementes tratadas e lavadas e as não tratadas foram colocadas em papel-toalha umedecido com quantidade de água deionizada equivalente a 2,5 vezes a massa do papel e mantidas por 24 horas sob temperatura de 20 °C. Em seguida, com o auxílio de um bisturi, foram separadas as partes das sementes: embrião, endosperma e pericarpo, totalizando 50 sementes por tratamento. As partes separadas de cada semente de cada tratamento foram colocadas para secar a 60 ± 5 °C por 24 horas. As amostras secas foram

trituras criogenicamente (Spex 6800 Freezer Mill, EUA) durante 30 min (15 ciclos de moagem de 2 min). O material foi reservado para análise.

2.2.3 Parte 2

2.2.3.1 Preparo das amostras de plântulas

Após o tratamento com ZnO, as sementes tratadas e não tratadas (controle) foram colocadas para germinar em tubos de polipropileno da marca falcon[®] com capacidade para 50 mL, preenchidos até o volume de 40 mL com vermiculita umedecida com água deionizada (resistividade de 18.2 MΩ cm), com 70% da capacidade de retenção do substrato, monitorada diariamente. As sementes em germinação foram mantidas em temperatura ambiente por 48, 72, 96 e 120 horas.

Após 48 horas de germinação, havia ocorrido a protrusão radicular e a raiz primária encontrava-se com cerca de 2 mm de comprimento; as sementes germinadas por 48 horas foram lavadas com água deionizada de modo a retirar todo o resíduo do tratamento com ZnO que estava no pericarpo, e com o auxílio de uma lâmina de bisturi, foi cortada uma seção transversal no meio da semente; o corte foi realizado de modo a manter a parte de interesse para análise com cerca de 1mm de espessura.

Após 72, 96 e 120 horas de germinação, foi possível observar as partes da plântula de milho: coleoptilo (parte aérea) e a raiz primária. As plântulas foram retiradas do substrato, e tiveram as suas partes separadas e lavadas com água deionizada de modo a retirar qualquer resíduo do tratamento que houvesse na parte externa (não absorvido). Foram feitos cortes na parte aérea e na raiz primária, de aproximadamente 10 a 15 mm de comprimento (Figura 2).

Figura 2. Demonstração do procedimento de preparo das amostras de plântulas de milho (parte aérea e raiz) de sementes tratadas e não tratadas germinadas por 72, 96 e 120 horas. A figura consiste em uma plântula após a germinação por 120 horas.

As partes da raiz e da parte aérea das plântulas foram colocados em suporte de acrílico para amostra entre dois pedaços de filme Ultralene® com uma espessura de 4 μm , de modo a vedar o material vegetal a ser analisado; em volta da amostra a ser analisada foram colocados 4 pedaços de algodão umedecidos com água deionizada para manter a hidratação do tecido por maior tempo possível, enquanto as análises eram realizadas (Figura 3). O filme de Ultralene continha frequentemente água livre, mesmo após a análise, indicando que as partes das plântulas ainda permaneciam hidratadas. Este material foi reservado para análise por SR μ -XRF.

Figura 3. Porta-amostra de acrílico para a análise das partes das plântulas de milho (parte aérea e raiz) de sementes tratadas e não tratadas germinadas por 72, 96 e 120 horas.

Sementes tratadas com ZnO e não tratadas após a germinação por 72, 96 e 120 horas nas mesmas condições descritas anteriormente foram separadas em parte aérea e raízes, para cada período de germinação (horas); foram realizadas triplicatas contendo 25 plântulas. As partes das plântulas foram lavadas em água deionizada e secas em estufa com circulação de ar mantida a temperatura de $60 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 horas. O material seco foi moído criogenicamente (Spex 6800 Freezer Mill, USA) durante 30 min (15 ciclos de 2 min de moagem).

2.2.4 Análise por microscopia de fluorescência de raios X com radiação síncrotron (SR μ -XRF)

A distribuição de metais nas sementes seccionadas e partes das plântulas foi examinada utilizando a linha de luz (m-XRF *beamline*) no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) em Campinas, Brasil. A energia dos elétrons dentro do anel de armazenamento é de 1,37 GeV com um campo magnético nos dipolos de 1,65 T, que produz uma energia crítica para os fótons de 2,08 keV. A fonte de radiação síncrotron para a linha de luz XRF é o dipolo magnético D09B do anel do LNLS (PÉREZ et al., 1999).

A amostra foi posicionada no plano da imagem com uma precisão de 0,5 μm , que consiste no posicionamento dos 3 eixos (x, y, z) com controlado remotamente por meio de computador. Foi utilizado um microscópio óptico (com ampliação de 500 x) para localizar a região de interesse para a análise nas amostras. As medições foram realizadas em geometria padrão ($45^\circ + 45^\circ$), usando feixe branco focalizado no tamanho de 12 microns x 22 microns por meio do uso de um par de espelhos configurados na geometria de Kirkpatrick-Baez. O espectro de fluorescência foi coletado com um detector de Silicon Drift com resolução de energia de 140 eV (FWHM) a 5,9 keV, em atmosfera de ar, sendo que o detector foi posicionado a 90° da direção de incidência do feixe no plano da órbita dos elétrons, para minimizar a contribuição da radiação espalhada nas amostras.

Na parte 1 do estudo, foi realizado o mapeamento total das partes das sementes para avaliar os pontos de interesse para promover uma análise com maiores detalhes (maior resolução espacial) em pontos específicos da semente. O mapeamento total da área transversal das sementes de milho tratadas com ZnO armazenadas por 0, 6 e 12 meses e não tratadas foi realizado pela varredura bidimensional (x, y). O padrão de varredura adotado foi o mesmo para todas as amostras; o tempo de medição por pixel foi ajustado para $0,4 \text{ seg.pixel}^{-1}$ e o tamanho do passo foi de 50 μm em ambas as direções. O tamanho da matriz da análise variou de acordo com o tamanho da área mapeada da semente. Um mapeamento total foi feito para cada

tratamento, e em seguida, repetiu-se o mapa total das sementes não tratadas (controle) e das sementes tratadas e armazenadas por 12 meses.

A partir do mapeamento total da área transversal das sementes, foram selecionados quatro locais (pontos) de interesse nas sementes em cada região: interseção entre o endosperma e o pericarpo, endosperma, interseção entre o embrião e o endosperma e o embrião. O mapa de cada região (ponto de interesse) foi feito com o tempo de medição por pixel ajustado para $0,4 \text{ seg.pixel}^{-1}$ e o tamanho do passo foi menor do que o realizado para o mapeamento total das sementes, de $25 \mu\text{m}$ em ambas as direções, de forma a proporcionar uma maior resolução. A matriz de cada parte da semente (ponto) foi de 40×40 .

Na parte 2 do estudo, foi realizado o mapeamento de uma região que compreendia a raiz primária em desenvolvimento para as sementes germinadas por 48 horas e nas partes das plântulas de milho (coleoptilo e raiz primária) de sementes tratadas e não tratadas germinadas por 72, 96 e 120 horas. O mapeamento foi realizado pela varredura bidimensional (x, y) com o tempo de medição por pixel ajustado para $0,4 \text{ seg.pixel}^{-1}$ e o tamanho do passo de $50 \mu\text{m}$ em ambas as direções. O tamanho da matriz da análise variou de acordo com o tamanho da área mapeada.

Os mapas de distribuição elementar foram gerados usando o *software* PyMCA 4.7.4 desenvolvido pelo grupo de suporte a instrumentação e *software* (BLISS) do síncrotron europeu ESRF (SOLÉ et al., 2007). Estes mapas foram utilizados para identificar os principais locais de acúmulo de Zn em cada parte da semente e em cada parte das plântulas de milho. Devido a limitação do tempo concedido para as análises por radiação síncrotron, não foram possíveis realizar triplicatas.

2.2.5 Digestão ácida e análise elementar por espectrometria de emissão óptica (ICP- OES)

Sementes inteiras e suas partes (pericarpo, endosperma e embrião) correspondendo à parte 1 deste estudo, e as plântulas (coleoptilo e radícula), constituintes da parte 2, após a moagem, foram digeridas de acordo com o procedimento descrito a seguir: pesou-se cerca de 100 mg do material, em triplicata, os quais foram transferidos para frascos de digestão de teflon do tipo TFM[®] e, em seguida, foram adicionados 2 mL de H_2O_2 30% v.v⁻¹ e 6 mL de HNO_3 20% v.v⁻¹.

Para a digestão das amostras foi utilizado um sistema de digestão micro-ondas com uma única câmara de reação (Ultrawave, Milestone, Sorisole, Itália) nas seguintes condições operacionais: i) pressurização com nitrogênio a 40 bar; ii) elevação da temperatura até 240 °C durante 20 min; iii) a temperatura de 240°C foi mantida por 20 min; iv) resfriamento durante 15 minutos. Os digeridos foram transferidos para frascos volumétricos e diluídos com água deionizada (resistividade de 18.2 MΩ cm) até 20 mL.

Nas digestões foi utilizado ácido nítrico (Merck[®], Darmstadt, Alemanha) sub-destilado e para reduzir possíveis problemas relacionados à contaminação, todos os materiais foram lavados com água deionizada e mantidos em banho com ácido nítrico (10% v.v⁻¹) por no mínimo 24 horas, antes do uso. As soluções foram preparadas em capela de fluxo laminar.

Para a verificação da exatidão do método, foram utilizados materiais de referência certificados (CRMs) do Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (NIST) (Gaithersburg, MD, EUA) que passaram pelo mesmo procedimento de digestão das amostras. Os resultados dos CRMs encontram-se no APÊNDICE A. Foram utilizados os seguintes CRMs: colmos de milho (CRM 8412), cereais de café da manhã fortificado (CRM 3233), folhas de macieira (CRM 1515) e folhas de pessegueiro (CRM 1547).

As soluções resultantes foram analisadas por ICP- OES com um espectrômetro de emissão óptica com visão axial e radial iCAP 6500 Duo (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) equipado com um nebulizador PEEK Mira Mist[®] e uma câmara de nebulização ciclônica. O Zn foi determinado aplicando as seguintes condições instrumentais: potência aplicada de radiofrequência de 1,2 kW; fluxo de argônio para o plasma, gás auxiliar e o nebulizador de 12, 0,5 e 0,6 L.min⁻¹, respectivamente; 1,5 mL.min⁻¹ de vazão de amostra e 20 s de tempo de medida. As determinações foram realizadas em triplicatas e os resultados foram expressos em concentrações de Zn em cada região da semente e em acúmulo de Zn na raiz e parte aérea das plântulas após 72, 96 e 120 horas de germinação.

Toda a parte de tratamento das sementes, digestão e a análise do material em ICP-OES foram realizadas no Laboratório de Química Analítica pertencente ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo (USP / CENA).

2.3 Resultados e discussão

2.3.1 Parte 1

A avaliação do extrato obtido nas lavagens das sementes demonstrou que a partir da quarta lavagem os valores percentuais de massa de Zn extraído das sementes não tratadas (controle) e tratadas com ZnO não diferem estatisticamente (Figura 4). Esse aspecto evidencia que quando as sementes foram cortadas para a análise de suas partes por SR μ -XRF ou para verificação das concentrações de Zn nas partes das sementes por ICP-OES, não ocorreu contaminação pela presença de resquícios do ZnO do recobrimento das sementes, sendo a lavagem efetiva na retirada do produto.

Figura 4. Percentual de massa de Zn extraído nas lavagens das sementes não tratadas (controle) e tratadas com ZnO, de acordo com o número de extrações. Médias e desvio padrão correspondem a 3 repetições. Teste de F para os tratamentos controle e sementes tratadas: ** $p \leq 0,01$.

2.3.1.1 Distribuição de Zn em sementes de milho por análise de SR μ -XRF

O mapeamento total de SR μ -XRF da área transversal das sementes não tratadas possibilitou a verificação dos principais locais (partes) de acúmulo de Zn nas sementes e além disso foi possível realizar a combinação do Zn com dois elementos importantes para a constituição das sementes, o primeiro deles consiste no S, o qual, pela análise das imagens, mostrou-se distribuído em todas as regiões das sementes e o segundo deles, o P, elemento que

possui um importante papel no acúmulo de outros metais, tais como o Zn nas sementes (Figuras 5).

Figura 5. Mapeamento da superfície transversal de **sementes de milho não tratadas (controle)** (A e D) por SR μ -XRF, dos elementos: Zn, S e P (B e E) e do Zn (C e F), na qual as barras de cor indicam as contagens de Zn da mais alta (vermelho) à mais baixa (azul). Condições de medida: diâmetro do feixe = 25 μ m; passo = 50 μ m; tempo de irradiação por local = 0,4 s; tempo total estimado de análise = 5 h. P1, P2, P3 e P4 = representam pontos de interesse para análise em maior resolução (tamanho: 1 x 1 cm).

A análise do mapeamento total de SR μ -XRF das sementes de milho não tratadas demonstrou que o S (coloração verde) está uniformemente distribuído por todas as partes das sementes (pericarpo, endosperma e embrião), ao passo que o P e o Zn, coloração azul e

vermelha no mapa, respectivamente, estão preferencialmente localizados na região do escutelo no embrião das sementes (Figuras 5B e 5E).

Com relação ao Zn, os mapas de distribuição elementar de SR μ -XRF, para as duas sementes não tratadas analisadas (Figuras 5A e 5D), demonstraram alto acúmulo desse elemento na região do embrião; logo acima da camada negra das sementes e da região basal de células que conduzem ao endosperma ocorre a maior acumulação de Zn (Figuras 5C e 5F); ressalta-se ainda que no endosperma, apenas para a segunda semente não tratada avaliada (Figura 5D), houve acúmulo de Zn em pontos específicos (Figuras 5E e 5F).

Os mapas de SR μ -XRF em regiões específicas das sementes não tratadas, demonstra que podem ocorrer locais isolados de acúmulo de Zn e que o elemento não está associado com a presença de P e S; esse comportamento é verificado no endosperma no ponto 1 (P1) (Figuras 6B e 6C – P1) ou no ponto 2 (P2) na região próxima ao escutelo (Figuras 6B e 6C – P2). No embrião ocorre a colocalização de P e Zn no escutelo, conforme verificado nos mapas dos pontos 3 e 4 (P3 e P4); todavia, por essas imagens, verifica-se também que nem todo o Zn presente no embrião está ligado ao P; na imagem relacionada ao ponto 3 (P3) observa-se que uma parte do Zn está associado ao P (coloração de tonalidade rosa), uma parte do Zn está associado ao S (coloração de tonalidade amarela) e outra parte do Zn não está ligado nem ao P e ao S (Figuras 7B e 7C – P3 e P4).

Figura 6. Mapeamento da área nos pontos: P1 e P2 das **sementes de milho não tratadas (controle)** (A) por SR μ -XRF, dos elementos: Zn, S e P (B) e do Zn (C), na qual as barras de cor indicam as contagens de Zn da mais alta (vermelho) à mais baixa (azul). Condições de medida: diâmetro do feixe = 25 μ m; passo = 25 μ m; tempo de irradiação por local = 0,4 seg. pixel^{-1} ; área de análise = 1 x 1 cm.

Figura 7. Mapeamento da área nos pontos: P3 e P4 das **sementes de milho não tratadas (controle)** (A) por SR μ -XRF, dos elementos: Zn, S e P (B) e do Zn (C), na qual as barras de cor indicam as contagens de Zn da mais alta (vermelho) à mais baixa (azul). Condições de medida: diâmetro do feixe = 25 μ m; passo = 25 μ m; tempo de irradiação por local = 0,4 seg. pixel^{-1} ; área de análise = 1 x 1 cm.

A localização do Zn em grãos de cereais, tais como arroz, trigo e cevada, foi objeto de estudo em alguns trabalhos; de modo geral, os elementos essenciais tem uma distribuição heterogênea nos grãos (LOMBI et al., 2011a; KYRIACOU et al., 2014; PERSSON et al., 2016); especificamente o Zn, nesses grãos de cereais, é preferencialmente acumulado na camada de aleurona e embrião, que são partes mais externas do grão (LIN et al., 2005; OZTURK et al., 2006; LIU et al., 2007; PERSSON et al., 2009; LOMBI et al., 2009; 2011a; CAKMAK et al., 2010a, 2010b; STOMPH et al., 2011; LU et al., 2013).

Os resultados desse trabalho demonstram que o acúmulo de Zn em grãos de milho segue o mesmo comportamento encontrado nos grãos dos demais cereais (arroz, trigo e cevada); esse elemento acumula-se principalmente em tecidos especializados, tais como o embrião, com pequenos pontos localizados de acúmulo no endosperma (LOMBI et al., 2011a; WANG et al., 2011).

Embora os processos fisiológicos de distribuição de Zn e outros micronutrientes, a partir da planta-mãe para os grãos de cereais sejam complexos, como apontado por vários autores (PALMGREN et al., 2008; BORG et al., 2009; TAURIS et al., 2009; CAKMAK et al., 2010b; OLSEN; PALMGREN, 2014), evidências de estudos realizados sugerem que os nutrientes são descarregados do feixe vascular e depois transportados por meio das células de transferência da projeção nucelar para o endosperma (KRISHNAN; DAYANANDAN, 2003; BORG et al., 2009).

Dessa forma, infere-se que para o melhor entendimento da região de maior acúmulo de Zn nos grãos, é necessária a compreensão dos eventos que ocorrem durante o processo de enchimento de grãos. A redistribuição de Zn para os grãos é realizada pelo floema é a via para o fornecimento do Zn proveniente da remobilização (PEARSON; RENGEL, 1994; GARNETT; GRAHAM, 2005), conseqüentemente, o padrão de distribuição de Zn nos grãos reflete o transporte de Zn local e a longa-distância dentro da planta (STOMPH et al., 2011; SUBRAMANIAN et al., 2011; WHITE; BROADLEY, 2011).

Em grãos de cevada e trigo, o floema descarrega fotossintéticos assimilados e íons para os tecidos dos grãos em desenvolvimento na região do vinco no grão, os quais são transportados, por meio das células da camada de aleurona, para o endosperma amiláceo e para o embrião (TAURIS et al., 2009; STOMPH et al., 2011; HEGELUND et al., 2012; AJIBOYE et al., 2015). Em alguns trabalhos realizados para trigo, tem-se observado grande acúmulo de Zn no vinco do floema (*“crease phloem”*), por ser a “porta de entrada” do nutriente nos grãos

(STOMPH et al., 2011; WANG et al. 2011; XUE et al., 2015; AJIBOYE et al., 2015). Para grãos de milho, o maior acúmulo de Zn, ocorre próximo às células condutoras basais do endosperma, onde ocorre a ligação do grão com a espiga e de onde provém os fotoassimilados.

Esse perfil de distribuição de Zn em grãos de arroz e trigo implica em preocupações da pesquisa, em virtude das principais partes onde ocorre o acúmulo desse elemento, a camada de aleurona e o embrião, serem partes, frequentemente, retiradas no processamento dos grãos, reduzindo, dessa forma, o valor nutricional dos grãos. Portanto, grande esforço tem sido feito no sentido de enriquecer o endosperma de grãos com Zn, parte que é normalmente consumida.

Alguns trabalhos foram realizados, com o objetivo de se investigar o impacto da aplicação de Zn nas folhas sobre a acumulação e localização de Zn em grãos de trigo, utilizando algumas técnicas de análise de imagens para avaliação da distribuição desse elemento (OZTURK et al., 2006; CAKMAK et al., 2010b, KUTMAN et al., 2011), entretanto, para o melhor entendimento da complexa distribuição de micronutrientes em tecidos, são necessárias técnicas especializadas tais como SR μ -XRF (LOMBI et al. 2009, 2011b, c; KYRIACOU et al., 2014; AJIBOYE et al., 2015). Em alguns trabalhos, foi observado que a aplicação de Zn foliar aumentou a concentração do elemento no endosperma de grãos de trigo (CAKMAK et al., 2010a), no tegumento (XUE et al., 2015) e no vinco com o floema, conforme avaliado por microscopia de XRF (AJIBOYE et al., 2015).

A análise da distribuição de Zn em grãos também tem contribuído para a identificação de materiais genéticos que acumulem esse nutriente nas partes comestíveis dos grãos, estratégia conhecida como biofortificação genética (JAKSOMSAK et al., 2015), bem como para a avaliação de materiais genéticos melhorados geneticamente para o menor acúmulo de ácido fítico (InsP6) (LIN et al., 2005; SAKAI et al., 2015), pois o InsP6 possui um grande papel na dinâmica de acumulação e distribuição de metais durante a formação das sementes.

Para a cultura do milho, apesar dos grãos não passarem pelo mesmo tipo de processamento realizado para grãos de arroz e trigo, existe uma preocupação da pesquisa genética, na redução do teor de ácido fítico dos grãos; nesse sentido Lin et al. (2005) avaliaram a concentração e distribuição de ácido fítico nas partes de grãos de milho em um tipo selvagem e outro mutante com baixo teor de ácido fítico. Os autores verificaram que cerca de 95% do ácido fítico nos grãos de milho está localizado no embrião, principalmente no escutelo, o mutante reduziu o teor de ácido fítico em 62% e também apresentaram maiores concentrações de Mg, Fe, Mn, K e Zn.

2.3.1.2 Concentração de Zn nas partes das sementes

Na Tabela 1 encontra-se os valores de concentração de Zn nas sementes inteiras e em suas partes (pericarpo, endosperma e embrião). Em uma análise inicial, verificou-se que o pericarpo e o embrião concentram a maior parte do Zn presente nas sementes de milho. Quando se compara a concentração de Zn nas partes de sementes tratadas e não tratadas (controle), observa-se que sementes tratadas apresentaram maiores concentrações de Zn em suas partes, a medida em que aumenta o tempo de armazenamento; entretanto, quando é avaliada a semente inteira esse comportamento não ocorre. Tal aspecto pode ser atribuído pelo efeito da massa total da semente, ter diluído prováveis acúmulos de Zn nos tecidos, proveniente do tratamento de sementes e, como consequência, não foram verificadas diferenças significativas nas concentrações de Zn entre sementes tratadas e não tratadas.

Tabela 1. Frações de massa de Zn (mg.kg⁻¹) em sementes inteiras de milho e em suas partes (pericarpo, endosperma e embrião), para sementes não tratadas (controle) e tratadas com ZnO após o armazenamento por 0, 6 e 12 meses.

Parte da semente	Tratamento	Zn (mg.kg ⁻¹) ¹
Semente inteira	Controle	36 ± 10 ^{ns}
	Sementes tratadas / armazenadas por 0 meses	32,8 ± 0,8
	Sementes tratadas / armazenadas por 6 meses	32,3 ± 0,4
	Sementes tratadas / armazenadas por 12 meses	30,8 ± 0,7
Pericarpo	Controle	50,5 ± 0,8 c *
	Sementes tratadas / armazenadas por 0 meses	121 ± 2 b
	Sementes tratadas / armazenadas por 6 meses	118,1 ± 0,4 b
	Sementes tratadas / armazenadas por 12 meses	138 ± 4 a
Endosperma	Controle	4,4 ± 0,3 c *
	Sementes tratadas / armazenadas por 0 meses	5,3 ± 0,2 b
	Sementes tratadas / armazenadas por 6 meses	5,7 ± 0,4 ab
	Sementes tratadas / armazenadas por 12 meses	6,5 ± 0,2 a
Embrião	Controle	46,1 ± 0,9 c *
	Sementes tratadas / armazenadas por 0 meses	56 ± 4 b
	Sementes tratadas / armazenadas por 6 meses	64,0 ± 0,3 a
	Sementes tratadas / armazenadas por 12 meses	55,9 ± 1,4 b

¹Médias seguidas por letras distintas na coluna, para cada parte da sementes, diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,01).

Os resultados obtidos com a determinação das frações de massa de Zn demonstraram que, durante o armazenamento das sementes de milho, o Zn em revestimento pode penetrar no pericarpo e acumular-se no endosperma ou no embrião das sementes; esse comportamento ocorre, provavelmente, quando as sementes são expostas às condições de armazenamento inapropriadas, pois nestas condições a atividade respiratória é mais acentuada, e mesmo que o pericarpo ofereça uma barreira de proteção às sementes, ela não é impermeável à entrada de compostos (DIAS et al., 2014; ZHANG et al., 2015); a entrada do ZnO pode prejudicar o sistema de reparo celular e acelerar a perda da viabilidade das sementes.

Os mapas de SR μ -XRF, além de possibilitarem a determinação dos locais de acúmulo do Zn nas sementes, também foram utilizados para propiciar a observação e a comparação de sementes não tratadas e das tratadas quanto à distribuição do Zn, após o armazenamento por 0, 6 e 12 meses, com o objetivo de avaliar se o perfil de acúmulo desse nutriente em sementes tratadas é alterado em relação às sementes não tratadas.

Numa primeira análise do mapeamento total de SR μ -XRF da área transversal das sementes, evidencia-se que sementes tratadas e armazenadas por 0 meses apresentam o mesmo perfil de acúmulo de Zn das sementes não tratadas (controle), o qual consiste no maior acúmulo de Zn na região do escutelo no embrião (Figuras 8B e 8C).

Figura 8. Mapeamento da superfície transversal de **sementes de milho tratadas com ZnO e armazenadas por 0 meses** (A) por SR μ -XRF, dos elementos: Zn, S e P (B) e do Zn (C), na qual as barras de cor indicam as contagens de Zn da mais alta (vermelho) à mais baixa (azul). Condições de medida: diâmetro do feixe = 25 μ m; passo = 50 μ m; tempo de irradiação por local = 0,4 s; tempo total estimado de análise = 5 h. P1, P2, P3 e P4 = representam pontos de interesse para análise em maior resolução (tamanho: 1 x 1 cm).

Por meio da observação dos mapas de SR μ -XRF em regiões específicas das sementes tratadas e armazenadas por 0 meses, não é possível afirmar que o Zn disponibilizado em tratamento de sementes penetrou no pericarpo, pois o endosperma (Ponto 1 - P1), a região de transição entre o escutelo e o embrião (Ponto 2 - P2) e a região do embrião (Pontos 3 e 4 - P3 e P4) apresentaram padrão de acúmulo de Zn semelhante ao das sementes não tratadas (Figuras 9 e 10). Ressalta-se na imagem do ponto 1 (P1), referente ao endosperma, que nas sementes tratadas e armazenadas por 0 meses, o endosperma não apresentou uma região de grande acúmulo de Zn (Figuras 9B e 9C - P1), como as sementes não tratadas haviam apresentado (Figuras 6B e 6C - P1). Em relação ao mapa específico da região do embrião (pontos 3 e 4), verifica-se que ocorre a presença preponderante de Zn e Zn colocalizado com o P e S, como observado para sementes não tratadas (Figuras 10B – P3 e P4).

Figura 9. Mapeamento da área nos pontos: P1 e P2 das **sementes de milho tratadas com ZnO e armazenadas por 0 meses** (A) por SR μ -XRF, dos elementos: Zn, S e P (B) e do Zn (C), na qual as barras de cor indicam as contagens de Zn da mais alta (vermelho) à mais baixa (azul). Condições de medida: diâmetro do feixe = 25 μ m; passo = 25 μ m; tempo de irradiação por local = 0,4 seg. pixel⁻¹; área de análise = 1 x 1 cm.

Figura 10. Mapeamento da área nos pontos: P3 e P4 das **sementes de milho tratadas com ZnO e armazenadas por 0 meses** (A) por SR μ -XRF, dos elementos: Zn, S e P (B) e do Zn (C), na qual as barras de cor indicam as contagens de Zn da mais alta (vermelho) à mais baixa (azul). Condições de medida: diâmetro do feixe = 25 μ m; passo = 25 μ m; tempo de irradiação por local = 0,4 seg. pixel⁻¹; área de análise = 1 x 1 cm.

Para sementes tratadas e armazenadas por 6 meses, o padrão de acúmulo de Zn altera-se um pouco em relação às sementes não tratadas e tratadas e armazenadas por 0 meses, em razão do ponto de maior acúmulo de Zn nas sementes tratadas e armazenadas por 6 meses localizar-se próximo à região do escutelo (no endosperma), na forma de uma região bem delimitada, aparentemente contendo apenas Zn e não associado ao P, conforme exposto no mapa de SR μ -XRF (Figuras 11B e 11C).

Essa condição de acúmulo, fora do padrão de distribuição, pode indicar a presença de Zn proveniente do tratamento; todavia, apesar desse resultado confirmar os dados de concentração, não se pode afirmar que essa condição de acúmulo seja devida ao tratamento, pois a distribuição de metais, dentre eles o Zn, nas sementes, pode variar bastante dentro de uma mesma espécie. Em alguns trabalhos têm sido relatado que existe ampla variação nas concentrações e distribuição de Zn nas sementes de cereais relacionadas às diferentes condições de produção, tais como seca e fornecimento de nutrientes durante o cultivo das plantas (JAKSOMSAK et al., 2015; UPADHYAYA et al., 2016).

Figura 11. Mapeamento da superfície transversal de **sementes de milho tratadas com ZnO e armazenadas por 6 meses** (A) por SR μ -XRF, dos elementos: Zn, S e P (B) e do Zn (C), na qual as barras de cor indicam as contagens de Zn da mais alta (vermelho) à mais baixa (azul). Condições de medida: diâmetro do feixe = 25 μ m; passo = 50 μ m; tempo de irradiação por local = 0,4 s; tempo total estimado de análise = 5 h. P1, P2, P3 e P4 = representam pontos de interesse para análise em maior resolução (tamanho: 1 x 1 cm).

No primeiro mapa de SR μ -XRF das regiões específicas foi evidenciado o pericarpo das sementes tratadas e armazenadas por 6 meses, referente ao ponto 1 (P1). Pela observação do mapa, fica evidente que aos 6 meses de armazenamento o Zn disponibilizado via tratamento de sementes aparentemente é absorvido e acumulado na parte externa da semente; contudo não é possível identificar se o Zn encontra-se no pericarpo ou na camada de aleurona (Figuras 12B e 12C - P1). Tal comportamento não foi observado para sementes não tratadas (Figuras 6B e 6C - P1) e tratadas e armazenadas por 0 meses (Figuras 9B e 9C - P1). Nesse ponto de acúmulo de Zn o nutriente mostra-se associado ao S (pontos em amarelo) (Figuras 12B - P1).

No mapa de SR μ -XRF do ponto 2 (P2), região que compreende a transição entre o endosperma e o escutelo, foi realizada a avaliação do ponto de alto acúmulo de Zn nas sementes tratadas e armazenadas por 6 meses e observou-se que o Zn não estava associado ao P e ao S nesse local e que representava uma massa delimitada de Zn (Figuras 12B e 12C - P2).

Figura 12. Mapeamento da área nos pontos: P1 e P2 das **sementes de milho tratadas com ZnO e armazenadas por 6 meses** (A) por SR μ -XRF, dos elementos: Zn, S e P (B) e do Zn (C), na qual as barras de cor indicam as contagens de Zn da mais alta (vermelho) à mais baixa (azul). Condições de medida: diâmetro do feixe = 25 μ m; passo = 25 μ m; tempo de irradiação por local = 0,4 seg. pixel^{-1} ; área de análise = 1 x 1 cm.

Na região do embrião de sementes tratadas e armazenadas por 6 meses, foram observados pontos de elevado acúmulo de Zn de acordo com o número de contagens; no ponto 3 (P3) verifica-se, como nas demais sementes avaliadas, que uma parte do Zn não está associado ao P; entretanto, existe uma parte do Zn que está ligado ao P, pela tonalidade do mapa de SR μ -XRF (Figuras 13B e 13C - P3). No ponto 4 (P4), região próxima à camada negra, a associação de Zn e P ocorre, formando regiões esféricas de acúmulo desses dois elementos (Figuras 13B e 13C - P4). Lin et al. (2005) também observaram, para sementes de milho, que a associação de ácido fítico com P, K, Mg, Ca, Fe e Zn no escutelo é caracterizada pela formação de globóides nas células do escutelo e na camada de aleurona.

Figura 13. Mapeamento da área nos pontos: P3 e P4 das **sementes de milho tratadas com ZnO e armazenadas por 6 meses** (A) por SR μ -XRF, dos elementos: Zn, S e P (B) e do Zn (C), na qual as barras de cor indicam as contagens de Zn da mais alta (vermelho) à mais baixa (azul). Condições de medida: diâmetro do feixe = 25 μ m; passo = 25 μ m; tempo de irradiação por local = 0,4 seg. pixel⁻¹; área de análise = 1 x 1 cm.

Foram avaliadas por SR μ -XRF duas sementes tratadas e armazenadas por 12 meses, para a primeira semente analisada (Figura 14A), observa-se que houve acúmulo de Zn no endosperma em alguns pontos específicos e na região que delimita o escutelo (Figuras 14B e 14C). Para a segunda semente tratada e armazenada por 12 meses avaliada por SR μ -XRF (Figura 14D) observou-se o mesmo padrão de acúmulo de Zn das demais sementes analisadas, na região do embrião e houve também um ponto de maior acúmulo na região do pericarpo (Figuras 14E e 14F).

Figura 14. Mapeamento da superfície transversal de **sementes de milho tratadas com ZnO e armazenadas por 12 meses** (A e D) por SR μ -XRF, dos elementos: Zn, S e P (B e E) e do Zn (C e F), na qual as barras de cor indicam as contagens de Zn da mais alta (vermelho) à mais baixa (azul). Condições de medida: diâmetro do feixe = 25 μ m; passo = 50 μ m; tempo de irradiação por local = 0,4 s; tempo total estimado de análise = 5 h. P1, P2, P3 e P4 = representam pontos de interesse para análise em maior resolução (tamanho: 1 x 1 cm).

Nos mapas de SR μ -XRF das partes específicas da semente tratada e armazenada por 12 meses, houve pontos isolados de maior acúmulo de Zn no endosperma, conforme já havia sido observado no mapa da área transversal das sementes, o Zn nesse local não estava associado ao P e nem ao S (Figuras 15B e 15C - P1 e P2). Pelos mapas específicos da região do embrião

pode-se observar o mesmo perfil de acúmulo de Zn das demais sementes avaliadas (Figuras 16B e 16C - P3 e P4).

Figura 15. Mapeamento da área nos pontos: P1 e P2 das **sementes de milho tratadas com ZnO e armazenadas por 12 meses** (A) por SR μ -XRF, dos elementos: Zn, S e P (B) e do Zn (C), na qual as barras de cor indicam as contagens de Zn da mais alta (vermelho) à mais baixa (azul). Condições de medida: diâmetro do feixe = 25 μ m; passo = 25 μ m; tempo de irradiação por local = 0,4 seg. pixel⁻¹; área de análise = 1 x 1 cm.

Figura 16. Mapeamento da área nos pontos: P1 e P2 das **sementes de milho tratadas com ZnO e armazenadas por 12 meses** (A) por SR μ -XRF, dos elementos: Zn, S e P (B) e do Zn (C), na qual as barras de cor indicam as contagens de Zn da mais alta (vermelho) à mais baixa (azul). Condições de medida: diâmetro do feixe = 25 μ m; passo = 25 μ m; tempo de irradiação por local = 0,4 seg. pixel^{-1} ; área de análise = 1 x 1 cm.

2.3.1.3 Interação do Zn com P e S nas sementes

De forma geral, nos mapas de SR μ -XRF das sementes, foi observada a colocação de P e Zn em regiões do escutelo, especialmente na área de maior concentração de Zn, acima da camada negra; esse resultado indica que ambos os elementos podem estar na forma de fitato, pois segundo Iwai et al. (2012) para formar fitato, o P e os demais elementos (Mg, K, Ca, Mn, Fe e Zn) devem estar presentes no mesmo local. Portanto, a determinação da localização precisa do P e dos outros elementos nos tecidos de sementes, permite avaliar a presença de fitato, assim como as diferenças na distribuição dos metais com o P podem sugerir o armazenamento dos metais em outra forma que não seja fitato.

Iwai et al. (2012) verificaram que durante a formação de grãos de arroz, a molécula de P foi rapidamente incorporada ao ácido fitico, o qual se acumulou preferencialmente na parte externa das sementes, na camada de aleurona; o mesmo comportamento foi observado em grãos de trigo e cevada (ZAIMA et al., 2010). Por outro lado, os resultados obtidos indicam que em

sementes de milho o ácido fítico é principalmente armazenado no embrião. Bohn et al. (2008) ressaltaram que em grãos de arroz, trigo, cevada e milho o fitato é armazenado como globóides, os quais são compartimentalizados em proteínas armazenadas nos vacúolos das células. Segundo Raboy (2009) ainda não se sabe se todos os metais podem se ligar da mesma forma ao ácido fítico, embora a maioria dos elementos ocorram em sementes na forma de fitato.

Com relação à biofortificação, o fitato forma complexos insolúveis com Zn constituindo-se em um anti-nutriente (CLEMENS, 2014). Contudo, para as sementes, a presença do fitato é um aspecto positivo, pois durante a germinação, o fitato é hidrolisado por fitases, liberando fosfatos inorgânicos, inositol e vários minerais além de Zn, tais como K, Mg, Ca, Mn e Fe (LOEWUS; MURTHY, 2000), representando um componente de grande importância para a nutrição das plântulas.

Os resultados demonstraram que uma parte do Zn estava colocalizado com P, entretanto, haviam pontos no embrião e no endosperma em que esses dois elementos não estavam associados e que em função desse resultado, provavelmente o Zn esteja em outra forma química. Esse aspecto foi relatado por Iwai et al. (2012) em sementes de arroz, quando os autores verificaram que uma parte do Zn nas sementes estava ligado ao ácido fítico, enquanto outra parte estava em outra forma não identificada, no endosperma.

Sakai et al. (2015) também verificaram, por SR μ -XRF, que nem todos os cátions minerais em sementes de arroz estão na forma de fitato, e que o Zn e Cu acumulam-se na forma de outro composto no endosperma; os autores fizeram essa afirmação em função de uma quantidade significativa de Zn e Cu não estarem colocalizados com P nos tecidos do endosperma. Para sementes de milho, verificou-se que o Zn no endosperma não está associado ao P e nem ao S.

O Zn também pode estar associado a compostos de baixo peso molecular em grãos, como verificou-se em grãos de trigo, provavelmente na forma de Zn-nicotianamina (EAGLING et al., 2014). Persson et al. (2009) em análises de especiação de embriões de cevada encontraram que o Zn estava associado ao S indicando a existência de ligação de Zn a proteínas e, ou a peptídeos. Em grãos de trigo, a especiação detectou a associação de S com Fe, além do P e do oxigênio (SINGH et al., 2013).

O mapeamento total por SR μ -XRF do corte transversal de sementes não permitiu a observação da colocalização de Zn e S; contudo, quando se avaliou áreas específicas nas sementes com uma maior resolução espacial, foram observadas regiões (tonalidade amarela),

as quais consistem na associação de Zn e S, especialmente na delimitação do eixo embrionário (Figura 7B - P3 e Figuras 10B dos P3 e P4) e na camada negra (Figura 13B - P4).

O S possui um importante papel na constituição dos aminoácidos metionina e cisteína e, portanto, está presente na maioria das proteínas. Com base na importância da ampla gama de metabólitos e proteínas contendo S, as vias de assimilação desse elemento nas plantas são rigorosamente reguladas. Sementes de milho, apresentaram uma distribuição uniforme do S em todas as partes (pericarpo, endosperma e embrião) e embora esse elemento esteja mais abundante no embrião, foi o único elemento, dentre os determinados (Ca, Cl, Cu, Fe, K, Mn, P e Zn, mapas não elaborado para todos), que também apresentou elevado acúmulo no endosperma. Wu et al. (2013) também observaram o mesmo padrão de acúmulo de S em grãos de trigo.

Para grãos de arroz, Lombi et al. (2009) utilizaram a análise por SR μ -XRF e encontraram pontos específicos de colocalização dos elementos Zn e S na camada de aleurona e pericarpo que se estendeu ao endosperma, o que segundo os autores pode indicar a complexação do Zn com grupos (thiol) -SH, tais como os presentes em fitoquelatinas e metalotioneína, as quais possuem um importante papel na quelação por ácidos orgânicos e aminoácidos, compartimentalização de metal em estruturas subcelulares, além de mecanismos enzimáticos e não enzimáticos de proteção contra o estresse oxidativo propiciado pela presença de metais pesados em excesso nas células (WANG et al., 2009). Dessa forma, a associação de Zn e S também pode indicar a ativação do sistema de defesa celular, em função do elevado acúmulo de Zn nas sementes.

Nas sementes também podem ser encontrados ácidos orgânicos, tais como malato ou citrato, os quais podem favorecer a absorção de Zn e auxiliar no transporte do Zn no floema (BOUIS; WELCH, 2010; SHAHZAD et al., 2014), possuindo um papel importante na homeostase de Zn nas plantas (SINCLAIR; KRÄMER, 2012).

2.3.2 Parte 2

O mapa de SR μ -XRF da região destacada nas sementes não tratadas, germinadas por 48 horas, indica que o Zn segue o mesmo comportamento de distribuição mencionado na primeira parte do estudo, o qual consiste no alto acúmulo na região próxima à camada negra no escutelo. Contudo o Zn, após 48 horas do início da germinação das sementes, não demonstra ter sido remobilizado para a raiz primária em desenvolvimento, permanecendo na região do escutelo (Figura 17B e 17C). Apenas mediante uma análise quantitativa, que

implica em dados mais precisos sobre as concentrações de Zn nas partes da semente, é possível afirmar que o Zn não é redistribuído para a raiz primária em formação.

O mapa de SR μ -XRF para a semente tratada, após 48 horas de germinação, indicou que a composição natural de Zn (reserva) certamente era distinta do perfil observado até o momento para sementes de milho, em razão do mapa não indicar a associação de Zn com P na região do escutelo, acima da camada negra. Por meio da observação da imagem, verifica-se que o Zn disponibilizado via tratamento está sendo absorvido pelas sementes e provavelmente o ponto de entrada seja a região do embrião, pela presença de pontos em vermelho, os quais representam elevada concentração de Zn no mapa de SR μ -XRF (Figuras 18B e 18C).

Ainda com relação às imagens de sementes germinadas por 48 horas, foi realizado o mapa de distribuição do P, o qual está em menor concentração do que o Zn; ressalta-se também que o ponto de maior acúmulo de P não coincide com o de Zn (Figuras 17D e 18D), apesar de verificar no mapa para sementes não tratadas a coloração de tonalidade rosa, a qual representa P e Zn, associados no embrião (Figura 17B). Pelo fato do Zn estar mais concentrado do que o P, quando é calculado o mapa baseado nas contagens de Zn menos as contagens do P em cada ponto não se altera, permanecendo semelhante ao mapa para o Zn (Figuras 17E e 18E), enquanto para o cálculo de P menos o Zn, as contagens ficam negativas (Figuras 17F e 18F) e para a divisão do Zn pelo P, as contagens se aproximam de zero (Figuras 17G e 18G); tal aspecto indica que em muitos pontos os dois elementos podem estar associados.

É justificável que o principal local de entrada do Zn fornecido via tratamento de sementes, durante o processo de germinação das sementes, seja a região do embrião pois as diferentes partes da semente de milho absorvem água com velocidades distintas, sendo que o embrião absorve com maior velocidade e de forma contínua, em razão do alongamento e da divisão celular; em contrapartida, o tegumento reidrata-se com velocidade inferior às demais partes e o endosperma reidrata-se a uma velocidade intermediária (BEWLEY; BLACK, 1994; McDONALD et al., 1994). Dessa forma, os resultados indicam que o Zn disponibilizado via tratamento entra na semente durante o processo germinativo junto com a água e em função do embrião embeber mais rapidamente é a região da semente onde ocorre a maior parte da absorção do Zn disponibilizado via tratamento de sementes.

A região do embrião apresenta-se como a principal “porta de entrada” para o elemento disponibilizado em tratamento de sementes; contudo, a absorção do Zn ou mesmo a redistribuição desse elemento para as demais partes das sementes, durante a germinação, não

podem ser descartadas, haja vista a elevada concentração encontrada no endosperma e pericarpo de sementes tratadas, em comparação com as sementes não tratadas (Figuras 17C e 18C). Segundo Zhang et al. (2015) o Zn é absorvido principalmente após a ocorrência da protrusão radicular, pelas raízes primárias, e que durante a germinação, pouco Zn é encontrado no endosperma que está sendo consumido para fornecer reservas à plântula em desenvolvimento.

Figura 17. Mapas de distribuição elemental de SR μ -XRF da **semente não tratada (controle)** após **48 horas de germinação**, com o destaque para a região de análise (A), mapa dos elementos: Zn, S e P (B), Zn (C), P (D), Zn - P (E), P - Zn (F) e Zn / P (G).

Figura 18. Mapas de distribuição elementar de SR μ -XRF da **semente tratada com ZnO** após **48 horas de germinação**, com o destaque para a região de análise (A), mapa dos elementos: Zn, S e P (B), Zn (C), P (D), Zn - P (E), P - Zn (F) e Zn / P (G).

Para a avaliação das plântulas, após 72, 96 e 120 horas de germinação das sementes, a massa seca da parte aérea e das raízes das plântulas de milho foram avaliadas separadamente e os resultados demonstraram que o tratamento não propiciou o aumento significativo da massa seca (Figuras 19A e 19B); por outro lado, o acúmulo de Zn nas raízes e parte aérea das plântulas aumentou consideravelmente após 72, 96 e 120 horas de germinação (Figura 19C e 19D), indicando que as plântulas absorveram o Zn disponibilizado.

Figura 19. Massa seca da raiz (A) e da parte aérea (PA) (B) e acúmulo de Zn nas raízes (C) e na parte aérea (D) de plântulas de milho provenientes de sementes não tratadas (controle) e tratadas com ZnO, em vermelho e preto, respectivamente, após a germinação por 72, 96 e 120 horas. Teste de F para os tratamentos controle e sementes tratadas: ** $p \leq 0,01$.

Para avaliar como ocorre a distribuição do Zn absorvido pelo tratamento de sementes em plântulas, foram feitas imagens de SR μ -XRF da parte aérea e raízes de plântulas em cada período de germinação das sementes (72, 96 e 120 horas). Os mapas de cada região foram

observados por meio da comparação entre plântulas provenientes de sementes não tratadas e tratadas, avaliando o número de contagens de Zn em cada parte e a distribuição do elemento nos tecidos.

Pela análise das imagens de SR μ -XRF, observa-se que após 72, 96 e 120 horas de germinação, tanto a parte aérea quanto as raízes de plântulas que receberam o fornecimento de Zn apresentaram maior acúmulo de Zn do que aquelas que não receberam (Figuras 20, 21 e 22). Hernandez-viezcas et al. (2013) demonstraram que plantas de soja cultivadas em solo com nanopartículas de ZnO acumularam mais Zn na parte aérea.

Nas raízes de plântulas provenientes de sementes tratadas, após 72 horas de germinação, quando compara-se o acúmulo de Zn nos terços superior, médio e inferior, verificou-se que a região da coifa da raiz parece ser uma área de grande acúmulo de Zn tanto para plântulas provenientes de sementes não tratadas como para aquelas que tiveram o fornecimento adicional de Zn (Figura 20). Lv et al. (2015) investigaram a absorção de nanopartículas de ZnO presentes no solo por plântulas de milho e encontraram resultados semelhantes de elevada concentração nas raízes, com a parte apical apresentando-se como uma região importante na absorção.

A parte apical das raízes de monocotiledôneas e dicotiledôneas possuem três regiões, classificadas de acordo com a atividade (meristemática, de alongamento e de maturação), conforme exposto na Figura 23A. Na região meristemática, as células dividem-se tanto em direção à base radicular, para formar células que se diferenciarão em tecidos da raiz funcional, quanto em direção ao ápice radicular, para formar a coifa, a qual protege as células meristemáticas à medida que a raiz se movimenta através do solo. A coifa secreta um material gelatinoso denominado *mucigel*, o qual frequentemente envolve o ápice radicular, apesar da sua função precisa não ser conhecida, tem sido sugerido que ele pode promover a transferência de nutrientes à raiz (RUSSEL, 1977). Dessa forma pode ocorrer absorção de nutrientes na parte apical das raízes.

Figura 20. Mapas de distribuição elemental de SR μ -XRF para o Zn: coleoptilo (parte aérea) (A), parte superior da raiz primária (B), parte mediana da raiz primária (C), parte inferior (apical) da raiz primária (D) e corte transversal da raiz na parte mediana de plântulas de milho provenientes de **sementes não tratadas (controle)** e **tratadas com ZnO** identificadas pelos números 1 e 2, respectivamente, após a **germinação por 72 horas**. As barras de cor indicam as contagens de Zn da mais alta (vermelho) a mais baixa (azul).

Figura 21. Mapas de distribuição elemental de SR μ -XRF para o Zn: coleoptilo (parte aérea) (A), parte superior da raiz primária (B), parte mediana da raiz primária (C), parte inferior (apical) da raiz primária (D) e corte transversal da raiz na parte mediana de plântulas de milho provenientes de **sementes não tratadas (controle)** e **tratadas com ZnO** identificadas pelos números 1 e 2, respectivamente, após a **germinação por 96 horas**. As barras de cor indicam as contagens de Zn da mais alta (vermelho) a mais baixa (azul).

Figura 22. Mapas de distribuição elemental de SR μ -XRF para o Zn: coleoptilo (parte aérea) (A), parte superior da raiz primária (B), parte mediana da raiz primária (C), parte inferior (apical) da raiz primária (D) e corte transversal da raiz na parte mediana de plântulas de milho provenientes de **sementes não tratadas (controle)** e **tratadas com ZnO** identificadas pelos números 1 e 2, respectivamente, após a **germinação por 120 horas**. As barras de cor indicam as contagens de Zn da mais alta (vermelho) a mais baixa (azul).

Figura 23. Seção longitudinal da região apical da raiz de plântulas, adaptado de Taiz; Zeiger (2013) (A) e corte transversal da parte mediana de plântulas de milho, identificando as regiões: epiderme, córtex e estelo (B).

De forma geral, observa-se grande acúmulo do Zn na ponta das raízes, parte que representa a região meristemática (Figura 23A), e para as plântulas que receberam o fornecimento de Zn esse acúmulo é intensificado (Figuras 20D1 e 20D2). Ozturk et al. (2006) também verificaram elevado acúmulo do Zn em tecidos meristemáticos de plântulas de trigo. É importante detalhar os eventos que ocorrem em cada parte do ápice radicular para compreender o papel do Zn nesse local; no ápice propriamente dito a divisão celular é relativamente lenta, sendo esta região denominada de centro quiescente. Após algumas gerações de lentas divisões celulares, as células radiculares deslocadas cerca de 0,1 mm do ápice começam a se dividir mais rapidamente. A divisão celular novamente vai diminuir cerca de 0,4 mm do ápice e as células expandem-se igualmente em todas as direções. A região de alongamento começa a 0,7 a 1,5 mm do ápice, na qual as células alongam-se rapidamente, e produzem um anel central de células denominado endoderme (Figura 23A).

Pela análise de SR μ -XRF de plântulas ressalta-se a grande importância do Zn, provavelmente relacionado a síntese de proteínas nos tecidos em formação (meristemáticos), os quais possuem um importante papel no crescimento e fornecimento de proteínas aos demais tecidos. Cakmak et al. (2010b) ressaltaram que a presença de Zn nos tecidos está relacionada com proteínas. As altas taxas de absorção de nutrientes na região apical da raiz resultam da

forte demanda por nutrientes nesses tecidos e da disponibilidade relativamente alta de nutrientes no substrato que as circunda.

O ponto preciso de entrada (absorção) dos minerais no sistema radicular tem sido um tópico de considerável interesse; além da participação da bainha de *mucigel*, que pode propiciar a absorção de nutrientes, segundo Lv et al. (2015) as nanopartículas de ZnO entram nas raízes na forma de ZnO, devido à adsorção delas à superfície radicular das plântulas, as quais foram parcialmente internalizadas, como evidenciado por microscopia de fluorescência, pelos autores. Alguns pontos em destaque nas raízes podem indicar tal comportamento nesse estudo, conforme apresentado nas Figuras 20B2 e 20C2. Todavia, nesse trabalho não foi possível verificar se o Zn está na forma de óxido.

Segundo Lv et al. (2015) as nanopartículas de ZnO são internalizadas nas células da ponta da raiz no milho, pois não há diferenciação morfológica exata da estria de Caspary nesse local; além disso, tanto o crescimento como a divisão das células nessa região são processos intensificados, assim as nanopartículas de ZnO adsorvidas na superfície das células da ponta da raiz são susceptíveis de serem incorporadas no espaço intercelular (no córtex), com a formação contínua de células no alongamento da raiz e são posteriormente incorporados pelas novas células e presentes nas células de outras regiões radiculares e, assim, têm a oportunidade de penetrar no cilindro vascular da raiz primária. Portanto, a estria de Caspary é a barreira para a entrada do Zn na forma de nanopartículas de ZnO nos feixes vasculares (estelo).

Apesar de Lv et al. (2015) demonstrarem que o Zn pode entrar na forma de nanopartículas de ZnO nas raízes, os autores verificaram que a maior parte do Zn absorvido estava na forma de Zn^{2+} liberado das nanopartículas de ZnO e acumulado principalmente na forma de fosfato de Zn. Os autores ainda verificaram que na parte apical das raízes o Zn foi encontrado principalmente na epiderme, sendo que uma pequena parte estava no córtex e uma concentração ainda menor entrou no sistema vascular, por meio de locais de descontinuidade da estria de Caspary; este aspecto ocorreu em função da endoderme impedir a entrada do Zn na forma de óxido no sistema vascular. Segundo Terzano et al. (2008), o Zn absorvido pelas raízes foi acumulado na região externa à endoderme da raiz sob a forma de fitato, enquanto uma fração menor do Zn é transportado via xilema ligado ao citrato.

Nas partes superior e inferior da raiz, após 72 horas de germinação, também foram verificadas maiores concentrações de Zn próximo à epiderme (Figuras 20B2 e 20C2), caracterizando a absorção do Zn disponibilizado via tratamento de sementes. A análise da seção

transversal da raiz, mostrou maiores concentrações de Zn na região externa (córtex) da raiz primária (Figura 19 E2).

Após 96 horas de germinação, a parte aérea das plântulas (coleoptilo) concentra grande acúmulo de Zn; entretanto, as maiores concentrações ainda foram observadas nas raízes. Na parte superior das raízes, identificadas com a letra “B”, é possível fazer uma comparação interessante entre plântulas provenientes de sementes não tratadas e tratadas; o ponto em destaque, com maior concentração de Zn corresponde certamente à presença de um pelo radicular ou sítio de afinidade ao Zn, pois o número de contagens em plântulas provenientes de sementes tratadas é cerca de 100 vezes maior do que em plântulas provenientes de sementes não tratadas (Figuras 21B1 e 21B2). Pela imagem do terço médio, verifica-se alta concentração de Zn na parte mediana, o que pode caracterizar a presença de Zn nos vasos vasculares (Figuras 21C2), bem como a análise do corte transversal pode confirmar esta avaliação, com regiões de maior concentração na parte central (Figuras 21E2). A região meristemática na parte apical da raiz primária, novamente, exibiu um alto acúmulo de Zn (Figuras 21D2).

Straczek et al. (2008) avaliaram a distribuição e a especiação de Zn em plantas de tabaco demonstraram que paredes celulares das raízes exibiam uma distribuição de sítios de afinidade para o Zn que estava solúvel em água e nesses pontos ocorre alta absorção do elemento.

No terço médio e superior da raiz, os pelos radiculares possuem um importante papel na absorção dos nutrientes, com grandes áreas superficiais para a absorção de água e solutos e eles aparecem primeiro na região de maturação na raiz primária (Figura 23A). É nesta região que o xilema desenvolve a capacidade de transportar quantidades substanciais de água e solutos para a parte aérea. Dentro do solo, os nutrientes podem mover-se em direção à superfície radicular tanto por fluxo de massa quanto por difusão. No fluxo de massa, os nutrientes são carregados pela água que se move através do solo em direção às raízes. A quantidade de nutrientes fornecida às raízes por fluxo de massa através do solo em direção à planta depende das taxas de transpiração e dos níveis de nutrientes na solução. Quando tanto a taxa de fluxo de água quanto as concentrações de nutrientes na solução do solo são altas, o fluxo de massa pode desempenhar um importante papel no suprimento de nutrientes.

Após 120 horas de germinação, na parte aérea observa-se elevado acúmulo de Zn no coleoptilo de plântulas que receberam fornecimento de Zn; esse aspecto é muito importante, pois nesse local ocorrem sucessivas divisões celulares para a formação das folhas (Figura 22A2). A imagem do terço superior da raiz das plântulas após 120 horas de germinação novamente identifica os pontos de entrada do Zn fornecido via tratamento de sementes (Figura

22B2) e as imagens do terço apical e do corte transversal são semelhantes às obtidas com 96 horas de germinação (Figura 22D2 e 22E2).

2.4 Conclusões

2.4.1 Parte 1

Sementes de milho apresentam maior acúmulo de Zn no escutelo, acima da camada negra, indicando provavelmente o descarregamento do floema nos grãos. O Zn presente no escutelo está preponderantemente ligado ao P, possivelmente na forma de fitato, contudo, também está associado ao S.

O Zn fornecido via tratamento de sementes, pode penetrar no pericarpo e acumular-se em pontos específicos da semente durante o armazenamento sob condições não controladas.

2.4.2 Parte 2

Durante o processo germinativo, a região do embrião é um importante local para a entrada do Zn disponibilizado via tratamento de sementes juntamente com a água.

Plântulas de milho, que receberam fornecimento de Zn pelo tratamento de sementes, apresentam, de modo geral, maiores acúmulos de Zn. Em plântulas de milho após 72, 96 e 120 horas de germinação, a parte apical da raiz primária, mais precisamente, na região meristemática, apresenta-se como um importante ponto de acúmulo do Zn. O Zn proveniente do tratamento de sementes, possivelmente entra nas raízes por meio de sítios de alta afinidade ao elemento e, ou por meio dos pelos radiculares.

Referências

- ADEDIRAN, G.A.; NGWENYAA, B.T.; MOSSELMANSB, J.F.W.; HEALA, K.V.; HARVIEA, B.A. Mechanisms behind bacteria induced plant growth promotion and Zn accumulation in *Brassica juncea*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 283, p. 490-499, 2015.
- AJIBOYE, B.; CAKMAK, I.; PATERSON, D.; JONGE, M.D.; HOWARD, D.L.; STACEY, S.P.; TORUN, A.A.; AYDIN, N.; McLAUGHLIN, M.J. X-ray fluorescence microscopy of zinc localization in wheat grains biofortified through foliar zinc applications at diferente growth stages under field conditions. **Plant Soil**, v. 392, p. 357-370, 2015.
- BAILLY, C. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. **Seed Science Research**, v. 14, p. 93-107, 2004.
- BALESTRAZZI, A.; CONFALONIERI, M.; MACOVEI, A.; CARBONERA, D. Seed imbibition in *Medicago truncatula* Gaertn.: expression profiles of DNA repair genes in relation to PEG-mediated stress. **Journal of Plant Physiology**, v. 168, p. 706-713, 2011.
- BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Seeds Physiology of development and germination**. New York: Plenum Press. 445 p. 1994.
- BOHN, L.; MEYER, A.S.; RASMUSSEN, S.K. Phytate: impact on environment and human nutrition. A challenge for molecular breeding. **Journal of Zhejiang University**, v. 9, p. 165-191, 2008.
- BORG, S.; BRINCH-PEDERSEN, H.; TAURIS, B.; HOLM, P. B. Iron transport, deposition and bioavailability in the wheat and barley grain. **Plant Soil**, v. 325, n. 15, 2009.
- BOUIS, H.E.; WELCH, R.M. Biofortification – a sustainable agricultural strategy forreducing micronutrient malnutrition in the global south, **Crop Science**, v. 50, p. S20-S32, 2010.
- BRAY, C.M.; WEST, C.E. DNA repair mechanisms in plants: crucial sensors and effectors for the maintenance of genome integrity. **New Phytologist**, v. 168, p. 511-528, 2005.
- BRIER, N.D.; GOMAND, S.V.; DONNER, E.; PATERSON, D.; DELCOUR, J.A.; LOMBI, E.; SMOLDERS, E. Distribution of minerals in wheat grains (*Triticum aestivum* L.) and in roller milling fractions affected by pearling. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2015, 63, p. 1276-1285.

- BRIGGS, G.; BROMILOW, R.; EVANS, A. Relationships between lipophilicity and root uptake and translocation of non-ionised chemicals by barley. **Pesticide Science**, v. 13, p. 495-504, 1982.
- CAKMAK, I. Enrichment of cereal grains with zinc: agronomic or genetic biofortification? **Plant Soil**, v. 302, p. 1-17, 2008.
- CAKMAK, I.; KALAYCI, M.; KAYA, Y.; TORUN, A.A.; AYDIN, N.; WANG, Y.; ARISOY, Z.; ERDEM, H.; YAZICI, A.; GOKMEN, O.; OZTURK, L.; HORST, W. J. Biofortification and localization of zinc in wheat grain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 9092-9102, 2010a.
- CAKMAK, I.; PFEIFFER, W.H.; McCLAFFERTY, B. Biofortification of durum wheat with zinc and iron. **Cereal Chemistry**, v. 87, p. 10-20, 2010b.
- CAMPION, B.; GLAHN, R.P.; TAVA, A.; PERRONE, D.; DORIA, E.; SPARVOLI, F.; CECOTTI, R.; DANI, V.; NIELSEN, E. Genetic reduction of antinutrients in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seed, increases nutrients and in vitro iron bioavailability without depressing main agronomic traits. **Field Crops Research**, v. 141, p. 27-37, 2013.
- CAREY, A.M.; SCHECKEL, K.G.; LOMBI, E.; NEWVILLE, M.; CHOI, Y.; NORTON, G.J.; CHARNOCK, J.M.; FELDMANN, J.; PRICE, A.H.; MEHARG, A.A. Grain unloading of arsenic species in rice. **Plant Physiology**, v. 152, p. 309-319, January 2010.
- CHEAH, K.S.E.; OSBORNE, D.J. DNA lesions occur with loss of viability in embryos of ageing rye seed. **Nature**, v. 272, p. 593-599, 1978.
- CLEMENS, S. Zn and Fe biofortification: The right chemical environment for human bioavailability. **Plant Science**, v. 225, p. 52-57, 2014.
- COE, E.H. The origins of maize genetics. **Nature Reviews Genetics**, v. 2, p. 898-905, 2001.
- DIAS, M.A.N.; TAYLOR, A.G.; CICERO, S.M.. Uptake of systemic seed treatments by maize evaluated with fluorescent tracers. **Seed Science and Technology**, v. 42, p. 101-107, 2014.
- DONNER, E.; DE JONGE, M.D.; KOPITTKE, P.M.; LOMBI, E. **Mapping element distributions in plant tissues using synchrotron X-ray fluorescence techniques**. In: Plant Mineral Nutrients: Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology (Vol. 953) (Maathuis, F.J.M., ed.), p. 143–159, Springer, 2013.
- EAGLING, T.; NEAL, A.L.; McGRATH, S.P.; TAIT, S. F.; SHEWRY, P.R.; ZHAO, F.J. Distribution and speciation of iron and zinc in grain of two wheat genotypes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 708-716, 2014.
- EDGINGTON, L.V. Structural requirements of systemic fungicides. **Annual Review of Phytopathology**, v. 19, p. 107-124, 1981.

- FAROOQ, M.; WAHID, A.; SIDDIQUE, K.H.M. Micronutrient application through seed treatments – a review. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v.12, p.125-142, 2012.
- GARNETT, T.P.; GRAHAM, R.D. Distribution and remobilization of iron and copper in wheat. **Annals of Botany**, v. 95, p. 817-826, 2005.
- GROOT, S.; SURKI, A.A.; VOS, R.; KODDE, J. Seed storage at elevated partial pressure of oxygen, a fast method for analysing seed ageing under dry conditions. **Annals of Botany**, v. 110, p. 1149-1159, 2012.
- HEGELUND, J.N.; PEDAS, P.; HUSTED, S.; SCHILLER, M.; SCHJOERRING, J.K. Zinc fluxes into developing barley grains: use of stable Zn isotopes to separate root uptake from remobilization in plants with contrasting Zn status. **Plant Soil**, v. 361, p. 241-250, 2012.
- HERNANDEZ-VIEZCAS, J.A.; CASTILLO-MICHEL, H.; ANDREWS, J.C.; COTTE, M.; RICO, C.; PERALTA-VIDEA, J.R.; GE, Y.; PRIESTER, J.H.; HOLDEN, P.A.; GARDEA-TORRESDEY, J.L. In situ synchrotron x-ray fluorescence mapping and speciation of CeO₂ and ZnO nanoparticles in soil cultivated soybean (*Glycine max*). **ACS Nano**, v. 7, p. 1415-1423, 2013.
- IWAI, T.; TAKAHASHI, M.; ODA, K.; TERADA, Y.; YOSHIDA, K.T. Dynamic changes in the distribution of minerals in relation to phytic acid accumulation during rice seed development. **Plant Physiology**, v. 160, p. 2007-2014, 2012.
- JAKSOMSAK, P.; YIMYAM, N.; DELL, B.; PROM-U-THAI, C.; RERKASEM, B. Variation of seed zinc in a local upland rice germplasm from Thailand. **Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization**, v. 13, n. 2, p. 168-175, 2015.
- KESHUN, L.; PETERSON, K.L.; RABOY, V. Comparison of the phosphorus and mineral concentrations in bran and abraded kernel fractions of a normal barley (*Hordeum vulgare*) cultivar versus four low phytic acid isolines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 11, 2007.
- KIM, S.A.; PUNSHON, T.; LANZIROTTI, A.; LI, L.; ALONSO, J.M.; ECKER, J.R.; KAPLAN, J.; GUERINOT, M.L. Localization of iron in Arabidopsis seed requires the vacuolar membrane transporter VIT1. **Science**, v. 314, p. 1295-1298, 2006.
- KRISHNAN, S.; DAYANANDAN, P. Structural and histochemical studies on grain-filling in the caryopsis of rice (*Oryza sativa* L.). **Journal of Biosciences**, v. 28, p. 455-469, 2003.

- KUMAR, S.J.; PRASAD, S.R.; BANERJEE, R.; THAMMINENI, C. Seed birth to death: dual functions of reactive oxygen species in seed physiology. **Annals of Botany**, v. 116, p. 663-668, 2015.
- KUTMAN, U.B.; YILDIZ, B.; CAKMAK, I. Effect of nitrogen on uptake, remobilization, and partitioning of zinc and iron throughout the development of durum wheat. **Plant Soil**, v. 342, p. 149-164, 2011.
- KYRIACOU, B.; MOORE, K.L.; PATERSON, D.; DE JONGE, M.D.; HOWARD, D.L.; STANGOULIS, J.; TESTER, M.; LOMBI, E.; JOHNSON, A.A.T. Localization of iron in rice grain using synchrotron X-ray fluorescence microscopy and high resolution secondary ion mass spectrometry. **Journal of Cereal Science**, v. 59, p. 173-180, 2014.
- LIN, L.; OCKENDEN, I.; LOTT, J.N.A. The concentrations and distribution of phytic acid-phosphorus and other mineral nutrients in wild-type and low phytic acid1-1 (*lpa1-1*) corn (*Zea mays* L.) grains and grain parts. **Canadian Journal of Botany**, v. 83, p. 131-141, 2005.
- LING, S.J.; QIANG, L.L. A study on distribution and chemical speciation of lead in corn seed germination by synchrotron radiation x-ray fluorescence and absorption near edge structure spectrometry. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 42, n. 10, p. 1447-1452, 2014.
- LOEWUS, F.A.; MURTHY, P.P.N. myo-Inositol metabolism in plants. **Plant Science**, v. 150, p. 1-19, 2000.
- LOMBI, E.; JONGE, M.D.; DONNER, E.; RYAN, C.G.; PATERSON, D. Trends in hard X-Ray fluorescence mapping: environmental applications in the age of fast detectors. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 400, p. 1637-1644, 2011b.
- LOMBI, E.; SCHECKEL, K. G.; KEMPSON, I. M. In situ analysis of metal(loid)s in plants: State of the art and artefacts. **Environmental and Experimental Botany**, v. 72, p. 3-17, 2011c.
- LOMBI, E.; SCHECKEL, K.G.; PALLON, J.; CAREY, A.M.; ZHU, Y.G.; MEHARG, A.A. Speciation and distribution of arsenic and localization of nutrients in rice grains. **New Phytologist**, v. 184, p. 193-201, 2009.
- LOMBI, E.; SMITH, E.; HANSEN, T.; PATERSON, D.; JONGE, M. DE; HOWARD, D.; PERSSON, D.P.; HUSTED, S.; RYAN, C.; SCHJOERRING, J.K. Megapixel imaging of (micro)nutrients in mature barley grains. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, v. 273-282, 2011a.
- LOMBI, E.; SUSINI, J. Synchrotron-based techniques for plant and soil science: opportunities, challenges and future perspectives. **Plant Soil**, v. 320, p. 1-35, 2009.

- LU, L.; LIAO, X.; LABAVITCH, J.; YANG, X.; NELSON, E.; DU, Y.; BROWN, P.H.; TIAN, S. Speciation and localization of Zn in the hyperaccumulator *Sedum alfredii* by extended X-ray absorption fine structure and micro-X-ray fluorescence. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 84, p. 224-232, 2014.
- LU, L.; TIAN, S.; LIAO, H.; ZHANG, J.; YANG, X.; LABAVITCH, J.M.; CHEN, W. Analysis of metal element distributions in rice (*Oryza sativa* L.) seeds and relocation during germination based on X-ray fluorescence imaging of Zn, Fe, K, Ca and Mn. **Plos One**, v. 8, n. 2, 2013.
- LV, J.; ZHANG, S.; LUO, L.; ZHANG, J.; YANG, K.; CHRISTIED, P. Accumulation, speciation and uptake pathway of ZnO nanoparticles in maize. **Environmental Science: Nano**, v. 2, p. 68-77, 2015.
- MCDONALD, M.B.JR.; SULLIVAN, J.; LAUER, M.J. The pathway of water uptake in maize seeds. **Seed Science and Technology**, v. 22, p. 79-90, 1994.
- MEHARG, A.A.; LOMBI, E.; WILLIAMS, P.N.; SCHECKEL, K.G.; FELDMANN, J.; RAAB, A.; ZHU, Y.; ISLAM, R. Speciation and localization of arsenic in white and brown rice grains. **Environmental Science and Technology**, v. 42, p. 1051-1057, 2008.
- MOHAMED-YASSEEN, Y.; BARRINGER, S.; SPLITTSTOESSER, W.; COSTANZA, S. The role of seed coats in seed viability. **Botanical Review**, v. 60, p. 426-439, 1994.
- MOORE, K.L.; CHEN, Y.; VAN DE MEENE, A.M.L.; HUGHES, L.; LIU, W.; GERAKE, T.; MOSSELMANS, F.; McGRATH, S.P.; GROVENOR, C.; ZHAO, F.J. Combined NanoSIMS and synchrotron X-ray fluorescence reveal distinct cellular and subcellular distribution patterns of trace elements in rice tissues. **New Phytologist**, v. 201, p. 104-115, 2014.
- MOORE, K.L.; ZHAO, F.J.; GRITSCH, C.S.; TOSI, P.; HAWKESFORD, M.J.; McGRATH, S.P.; SHEWRY, P.R.; GROVENOR, C.R.M. Localisation of iron in wheat grain using high resolution secondary ion mass spectrometry. **Journal of Cereal Science**, v. 55, p. 183-187, 2012.
- MURGIA, I.; AROSIO, P.; TARANTINO, D.; SOAVE, C. Biofortification for combating hiddenhunger for iron. **Trends Plant Science**, v. 17, p. 47-55, 2012.
- NEAL, A.L.; GERAKE, K.; BORG, S.; QUINN, P.; MOSSELMANS, J. F.; BRINCH-PEDERSEN, H.; SHEWRY, P.R. Iron and zinc complexation in wildtype and ferritin-

- expressing wheat grain: Implications for mineral transport into developing grain. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 18, p. 557-570, 2013.
- OLSEN, L.I.; PALMGREN, M.G. Many rivers to cross: the journey of zinc from soil to seed. **Front Plant Science**, v. 5, n. 30, p. 1-6, 2014.
- OZTURK, L.; YAZICI, M.A.; YUCEL, C.; TORUN, A.; CEKIC, C.; BAGCI, A.; OZKAN, H.; BRAUN, H.J.; SAYERS, Z.; CAKMAK, I. Concentration and localization of zinc during seed development and germination in wheat. **Physiologia Plantarum**, v. 128, p. 144-152, 2006.
- PALMGREN, M.G.; CLEMENS, S.; WILLIAMS, L.E.; KRAMER, U.; BORG, S.; SCHJØRRING, J.K.; SANDERS, D. Zinc biofortification of cereals: problems and solutions. **Trends Plant Science**, v. 13, p. 464-473, 2008.
- PEARSON, J.N.; RENGEL, Z. Distribution and remobilization of Zn and Mn during grain development in wheat. **Journal of Experimental Botany**, v. 45, p. 1829-1835, 1994.
- PÉREZ, C.A.; RADTKE, M.; SANCHEZ, H.J.; TOLENTINO, H.; NEUENSHWANDER, R.T.; BARG, W.; RUBIO, M.; BUENO, M.I.S.; RAIMUNDO, I.M.; ROHWEDDER, J.J.R. Synchrotron radiation X-ray fluorescence at the LNLS: beamline instrumentation and experiments. **X-Ray Spectrometry**, v. 28, p. 320-326, 1999.
- PERSSON, D.P.; BANG, T.C.; PEDAS, P.R.; KUTMAN, U.B.; CAKMAK, I.; ANDERSEN, B.; FINNIE, C.; SCHJØRRING, J.K.; HUSTED, S. Molecular speciation and tissue compartmentation of zinc in durum wheat grains with contrasting nutritional status. **New Phytologist**, 2016.
- PERSSON, D.P.; HANSEN, T.H.; LAURSEN, K.H.; SCHJØRRING, J.K.; HUSTED, S. Simultaneous iron, zinc, sulfur and phosphorus speciation analysis of barley grain tissues using SEC-ICP-MS and IP-ICP-MS. **Metallomics**, p. 418-426, 2009.
- PUNSHON, T.; HIRSCHI, K.; YANG, J.; LANZIROTTI, A.; LAI, B.; GUERINOT, M.L. The role of CAX1 and CAX3 in elemental distribution and abundance in Arabidopsis seed. **Plant Physiology**, v. 158, p. 352-362, 2012.
- QUEROU, R.; EUVRAD, M.; GAUVRIT, C. Uptake of triticonazole, during imbibition, by wheat caryopses after seed treatment. **Pesticide Science**, v. 49, p. 284-290, 1997.
- RABOY, V., Approaches and challenges to engineering seed phytate and total phosphorus, **Plant Science**, v. 177, p. 281-296, 2009.
- RAES, K.; KNOCKAERT, D.; STRUIJS, K.; CAMP, J.V. Role of processing on bioaccessibility of minerals: influence of location of minerals and anti-nutritional factors in the plant. **Trends Food Science Technology**, v. 37, p. 32-41, 2014.

- RAMOS, M.S.; KHODJA, H.; MARY, V.; THOMINE, S. Using μ PIXE for quantitative mapping of metal concentration in *Arabidopsis thaliana* seeds. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, n. 168, p. 1-10, 2013.
- RAWAT, N.; NEELAM, K.; TIWARI, V.K.; DHALIWAL, H.S. Biofortification of cereals to overcome hidden hunger. **Plant Breeding**, v. 132, p. 437-445, 2013.
- RUSSELL, R.S. **Plant root systems: Their function and interaction with the soil**. McGraw-Hill, London. In: TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia vegetal (5th ed., p. 918). Porto Alegre: Artmed, 2013.
- SAKAI, H.; IWAI, T.; MATSUBARA, C.; USUI, Y.; OKAMURA, M.; YATOU, O.; TERADA, Y.; AOKI, N.; NISHIDA, S.; YOSHIDA, K.T. A decrease in phytic acid content substantially affects the distribution of mineral elements within rice seeds. **Plant Science**, v. 238, p. 170-177, 2015.
- SALANENKA, Y.A.; TAYLOR, A.G. Seedcoat permeability: uptake and post-germination transport of applied model tracer compounds. **Hortscience**, v. 46, n. 4, 2011.
- SANO, N.; RAJJOU, L.; NORTH, H.M.; DEBEAUJON, I.; MARION-POLL, A.; SEO, M. Staying Alive: Molecular Aspects of Seed Longevity. **Plant Cell Physiology**, p. 1-15, 2015.
- SARRET, G.; PILON SMITS, E.A.H.; CASTILLO MICHEL, H.; ISAURE, M.P.; ZHAO, F.J.; TAPPERO, R. Use of synchrotron-based techniques to elucidate metal uptake and metabolism in plants. **Advances in Agronomy**, v. 119, p. 1-82, 2013.
- SARRET, G.; WILLEMS, G.; ISAURE, M.; MARCUS, M.A.; FAKRA, S.C.; FREROT, H.; PAIRIS, S.; GEOFFROY, N.; MANCEAU, A.; SAUMITOU-LAPRADE, P. Zinc distribution and speciation in *Arabidopsis halleri* x *Arabidopsis lyrata* progenies presenting various zinc accumulation capacities. **New Phytologist**, v. 184, p. 581-595, 2009.
- SHAHZAD, Z.; ROUACHED, H.; RAKHA, A. Combating mineral malnutrition through iron and zinc biofortification of cereals, **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, p. 329-346, 2014.
- SINCLAIR, S.A.; KRÄMER, U. The zinc homeostasis network of land plants. **Biochimica et Biophysica Acta**, p. 1553-1567, 2012.
- SINGH, S.P.; VOGEL-MIKUS, K.; ARCOM, I.; VAVPETIC, P.; JEROMEL, L.; PELICON, P.; KUMAR, J.; TULI, R. Pattern of iron distribution in maternal and filial tissues in wheat grains with contrasting levels of iron. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, p. 3249-3260, 2013.

- SOLÉ, V.A.; PAPILLON, E.; COTTE, M.; WALTER, PH.; SUSINI, J. A multiplatform code for the analysis of energy-dispersive X-ray fluorescence spectra. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 62, p. 63-68, 2007.
- STOMPH, T.J.; CHOI, E.Y.; STANGOULIS, J.C.R. Temporal dynamics in wheat grain zinc distribution: is sink limitation the key? **Annals of Botany**, v. 107, p. 927-937, 2011.
- STRACZEK, A.; SARRET, G.; MANCEAUB, A.; HINSINGER, P.; GEOFFROY, N.; JAILLAR, B. Zinc distribution and speciation in roots of various genotypes of tobacco exposed to Zn. **Environmental and Experimental Botany**, v. 63, p. 80-90, 2008.
- SUBRAMANIAN, N.K.; WHITE, P.J.; BROADLEY, M.R.; RAMSAY, G. The three-dimensional distribution of minerals in potato tubers. **Annals of Botany**, v. 107, p. 681-691, 2011.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal** (5th ed., p. 918). Porto Alegre: Artmed, 2013.
- TAURIS, B.; BORG, S.; GREGERSEN, P.L.; HOLM, P.B. A roadmap for zinc trafficking in the developing barley grain based on laser capture microdissection and gene expression profiling. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, p. 1333-1347, 2009.
- TAYLOR, A.G.; ECKENRODE, C.J.; STRAUB, R.W. Seed treatments for onions: challenges and progress. **HortScience**, v. 36, p. 199-205, 2001.
- TAYLOR, A.G.; SALANENKA, Y.A. Seed treatments: phytotoxicity amelioration and tracer uptake. **Seed Science Research**, v. 22, p. S86-S90, 2012.
- TERZANO, R.; CHAMI, Z.A.; VEKEMANS, B.; JANSSENS, K.; MIANO, T.; RUGGIERO, P. Zinc distribution and speciation within rocket plants (*Eruca vesicaria* L. Cavaleri) grown on a polluted soil amended with compost as determined by XRF microtomography and micro-XANES. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 3222-3231, 2008.
- THIELERT, W.; STEFFENS, W.; FUHR, F.; KUCK, K.H.; SCHEINPFLUG, H. Uptake of triadimenol through wheat caryopsis after application by seed treatment. **Pesticide Science**, v. 22, p. 93-105, 1988.
- UPADHYAYA, H.D.; DWIVEDI, S.L.; SINGH, S.; SAHRAWAT, K.L.; SINGH, S.K. Genetic variation and postflowering drought effects on seed iron and zinc in ICRISAT sorghum mini core collection. **Crop science**, v. 56, p. 374-384, 2016.
- WALTERS, C. Understanding the mechanisms and kinetics of seed ageing. **Seed Science Research**, v. 8, p. 223-244, 1998.
- WANG, C.; ZHANG, S. H.; WANG, P. F.; HOU, J.; ZHANG, W. J.; LI, W.; LIN, Z. P. The effect of excess Zn on mineral nutrition and antioxidative response in rapeseed seedlings. **Chemosphere**, v. 75, p. 1468-1476, 2009.

- WANG, Y.X.; SPECHT, A.; HORST, W.J. Stable isotope labelling and zinc distribution in grains studied by laser ablation ICP-MS in an ear culture system reveals zinc transport barriers during grain filling in wheat. **New Phytologist**, v. 189, p. 428-437, 2011.
- WATERWORTH, W.M.; BRAY, C.M.; WEST, C.E. The importance of safeguarding genome integrity in germination and seed longevity. **Journal of Experimental Botany**, v. 66, p. 3549-3558, 2015.
- WHITE, P.J., BROADLEY, M.R. Physiological limits to zinc biofortification of edible crops. **Frontiers in Plant Science**, v. 2, n. 80, 2011.
- WILLIAMS, P.N.; LOMBI, E.; SUN, G.X.; SCHECKEL, K.; ZHU, Y.G.; FENG, X.; ZHU, J.; CAREY, A.M.; ADOMAKO, E.; LAWGALI, Y.; DEACON, C.; MEHARG, A.A. Selenium characterization in the global rice supply chain. **Environmental Science and Technology**, v. 43, p. 6024-6030, 2009.
- WU, B.; ANDERSCH, F.; WESCHKE, W.; WEBERB, H.; BECKERA, J.S. Diverse accumulation and distribution of nutrient elements in developing wheat grain studied by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry imaging. **Metallomics**, v. 5, p. 1276-1284, 2013.
- WU, P.; TIAN, J. C.; WALKER, C. E.; WANG, F. C. Determination of phytic acid in cereals: a brief review. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 44, p. 1671-1676, 2009.
- XUE, Y.; XIA, H.; MCGRATH, S.P.; SHEWRY, P.R.; ZHAO, F. Distribution of the stable isotopes ^{57}Fe and ^{68}Zn in grain tissues of various wheat lines differing in their phytate content. **Plant Soil**, v. 396, p. 73-83, 2015.
- YOUNG, L.W.; WESTCOTT, N.D.; ATTENKOFERB, K.; REANEY, M.J.T. A high-throughput determination of metal concentrations in whole intact *Arabidopsis thaliana* seeds using synchrotron-based X-ray fluorescence spectroscopy. **Journal of Synchrotron Radiation**, v. 13, p. 304-313, 2006.
- ZAIMA, N.; GOTO-INOUE, N.; HAYASAKA, T.; SETOU, M. Application of imaging mass spectrometry for the analysis of *Oryza sativa* rice. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 24, p. 2723-2729, 2010.
- ZHANG, R.; ZHANG, H.; TU, C.; HU, X.; LI, L.; LUO, Y.; CHRISTIE, P. Phytotoxicity of ZnO nanoparticles and the released Zn(II) ion to corn (*Zea mays* L.) and cucumber (*Cucumis sativus* L.) during germination. **Environmental Science and Pollution Research**, 2015.

- ZHAO, F.J., MOORE, K.L.; LOMBI, E.; ZHU, Y.G. Imaging element distribution and speciation in plant cells, **Trends Plant Science**, v. 19, p. 183-192, 2014.
- ZHAO, L.; PERALTA-VIDEA, J. R.; VARELA-RAMIREZ, A.; CASTILLO-MICHEL, H.; LI, C.; ZHANG, J.; AGUILERA, R.; KELLER, A.; GARDEA-TORRESDEY, J. L. Effect of surface coating and organic matter on the uptake of CeO₂ NPs by corn plants grown in soil: insight into the uptake mechanism. **Journal of Hazardous Materials**, p. 131-138, 2012.
- ZHAO, L.; SUN, Y.; HERNANDEZ-VIEZCAS, J.A.; HONG, J.; MAJUMDAR, S.; NIU, G.; DUARTE-GARDEA, M.; PERALTA-VIDEA, J.R.; GARDEA-TORRESDEY, J.L. Monitoring the environmental effects of CeO₂ and ZnO nanoparticles through the life cycle of corn (*Zea mays*) plants and in situ μ -XRF mapping of nutrients in kernels. **Environmental Science and Technology**, v. 49, p. 2921-2928, 2015.

3 APLICAÇÃO DE ZINCO EM SEMENTES DE MILHO: AVALIAÇÕES DO RENDIMENTO DE GRÃOS E COMPOSIÇÃO DE NUTRIENTES NAS PLANTAS E NOS GRÃOS

Resumo

A deficiência de Zn nas plantas, devido à baixa disponibilidade do elemento nos solos, é um dos problemas recorrentes em áreas agrícolas no mundo. A cultura do milho possui alta sensibilidade a essa deficiência e pode apresentar redução na produção de biomassa e na concentração de Zn nos grãos em condições de baixo teor no solo desse elemento, ou em situações que tornam o Zn indisponível às plantas. Diante disso, avaliou-se o efeito do Zn aplicado via semente, sobre os aspectos relacionados ao crescimento das plantas, rendimento da cultura e composição química da planta e dos grãos, sob o cultivo em campo em três locais. As sementes de milho revestidas com óxido de Zn (ZnO) foram semeadas nas regiões de Indianópolis-MG (local 1) e Santo Antônio de Goiás-GO (local 2) na safra de 2013/2014 e Colina-SP (local 3) na safra de 2015/2016. As plantas de milho cultivadas no local 1, avaliadas no estágio fenológico V6, apresentaram aumento do diâmetro de colmo propiciado pelo tratamento de sementes com Zn, provavelmente influenciado pelo menor fornecimento de água durante o cultivo. O tratamento de sementes com Zn reduziu o acúmulo de boro na parte aérea das plantas cultivadas no local 1 e reduziu o acúmulo de potássio, de enxofre e de magnésio nas plantas cultivadas no local 3, avaliadas no estágio fenológico V7; houve, também, redução nas concentrações de potássio e enxofre nos grãos. O tratamento de sementes não foi efetivo em incrementar o rendimento de grãos, quando o teor de Zn no solo encontrava-se em níveis adequados (locais 1 e 2) e baixo (local 3). Os resultados indicam que o efeito do tratamento de sementes de milho com Zn pode estar relacionado aos fatores ligados ao desenvolvimento inicial das plântulas, tais como no vigor das plântulas.

Palavras-chave: *Zea mays* L.; Tratamento de sementes; Nutrição de plantas; Micronutrientes.

Abstract

Zn deficiency in plants, due to the low availability of the element in soils, is one of the recurring problems in agricultural areas in the world. Maize cultivation has a high sensitivity to this deficiency and may present a reduction in biomass production and Zn concentration in the grains under conditions of low soil content, or in situations that render Zn unavailable to plants. Therefore, the effect of Zn applied by seed on the aspects related to plant growth, crop yield and chemical composition of the plant and the grains under field cultivation in three locations was evaluated. Zn oxide-coated corn seeds (ZnO) were sown in the Indianópolis-MG (local 1) and Santo Antônio de Goiás-GO (local 2) regions in the 2013/2014 crop and Colina-SP (local 3) in the 2015/2016 harvest. The maize plants cultivated at site 1, evaluated at the V6 phenological stage, showed an increase in stem diameter caused by the treatment of seeds with Zn, probably influenced by the lower water supply during cultivation. Seed treatment with Zn reduced the boron accumulation in the aerial part of the plants cultivated in the site 1 and reduced the accumulation of potassium, sulfur and magnesium in the plants cultivated in the site 3, evaluated in the V7 phenological stage; There was also a reduction in the concentrations of potassium and sulfur in the grains. Seed treatment was not effective in increasing grain yield when Zn content in soil was at adequate levels (sites 1 and 2) and low (site 3). The results indicate that the effect of maize seed treatment with Zn may be related to the factors related to seedling initial development, such as vigor of seedlings.

Keywords: *Zea mays* L.; Seed treatment; Plant nutrition; Micronutrients.

3.1 Introdução

A deficiência em micronutrientes mais frequente nas principais culturas agrícolas está relacionada ao Zn (MALAVOLTA, 2006; ALLOWAY, 2008). A cultura do milho é altamente exigente quanto a esse elemento, sendo um dos cereais mais suscetíveis ao baixo teor de Zn nos solos (ALLOWAY, 2009). Aproximadamente 50% das áreas de cultivo de grãos do mundo apresentam solos com baixa disponibilidade de Zn para as plantas (GRAHAM; WELCH, 1996; CAKMAK 2002; ALLOWAY, 2008), resultando em menores concentrações do elemento nos grãos (aproximadamente de 5 a 12 mg.kg⁻¹), sendo estes valores abaixo daqueles necessários (40-60 mg.kg⁻¹) para a adequada nutrição das populações que dependem desta fonte de alimento (PFEIFFER; McCLAFFERTY, 2007). Além de resultar em baixo conteúdo de Zn nos grãos, a baixa disponibilidade desse elemento nos solos também pode afetar a produção das culturas.

Segundo Fageria e Stone (2007), a deficiência em Zn é amplamente relatada na América do Sul, especialmente no Brasil e está associada, principalmente, aos baixos teores totais de Zn nos solos tropicais, profundos e intemperizados (latossolos, oxissolos e ultissolos), o que tem sido agravado pela prática intensiva da aplicação de calcário em superfície, visando o aumento do pH e, em algumas situações, à elevada aplicação localizada de fósforo (FAGERIA, 2000). Além disso, várias características químicas e mineralógicas influenciam as reações de adsorção de Zn no solo, dentre as quais estão o pH, a capacidade de troca catiônica, o teor de matéria orgânica, cátions e ânions solúveis, o tipo e teor de argila e de óxidos e hidróxidos de alumínio e ferro (ALLOWAY, 2009).

No Brasil, as classes de disponibilidade de Zn nos solos são geralmente determinadas de acordo os métodos de avaliação da fertilidade do solo, em São Paulo, por exemplo, utilizando como extrator o ácido penta-acético dietileno triamina – DTPA e pH 7,3, níveis abaixo de 0,6 mg.kg⁻¹ são considerados baixos para a cultura do milho, sendo teores entre 0,6 e 1,2 mg.kg⁻¹ considerados médios (RAIJ et al., 1996). Para Minas Gerais, os teores de Zn (extrator Mehlich-1) são classificados em 5 classes, dentre as quais, valores menores que 0,4 mg kg⁻¹ são considerados muito baixos e entre 1,6 a 2,2 mg.kg⁻¹ são considerados níveis bons desse elemento no solo (ALVAREZ et al., 1999). Existe também uma classificação por região feita para o Centro-Oeste, na qual os teores de Zn, utilizando o extrator Mehlich-1, são classificados em 3 classes, a partir das quais valores menores que 1,0 mg.kg⁻¹ são considerados baixos, entre

1,1 a 1,6 mg.kg⁻¹ são considerados médios e maiores que 1,6 mg.kg⁻¹ são níveis altos desse micronutriente nos solos (GALRÃO, 2002). Por sua vez, o nível crítico de Zn para milho, na massa de matéria seca de folhas recém-expandidas, é de 15 mg.kg⁻¹ (CANTARELLA et al., 1996).

A resposta das plantas à adição de Zn depende da exigência de cada espécie (FAGERIA, 2000), da produtividade desejada, da intensidade de uso do solo, da distribuição do sistema radicular e de fatores climáticos, tais como a disponibilidade de água. Para Fancelli e Dourado-Neto (2004), as recomendações técnicas de adubação para a cultura do milho devem ser ainda mais específicas, tendo como base o sistema de produção e a região de cultivo. A recomendação para aplicação de Zn em milho, para o Estado de Minas Gerais é de 1,0 a 2,0 kg.ha⁻¹ de Zn em solos com baixo teor disponível (RIBEIRO et al., 1999) e, para o Estado de São Paulo, recomenda-se a dose de Zn de 4,0 kg.ha⁻¹ em solos com teores desse elemento menores que 0,6 mg.kg⁻¹ e 2 kg.ha⁻¹ de Zn para solos com 0,6 a 1,2 mg.kg⁻¹ de Zn (RAIJ et al., 1996). Galvão (2002) recomendou a adubação com óxido de Zn via semente para condições de cerrado, caso não seja possível aplicá-lo via solo.

O uso de fertilizantes contendo Zn pode propiciar o aumento do rendimento das culturas, além de aumentar o conteúdo de Zn nos grãos. Essa técnica é denominada de biofortificação agrônômica, termo que se refere ao processo de aumento do teor dos micronutrientes pela adubação, como o Zn, nas partes comestíveis, especialmente em grãos de cereais (CAKMAK, 2008a, b; BOUIS; WELCH, 2010; CAKMAK et al., 2010; WHITE; BROADLEY, 2011). Micronutrientes podem ser aplicados diretamente no solo, nas folhas e pelo tratamento de sementes (JOHNSON et al., 2005). Devido à dificuldade de se distribuir uniformemente, via solo ou folhas, as quantidades de micronutrientes requeridas pelas culturas destaca-se como alternativa o tratamento de sementes, o qual possui algumas vantagens, tais como a uniformidade de distribuição, a disponibilização dos nutrientes próximos à raiz desde o início do desenvolvimento das plântulas (TAYLOR et al., 1998; SCOTT, 1998; FAROOQ et al., 2012), menores custos de aplicação (JOHNSON et al., 2005) e menor impacto ambiental (HILL, 1999).

O tratamento de sementes com Zn objetiva fornecer condições adequadas desse micronutriente às plantas, em situações em que a presença dele no solo é insuficiente para suprir as exigências das plantas; além disso, essa técnica pode ser usada para complementar as aplicações via solo e folhas (SLATON et al. 2001; FAROOQ et al. 2012; DIAS; CICERO, 2016). Sob condições de solo com baixa disponibilidade de Zn, o tratamento de sementes ou revestimento com este elemento limitante tem se mostrado uma forma mais econômica e

adequada de disponibilização do que aplicações foliares ou no solo (SCOTT et al., 1989; ADHIKARI; RATTAN, 2000; SLATON et al., 2001; AJOURI et al., 2004; PRADO et al., 2008), além do fato de poder melhorar a eficiência no uso de Zn quando comparado a outros métodos (SINGH, 2007; REHMAN et al., 2012). A aplicação de Zn via sementes também pode estar associada à disponibilização do nutriente via solo, o que proporciona o aumento do rendimento das culturas (NAIK; DAS, 2007; SHIVAY et al., 2008; REHMAN et al., 2012).

No revestimento de sementes, partículas do nutriente, finamente moídas, as quais estão dissolvidas ou suspensas são aplicadas formando uma camada aproximadamente contínua cobrindo a semente (FAROOQ et al. 2012); tal técnica confere praticidade ao agricultor, pois o tratamento industrial de sementes, no qual se realiza a cobertura com fungicidas e inseticidas, também poderia ser empregado para a aplicação do Zn como uma forma econômica de prevenção da deficiência desse elemento e melhoria do estabelecimento de plântulas em solos com baixa disponibilidade de Zn (REHMAN et al., 2012). Consequentemente, propiciam-se efeitos no rendimento das culturas e na concentração (ou conteúdo) de Zn nos grãos (HUSSAIN et al., 2012; SHIVAY et al., 2013; 2015; USMAN et al., 2014). A aplicação de Zn nas sementes também pode ser realizada por meio do “priming” de sementes (FAROOQ et al., 2012), técnica que também confere efeitos benéficos às culturas (SLATON et al., 2001; HARRIS et al., 2007; MOHSIN et al., 2014; MUHAMMAD et al, 2015).

Muitos estudos com o objetivo de avaliar a influência da adubação via foliar e via solo com Zn na biofortificação de grãos de cereais, têm sido realizados e os resultados amplamente divulgados (CAKMAK, 2008; PECK et al., 2008; WISSUWA et al., 2008; ZHANG et al., 2010; PHATTARAKUL et al., 2012). Entretanto, trabalhos com objetivo de avaliar a contribuição da aplicação de fertilizantes via sementes na produção de grãos com alto valor nutricional, principalmente para a cultura do milho, são escassos (PRASAD et al., 2014).

Apesar das práticas de cultivo, adotando-se a aplicação do nutriente via foliar e no solo, de modo geral, para produzir grãos de cereais com alta concentração de Zn serem comumente empregadas, as aplicações via solo demandam maiores investimentos e são mais susceptíveis a perdas do produto por fixação no solo e à ocorrência de maior inibição da absorção de outros nutrientes (JOY et al., 2015). Todavia, a aplicação foliar com alta concentração de Zn pode causar danos às cutículas das folhas (EICHERT; FERNÁNDEZ, 2012) e toxicidade. Hussain et al. (2012) afirmaram que, apesar de o fornecimento de Zn às

plantas via solo e foliar serem as formas usuais de disponibilização de Zn para as culturas, essas práticas não são viáveis do ponto de vista econômico e ambiental.

De modo geral, poucos estudos foram realizados para explorar os efeitos da aplicação de Zn via semente em condição de campo no rendimento de grãos, biomassa de plantas e nas concentrações de Zn nos tecidos vegetais das plantas de milho. Neste contexto, realizou-se este estudo para avaliar os reflexos da utilização da técnica de tratamento de sementes com Zn, nos seguintes aspectos: (i) nos caracteres de crescimento das plantas; (ii) na produção de matéria seca e no rendimento de grãos; (iii) no acúmulo de nutrientes nas plantas e nas concentrações nos grãos.

3.2 Materiais e métodos

3.2.1 Localização dos experimentos

Os experimentos de campo foram realizados nos municípios de Indianópolis, Minas Gerais (MG) (19° 2' 33" sul, 47° 55' 1" oeste e altitude: 849,0 metros) (local 1) e em Santo Antônio de Goiás, Goiás (GO), na Sede da Embrapa Arroz e Feijão (16° 28' 00" sul, 49° 17' 00" oeste e altitude: 823,0 metros) (local 2) na safra de 2013/2014; em 2015/2016, foi realizado no município de Colina, São Paulo (SP), na sede da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), Polo Regional Alta Mogiana (20° 42' 58" sul, 48° 32' 45" oeste e altitude: 595,0 metros) (local 3).

3.2.2 Tratamento das sementes com zinco

Foram utilizadas sementes do híbrido 30A37PW “peneira 22 curta” (22/64”) (Morgan[®], Dow AgroSciences, Jardinópolis, São Paulo, Brasil); as sementes estavam tratadas com o fungicida Maxim[®] XL (fludioxonil e metalaxil-M) e os inseticidas Actellic[®] 500 CE (pirimifós-metílico) e K- Obiol[®] 25 CE (deltametrina). A fonte de Zn utilizada para o tratamento de sementes foi uma suspensão líquida contendo óxido de Zn, com 100% ZnO e densidade 2 g.cm⁻³ (Maxi Zinc[®], Agrichem, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil).

Nos locais 1 e 2, foram utilizadas quatro doses de Zn, correspondendo a 50, 100, 150 e 200 mL ZnO.ha⁻¹, as quais correspondem a 50, 100, 150 e 200 g Zn.ha⁻¹ e o tratamento testemunha (sem aplicação de Zn). No local 3, foram utilizadas as doses de 100, 200, 300 e 400 mL ZnO.ha⁻¹, as quais correspondem a 100, 200, 300 e 400 g Zn.ha⁻¹ e o tratamento testemunha (sem o tratamento de semente com Zn). As doses foram estabelecidas considerando uma taxa de semeadura de sessenta mil sementes por hectare e tendo como base a dose recomendada (100 mL ZnO.ha⁻¹ ou 100 g Zn.ha⁻¹). As doses foram maiores no local 3, devido ao baixo teor disponível de Zn no solo neste local (Tabela 1). As sementes foram tratadas em equipamento do tipo “panela rotatória” (“*pan coater*”), contendo um motor “Leroy-Somer” rotativo (modelo LS71 0,75 Kw), que permitiu a cobertura do pericarpo das sementes de milho, as quais foram acondicionadas em sacos de papel “Kraft” até a semeadura em campo.

3.2.3 Realização dos experimentos

No local 1, a unidade experimental consistiu de seis linhas de 7 m de comprimento, espaçadas 0,5 m entre linhas; foram colhidas (área útil) as quatro linhas centrais, tendo como bordadura 1,0 m da extremidade das linhas e uma linha de cada lado, resultando como área útil 10,0 m². Na área, onde o experimento foi instalado, era empregado o sistema de plantio direto e, desta forma, não foram realizadas operações de preparo do solo. As parcelas foram demarcadas e a semeadura foi realizada no dia 18 de novembro de 2013.

Ainda no local 1, ao longo do ciclo da cultura foram realizadas a adubação de cobertura com ureia, no estádio V4 (150 kg.ha⁻¹ de N a lanço), duas aplicações de herbicida, utilizando o produto glifosato (1,5 L.ha⁻¹, com 200 L de calda) e realizadas 3 aplicações de fungicidas e inseticida, nos estádios V4, V8 e R1, com os produtos Opera[®] (0,75 L.ha⁻¹ com 300 L de calda), Bendazol[®] (1,0 L.ha⁻¹ com 280 L de calda) e Premio[®] (100 mL.ha⁻¹ com 200 L de calda). A colheita foi realizada no dia 05 de abril de 2014.

No local 2, a unidade experimental era composta por seis linhas de 5 m de comprimento, espaçadas 0,7 m entre linhas; foram colhidas (área útil) as quatro linhas centrais e como bordadura 0,5 m de cada extremidade das linhas e uma linha de cada lado, resultando como área útil 11,2 m².

No local 2, como preparo do solo, foram realizadas as operações de subsolagem, grade aradora e duas passagens da grade niveladora. Após a demarcação das parcelas, a semeadura foi realizada no dia 27 de novembro de 2013. Ao longo do ciclo da cultura, foram realizadas duas aplicações de herbicida, utilizando o produto glifosato (1,5 L.ha⁻¹, com 200 L de calda) e realizada a adubação de cobertura com ureia, no estádio V6 (100 kg.ha⁻¹ de N a lanço). A colheita foi realizada no dia 22 de abril de 2014.

No local 3, a unidade experimental era composta por quatro linhas de 5 m de comprimento, espaçadas 0,8 m entre linhas; foram colhidas (área útil) as duas linhas centrais, resultando como área útil 8,0 m².

Após a demarcação das parcelas, a semeadura foi realizada no dia 01 de dezembro de 2015. Ao longo do ciclo da cultura, foram realizadas duas adubações de cobertura, a primeira de nitrogênio (N) e potássio (K) em V6 com nitrato de amônio (150 kg.ha⁻¹ de N) e cloreto de potássio (75 kg.ha⁻¹ de K) e a segunda de K em V8 na mesma dose da primeira adubação. Foi realizada a aplicação dos inseticidas Engeo pleno[®] (200 mL.ha⁻¹ com 200 L de calda) e Pirate[®] (250 mL.ha⁻¹ com 200 L de calda) em V7. A colheita foi realizada no dia 28 de abril de 2016.

Foram semeadas de 4 a 5 sementes por metro, nos três locais e realizadas análises de solo das parcelas experimentais (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1. Características químicas do solo e granulometria (profundidade de 0 - 20 cm) nos locais onde foram realizados os experimentos. Todas as análises foram realizadas antes da semeadura.

Locais ¹	pH H ₂ O	P	K ⁺	Ca ⁺²	Mg ⁺²	Al ⁺³	H + Al	M.O.	V
		mg.dm ⁻³	-----	-----	cmolc.dm ⁻³	-----	-----	-%	-%
1	6,1	15,3	0,15	3,70	0,90	0,00	2,90	10,7	62
2	5,5	13,9	0,34	1,56	0,71	0,08	4,90	32,3	-
3	5,2	10,0	0,47	1,90	0,80	-	1,80	22,0	64

¹Locais: 1 = Indianópolis, MG. 2 = Santo Antônio de Goiás, GO. 3 = Colina, SP. * V = Sat. Base. P, K = [HCl 0,05 mol.L⁻¹ + H₂SO₄ 0,0125 mol.L⁻¹]. Ca, Mg, Al = [KCl 1 mol.L⁻¹] / H + Al = [Solução Tampão SMP à pH 7,5]. M.O. = Método Colorimétrico.

Tabela 2. Características químicas e físicas do solo (profundidade de 0 - 20 cm) nos locais onde foram realizados os experimentos. Todas as análises foram realizadas antes da semeadura.

Locais ¹	B	Cu	Fe	Mn	Zn	Areia	Silte	Argila	Classe textural
	-----	-----	-----	-----	-----	-----	g.kg ⁻¹	-----	
1	0,07	1,1	44,0	1,20	2,6	768,0	0,0	232,0	Franco Argiloso Arenoso
2	-	2,5	33,9	55,54	3,8	329,0	96,7	574,4	Argiloso
3	0,21	0,4	25,0	9,40	0,6	805,0	45,0	150,0	Média

¹Locais: 1 = Indianópolis, MG. 2 = Santo Antônio de Goiás, GO. 3 = Colina, SP. B = [BaCl₂. 2H₂O 0,0125% à quente]. Cu, Fe, Mn e Zn = [DTPA 0,005 mol.L⁻¹ + TEA 0,1 mol⁻¹ + CaCl₂ 0,01 mol.L⁻¹ a pH 7,3].

Os estádios fenológicos foram acompanhados de acordo com o procedimento citado por Fancelli e Dourado Neto (2000), tendo como referência o desenvolvimento das plantas da testemunha. Foram determinados, diariamente, os dados pluviométricos e a temperatura média de cada região. A precipitação pluvial média durante o período de cultivo foi de 5,51, 9,09 e 7,34 mm, para os locais 1, 2 e 3, respectivamente, e a temperatura média foi de aproximadamente 25,0 °C, para os três locais (Figura 1). A precipitação pluvial acumulada por período de cultivo (estádio fenológico) foi menor para o local 1 em todos os períodos (Figura 1D).

Figura 1. Dados meteorológicos obtidos durante o cultivo em Indianópolis, MG (A), Santo Antônio de Goiás, GO (B) e Colina, SP (C), locais 1, 2 e 3, respectivamente, e precipitação pluviométrica acumulada por estágio fenológico da cultura em cada local (D). Fonte: A: Estação meteorológica em Indianópolis, MG. B: Estação meteorológica na Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO. C: Estação meteorológica na Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), Colina, SP.

3.2.4 Avaliações do crescimento das plantas

O comprimento da planta foi determinado a partir do nível do solo até o ápice da folha mais alta da planta, com o limbo foliar distendido (MELO et al., 2006). As avaliações foram realizadas no estágio fenológico de seis folhas (V6) e na colheita (R4) no local 1, quatro e oito folhas (V4 e V8) no local 2 e quatro folhas no local 3. O diâmetro do colmo foi determinado no colo da planta, em milímetros, com o auxílio de um paquímetro. As avaliações foram realizadas no estágio fenológico de seis folhas (V6) no local 1 e quatro e oito folhas (V4 e V8) no local 2. Para o local 3 não foi realizada a medida de diâmetro do colmo. As determinações de altura e de diâmetro foram realizadas em quatro plantas por parcela.

3.2.5 Aspectos relacionados ao rendimento da cultura

Foi determinado o estande final de plantas pela contagem do número de plantas na área útil, transformando em percentual de plantas por hectare em relação ao estande inicial. Foi

contabilizado o número de espigas na área útil de cada parcela e os resultados foram transformados, considerando 10 m² como área útil para os 3 locais. A prolificidade foi determinada a partir da divisão do número total de espigas pelo número de plantas na área útil.

Foram realizadas, nas espigas, algumas avaliações, as quais consistiram das determinações do tamanho da espiga, do número de fileiras de grãos por espiga e de grãos por fileira e do número de grãos por espiga, sendo essa última realizada com auxílio do aparelho 801 Count-A-Pak® (Seedburo, Des plaines, Illinois, USA). Todas estas determinações foram realizadas em cinco espigas por parcela, obtendo-se o valor médio.

A massa seca da parte aérea da planta, exceto da espiga, foi determinada a partir da coleta de quatro plantas por parcela, as quais foram lavadas em água e, em seguida, secas em estufa a 65°C até atingirem massa constante, a qual foi monitorada diariamente. A produção de biomassa foi determinada em balança analítica e os resultados expressos em gramas por planta. Todas as espigas colhidas na área útil das parcelas foram debulhadas e, depois disso, foi feita a pesagem dos grãos de todas essas espigas. Em seguida, converteu-se o resultado para toneladas.ha⁻¹ e corrigiu-se o teor de água para 13%.

3.2.6 Acúmulo de nutrientes nas plantas e grãos

As concentrações de nutrientes foram determinadas em plantas na época da colheita (estádio fenológico R4) para os locais 1 e 2 e em plantas no estágio V7 e grãos para o local 3. Amostras das plantas e dos grãos foram moídos em moinho de facas do tipo Willey (Marconi®, Piracicaba, SP, Brasil). A digestão e a análise do material em espectrômetro de emissão óptica (ICP-OES) foram realizadas no Laboratório de Química Analítica, do Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo (USP / CENA).

As amostras de sementes foram submetidas à digestão ácida assistida por radiação micro-ondas (ETHOS 1600, Milestone, Italy) pesando-se 250 mg do material previamente moído, em triplicata, o qual foi transferido para frascos de digestão de teflon TFM® e, em seguida, foram adicionados 6,0 mL de HNO₃ 20 % v.v⁻¹ e 2,0 mL de H₂O₂ 30 % v.v⁻¹. O programa de aquecimento foi realizado como descrito por Campos et al. (2015). Os digeridos foram transferidos para balões volumétricos e o volume foi completado para 20 mL com água deionizada (resistividade de 18.2 MΩ cm). As soluções finais foram analisadas por ICP-OES (iCAP 6500 Duo, Thermo, Waltham, USA) com as condições operacionais descritas por Peruchi et al. (2014). Os resultados das análises das amostras foram relatados como a média de

quatro réplicas. As concentrações de nutrientes na parte aérea das plantas foram multiplicadas pela massa seca da planta e expressas em acúmulo de nutrientes por planta (FAGERIA, 1998) e nos grãos, em concentração. Para a validação do método, foram utilizados materiais de referência certificados (CRMs) do Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (NIST) (Gaithersburg, MD, EUA) que passaram pelo mesmo procedimento de digestão das amostras. Os resultados dos CRMs encontram-se no APÊNDICE A. Foram utilizados os seguintes CRMs: colmos de milho (CRM 8412), cereais de café da manhã fortificado (CRM 3233), folhas de macieira (CRM 1515) e folhas de pessegueiro (CRM 1547).

3.2.7 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento utilizado foi o de blocos ao acaso, contendo cinco tratamentos e quatro blocos. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância, separadamente para cada local e o efeito das doses, quando significativo, pelo Teste F, foi estudado por regressão polinomial, utilizando o sistema computacional SAS Institute Inc., Cary. NC., USA 2010, versão 9.3.

3.3 Resultados e discussão

3.3.1 Avaliações do crescimento das plantas

O tratamento de sementes de milho com Zn não influenciou a altura e o diâmetro do colmo das plantas cultivadas nos locais 2 e 3. Para as plantas cultivadas no local 1, houve efeito significativo das doses de Zn para o diâmetro de colmo no estágio V6 (Tabela 3). A dose de Zn de aproximadamente 100 g Zn.ha⁻¹ promoveu maior diâmetro do colmo das plantas no estágio V6 (Figura 2A).

Tabela 3. Altura e diâmetro do colmo de plantas de milho segundo a dose de Zn em tratamento de sementes em três locais de cultivo.

Doses ¹	Local 1 ⁴		Local 2				Local 3
	ALT ² - V6	ALT - Colheita	ALT - V4	ALT - V8	DIAM - V4	DIAM - V8	ALT - V4
	----- m.planta ⁻¹ -----	----- m.planta ⁻¹ -----	----- m.planta ⁻¹ -----	----- m.planta ⁻¹ -----	----- mm.planta ⁻¹ -----	----- mm.planta ⁻¹ -----	-- cm.planta ⁻¹ --
Controle	1,06 ^{ns}	2,75 ^{ns}	0,57 ^{ns}	1,64 ^{ns}	13,70 ^{ns}	25,80 ^{ns}	34,63 ^{ns}
1	1,15	2,72	0,60	1,73	14,17	26,66	35,00
2	1,18	2,73	0,58	1,62	12,51	25,52	33,94
3	1,14	2,81	0,62	1,64	13,42	25,74	32,13
4	1,13	2,76	0,59	1,58	13,06	26,88	38,19
CV (%)	5,02	2,53	6,22	3,92	6,02	5,10	8,77

^{ns} Não significativo pelo Teste F. Nível de significância: *P < 0.05. CV: coeficiente de variação. ¹Doses utilizadas nos locais 1 e 2: 50, 100, 150 e 200 g Zn ha⁻¹. Doses utilizadas no local 3: 100, 200, 300 e 400 g Zn ha⁻¹. ²ALT: altura de plantas, ³DIAM: diâmetro do colmo. ⁴ Local 1: Indianópolis, MG. Local 2: Santo Antônio de Goiás, GO. Local 3: Colina, SP.

Figura 2. Diâmetro do colmo no estágio V6 (A) e acúmulo de B em plantas de milho no final do ciclo (estádio R4) (B) cultivadas no local 1, em função do tratamento de sementes.

O incremento no diâmetro de plantas cultivadas no local 1 pelo tratamento de sementes com Zn pode estar associado à baixa precipitação pluvial neste local nos estádios iniciais de desenvolvimento das plantas; até V4, a precipitação pluvial acumulada para o local 1 foi de 117 mm e para os locais 2 e 3, foi de 342 e 215 mm, respectivamente (Figura 1D). As plantas podem ter sentido a baixa disponibilidade de água, em um momento crucial para o seu desenvolvimento e aquelas que receberam fornecimento de Zn via tratamento de sementes utilizaram o nutriente para o seu estabelecimento no campo e, como reflexo, apresentaram diâmetro de colmo maior quando comparado ao tratamento controle (Figura 2A).

O Zn é um importante nutriente para a tolerância das plantas a fatores de estresse ambiental, como o estresse hídrico observado no local 1. É relatado que as plantas se tornam mais sensíveis à deficiência de Zn quando submetidas às condições de sequeiro do que irrigadas (EKIZ et al., 1998; KHAN et al., 2003), em função do Zn afetar a expressão e regulação de genes relacionados ao mecanismo de defesa (CAKMAK, 2000), e ser componente estrutural da enzima Cu-Zn superóxido dismutase (CuZnSOD) (CAKMAK et al., 1997b; YU et al., 1999; HACISALIHOGU et al., 2003), que confere proteção aos componentes estruturais da membrana citoplasmática (lipídios e proteínas) contra o dano oxidativo e controla a geração de espécies reativas de oxigênio – O_2^- e H_2O_2 (CAKMAK, 2000).

Apesar de o Zn participar da produção de triptofano, responsável pela síntese de ácido indolacético (AIA) nos vegetais, hormônio importante para o crescimento apical e para a expansão celular (EPSTEIN; BLOOM, 2005), não foi observado aumento da altura de plantas pelo fornecimento adicional de Zn via tratamento de sementes (Tabela 3). Mari et al. (2015) também não verificaram efeitos da aplicação de Zn na altura e no diâmetro das plantas de milho com 30 dias de cultivo, estabelecidas em solo com $0,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ de Zn (extrator DTPA); entretanto, aos 60 dias após a emergência das plantas, no estágio fenológico R1, o tratamento proporcionou aumento do diâmetro das plantas cultivadas em campo.

Situações em que o tratamento de sementes com o Zn propicia o incremento em comprimento podem representar um aspecto importante para as culturas, pois o nutriente poderá atuar no crescimento inicial das plântulas e auxiliar no estabelecimento da cultura no campo, acelerando a emergência das plântulas e, com isso, reduzindo o período de exposição a fatores adversos nesta fase crítica de crescimento das plantas. Os resultados obtidos, em que o tratamento não foi capaz de promover o aumento no crescimento das plantas, sugerem que o

seu efeito deve ser melhor estudado nos estádios iniciais do desenvolvimento das plântulas, anterior aos estádios avaliados neste estudo.

No desenvolvimento das plântulas, a concentração de Zn nas sementes é um aspecto fundamental, pois, segundo Obata et al. (1999), plântulas que emergem a partir de sementes com baixa concentração de Zn podem ser altamente sensíveis a estresses bióticos e abióticos. Além disso, sementes enriquecidas com Zn podem apresentar melhor desempenho em relação à germinação, sanidade das plântulas, crescimento das plantas e maior rendimento de grãos (CAKMAK et al. 1996). Assim, espera-se que o fornecimento de Zn via semente, especialmente em materiais, ou lotes de sementes com baixo conteúdo nesse nutriente, possa aumentar o vigor das plântulas, notadamente em condições de baixa disponibilidade do elemento no solo.

3.3.2 Aspectos relacionados ao rendimento da cultura

O revestimento de sementes com Zn não propiciou incrementos nos atributos relacionados ao rendimento da cultura nos três locais de cultivo. No local 1, onde a precipitação pluvial foi menor do que a observada nos locais 2 e 3 (Figura 1), embora este aspecto tenha resultado em menores espigas, como observa-se na Figura 3 e também no menor número de grãos por fileira e de grãos por espiga, este comportamento ocorreu tanto para o tratamento controle, bem como para os tratamentos com o fornecimento de Zn via semente (Tabela 4).

Figura 3. Espigas produzidas nos três locais de cultivo. Local 1: Indianópolis, MG. Local 2: Santo Antônio de Goiás, GO. Local 3: Colina, SP.

Tabela 4. Aspectos relacionados ao rendimento das plantas de milho segundo as doses de Zn em tratamento de sementes nos três locais de cultivo.

g de Zn.ha ⁻¹	EST ¹ -- % --	ESP	PROL - espiga.planta ⁻¹ -	TESP - - cm - -	NESP	NGF	NGESP	MS - - g.planta ⁻¹ - -	RG ton.ha ⁻¹
Local 1 ²									
0	92,25 ^{ns}	87,75 ^{ns}	0,95 ^{ns}	15,70 ^{ns}	15,70 ^{ns}	27,80 ^{ns}	398,10 ^{ns}	138,67 ^{ns}	11,35 ^{ns}
50	94,50	91,25	0,97	15,65	15,20	27,55	396,95	131,20	11,93
100	91,50	88,00	0,96	15,49	15,60	27,10	398,15	131,10	11,48
150	92,50	89,00	0,96	15,48	15,30	27,75	391,60	140,74	12,00
200	89,25	87,00	0,97	15,94	15,00	29,75	420,93	120,73	11,29
CV (%)	2,97	4,75	2,58	3,84	3,75	10,18	12,21	7,95	6,39
Local 2									
0	73,44 ^{ns}	70,31 ^{ns}	0,96 ^{ns}	17,07 ^{ns}	15,50 ^{ns}	40,05 ^{ns}	605,80 ^{ns}	146,84 ^{ns}	13,95 ^{ns}
50	76,79	65,85	0,86	17,03	15,60	40,00	603,30	138,40	13,31
100	71,65	66,96	0,93	17,52	15,30	39,75	594,95	144,97	13,49
150	77,90	72,99	0,94	17,03	15,30	38,95	583,55	145,28	14,23
200	75,00	70,76	0,95	17,38	15,40	40,55	618,40	141,22	14,10
CV (%)	4,69	5,36	5,15	2,88	3,98	4,90	4,55	13,11	4,49
Local 3									
0	87,50 ^{ns}	89,69 ^{ns}	1,03 ^{ns}	16,05 ^{ns}	15,38 ^{ns}	35,19 ^{ns}	562,63 ^{ns}	10,59 ^{ns}	14,51 ^{ns}
100	84,06	87,81	1,04	15,31	15,13	34,69	549,92	10,40	14,14
200	85,31	88,44	1,04	14,85	15,25	32,00	540,67	9,32	13,56
300	85,00	88,44	1,04	14,86	14,00	32,90	526,00	10,60	13,19
400	84,06	89,06	1,06	15,12	15,17	33,13	546,33	10,53	14,55
CV (%)	3,41	3,59	2,26	4,87	4,30	5,74	4,88	13,42	8,69

^{ns} Não significativo pelo Teste F (p<0,05). CV: coeficiente de variação. ¹ EST: estande final de plantas, ESP: número de espigas em 10 m², PROL: prolificidade, TESP: tamanho de espiga, NESP: número de fileiras de grãos por espiga, NGF: número de grãos por fileira, NGESP: número de grãos por espiga, MS: massa seca da parte aérea da planta e RG: rendimento de grãos. ² Local 1: Indianópolis, MG. Local 2: Santo Antônio de Goiás, GO. Local 3: Colina, SP.

Durante o cultivo no local 1, o fornecimento de Zn não foi efetivo em reduzir a produção de espigas com “grãos chochos” na ponta, os quais ocorreram devido à menor precipitação pluvial durante todo o ciclo da cultura, especialmente na fase de enchimento de grãos (Figura 3). Funguetto et al. (2010) verificaram que o tratamento de sementes de arroz com sulfato de Zn, com o cultivo das plantas em casa de vegetação, em solo com teor de Zn de $11,9 \text{ mg.dm}^{-3}$, foi eficiente em promover o aumento do número de grãos por panícula e o peso de grãos por planta; o fato de a planta estar bem nutrida na fase reprodutiva, também reduziu o abortamento de grãos e o número de “grãos chochos”.

A disponibilidade de água é um importante fator que afeta o efeito do fornecimento de Zn para as culturas. O aumento do crescimento das plantas e da absorção de Zn causados por aplicações no solo e em folhas foram mais significativos sob condições de fornecimento adequado de água do que sob condições de sequeiro (WANG; JIN, 2007; WANG et al., 2009). Embora o tratamento de sementes tenha propiciado maior diâmetro de colmo em plantas cultivadas no local 1, não houve efeito do tratamento nos parâmetros de rendimento (Tabela 4). Da mesma forma que as plantas são mais suscetíveis à baixa oferta de Zn quando expostas ao estresse hídrico, o conteúdo de água também afeta a disponibilidade e a absorção de Zn pelas plantas (BAGCI et al., 2007; PECK; McDONALD, 2010).

O Zn fornecido via tratamento de sementes, da mesma forma que a aplicação desse elemento diretamente no solo, está sujeito às condições do solo, as quais interferem na disponibilidade do nutriente para as plantas; o teor de Zn natural no solo pode limitar a influência da aplicação do fertilizante no rendimento (YANG et al., 2011a; 2011b). Para alguns autores, que avaliaram a aplicação de Zn via solo, a interferência no rendimento ocorreu em situações de baixa disponibilidade acentuada de Zn no solo; por exemplo, Wang et al. (2012) não observaram efeitos no rendimento de grãos de milho e de trigo em aplicações de Zn via solo com teores de $0,78 \text{ mg.kg}^{-1}$ de Zn no solo (extrator DTPA) para o cultivo de trigo e com $0,63$ e $0,48 \text{ mg.kg}^{-1}$ (extrator DTPA) para milho, o mesmo resultado foi verificado por Zhang et al. (2012) em solo com teor de Zn de $0,4 \text{ mg.kg}^{-1}$ (extrator DTPA) no cultivo de trigo. Estes teores de Zn podem ser classificados como baixos. Apenas para o teor muito baixo de Zn no solo de $0,18 \text{ mg.kg}^{-1}$ (extrator DTPA), a sua aplicação proporcionou o aumento no rendimento de grãos de trigo (CAKMAK et al., 2010a; 2010b). Em um trabalho recente, a aplicação de Zn via solo e folhas, em solo com teor de Zn de $0,44 \text{ mg.kg}^{-1}$ (extrator DTPA), não foi efetivo em aumentar o rendimento de arroz (YIN et al., 2016).

Os resultados indicam que a aplicação de Zn via semente resultará em condições favoráveis à expressão de fatores relacionados ao rendimento da cultura, caso os teores

disponíveis desse micronutriente no solo forem baixos, ou muito baixos, de modo que haja limitação na produção da cultura. Teores de Zn no solo no local 1 de $2,6 \text{ mg.dm}^{-3}$ e no local 2 de $3,8 \text{ mg.dm}^{-3}$ encontravam-se adequados para o cultivo (ALVAREZ et al., 1999; SOUZA; LOBATO, 2002; GALRÃO, 2002); mesmo no local 3, onde o teor de Zn encontrava-se em $0,6 \text{ mg.dm}^{-3}$, classificado como baixo em Zn, não houve contribuição do tratamento de sementes no rendimento da cultura. Santos et al. (2011) também não verificaram efeito no rendimento pelo tratamento de sementes de arroz cultivado em locais com teores de Zn no solo que variavam de $0,6$ a $2,8 \text{ mg.dm}^{-3}$.

Apesar destes resultados, a aplicação de Zn nas sementes de trigo na forma de sulfato de Zn ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) associada ao fornecimento no sulco de semeadura, em solo com teor de Zn de $0,44 \text{ mg.kg}^{-1}$ (extrator DTPA) promoveu incremento no rendimento de grãos e na concentração de Zn nos grãos (HUSSAIN et al., 2012). Aumentos na produção e na concentração de Zn nos grãos e na palha de aveia também foram observados pela aplicação de Zn na forma de sulfato e óxido via semente, em solo com $0,63 \text{ mg.kg}^{-1}$ de Zn (extrator DTPA) (SHIVAY et al., 2013). Sob as mesmas condições experimentais também houve maior número de perfilhos e comprimento de panícula propiciados pela aplicação de Zn via semente quando comparado à aplicação no solo. Entretanto, a fonte sulfato de Zn resultou em rendimentos superiores em comparação àqueles obtidos com o suprimento de óxido de Zn (SHIVAY et al., 2015).

Slaton et al. (2001) compararam a aplicação via sementes de sulfato de Zn e Zn EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), fontes consideradas solúveis em água, com o suprimento de Zn via solo e verificaram que o tratamento de sementes apresentou melhor ou igual desempenho do que a aplicação no solo, quanto a massa seca das plantas, a concentração de Zn nos tecidos e o rendimento de grãos. Diferenças observadas entre os resultados do suprimento de sulfato ou óxido de Zn, podem ser explicadas pelo fato da primeira fonte ser solúvel em água e, portanto, prontamente disponível, enquanto o óxido de Zn é moderadamente solúvel em água e não está prontamente disponível para as plantas. A solubilidade em água de fontes de Zn é considerada um critério importante para a disponibilidade de Zn em materiais utilizados no revestimento de sementes (SLATON et al., 2005).

Compostos altamente solúveis em água possuem maior mobilidade, especialmente porque o contato íon-raiz do Zn, em grande parte, ocorre por difusão; assim, quanto maior a solubilidade da fonte, mais facilmente o Zn é captado e, posteriormente, absorvido pelas raízes.

Giordano e Mortvedt (1972) relataram que o movimento do fertilizante como sulfato de Zn, após 4 semanas da aplicação, foi de 20 mm, enquanto para o óxido de Zn foi de 5 mm. A baixa solubilidade do Zn na forma de óxido em água pode ter interferido sua disponibilidade e na absorção pelas plantas.

O Zn, disponibilizado via solo ou por meio do tratamento de sementes, também pode ter o seu efeito influenciado pelo alto conteúdo de matéria orgânica, a qual desempenha importante papel na disponibilização do Zn, pois esse elemento pode ficar adsorvido e indisponível, em algum momento, às plantas. Teores de matéria orgânica maiores do que 3 % no solo podem limitar a eficiência da aplicação de Zn no solo pela formação de complexos organo-Zn (ALLOWAY, 2009). Nos três locais de cultivo, o teor de matéria orgânica estava bem acima de 3 %, aspecto que pode ter reduzido a disponibilidade do elemento às plantas e limitado a sua absorção (Tabela 1).

Em alguns trabalhos, a aplicação foliar de Zn também não propiciou o aumento do rendimento das culturas (ZHANG et al., 2012; WANG et al., 2012). Esses resultados foram atribuídos pelos autores à limitação nutricional de Zn das plantas durante a germinação e nos estádios iniciais de crescimento, quando não havia área foliar suficiente para receber aplicação efetiva de Zn, prejudicando o crescimento inicial.

Neste contexto, o tratamento de sementes com Zn, mesmo não resultando em aumento do rendimento de grãos, pode fornecer condições adequadas de Zn às plântulas, em situações em que a presença dos elementos no solo é insuficiente para suprir sua exigência inicial (SLATON et al. 2001; FAROOQ et al. 2012; DIAS; CICERO, 2016), sobretudo porque a reserva de Zn nas sementes pode ser insuficiente para fornecer condições adequadas durante o desenvolvimento inicial das plantas. Em diversas pesquisas têm sido verificado que sementes com alto conteúdo inicial de Zn resultaram em plântulas com maior crescimento das raízes e da parte aérea (RENGEL; GRAHAM, 1995; CAKMAK, 2008; 2009), maior rendimento de grãos (YILMAZ et al., 1998; HARRIS et al., 2007; CAKMAK, 2008; 2009; MUHAMMAD et al, 2015), promove o aumento da resistência a doenças, melhora a viabilidade e o vigor das sementes (CAKMAK, 2008a; 2009) e melhora a tolerância a estresses abióticos (CAKMAK, 2008; 2009; BHANUPRAKASH; YOGEESSHA, 2016).

Ozturk et al. (2006) demonstraram a importância do Zn para a nutrição inicial das plantas; segundo os autores, o teor de Zn exigido por plântulas de trigo é cerca de 5 a 10 vezes maior do que o teor adequado para folhas desenvolvidas; nas pontas de raízes de plântulas de trigo, a concentração de Zn é cerca de $220 \mu\text{g.g}^{-1}$ de massa seca; já nos meristemas da parte

aérea e em outros tecidos meristemáticos, a concentração de Zn requerida para a manutenção da síntese de proteínas é de cerca de $100 \mu\text{g.g}^{-1}$ de massa seca.

3.3.3 Acúmulo de nutrientes nas plantas de milho e nos grãos

Em relação ao acúmulo de macronutrientes na parte área das plantas cultivadas nos locais 1 e 2, não houve efeito do tratamento de sementes com Zn. Para o local 3, o acúmulo de potássio (K), magnésio (Mg) e enxofre (S) nas plantas avaliadas no estágio fenológico V7 foram influenciados pelo revestimento das sementes com Zn. O acúmulo de micronutrientes não foi afetado pelo fornecimento de Zn às plantas cultivadas nos locais 2 e 3. No local 1, ocorreu influência do tratamento de sementes com Zn para o acúmulo de boro (B) (Tabelas 5 e 6).

Figura 4. Acúmulo de nutrientes na parte aérea das plantas de milho cultivadas em três locais, segundo as doses de Zn no tratamento de sementes.

g de Zn ha ⁻¹	P	K	Ca	Mg	S	B	Cu	Fe	Mn	Zn
	----- mg.planta ⁻¹ -----					----- µg.planta ⁻¹ -----				
Local 1 ¹										
0	78,46 ^{ns}	1692,77 ^{ns}	387,40 ^{ns}	225,68 ^{ns}	73,67 ^{ns}	1353,403*	243,27 ^{ns}	28016,78 ^{ns}	4821,76 ^{ns}	1573,97 ^{ns}
50	70,47	1977,05	364,19	203,37	67,23	1134,285	212,38	26988,25	6869,45	2191,63
100	69,00	1628,07	405,49	235,68	68,76	841,229	179,72	27090,85	6102,79	1628,57
150	71,59	1989,78	398,22	237,09	68,06	691,620	502,84	29942,44	5657,53	1706,76
200	65,82	2006,44	328,95	232,81	62,17	652,920	167,12	22794,82	5554,27	1614,12
CV (%)	20,76	16,09	19,52	15,88	13,61	26,61	112,40	17,82	27,64	33,23
Local 2										
0	3,38 ^{ns}	967,27 ^{ns}	374,99 ^{ns}	343,05 ^{ns}	71,88 ^{ns}	1100,26 ^{ns}	339,45 ^{ns}	76585,53 ^{ns}	8876,76 ^{ns}	1967,84 ^{ns}
50	74,46	1125,72	363,42	302,65	66,91	1076,23	263,53	68993,83	7490,56	2227,44
100	58,67	1232,25	352,23	311,80	64,24	937,47	291,50	74228,16	8215,48	1836,30
150	61,68	1111,79	350,33	318,05	64,71	908,56	273,69	63778,65	8132,69	1670,56
200	58,38	1097,28	319,83	319,08	65,60	1078,02	282,28	44715,88	7704,45	2453,80
CV (%)	23,32	21,07	25,72	14,63	15,03	34,29	24,18	36,85	17,34	38,43
Local 3										
0	31,01 ^{ns}	367,54*	38,63 ^{ns}	28,02*	31,90*	156,49 ^{ns}	90,98 ^{ns}	8081,73 ^{ns}	822,95 ^{ns}	273,63 ^{ns}
100	27,15	269,52	32,66	21,85	26,09	145,77	80,96	8263,43	761,95	276,30
200	23,54	259,40	31,35	22,39	22,41	145,10	75,68	9639,06	726,98	243,74
300	25,27	256,44	35,37	25,11	25,93	162,96	83,27	8858,63	800,60	321,37
400	32,76	246,16	32,46	29,36	31,14	152,30	89,10	10710,56	760,63	296,71
CV (%)	15,91	16,73	15,41	13,47	14,06	14,56	15,81	71,60	19,36	15,38

^{ns} Não significativo pelo Teste F (p<0,05). *Significativo pelo Teste F (p<0,05). CV: coeficiente de variação. ¹ Local 1: Indianópolis, MG; local 2: Santo Antônio de Goiás, GO e Local 3: Colina, SP.

Tabela 5. Concentração de nutrientes nos grãos de milho de plantas cultivadas em Colina, SP, segundo as doses de Zn no tratamento de sementes.

g de Zn ha ⁻¹	P	K	Ca	Mg	S	B	Cu	Fe	Mn	Zn
	----- g.kg ⁻¹ -----					----- mg.kg ⁻¹ -----				
0	2,72 ^{ns}	3,24**	0,03 ^{ns}	0,75 ^{ns}	1,22*	2,06 ^{ns}	1,70 ^{ns}	12,76 ^{ns}	5,72 ^{ns}	15,57 ^{ns}
100	2,42	2,99	0,03	0,67	1,16	1,62	1,73	9,01	5,10	14,20
200	2,17	2,62	0,03	0,59	1,09	1,62	1,73	8,93	4,57	13,59
300	2,07	2,57	0,03	0,59	1,05	1,74	1,63	9,20	4,31	13,25
400	2,37	2,71	0,02	0,61	1,06	1,59	1,66	17,06	5,01	13,72
CV (%)	14,52	8,95	23,45	13,00	5,91	20,69	10,83	81,70	12,75	12,22

^{ns} Não significativo pelo Teste F (p<0,05). Nível de significância *P <0.05 e **P<0.01. CV: coeficiente de variação.

O tratamento de sementes com Zn, proporcionou redução no acúmulo de K nas plantas no estágio V7, de forma linear (Figura 4A) e este efeito refletiu-se na composição dos grãos produzidos, os quais apresentaram redução linear da concentração de K (Figura 4B). Segundo Hawkesford (2012) ao aumentar a absorção de K nas raízes das plantas, a concentração desse elemento em grãos ou sementes mantêm-se constante, em valores de aproximadamente, 3 g.kg^{-1} ; entretanto, para os grãos de plantas cultivadas que receberam o fornecimento de Zn, a concentração de K foi menor do que 3 g.kg^{-1} , em decorrência do baixo acúmulo desse elemento nas plantas (Tabela 6).

Figura 5. Acúmulo de K, Mg e S na parte aérea de plantas de milho (A) e concentração de K e S em grãos de milho (B) no local 3 (Colina, SP), segundo as doses de Zn no tratamento de sementes.

Doses intermediárias de Zn (100, 200 e 300 g de Zn.ha⁻¹) proporcionaram redução no acúmulo de Mg e S nas plantas cultivadas no local 3 (Figura 4A); a redução do conteúdo de S pelo tratamento das sementes também foi observada de forma linear para os grãos produzidos (Figura 4B). Isso se deu porque o S apresenta baixa mobilidade no floema e o Mg possui alta mobilidade quanto à redistribuição (EPSTEIN; BLOOM, 2005; MALAVOLTA, 2006); dessa forma, o Mg foi redistribuído para os grãos, em contrapartida, a baixa disponibilidade de S nas plantas foi refletida nos grãos – mesmo sendo considerado um dreno fisiológico forte. Souza et al. (2010) também observaram ajuste ao quadrático de regressão do acúmulo de Mg e S na parte aérea de plantas de arroz, com relação as doses de Zn aplicadas no tratamento.

Houve redução linear no acúmulo de B nas plantas cultivadas no local 1, pelo aumento das doses de Zn no tratamento de sementes (Figura 2B). Esse comportamento pode ser

atribuído, por um lado, ao efeito interiônico de inibição não competitiva entre B e Zn (MALAVOLTA et al., 2006), e por outro, pela disponibilidade do B que pode ser reduzida em condições de baixa umidade do solo, reduzindo, o fluxo de massa do íon borato para as raízes (BROADLEY et al., 2012). Desse modo, a baixa precipitação pluvial no local 1, associada ao efeito interiônico de inibição não competitiva entre B e Zn, pode ter interferido na absorção de B pelas plantas que receberam o fornecimento de Zn via tratamento de sementes.

Menor acúmulo de B e K na parte aérea também foi observado pelo tratamento de sementes de arroz com sulfato e óxido de Zn em cultivo em casa de vegetação por 30 dias (ROZANE et al., 2009). Os mesmos autores observaram maior acúmulo de S, Cu, Fe e Mn pelo tratamento de sementes. O tratamento de sementes de arroz com Zn também promoveu a redução do acúmulo de B na parte aérea e na raiz, com o aumento das dosagens (SOUZA et al., 2010).

O baixo acúmulo de Mg nas plantas cultivadas no local 3 pelo fornecimento de doses intermediárias de Zn, via tratamento de sementes, pode ser atribuído ao fato desse elemento possuir raio iônico semelhante ao Zn e, por isso, competir pelo mesmo sítio de ligação nas raízes; como consequência, a toxicidade ocasionada pelo alto fornecimento de Zn pode ser notada, muitas vezes, como clorose nas folhas jovens, induzida pela deficiência de, por exemplo, Mg ou Fe, o qual também possui raio iônico semelhante ao Zn (SAGARDOY et al., 2009). Apesar do baixo acúmulo de Mg nas plantas em V7, não foram observados sintomas de deficiência desse elemento nas folhas, nem mesmo redução da concentração nos grãos.

O acúmulo de Zn nas plantas e a concentração de Zn nos grãos não foram afetados pelo tratamento de sementes; portanto, não houve efeito sobre a biofortificação dos grãos produzidos (Tabelas 4 e 5). Apesar de não terem ocorrido diferenças estatísticas entre os tratamentos, observa-se que houve diferença em valores absolutos no acúmulo de Zn na parte aérea de plantas no local 1 para a dose 50 g de Zn.ha⁻¹ e no local 2 para as doses de Zn de 50 e 200 g de Zn.ha⁻¹ e no local 3 para a dose de 300 g de Zn.ha⁻¹ (Tabela 5).

Embora o tratamento de sementes com Zn não tenha influenciado no aumento da acumulação deste elemento na parte aérea das plantas nos estádios avaliados neste estudo, Dias e Cicero (2016) observaram que a aplicação de ZnO via tratamento de sementes, em estádios iniciais do desenvolvimento das plantas (estádio fenológico V2), propiciou o aumento da concentração e do acúmulo de Zn nas raízes e na parte aérea de plantas de milho, cultivadas em vaso, tendo como substrato areia. Puga et al. (2013) verificaram que a aplicação de óxido de Zn via semente para milho e sorgo resultou em maior concentração de Zn nos grãos.

Rehman et al. (2012) ressaltaram que o alto conteúdo de Zn nas sementes propicia um efeito inicial do fertilizante para que se alcance um rendimento satisfatório das culturas; entretanto, não é suficiente para promover alta concentração de Zn nos grãos. Por isso, o uso de sementes com altos teores de Zn, via tratamento de sementes, deve ser complementado pela aplicação de Zn via foliar; dessa forma, aumenta-se a produtividade e a concentração de Zn nos grãos (JIANG et al., 2008; REHMAN et al., 2012).

Nesse sentido, mesmo para o fornecimento de Zn via solo ou folhas, os resultados em aumento do rendimento são pouco expressivos ou nulos, e alguns trabalhos tem atribuído esse aspecto ao fato do aumento da concentração de Zn nos grãos não está diretamente relacionado a produtividade das culturas, ou seja, o conteúdo de nutrientes minerais pode ser melhorado sem afetar o rendimento dos grãos (WANG et al., 2012), segundo Sakai et al. (2015) isso se deve ao fato do carregamento de carbono, o qual contribui para o rendimento das culturas, provavelmente ser controlado por mecanismos regulatórios diferentes do carregamento de minerais para sementes ou grãos.

3.4 Conclusões

O crescimento das plantas foi afetado pelo tratamento de sementes com Zn, no qual a dose de 100 g de Zn.ha⁻¹ propiciou maior diâmetro do colmo de plantas cultivadas no local 1 (Indianópolis, MG).

Não foram observados efeitos do tratamento de sementes com Zn nas doses de 50, 100, 150 e 200 g de Zn.ha⁻¹ nos aspectos relacionados ao rendimento das plantas nos três locais de cultivo.

O tratamento de sementes reduziu o acúmulo de K, Mg e S na parte aérea de plantas cultivadas no local 3 (Colina, SP) e esta redução foi refletida em menores concentrações de K e S nos grãos de milho produzidos. Também houve redução do acúmulo de B na parte aérea das plantas, cultivadas no local 1 (Indianópolis, MG).

Não houve maior acúmulo de Zn nas plantas e nos grãos de milho, em decorrência do tratamento de sementes nas doses avaliadas neste estudo.

Referências

- ADHIKARI, T.; RATTAN, R.K. Modeling zinc uptake by rice crop using a Barber-Cushman approach. **Plant and Soil**, v. 227, p. 235-242, 2000.
- AJOURI, A.; ASGEDOM, H.; BECKER, M. Seed priming enhances germination and seedling growth of barley under conditions of P and Zn deficiency. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 167, p. 630-636, 2004.
- ALLOWAY, B.J. Soil factors associated with zinc deficiency in crops and humans. **Environ. Geochem Health**, v. 31, p. 537-548, 2009.
- ALLOWAY, B.J. **Zinc in soils and crop nutrition**. Paris: International Fertilizer Industry Association, 2008. 133 p.
- ALVAREZ, V., V.H.; NOVAIS, R.F.; BARROS, N.F.; CANTARUTTI, R.B.; LOPES, A.S. Interpretação dos resultados das análises de solo. In: RIBEIRO, A.C.; GUIMARAES, P. T. G.; ALVAREZ V., V. H. (Ed.). **Recomendação para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais: 5. Aproximação**. Viçosa, MG: Comissão de Fertilidade do Solo do Estado de Minas Gerais, 1999. p. 25-32.
- BAGCI, S.A.; EKIZ, H.; YILMAZ, A.; CAKMAK, I. Effects of zinc deficiency and drought on grain yield of field-grown wheat cultivars in Central Anatolia. **Journal Agronomy Crop Science**, v. 193, p. 198-206, 2007.
- BHANUPRAKASH, K.; YOGESHA, H.S. **Seed Priming for Abiotic Stress Tolerance: An Overview**, p. 103-117, 2016. In: RAO, N.K.S.; SHIVASHANKARA, K.S.; LAXMAN, R.H. **Abiotic Stress Physiology of Horticultural Crops**, 2016.
- BOUIS, H.E.; WELCH, R.M. Biofortification – a sustainable agricultural strategy for reducing micronutrient malnutrition in the Global South. **Crop Science**, v. 50, p. s20-s32, 2010.
- BROADLEY, M.; BROWN, P.; CAKMAK, I.; RENGEL, Z.; ZHAO, F. **Function of Nutrients: Micronutrients**. Chapter 7. p. 191-248. In: MARSCHNER, H. **Marchner's mineral nutrition of higher plants**. 3rd ed. Oxford: Elsevier, 2012. 643 p.
- CAKMAK, I. Enrichment of cereal grains with zinc: agronomic or genetic biofortification? **Plant Soil**, v.302, p.1-17, 2008a.
- CAKMAK, I. Enrichment of fertilizers with zinc: An excellent investment for humanity and crop production in India. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 23 p. 281-289, 2009.
- CAKMAK, I. Plant nutrition research: Priorities to meet human needs for food in sustainable ways. **Plant Soil**, v. 247, p. 3-24. 2002.

- CAKMAK, I. Possible roles of zinc in protecting plant cells from damage by reactive oxygen species. **New Phytologist**, v. 146, p. 185-205. 2000.
- CAKMAK, I. **Zinc deficiency in wheat in Turkey**. In: Alloway, B.J. (Ed.), *Micronutrient Deficiencies in Global Crop Production*. Springer, Dordrecht, pp. 181-200, 2008b.
- CAKMAK, I.; DERICI, R.; TORUN, B.; TOLAY, I.; BRAUN, H. J.; SCHLEGEL, R. Role of rye chromosomes in improvement of zinc efficiency in wheat and triticale. **Plant Soil**, v. 196, 249-253, 1997b.
- CAKMAK, I.; KALAYCI, M.; KAYA, Y.; TORUN, A.A.; AYDIN, N.; WANG, Y.; ARISOY, Z.; ERDEM, H.; YAZICI, A.; GOKMEN, O.L.O.; HORST, W.J. Biofortification and localization of zinc in wheat grain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 9092-9102, 2010a.
- CAKMAK, I.; PFEIFFER, W.H.; McCLAFFERTY, B. Biofortification of durum wheat with zinc and iron. **Cereal Chemistry**, v. 87, p. 10-20, 2010b.
- CAKMAK, I.; TORUN, B.; ERENOGLU, B.; KALAYCI, M.; YILMAZ, A.; EKIZ, H.; BRAUN, H.J. Zinc deficiency in soils and plants in Turkey and plant mechanism involved in zinc deficiency. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, v. 20 (Special issue), p. 13-23, 1996.
- CAMPOS, N.V.; GUERRA, M.B.B.; MELLO, J.W.V.; SCHAEFER, C.E.G.R.; KRUG, F.J. ALVES, E.E.N.; AZEVEDO, A.A. Accumulation and spatial distribution of arsenic and phosphorus in the fern *Pityrogramma calomelanos* evaluated by micro X-ray fluorescence spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 30, p. 2375-2383, 2015.
- CANTARELLA, H.; RAIJ, B. van; CAMARGO, C.E.O. Cereais. In: RAIJ, B. van; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A.; FURLANI, A.M.C. (Ed.). **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. Campinas: Instituto Agrônômico, 1996. p. 45-47.
- DIAS, M.A.N.; CICERO, S.M. Effect of copper carbonate and zinc oxide applied to seeds on copper and zinc uptake by maize seedlings. **Bragantia**, v. 75, n. 3, p. 286-291, 2016.
- EICHERT, T.; FERNÁNDEZ, V. **Uptake and release of elements by leaves and other aerial plant parts**, Chapter 4. In: MARSCHNER, H. *Marchner's mineral nutrition of higher plants*. 3rd ed. Oxford: Elsevier, 2012. 643 p.
- EKIZ, H.; BAGCI, S.A.; KIRAL, A.S.; EKER, S.; GÜLTEKIN, I.; ALKAN, A.; CAKMAK, I. Effects of zinc fertilization and irrigation on grain yield and zinc concentration of various

- cereals grown in zinc-deficient calcareous soils. **Journal of Plant Nutrition**, v. 21, p. 2245-2256, 1998.
- EPSTEIN, E.; BLOOM, A. J. **Mineral nutrition of plants: principles and perspectives**. 2.ed. Massachussets: Sinauer, 2005. 380 p.
- FAGERIA, N. K. Níveis adequados e tóxicos de Zn na produção de arroz, feijão, milho, soja e trigo em solo de cerrado. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 4, n. 3, p. 390-395, 2000.
- FAGERIA, N. K. Otimização da eficiência nutricional na produção das culturas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 2, p. 6-16, 1998.
- FAGERIA, N. K.; L. F. STONE. **Micronutrient deficiencies in crops in South America**. Chap. 10, In Alloway, B.J. (ed.) *Micronutrient deficiencies in global crop production*, Springer, Dordrecht, p. 245-266. 2007.
- FANCELLI, A.L.; DOURADO NETO, D. **Produção de milho**. 2. ed. Guaíba: Agropecuária, 2004. 360 p.
- FANCELLI, A.L.; DOURADO-NETO, D. **Produção de milho**. Guaíba: Agropecuária, 2000. 360p.
- FAROOQ, M.; WAHID, A.; SIDDIQUE, K.H.M. Micronutrient application through seed treatments – a review. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v.12, p.125-142, 2012.
- FUNGUETTO, C.I.; PINTO, J.F.; BAUDET, L.; PESKE, S.T. Desempenho de sementes de arroz irrigado recobertas com zinco. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, n. 2, p.117-123, 2010.
- GALRÃO, E. Z. Micronutrientes. In: SOUSA, D. M. G.; LOBATO, E. (Ed.). **Cerrado: correção do solo e adubação**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2002. 416 p.
- GIORDANO, P.M.; MORTVEDT, J.J. Rice response to Zn in Arkansas Agric. Exp. Stn. Res. Service, Fayetteville, AR. flooded and nonflooded soil. **Agronomiy Journal**, v. 64, p. 521-524, 1972.
- GRAHAM, R.D.; WELCH, R.M. Breeding for staple food crops with high micronutrient density. **Washington: International Food Policy Research Institute**, 1996. IFPRI. Working Papers on Agricultural Strategies for Micronutrients, 3.
- HACISALIHOGU, G.; HART, J.J.; WANG, Y.H.; CAKMAK, I.; KOCHIAN L.V. Zinc efficiency is correlated with enhanced expression and activity of zinc-requiring enzymes in wheat. **Plant Physiology**, v. 131, p. 595-602, 2003.

- HARRIS, D.; RASHID, A.; MIRAJ, G.; ARIF, M.; SHAH, H. On-farm seed priming with zinc sulphate solution – A cost-effective way to increase the maize yields of resource-poor farmers. **Field Crops Research**, v.10, p.119-127, 2007.
- HAWKESFORD, M.; HORST, W.; KICHEY, T.; LAMBERS, H.; SCHJOERRING, J.; MØLLER, I.S.; WHITE, P. **Functions of macronutrients**. Chapter 6. p. 135-189. In: MARSCHNER, H. Marchner's mineral nutrition of higher plants. 3rd ed. Oxford: Elsevier, 2012. 643 p.
- HILL, H.J. Recent Developments in Seed Technology. **Journal of New Seeds**, v. 1, p. 105-112, 1999.
- HUSSAIN, S; MAQSOOD, M.A.; RENGEL, Z; AZIZ, T. Biofortification and estimated human bioavailability of zinc in wheat grains as influenced by methods of zinc application. **Plant Soil**, v. 361, p. 279-290, 2012.
- JIANG, W.; STRUIK, P.C.; ZHAO, M.; VAN KEULEN, H.; FAN, T.Q.; STOMPH, T.J. Indices to screen for grain yield and grain zinc mass concentration in aerobic rice at different soil Zn levels. **NJAS Wageningen Journal of Life Sciences**, v. 55, p. 181-197, 2008b.
- JOHNSON, S.E.; LAUREN, J.G.; WELCH, R.M.; DUXBURY, J.M.A. Comparison of the effects of micronutrient seed priming and soil fertilization on the mineral nutrition of chickpea (*Cicerarietinum*), lentil (*Lens culinaris*), rice (*Oryza sativa*) and wheat (*Triticumaestivum*) in Nepal . **Experimental Agriculture**, v.41, p.427-448, 2005.
- JOY, E J.M.; STEIN, A.J.; YOUNG, S.D.; ANDER, E.L.; WATTS, M.J.; BROADLEY, M.R. Zinc-enriched fertilisers as a potential public health intervention in Africa. **Plant Soil**, v. 389, p.1-24, 2015.
- KHAN, H. R.; McDONALD, G. K.; RENGEL, Z. Zinc fertilization improves water use efficiency, grain yield and seed Zn content in chickpea. **Plant and Soil**, v. 249, p. 389-400, 2003.
- MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2006. 638p.
- MARI, G.F.; PRADO, R.M.; SOARES A.A.V.L.; CAIONE, G.; CAMPOS, C.N.S. Residual effect of zinc application doses and methods on nutrition and productivity of corn. **American Journal of Plant Sciences**, v. 6, p. 298-305, 2015.
- MELO, P.C.S.; ANUNCIAÇÃO FILHO, C.J.; OLIVEIRA, F.J.; BASTOS, G.Q.; TABOSA, J.N.; SANTOS, V.F.; MELO, M.R.C.S. Seleção de genótipos de arroz tolerantes à salinidade durante a fase vegetativa. **Ciência Rural**, v.36, n.1, p.58-64, 2006.

- MOHSIN, A.U.; AHMAD, A.U.H.; FAROOQ, M.; ULLAH, S. Influence of zinc application through seed treatment and foliar spray on growth, productivity and grain quality of hybrid maize. **The Journal of Animal and Plant Sciences**, v. 24, n. 5, p. 1494-1503, 2014.
- MUHAMMAD, I; KOLLA, M; VOLKER, R; GÜNTER, N. Impact of nutrient seed priming on germination, seedling development, nutritional status and grain yield of maize. **Journal of Plant Nutrition**, 38:12, 1803-1821. 2015.
- NAIK, S.K.; DAS, D.K. Effect of split application of zinc on yield of rice (*Oryza sativa* L.) in an inceptisol. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 53, p. 305-313, 2007.
- OBATA, H.; KAWAMURA, S.; SENOO, K.; TANAKA, A. Changes in the level of protein and activity of Cu/Zn superoxide dismutase in zinc deficient rice plant, *Oryza sativa* L. **Soil Science Plant Nutrition**, v. 45, p. 891-896, 1999.
- OZTURK, L.; YAZICI, M.A.; YUCEL, C.; TORUN, A.; CEKIC, C.; BAGCI, A.; OZKAN, H.; BRAUN, H.J.; SAYERS, Z.; CAKMAK, I. Concentration and localization of zinc during seed development and germination in wheat. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 128, p. 144-152, 2006.
- PECK, A.W.; McDONALD, G. K. Adequate zinc nutrition alleviates the adverse effects of heat stress in bread wheat. **Plant Soil**, v. 337, p. 355-374, 2010.
- PECK, A.W.; MCDONALD, G.K.; GRAHAM, R.D. Zinc nutrition influences the protein composition of flour in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). **Journal Cereal Science**, v. 47, p. 266-274, 2008.
- PERUCHI, L.C.; NUNES, L.C.; CARVALHO, G.G.A.; GUERRA, M.B.B.; ALMEIDA, E.; RUFINI, I.A.; SANTOS JR., D.; KRUG, F.J. Determination of inorganic nutrients in wheat flour by laser-induced breakdown spectroscopy and energy dispersive X-ray fluorescence spectrometry, **Spectrochim. Acta Part B**, v. 100, p. 129-136, 2014.
- PFEIFFER, W.H.; McCLAFFERTY, B. Biofortification: breeding micronutrient-dense crops. In: KANG, M.S.; PRIYADARSHAN, P.M. (eds) Breeding major food staples for the 21st century. **Blackwell Scientific**, Oxford, p. 61-91, 2007.
- PHATTARAKUL, N., RERKASEM, B., LI, L.J., WU, L.H., ZOU, C.Q., RAM, H., SOHU, V.S., KANG, B.S., SUREK, H., KALAYCI, M., YAZICI, A., ZHANG, F.S., CAKMAK, I. Biofortification of rice grain with zinc through zinc fertilization in different countries. **Plant Soil**, v.361, p.131-141, 2012.
- PRADO, R.M.; ROMUALDO, L.M.; ROZANE, D.E.; VIDAL, A.A.; MARCELO, A.V. Modos de aplicação de zinco na nutrição e na produção de matéria seca do milho BRS 1001. **Bioscience Journal**, v. 24, n. 1, p. 67-74, 2008.

- PRASAD, R.; SHIVAY, Y.S.; KUMAR, D. Agronomic Biofortification of Cereal Grains with Iron and Zinc. In: **Advances in Agronomy**. v. 125, 2014.
- PUGA, A.P.; PRADO R.M.; MATTIUZ, BEN-HUR; VALE, D.W.; FONSECA, I.M. Chemical composition of corn and sorghum grains cultivated in Oxisol with different application methods and doses of zinc. **Ciencia e investigación agraria**, v. 40, n. 1, p. 97-108. 2013.
- RAIJ, B. van; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A.; FURLANI, A.M.C. (Ed.). **Recomendações de adubação e calagem para o estado de São Paulo**. 2. ed. Campinas: Instituto Agrônômico, 1996. 285 p. (IAC. Boletim Técnico, 100).
- REHMAN, H.; AZIZ, T.; FAROOQ, M.; WAKEEL, A.; RENGEL, Z. Zinc nutrition in rice production systems: a review. **Plant Soil**, v. 361, p. 203-226, 2012.
- RENGEL, Z.; GRAHAM, R.D. Importance of seed Zn content for wheat growth on Zn-deficient soil. **Plant and Soil**, v. 173, p. 267-274, 1995.
- RIBEIRO, A.C.; GUIMARÃES, P.T.G.; ALVAREZ V., V.H., eds. **Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais: 5ª aproximação**. Viçosa, MG: UFV, 1999. 359p.
- ROZANE, D. E.; PRADO, R. de M.; NATALE, W.; ROMUALDO, L. M. Acúmulo de nutrientes pelo arroz em função da aplicação de doses e fontes de zinco nas sementes. **Pesquisa Agropecuária Tropical** (Impresso), v. 39, p. 183-190, 2009.
- SAGARDOY, R.; MORALES, F.; LÓPEZ-MILLÁN, A. F.; ABADÍA, A.; ABADÍA, J. Effects of zinc toxicity on sugar beet (*Beta vulgaris* L.) plants grown in hydroponics. **Plant Biology**, v. 11, p. 339-350, 2009.
- SAKAI, H.; IWAI, T.; MATSUBARA, C.; USUI, Y.; OKAMURA, M.; YATOU, O.; TERADA, Y.; AOKI, N.; NISHIDA, S.; YOSHIDA, K.T. A decrease in phytic acid content substantially affects the distribution of mineral elements within rice seeds. **Plant Science**, v. 238, p. 170-177, 2015.
- SANTOS, O.S.; FILHO, H.N.; FRONZA, D.; MENEZES, N.L.; BASSO, D.P. Aplicação de zinco em sementes de arroz irrigado e no solo. **Ambiência - Revista do Setor de Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 7, n. 2, 2011.
- SAS Institute Inc. SAS statistical software, version 9.3. **SAS Institute**, Inc, Cary, NC, 2010.
- SCOTT, J.M. **Delivering fertilizers through seed coatings**. In: Nutrient use in crop production, p.197-220, 1998.

- SHIVAY, Y.S.; KUMAR, D.; PRASAD, R.; AHLAWAT, I. P. S. Relative yield and zinc uptake by rice from zinc sulphate and zinc oxide coatings onto urea. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v. 80, p. 181-188, 2008.
- SHIVAY, Y.S.; PRASAD, R.; PAL, M. Effect of sources, methods and time of application of zinc on productivity, zinc uptake and use efficiency of oats (*Avena sativa* L.) under zinc deficient condition. **Journal of Plant Nutrition**, v. 38, p. 1372-1382, 2015.
- SHIVAY, Y.S.; PRASAD, R.; PAL, M. Zinc fortification of oat grains through zinc fertilisation. **Agricultural Research**, v. 2, n. 4, p. 375-381, 2013.
- SINGH, M.V. Efficiency of seed treatment for ameliorating zinc deficiency in crops. In: **Proceeding of Zinc Crops Conference**, p. 24-26, 2007.
- SLATON, N.A.; NORMON, R.J.; WILSON, C.E.J. Effect of Zn source and application time on Zn uptake and grain yield of flood irrigated rice. **Agronomy Journal**, v. 92, p. 272-278, 2005.
- SLATON, N.A.; WILSON-JUNIOR, C.E.; NTAMATUNGIRO, S.; NORMAN, R.J.; BOOTHE, D.L. Evaluation of zinc seed treatment for rice. **Agronomy Journal**, v. 93, p. 152-157, 2001.
- SOUSA, D.M.G.; LOBATO, E. eds. **Cerrado: Correção do solo e adubação**. Planaltina, Embrapa Cerrados, 2002. 416p.
- SOUZA, H. A.; ROZANE, D. E.; PRADO, R. de M.; ROMUALDO, L. M. Avaliação da interação de nutrientes na aplicação de zinco em sementes pelo arroz. **Bioscience Journal (UFU)**, v. 26, p. 33-39, 2010.
- TAYLOR, A.G.; ALLEN, P.S.; BENNETT, M.A.; BRADFORD, K.J.; BURRIS, J.S.; MISRA, M.K. Seed enhancements. **Seed Science Research**, v. 8, p. 245-256, 1998.
- USMAN, M.; TAHIR, M.; MAJEED, M.A. Effect of zinc sulphate as soil application and seed treatment on green. **Pakistan Journal of Life and Social Sciences**, v. 12, n. 2, p. 87-91, 2014.
- WANG, H.; JIN, J.Y. Effects of zinc deficiency and drought on plant growth and metabolism of reactive oxygen species in maize (*Zea mays* L.). **Agricultural Sciences in China**, v. 6, p. 988-995, 2007.
- WANG, H.; LIU, R.L.; JIN, J.Y. Effects of zinc and soil moisture on photosynthetic rate and chlorophyll fluorescence parameters of maize. **Biologia Plantarum**, v. 53, p. 191-194, 2009.

- WANG, J.W.; MAO, H.; ZHAO, H.B.; HUANG, D.L.; WANG, Z.H. Different increases in maize and wheat grain zinc concentrations caused by soil and foliar applications of zinc in Loess Plateau, China. **Field Crop Research**, v. 135, p. 89-96, 2012.
- WHITE, P.J., BROADLEY, M.R. Physiological limits to zinc biofortification of edible crops. **Frontiers in Plant Science**, v. 2, n. 80, 2011.
- WISSUWA, M; ISMAIL, A.M.; GRAHAM, R.D. Rice grain zinc concentrations as affected by genotype, native soil-zinc availability, and zinc fertilization. **Plant Soil**, v. 306, p.37-48, 2008.
- YANG, X.W.; TIAN, X.H.; GALE, W.J.; CAO, Y.X.; LU, X.C.; ZHAO, A.Q. Effect of soil and foliar zinc application on zinc concentration and bioavailability in wheat grain grown on potentially zinc deficient soil. **Cereal Research Communications**, v. 39, p. 535-543, 2011a.
- YANG, X.W.; TIAN, X.H.; LU, X.C.; GALE, W.J.; CAO, Y.X. Foliar zinc fertilization improves the zinc nutritional value of wheat (*Triticum aestivum* L.) grain. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 14778-14785, 2011b.
- YILMAZ, A.; EKIZ, H.; GULTEKIN, I.; TORUN, B.; BARUT, H.; KARANLIK, CAKMAK, I. Effect of seed zinc content on grain yield and zinc concentration of wheat grown in zinc-deficient calcareous soils. **Journal of Plant Nutrition**, v. 21, p. 2257-2264, 1998.
- YIN, H.; GAO, X.; STOMPHC, T.; LI, L.; ZHANGA, F.; ZOU, C. Zinc concentration in rice (*Oryza sativa* L.) grains and allocation in plants as affected by different zinc fertilization strategies. **Communications in soil science and plant analysis**, v. 47, n. 6, 761–768, 2016.
- YU, Q.; WORTH, C.; RENGEL, Z. Using capillary electrophoresis to measure Cu/Zn superoxide dismutase concentration in leaves of wheat genotypes differing in tolerance to zinc deficiency. **Plant Science**, v. 143, p. 231-239, 1999b.
- ZHANG, Y.Q.; SHI, R.L.; KARIM, M.R.; ZHANG, F.S.; ZOU, C.Q. Iron and zinc concentrations in grain and flour of winter wheat as affected by foliar application. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 12268-12274, 2010.
- ZHANG, Y.Q.; SUN, Y.X.; YE, Y.L.; KARIM, M.R.; XUE, Y.F.; YAN, P.; MENG, Q.F.; CUI, Z.L.; CAKMAK, I.; ZHANG, F.S.; ZOU, C.Q. Zinc biofortification of wheat through fertilizer applications in different locations of china. **Field Crop Research**, v. 125, p. 1-7, 2012.

4 CONTRIBUIÇÃO DO ZN APLICADO ÀS SEMENTES DE MILHO PARA A NUTRIÇÃO DAS PLANTAS, UTILIZANDO O ISÓTOPO ^{68}Zn

Resumo

A marcação isotópica em plantas tem sido empregada em pesquisas para fornecer informações seguras quanto à contribuição de adubações foliares e via solo para a nutrição das plantas. Este é o primeiro trabalho desenvolvido que se propôs a utilização da técnica para determinar com precisão a participação do Zn disponibilizado via tratamento de sementes na nutrição da planta e no enriquecimento dos grãos. Sementes de milho foram tratadas com o produto óxido de zinco enriquecido em 99,16% de átomos de ^{68}Zn . O estudo foi dividido em duas partes: na primeira, as sementes tratadas com ^{68}ZnO foram colocadas para germinar por 120 horas; na segunda parte, plantas foram cultivadas em casa de vegetação e coletadas em 7 estádios fenológicos (V2, V4, V6, V8, V10, VT e R2/R3) sendo segmentadas para a análise. As plântulas referentes à primeira parte do estudo e as plantas segmentadas da segunda parte foram avaliadas quanto aos teores de Zn total (que consiste na soma dos 5 isótopos de Zn) e do Zn proveniente do tratamento de sementes, designado por ZnPTS, referente ao ^{68}Zn . Em plantas, também foi realizada a comparação do Zn com os demais nutrientes determinados (P, K, Ca, Mg, S, Fe, Cu, Mn e B) utilizando a análise multivariada. O Zn fornecido via tratamento de sementes participa da nutrição de todas as partes das plantas em todos os estádios fenológicos, sendo mais significativa a sua contribuição nos estádios iniciais de desenvolvimento, nas plântulas após 120 horas de germinação e nas plantas nos estádios fenológicos V2, V4 e V6; nessas fases, a maior parte do Zn na planta é proveniente do tratamento de sementes; nos estádios V8 e V10, o tratamento de sementes deixa de ser a maior fonte de Zn para as plantas, mas ainda possui grande contribuição na nutrição, com cerca de 44% do Zn total na planta. Quando a planta inicia a fase reprodutiva, a participação do Zn fornecido via tratamento reduz consideravelmente; entretanto, os grãos produzidos apresentam cerca de 31% da sua constituição em ZnPTS. A eficiência de recuperação do Zn aplicado nas sementes foi de cerca de 1,94% nas plantas ao final do ciclo, e nos grãos foi de 0,21%. Os teores de Zn total e de ZnPTS apresentaram maior relação com o Fe e, na sequência, com o P, K, S e Cu.

Palavras-chave: *Zea mays* L.; Tratamento de sementes; Marcação isotópica; Isótopo estável.

Abstract

Isotopic labeling in plants has been used in research to provide reliable information on the contribution of leaf and soil fertilization to plant nutrition. This is the first work developed that proposed the use of the technique to determine with precision the participation of Zn made available through seed treatment in plant nutrition and grain enrichment. Corn seeds were treated with the zinc oxide product enriched in 99.16% ^{68}Zn atoms. The study was divided in two parts: in the first, the seeds treated with ^{68}ZnO were placed to germinate for 120 hours; In the second part, plants were cultivated in a greenhouse and collected in 7 phenological stages (V2, V4, V6, V8, V10, VT and R2 / R3) being segmented for analysis. The seedlings referring to the first part of the study and the segmented plants of the second part were evaluated for the contents of total Zn (consisting of the sum of the 5 Zn isotopes) and the Zn from the seed treatment, designated ZnPTS, referring to ^{68}Zn . In plants, the Zn was compared with the other nutrients (P, K, Ca, Mg, S, Fe, Cu, Mn and B) using the multivariate analysis. The Zn supplied via seed treatment participates in the nutrition of all parts of the plants in all phenological stages, being more significant its contribution in the initial stages of development, in the seedlings after 120 hours of germination and in the plants in the phenological stages V2, V4 and V6; In these phases, most of the Zn in the plant comes from seed treatment; In the V8 and V10 stages, seed treatment ceases to be the main source of Zn for plants, but still has a great contribution in nutrition, with about 44% of the total Zn in the plant. When the plant begins the reproductive phase, the participation of the Zn supplied via treatment reduces considerably; However, the grains produced present about 31% of their constitution in ZnPTS. The recovery efficiency of Zn applied to the seeds was about 1.94% in the plants at the end of the cycle, and in the grains it was 0.21%. The total Zn and ZnPTS contents showed a higher relationship with Fe and, subsequently, with P, K, S and Cu.

Keywords: *Zea mays* L.; Seed treatment; Isotopic labeling; Stable isotope.

4.1 Introdução

O Zn tem importantes funções na planta (BROADLEY et al., 2012) e um papel essencial na manutenção da saúde humana (ALLOWAY, 2009). Nos últimos anos, grande esforço tem sido despendido no sentido de enriquecer grãos de culturas com esse elemento. Neste contexto, compreender como o fornecimento do Zn via adubação participa da nutrição da planta e identificar a sua contribuição no valor nutricional dos grãos é de grande importância.

A metodologia mais comum para mensurar a eficácia da resposta das plantas na aplicação de fertilizantes é o método indireto, o qual consiste na comparação entre plantas adubadas e aquelas que não receberam fertilizantes (GONZALEZ et al., 2008; SHIVAY et al., 2008; McBEATH et al., 2013). Contudo, esses experimentos tradicionais que usam fertilizantes não são capazes de distinguir entre o Zn aplicado via fertilizante (forma de interesse) e o Zn existente nos tecidos proveniente de outras fontes.

Para o estudo da absorção dos produtos disponibilizados por meio do tratamento de sementes, além da avaliação do Zn total pelo método indireto, também foram utilizados compostos conhecidos como traçadores fluorescentes, tais como a Cumarina 151 e Rodamina B, os quais, aplicados nas sementes, permitem a compreensão do mecanismo de absorção dos produtos utilizados no tratamento (TAYLOR; SALANENKA, 2012; DIAS et al., 2014). Todavia, segundo Taylor e Salanenka (2012), para melhor compreensão do mecanismo de absorção dos micronutrientes, disponibilizados por meio do tratamento de sementes, e do seu transporte pela planta, deve-se considerar como base os estudos dos elementos disponibilizados pela aplicação nas folhas ou no solo, nos quais se utilizam, em sua maioria, técnicas de marcadores radioativos ou elementos estáveis.

A incorporação de um isótopo, em uma técnica conhecida como método isotópico ou traçador, seja ele estável ou radioativo, permite o conhecimento detalhado a respeito da absorção, do transporte e da acumulação dos elementos fornecidos às plantas por meio da adubação foliar e no solo. Segundo Benedicto et al. (2011) a alta precisão e os baixos limites de detecção alcançados com a técnica de traçadores isotópicos podem permitir que se encontrem diferenças normalmente não detectadas com o uso das técnicas convencionais. Este aspecto é de grande relevância na comparação de novas formulações de fertilizantes, além disso, a utilização de traçadores isotópicos tem possibilitado avanços notórios no estudo da nutrição de plantas (ZHANG; BROWN, 1999; SANCHEZ et al., 2006).

O Zn é um metal de transição de número atômico 30, o qual possui cinco isótopos estáveis, ^{64}Zn , ^{66}Zn , ^{67}Zn , ^{68}Zn e ^{70}Zn , com abundâncias médias relativas de 49,17%, 22,73%, 4,04%, 18,45% e 0,61%, respectivamente (MEIJA et al., 2016), e o isótopo radioativo ^{65}Zn . Na literatura, existem muitos estudos que utilizaram o radioisótopo de Zn – 65 para avaliar a eficácia de fertilizantes de Zn no fornecimento desse elemento para as plantas (BOARETTO et al., 1998; ERENOGLU et al., 1999; 2002; 2011; HASLETT et al., 2001; BOARETTO et al., 2002; LIU et al., 2006; Jiang et al., 2007; SARTORI et al., 2008; PIPISKA et al., 2008; STACEY et al., 2008; SRIVASTAVA et al., 2008; DIESING et al., 2008). Entretanto, o uso de isótopos, fonte de radiação gama, envolve uma série de preocupações relacionadas com a segurança na manipulação em experimentos, além disso, podem gerar grande volume de resíduos (STURUP et al., 2008).

O desenvolvimento de técnicas analíticas sensíveis, tais como a espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), permitiu a utilização de isótopos estáveis como traçadores em plantas, objetivando a medição direta da absorção pela planta dos elementos disponibilizados via solo e via folhas. O uso de isótopos estáveis, em vez de radioativos, permite maior flexibilidade nos modelos experimentais utilizados. Os ensaios podem ser conduzidos sem que ocorra o decaimento da radioatividade ao longo do tempo, ademais, não existe a produção de resíduos radioativos.

O uso de isótopos estáveis constitui um método sensível de determinação direta da absorção de nutrientes colocados na superfície das folhas ou aplicados no solo (BOARETTO et al., 2003). Com o emprego dos isótopos estáveis, tem sido possível estudar com maior precisão o comportamento dos nutrientes aplicados, bem como o aproveitamento deles pela cultura e sua distribuição para os diversos órgãos da planta, permitindo a quantificação exata da participação do elemento na nutrição da planta. A grande contribuição da técnica isotópica reside na possibilidade de localizar, com grande precisão, a transferência do nuclídeo de um local, por exemplo, um órgão, para outro, via floema (redistribuição) ou via xilema (transporte).

A análise por espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado permite a realização de medições simultâneas e precisas de múltiplos isótopos estáveis do mesmo elemento em uma amostra (HALLIDAY et al., 1998). O crescente interesse por essa técnica consiste nos baixos limites de detecção obtidos e na capacidade de fornecer resultados da composição isotópica. A técnica baseia-se na medida da razão massa/carga (m/z) dos íons produzidos em um plasma. A elevada temperatura desse plasma, de aproximadamente 9727 °C, é responsável pela dessolvatação, vaporização, atomização e ionização dos constituintes de uma amostra, a qual pode ser sólida, líquida ou gasosa. Os íons formados são transferidos para uma

região de vácuo e focalizados em um feixe por meio de lente iônica. Assim, os íons atingem o analisador de razão massa/carga (m/z), em que são separados e, posteriormente, seguem em direção ao detector (BROEKAERT, 2002).

Estudos com traçador de Zn com isótopos estáveis têm sido utilizados para uma ampla variedade de aplicações, tais como na avaliação da disponibilidade, da captação e da acumulação de Zn em seres humanos (JANGHORBANI et al., 1983; ZIEGLER et al., 1989; ADAMS et al., 2002) e em peixes (WOLF et al., 2009).

A aplicação do método isotópico em plantas foi revisada por Mestek et al. (2001) que realizaram um estudo demonstrando como é a determinação de Zn em amostras de plantas; os autores utilizaram espectrômetro de massas. Em alguns estudos, utilizou-se essa técnica para distinguir, nos tecidos das plantas, entre o Zn proveniente das aplicações de interesse nas folhas ou no solo e o Zn derivado de outras fontes (ZHANG; BROWN, 1999; SANCHEZ; RIGHETTI, 2002; SANCHEZ et al., 2006; WU et al., 2010, 2011; ERENOGLU et al., 2011; BENEDICTO et al., 2011; XUE et al., 2015). Em outra vertente, tem-se utilizado o enriquecimento com o isótopo ^{68}Zn para compreender como ocorre o processo de transporte de Zn em plantas hiperacumuladoras (LU et al., 2013); contudo, ainda não foram realizados estudos utilizando traçadores isotópicos para determinação da participação do Zn disponibilizado via tratamento de sementes na nutrição da planta.

Diante da grande contribuição que as informações obtidas pelo uso da técnica isotópica pode fornecer sobre a absorção, o transporte e a redistribuição do Zn aplicado às sementes, neste trabalho, objetivou-se, pelo uso da fonte óxido de Zn marcada com isótopo estável ^{68}Zn , obter informações conclusivas com relação à contribuição do tratamento de sementes para a nutrição das plantas e para o enriquecimento dos grãos de milho.

4.2 Materiais e métodos

4.2.1 Descrição e preparo do material ^{68}ZnO

O material enriquecido com isótopo 68 de Zn foi adquirido da empresa ISOFLEX (San Francisco, CA, USA) (Figura 1A); o certificado de análise comprovou um enriquecimento de 99,16% em átomos de ^{68}Zn , na forma de óxido de Zn (ZnO) e a distribuição isotópica dos demais isótopos de Zn no material constituía em: 0,03%, 0,16%, 0,62% e 0,03% dos isótopos 64, 66, 67 e 70, respectivamente. O certificado de análise química do material também mostrou a presença dos seguintes elementos: alumínio (1 mg.kg^{-1}), arsênio (10 mg.kg^{-1}), cálcio (20 mg.kg^{-1}), cádmio (40 mg.kg^{-1}), cobalto (1 mg.kg^{-1}), crômio (3 mg.kg^{-1}), cobre (7 mg.kg^{-1}), ferro (1 mg.kg^{-1}), magnésio (1 mg.kg^{-1}), manganês (1 mg.kg^{-1}), chumbo (1 mg.kg^{-1}), silício (20 mg.kg^{-1}), estanho (280 mg.kg^{-1}) e sódio ($< 100 \text{ mg.kg}^{-1}$).

Figura 1. Isótopo marcado ^{68}Zn adquirido da empresa ISOFLEX (A). Tratamento das sementes (B). Sementes após o tratamento expostas à secagem por 24 horas em capela de fluxo laminar (C).

Foi realizada a análise do tamanho de partícula do material ^{68}ZnO e do produto Maxi zinc[®], o qual contém óxido de zinco, da empresa Agrichem do Brasil S.A (Ribeirão Preto, SP,

Brasil). A análise foi realizada no Laboratório de Radioisótopos pertencente ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo (USP / CENA) por difração à laser no aparelho MicroTec Plus Analysette 22 (Fritsch, Germany), com o ultrassom no modo desligado, utilizando o índice de refração do óxido de zinco de 2,008.

Essa análise é importante pois o tamanho da partícula possui grande influência na eficácia de fertilizantes aplicados no solo, em folhas e nas sementes; segundo Mortvedt (1992), a redução do tamanho de partícula resulta em aumento do número de partículas por unidade de peso aplicado de Zn e aumenta a área da superfície específica de um fertilizante, o que deve, consequentemente, aumentar a taxa de dissolução de fertilizantes com baixa solubilidade em água, tal como o óxido de zinco.

Na primeira análise, os índices obtidos para o material marcado (^{68}ZnO) foram: D10 = 1,20 μm , D50 = 3,70 μm e D90 = 11,30 μm e para o Maxi Zinc[®] foram: D10 = 0,20 μm , D50 = 0,76 μm e D90 = 1,90 μm . Efetuou-se a moagem do material ^{68}ZnO com o objetivo de tornar o tamanho de partícula semelhante ao do produto Maxi Zinc[®]. Para isto, 0,4 g de material foi colocado em tubo de microcentrífuga de polipropileno com capacidade para 1,5 mL (Eppendorf[®], São Paulo, Brasil) e foram realizados testes do tempo de moagem e de frequência da operação no aparelho CryoMill da Retsch[®] (Haan, Germany) em condições criogênicas (-196 °C). A moagem, a partir da qual se obteve o resultado desejado, foi de 3 minutos sob frequência de 25 Hz.

Na análise final de tamanho de partículas, os índices para o material marcado (^{68}ZnO) foram: D10 = 0,10 μm , D50 = 0,80 μm e D90 = 2,40 μm , valores próximos ao produto comercial Maxi Zinc[®].

4.2.2 Tratamento das sementes

O cálculo da quantidade de ^{68}ZnO utilizado no tratamento foi feito considerando-se a extração média de Zn pela cultura do milho de 47 g Zn.t⁻¹ (FANCELLI; DOURADO NETO, 2004) e uma produtividade média desejada de 12 t, resultando cerca 564 g de Zn.ha⁻¹. Considerou-se uma taxa de semeadura de 70.000 sementes.ha⁻¹; assim, a dose utilizada foi de 8,0 mg Zn.semente⁻¹, utilizando-se 0,8 g do produto ^{68}ZnO .

Nos tubos de microcentrífuga de polipropileno contendo o material moído foram adicionados 1 mL de água deionizada (resistividade de 18.2 M Ω cm) e 0,2 g de dispersante. Para homogeneizar o conteúdo, os tubos foram mantidos por 10 minutos em equipamento de banho ultrassom (Quimis[®], Diadema, SP, Brasil) com frequência constante (50 a 60 Hz).

Sementes do milho híbrido 30A37PW (Morgan®, Dow AgroSciences, Jardinópolis, SP) da peneira 22/64” foram utilizadas neste estudo. O tratamento foi feito em copos plásticos com capacidade para 200 mL, evitando-se a perda de material. Os copos foram mantidos em capela de fluxo laminar por 24 horas para secagem do produto (Figuras 1B e 1C).

4.2.3 Parte 1: Avaliação da participação do tratamento com Zn em plântulas de milho

Sementes tratadas com ^{68}ZnO foram mantidas em germinação em tubos de polipropileno da marca falcon® com capacidade para 50 mL e foram preenchidas até o volume de 40 mL com vermiculita umedecida com água deionizada (resistividade de $18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$) em 70% da capacidade de retenção do substrato. As sementes em germinação foram mantidas em germinador a $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ por 120 horas e a água foi monitorada em seu conteúdo inicial diariamente. Em seguida, foram cortadas a parte aérea e as raízes e ambas foram lavadas em água deionizada, para promover a retirada de qualquer resquício do ^{68}ZnO . Esse material foi seco em estufa com circulação de ar por 48 horas e, em seguida, foi determinada a massa da parte aérea e das raízes das plântulas, procedendo com a moagem criogênica do material (Spex 6800 Freezer Mill, EUA) durante 30 min (15 ciclos de 2 min de moagem). Foram feitas triplicatas com 10 plântulas para cada repetição.

4.2.4 Parte 2: Avaliação da participação do tratamento com Zn durante todo o ciclo de cultivo das plantas de milho

4.2.4.1 Preparo da terra e semeadura

O experimento foi conduzido em casa de vegetação no Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo (USP / CENA).

Foram utilizados vasos plásticos com capacidade para 11,5 l, os quais foram preenchidos com 10 l de terra, que correspondem a 10 Kg, pois a densidade determinada da terra era de 1 Kg.L^{-1} . Realizou-se a análise da terra coletada para o experimento. Os resultados das análises química e granulométrica foram: pH 4,0 em CaCl_2 $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$, $1,0 \text{ mg.dm}^{-3}$ P, 72 mg.dm^{-3} S- SO_4^{-2} , $0,5 \text{ mmolc.dm}^{-3}$ K, 6 mmolc.dm^{-3} Ca, $<1 \text{ mmolc.dm}^{-3}$ Mg, 8 mmolc.dm^{-3} Al^{+3} , $<0,4 \text{ mg.dm}^{-3}$ Cu, $0,2 \text{ mg.dm}^{-3}$ Zn, 4 mg.dm^{-3} Fe, $2,3 \text{ mg.dm}^{-3}$ Mn, $0,15 \text{ mg.dm}^{-3}$ B, SB (soma de bases trocáveis) $7,5 \text{ mmolc.dm}^{-3}$, CTC (capacidade de troca de cátions) $45,5 \text{ mmolc.dm}^{-3}$, V (saturação da CTC por bases) 16%, m (saturação por Alumínio) 52% e matéria orgânica 7 g.dm^{-3} .

³. A análise textural mostrou 701 g.kg⁻¹ de argila, 73 g.kg⁻¹ de silte, 50 g.kg⁻¹ de areia grossa e 174 g.kg⁻¹ de areia fina. As análises foram realizadas conforme Raij et al. (2001).

Foi realizada a correção da terra com a aplicação de calcário holical (36% CaO e 15% MgO com PRNT de 90%), visando 70% de saturação de bases (RAIJ et al., 1996); após a aplicação do calcário, a terra foi incubada e mantida em repouso por 2 meses. Foi realizada adubação nos vasos segundo a extração da cultura do milho (FANCELLI; DOURADO NETO, 2004) com a omissão do Zn, o qual foi disponibilizado apenas via tratamento de sementes.

Foram semeadas duas sementes por vaso, mantendo-se a distância de 15 cm entre sementes (Figura 2). A unidade experimental foi composta por três plantas com três repetições, com a retirada de 9 plantas a cada estágio de coleta.

Figura 2. Semeadura em casa de vegetação, com duas sementes por vaso.

Foi realizada adubação de cobertura de nitrogênio e de potássio, sob a forma de NH_4NO_3 e KCl nos estádios fenológicos de V4 e V6, após cada coleta de material. Foram realizadas aplicações complementares de manganês em V8, de potássio em V10 e de magnésio, cobre e potássio em VT com um terço da dose utilizada na adubação de base em solução, pois houve o aparecimento de sintomas de deficiência em pelo menos 3 plantas em diferentes vasos. A quantidade de água dos vasos foi mantida em 70% da capacidade de retenção do solo, controlada de acordo com o peso diário dos vasos; a temperatura e a umidade relativa do ar na casa de vegetação foram monitoradas com determinações a cada hora, os dados médios diários estão apresentados na Figura 3.

Figura 3. Temperaturas média, máxima e mínima e umidade relativa do ar média (UR média) na casa de vegetação durante o período de cultivo das plantas de milho.

Devido à pouca luminosidade na casa de vegetação no início do ciclo reprodutivo, as plantas atrasaram a emissão do pendão e da espiga e, por isso, houve a necessidade de promover a polinização manual com pólen proveniente de outras plantas, pois os grãos de pólen foram liberados antes que os estilos-estigmas das plantas tornassem receptivos; assim, não havia grãos de pólen suficientes para promover a polinização.

4.2.4.2 Coleta das amostras

Foram realizadas coletas de plantas e de raízes em V2, V4, V6, V8, V10, VT e R2/R3 aos 11, 16, 28, 36, 42, 125 e 152 dias após a semeadura; os estádios fenológicos foram determinados conforme Fancelli e Dourado Neto (2004) (Figura 4A). A parte aérea foi cortada cerca de 0,5 cm acima da superfície do solo (Figura 4B). Em V2 e V4, as plantas foram separadas em raízes e parte aérea e nos demais estádios vegetativos as plantas foram separadas conforme detalhado na Tabela 1.

Figura 4. Critério de identificação dos estádios de coleta. Planta em V2, com folha primária e primeira folha totalmente expandida, conforme Fancelli e Dourado Neto (2004) (A). Ponto de corte da planta para separação da parte aérea e raiz (B).

Tabela 1. Identificação das amostras da parte aérea coletadas nos estádios vegetativos.

Estádio	Amostras - Identificação		Descrição
V2	Planta inteira - Pi		Folha primária e 1ª folha totalmente expandida.
V4	Planta inteira - Pi		Folha primária e 1ª, 2ª e 3ª folhas totalmente expandidas.
V6	Terço inferior	Folhas – F1	Folha primária e 1ª, 2ª e 3ª folhas totalmente expandidas.
		Colmo – C1	Nível do solo até o ponto de inserção da 3ª folha.
	Terço médio	Folhas – F2	4ª e 5ª folhas totalmente expandidas
		Colmo – C2	Do ponto de inserção da 3ª folha até o ponto de inserção da 5ª folha.
	Terço superior	Folhas – F3	6ª folha totalmente expandida e demais.
V8	Terço inferior	Folhas – F1	Folha primária e 1ª, 2ª e 3ª folhas totalmente expandidas.
		Colmo – C1	Nível do solo até o ponto de inserção da 3ª folha.
	Terço médio	Folhas – F2	4ª e 5ª folhas totalmente expandidas.
		Colmo – C2	Do ponto de inserção da 3ª folha até o ponto de inserção da 5ª folha.
	Terço superior	Folhas – F3	6ª, 7ª e 8ª folhas totalmente expandidas.
		Colmo – C3	Do ponto de inserção da 5ª folha até o ponto de inserção da 8ª folha.
V10	Terço inferior	Folhas da ponta – F4	Demais folhas não expandidas.
	Terço médio	Folhas – F1	Folha primária e 1ª, 2ª, 3ª e 4ª folhas totalmente expandidas.
		Colmo – C1	Nível do solo até o ponto de inserção da 4ª folha.
	Terço superior	Folhas – F2	5ª, 6ª e 7ª folhas totalmente expandidas.
		Colmo – C2	Do ponto de inserção da 4ª folha até o ponto de inserção da 7ª folha.
V10	Terço inferior	Folhas – F3	8ª, 9ª e 10ª folhas totalmente expandidas.
		Colmo – C3	Do ponto de inserção da 7ª folha até o ponto de inserção da 10ª folha.
	Terço médio	Folhas da ponta – F4	Demais folhas não expandidas.
	Terço superior	Folhas – F1	Folha primária e 1ª, 2ª, 3ª e 4ª folhas totalmente expandidas.
		Colmo – C1	Nível do solo até o ponto de inserção da 4ª folha.
V10	Terço inferior	Folhas – F2	5ª, 6ª e 7ª folhas totalmente expandidas.
		Colmo – C2	Do ponto de inserção da 4ª folha até o ponto de inserção da 7ª folha.
	Terço superior	Folhas – F3	8ª, 9ª e 10ª folhas totalmente expandidas.
		Colmo – C3	Do ponto de inserção da 7ª folha até o ponto de inserção da 10ª folha.
	Terço médio	Folhas da ponta – F4	Demais folhas não expandidas.

Nos estádios VT e R2/R3, as plantas foram segmentadas de acordo com o tamanho, em folhas e colmos dos terços inferior, médio e superior em partes com comprimento semelhante, pois, nesses estádios, as plantas já haviam perdido algumas folhas do terço inferior, as quais foram reservadas para análise. Além disso, as plantas tiveram a separação do pendão, espiga sem os grãos (sabugos) e grãos. As avaliações foram realizadas separadamente para cada uma das referidas partes. Nas figuras 5, 6, 7, 8 e 9, estão algumas imagens do experimento. Os grãos colhidos estavam com cerca de 25% de teor de água e foram secos em estufa a 30°C até

atingirem 13%. Em cada estágio de coleta de plantas, também foram coletadas amostras de terra na rizosfera, conforme exemplificado na Figura 10.

Figura 5. Emergência de plântulas (A). Plantas no estágio V2, estágio no qual se realizou a primeira coleta (B).

Figura 6. Plantas em V4 (A) e V6 (B), segunda e terceira coleta de material vegetal, respectivamente.

Figura 7. Plantas em V8 / V10, quarta e quinta coleta (A) e iniciando o ciclo reprodutivo (B).

Figura 8. Estruturas reprodutivas das plantas: pendão (A) e espiga (B).

Figura 9. Espigas colhidas.

Figura 10. Representação do ponto de coleta da terra, de acordo com a área delimitada no quadrado amarelo.

As amostras de material vegetal foram lavadas 5 vezes em água deionizada, colocadas em estufa com circulação de ar até atingirem massa constante com o monitoramento diário da massa; em seguida, foi determinada a massa e as amostras com maior volume foram moídas em moinho de copo MA 630/1 (Marconi®, Piracicaba, SP); por outro lado, as amostras com menor volume no moinho analítico modelo IKA A11 basic (Quimis®, Diadema, SP) e as amostras de grãos foram moídas criogenicamente (Spex 6800 Freezer Mill, EUA) durante 30 min (15 ciclos de 2 min de moagem).

4.2.5 Digestão das amostras

As amostras das plântulas e das partes da planta coletadas em cada estágio, previamente moídas, foram digeridas de acordo com o seguinte procedimento: 250 mg foram pesados, colocados em recipientes de digestão TFM® e foram adicionados 2 mL de 30% v.v⁻¹ de H₂O₂ e 6 mL de 10% v.v⁻¹ de HNO₃.

Para a digestão das amostras foi utilizado um sistema de digestão micro-ondas com uma única câmara de reação (Ultrawave, Milestone, Sorisole, Itália) nas seguintes condições operacionais: i) pressurização com nitrogênio em 40 bar; ii) elevação da temperatura até 240 °C durante 20 min; iii) a temperatura de 240 °C foi mantida por 20 min; iv) resfriamento durante 15 minutos. Os digeridos foram transferidos para frascos volumétricos e diluídos com água deionizada (resistividade de 18.2 MΩ cm) até 20 mL.

Nas digestões foi utilizado ácido nítrico (Merck®, Darmstadt, Alemanha) sub-destilado e para reduzir possíveis problemas relacionados à contaminação, todos os materiais foram lavados com água e mantidos em banho com ácido nítrico (10% v.v⁻¹) por no mínimo 24 horas antes do uso. As soluções foram preparadas em capela de fluxo laminar.

A extração do Zn no solo foi realizada utilizando o método DTPA em pH 7,3 (RAIJ et al., 2001).

4.2.6 Análises por espectrometria de massas com fonte de plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) e por espectrometria de emissão óptica com fonte de plasma indutivamente acoplado (ICP-OES)

A determinação dos isótopos de Zn (64, 66, 67, 68 e 70) foi realizada por espectrometria de massas com fonte de plasma indutivamente acoplado – ICP-MS (Elan, DRC-e, PerkinElmer, Norwalk, CT, EUA) em sala limpa / classe 10000. Para análise, foi preparada

curva analítica para a quantificação de Zn nas amostras com o uso do material enriquecido (^{68}ZnO).

As soluções foram introduzidas no ICP-MS utilizando nebulizador *Meinhard* e câmara ciclônica. Para tanto, os seguintes parâmetros instrumentais foram utilizados: vazão do gás do nebulizador ($0,9 \text{ L min}^{-1}$), vazão do gás auxiliar ($1,2 \text{ L min}^{-1}$) e potência de radiofrequência (1200 W). O tempo de residência foi de 10 ms; o número de replicadas foi 5 para cada determinação. Cada razão entre massa e carga foi medida 100 vezes. O tempo de integração foi de 10000 ms e o tempo morto do detector foi de 60 ns. A produção de espécies M^+ foi avaliada pela introdução de uma solução contendo magnésio, índio e urânio, bem como a produção de cargas duplas e óxidos, monitorando as razões massa/carga (m/z) de bário e cério.

Todas as amostras também foram analisadas por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) para a determinação dos demais elementos (iCAP 6500 Duo, Thermo, Waltham, USA) conforme as condições operacionais descritas por Peruchi et al. (2014). Para a verificação da exatidão do método, foram utilizados materiais de referência certificados (CRMs) do NIST (Gaithersburg, MD, EUA) que passaram pelo mesmo procedimento de digestão das amostras. Os resultados dos CRMs encontram-se no APÊNDICE A.

As calibrações foram realizadas com as seguintes CRMs da Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (NIST) (Gaithersburg, MD, EUA): colmos de milho (CRM 8412), cereais de café da manhã fortificado (CRM 3233), folhas de macieira (CRM 1515), folhas de pessegueiro (CRM 1547) e folhas de tomateiro (CRM 1573).

Toda a parte de tratamento das sementes, digestão e a análise do material em ICP-OES foram realizadas no Laboratório de Química Analítica pertencente ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo (USP / CENA). A análise do material em ICP-MS foi realizada no “Laboratório do Grupo de Espectrometria e Preparo de Amostras”, laboratório esse pertencente ao Departamento de Química Analítica da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp).

4.2.7 Determinação do Zn proveniente do tratamento de sementes (ZnPTS)

A concentração total do Zn em cada amostra de parte da planta (Zn_{total} ; mg.Kg^{-1} de massa seca) e a razão final dos isótopos $^{68}\text{Zn}/^{67}\text{Zn}$ (R_{fin}) em cada amostra também de parte da planta, obtidas pela análise no ICP-MS, foram utilizadas para o cálculo do Zn proveniente do

tratamento de sementes nas amostras (ZnPTS), de acordo com a Eq. 1 proposta por Wu et al. (2010) e aplicada por Lu et al. (2013):

$$R_{fin} = \frac{(ZnPTS \times f_{68enr}) + f_{68nat}(Zntotal - ZnPTS)}{(ZnPTS \times f_{67enr}) + f_{67nat}(Zntotal - ZnPTS)} \quad \text{Eq. 1}$$

A qual é resolvida pela Eq. 2:

$$ZnPTS = \frac{Zntotal [f_{68nat} - (R_{fin} \times f_{67nat})]}{R_{fin}(f_{67enr} - f_{67nat}) + f_{68nat} - f_{68enr}} \quad \text{Eq. 2}$$

Os valores de f_{68nat} e f_{67nat} representam a abundância natural do ^{68}Zn e do ^{67}Zn (18,45% e 4,04%, respectivamente); f_{68enr} e f_{67enr} representam a abundância do ^{68}Zn e do ^{67}Zn no material enriquecido ZnO adquirido da empresa Isoflex[®] (99,16% e 0,62%, respectivamente).

Foi calculada a eficiência do uso do Zn aplicado no tratamento de sementes em cada estágio fenológico da planta (FUE) e a partição do Zn proveniente do tratamento de sementes nas partes das plantas (PZnPTS), de acordo com as equações a seguir, adaptadas de McBeath et al. (2013) e Hippler et al. (2015).

O ZnPTS refere-se ao acúmulo de Zn proveniente do tratamento de sementes na parte da planta ($\mu\text{g.planta}^{-1}$), ZnTS consiste na quantidade total de ^{68}Zn que foi fornecido pelo tratamento de sementes ($8 \text{ mg Zn.semente}^{-1}$), PZnPTS é a partição de ZnPTS nas partes das plantas.

$$FUE = (ZnPTS \div ZnTS) \times 100$$

$$PZnPTS = \left(ZnPTS \div \sum ZnPTS \text{ nas partes da planta em cada estágio} \right) \times 100$$

Os resultados do Zn total e do Zn proveniente do tratamento de sementes (ZnPTS) em cada amostra foram relatados como a média de triplicatas. Para avaliar a relação do Zntotal e do ZnPTS com os demais nutrientes, foi utilizada a estatística multivariada com as análises de agrupamento e de componentes principais. Para aplicar essas análises, as médias dos resultados de macro e micronutrientes nas amostras foram calculadas.

A análise de componentes principais foi calculada com os dados transformados em média zero e variância um para os resultados de concentrações dos nutrientes nas amostras. A

partir da matriz de correlação, foram calculados os autovalores (valores representativos da variabilidade retida para cada nova componente) e autovetores (valores representativos da localização dos pontos no gráfico); além disso, foram gerados os gráficos bidimensionais (“*biplot*”). O número ideal de componentes que explica os resultados foi considerado adequado quando a soma da representatividade dos autovalores superou 80% da variabilidade dos dados (JOLLIFFE, 2002).

Para análise de agrupamento foi considerada a distância Euclidiana dos resultados das amostras. A partir dos resultados, foi criado um dendograma, no qual, pelas ligações médias, determinou-se o quão próximo os demais elementos estavam da análise do Zn total e ZnPTS.

4.3 Resultados e discussão

4.3.1 Concentrações de Zn proveniente do tratamento de sementes (ZnPTS) nas plantas

Inicialmente, foram calculadas as concentrações de Zn proveniente do tratamento de sementes (ZnPTS) em mg Zn.Kg^{-1} de massa seca em cada parte das plântulas germinadas por 120 horas e das plantas de milho por estágio fenológico de coleta. A concentração de Zn total (Zntotal) menos o ZnPTS foi denominada de Zn proveniente de outras fontes (Figura 11). Para auxiliar na interpretação dos dados, as concentrações de ZnPTS foram transformadas em percentuais conforme exposto na Figura 12 para as plântulas e na Figura 13 para as plantas. Na primeira avaliação das concentrações de ZnPTS, observa-se que houve contribuição do tratamento de sementes na nutrição das plantas em todos os estádios e partes da planta.

Figura 11. Concentrações de Zn proveniente de outras fontes e do tratamento de sementes (ZnPTS) em cada parte e estágio fenológico das plantas. ¹ Pi: planta inteira; R: raiz; F1: folhas do terço inferior da planta; F2: folhas do terço médio da planta; F3: folhas do terço superior da planta; F4: folhas novas não expandidas; C1: colmo do terço inferior da planta; C2: colmo do terço médio da planta; C3: colmo do terço superior da planta; Fc: folhas caídas ao final do ciclo; Pd: pendão; Ep: espiga sem os grãos e Gr: grãos. Média e desvio padrão de 3 repetições.

Figura 12. Percentual de concentrações de Zn proveniente do tratamento de sementes (ZnPTS) na massa seca da parte aérea e raízes de plântulas de milho após a germinação por 120 horas.

Figura 13. Percentual de concentrações de Zn proveniente do tratamento de sementes (ZnPTS) na massa seca de cada parte da planta de milho e estágio fenológico. ¹ P_i : planta inteira; R: raiz; F1: folhas do terço inferior da planta; F2: folhas do terço médio da planta; F3: folhas do terço superior da planta; F4: folhas novas não expandidas; C1: colmo do terço inferior da planta; C2: colmo do terço médio da planta; C3: colmo do terço superior da planta; Fc: folhas caídas ao final do ciclo; Pd: pendão; Ep: espiga sem os grãos e Gr: grãos. Média e desvio padrão de 3 repetições.

Plântulas de milho apresentaram elevadas concentrações de ZnPTS, com valores de 84% e 92% do Zn total na parte aérea e raízes, respectivamente, oriundas do tratamento de sementes (Figuras 11 e 12). Sabe-se que as reservas das sementes presentes no endosperma e especialmente no embrião possuem um importante papel na nutrição dos tecidos que formarão as plântulas, até que essa apresente condições de se manter de forma autotrófica (COCUCCI; MARIATH, 2004). Com esse resultado, observa-se a grande utilização do Zn fornecido na nutrição de estruturas recém desenvolvidas da planta em formação.

Plantas com 2 folhas também apresentaram elevadas concentrações de ZnPTS, com a parte aérea e as raízes apresentando percentuais de concentração próximas às encontradas nas plântulas, iguais a 83% e 93%, respectivamente; esse resultado demonstra que o Zn disponibilizado via tratamento de sementes é essencial para a nutrição das plantas no início do seu crescimento e representa a maior fonte desse elemento para as plantas. O mesmo comportamento ocorreu para as plantas com 4 folhas expandidas, em que o ZnPTS corresponde a 75% e 80% do Zn total na parte aérea e nas raízes das plantas, respectivamente (Figura 13).

As plântulas e plantas nos estádios V2 e V4 utilizam como fornecimento de Zn o teor existente na própria composição natural das sementes; esse aspecto foi relatado por Muraoka (1981) que afirmou que o Zn existente nas sementes é transportado da semente para a planta, durante e após a germinação, chegando aos 30 dias após a emergência a valores próximos a 56, 64 e 69% do Zn total existente em plantas de soja, feijão e trigo, respectivamente, fato que representa a maior fonte de Zn para a nutrição das plantas. Quando o Zn é disponibilizado via tratamento, a reserva da semente deixa de ser a fonte prioritária em Zn para as plantas; como se observa nos resultados das Figuras 12 e 13, provavelmente o Zn atribuído ao teor natural das sementes está intrínseco ao valor designado como Zn proveniente de outras fontes (Figura 11).

Este aspecto é fundamental, porque sabe-se que a composição das sementes em nutrientes depende, em grande parte, da nutrição da planta-mãe durante o ciclo de cultivo e do transporte dos nutrientes para o desenvolvimento das sementes (KRANNER; COLVILLE, 2011), o que pode não ser adequado para atender a demanda da planta e aumentar o valor nutricional das sementes produzidas. Além disso, especificamente para sementes de milho, o acúmulo de reservas também está relacionado com a localização das sementes na espiga, pois sementes maiores, ou seja, aquelas localizadas na base e no meio da espiga, recebem maior acúmulo de nutrientes (SHIEH; McDONALD, 1982).

Nesse contexto, o Zn disponibilizado na fase inicial do crescimento das plantas, aplicado via semente, tem importante papel para suprir deficiências iniciais em Zn das plântulas, com a função de estimular o desenvolvimento radicular e, após o seu transporte via

xilema para as demais partes da planta, participa do seu metabolismo. Marengo e Lopes (2005) ressaltaram a importância do Zn disponibilizado via tratamento de sementes, isto porque, por meio dessa forma de fornecimento de Zn, a sua absorção pelas raízes pode ser mais rápida do que a absorção e o transporte desse elemento quando ele é aplicado em folhas.

Ainda com relação ao percentual de concentração de ZnPTS nas plantas em V2, observa-se que as raízes apresentaram maiores valores do que a parte aérea, embora em V4 esta diferença tenha sido reduzida (Figura 13). A maior concentração de ZnPTS em raízes ocorre porque, na interface raiz-solo, tem-se a liberação de íons H^+ por células das raízes, bem como a liberação de compostos capazes de formar quelatos com o Zn, aumentando a sua disponibilidade e consequentemente a sua absorção pelas raízes das plantas (WELCH, 1995; WU et al., 2011); dessa forma, o Zn acumula nas raízes para ser transportado para a parte aérea.

Segundo Broadley et al. (2007), o Zn é adquirido a partir da solução do solo como Zn^{2+} , mas também pode estar potencialmente complexado com ligantes orgânicos e após a absorção desse elemento pelas raízes, ele é fornecido à parte aérea via xilema. Outro aspecto que está relacionado com a absorção do Zn pelas raízes, diz respeito à liberação de ligantes denominados de fitosideróforos pelas raízes (CAKMAK et al., 1998; RENGEL et al., 1998); esses compostos possuem alta capacidade de complexar com Zn e aumentar a sua mobilidade na rizosfera (TREEBY et al., 1989) e no apoplasto de raízes (ZHANG et al., 1991), eles também estão envolvidos na absorção de Zn e no seu transporte para a parte aérea (VONWIREN et al., 1996). Portanto, o Zn aplicado na forma de ZnO necessita ser dissociado para que ocorra a sua absorção pelas raízes; provavelmente a disponibilização do Zn aplicado como óxido está relacionada com a liberação de ácidos orgânicos pelas raízes, pois essa fonte possui baixa solubilidade em água e o meio ácido propiciaria a disponibilização do Zn.

À medida que o Zn disponibilizado via tratamento é absorvido pelas raízes, ele é rapidamente transportado via xilema para a parte aérea (YONEYAMA et al., 2015). O transporte do ZnPTS para a parte aérea é evidente já nas plântulas e nas plantas nos estádios V2 e V4; a partir do estágio V6, quando as plantas foram segmentadas em partes (terços inferior, médio e superior) e em órgãos (folhas e colmos), é possível verificar com maior detalhe como o transporte do Zn fornecido via tratamento de sementes ocorre na planta. De modo geral, em plantas com 6 e 8 folhas totalmente expandidas, ainda é notável a grande contribuição do tratamento (Figura 11); a informação que é possível concluir a partir da observação das concentrações percentuais de ZnPTS em cada parte da planta é que as folhas possuem maior participação do ZnPTS, das quais as folhas do terço inferior da planta (F1) apresentam maior

teor de Zn_{total} e, conseqüentemente, de $ZnPTS$, os quais corresponderam a $73 \pm 7\%$ e $65 \pm 4\%$ nos estádios V6 e V8, respectivamente. Ressalta-se, na avaliação com a planta estratificada, que o Zn disponibilizado via revestimento das sementes e absorvido pelas raízes é transportado para as folhas e o colmo com grande função na nutrição destes órgãos, representando, de forma geral, contribuição em 50% ou mais do Zn_{total} em cada parte da planta (Figura 13).

Em V6, as raízes ainda apresentam grande parte da sua constituição do $ZnPTS$; entretanto, com o desenvolvimento da planta, o percentual de $ZnPTS$ nas raízes é reduzido continuamente, chegando a $5 \pm 2\%$ no estágio R2 / R3 (Figura 13), embora as concentrações de Zn_{total} (Zn proveniente de outras fontes + $ZnPTS$) nas raízes tenham aumentado (Figura 11). A redução do $ZnPTS$ nas raízes provavelmente ocorre, em decorrência do Zn disponibilizado pelo tratamento de sementes encontrar-se em uma forma indisponível para as plantas por reações de complexação e adsorção no solo (BROADLEY et al., 2007), e, apesar de existir no solo uma grande parte do que foi aplicado via tratamento e não foi absorvido, a planta parece recorrer ao Zn existente na composição natural do solo, mesmo que o teor de Zn disponível no solo seja muito baixo ($0,2 \text{ mg Zn.dm}^{-3}$) – esse aspecto é evidente, pois o Zn proveniente de outras fontes nas raízes aumenta (Figura 11).

Xue et al. (2015) também encontraram redução da absorção do Zn aplicado no solo após a antese, utilizando a marcação com o ^{68}Zn ; entretanto, Hegelund et al. (2012) verificaram que, mesmo durante os estádios reprodutivos, as raízes absorvem Zn do solo, tendo como principais destinos caules e espigas; ainda segundo os autores, as folhas recebem uma proporção muito pequena ($<5\%$) da absorção do Zn do solo durante os estádios reprodutivos da planta.

Contudo, mesmo com a redução da contribuição do $ZnPTS$ na composição das raízes em V8 e V10, observa-se grande participação do $ZnPTS$ na nutrição das folhas que estão em formação (não expandidas, denominada por “F4”), representando cerca de $47 \pm 12\%$ e $50 \pm 2\%$ do Zn nos estádios V8 e V10, respectivamente (Figura 13). Este aspecto é muito importante, pois evidencia a participação do $ZnPTS$ na nutrição de estruturas em formação da planta.

Avaliando a composição da planta quando ela inicia a fase reprodutiva, sabe-se que órgãos reprodutivos atuam como drenos para o Zn; nessas circunstâncias, no estágio VT, quando a planta emite o pendão, essa estrutura atua como um dreno do Zn existente nos demais órgãos vegetativos da planta (folhas e colmos), concentrando alto teor de Zn total (Figura 11), fato que provavelmente ocorre em decorrência de o Zn, acumulado em colmos e folhas, ser redistribuído para o pendão, pois o percentual de $ZnPTS$ das folhas é consideravelmente reduzido para cerca de 6% e nos colmos este valor também reduz, não de forma tão acentuada, para cerca de 34%; por outro lado o percentual de $ZnPTS$ no pendão é de $30\% \pm 2$ (Figura 13).

Com relação ao estágio R2 / R3, as espigas representam um forte dreno para o Zn, assim como o pendão, dessa forma o percentual de ZnPTS na constituição de espigas e grãos é relativamente alto, representando cerca de 31 e 33%, respectivamente. Além das folhas e colmos fornecerem, via redistribuição, os teores de ZnPTS aos órgãos reprodutivos (pendão e espiga), as folhas em senescência também podem ter fornecido o ZnPTS acumulado; observa-se que as folhas caídas ao final do ciclo da planta, designadas como “Fc”, apresentam um pequeno percentual de ZnPTS, cerca de 6 e 8% pela análise nos estádios VT e R2 / R3, respectivamente; o que demonstra que uma pequena parte do ZnPTS permanece nas folhas mesmo após a senescência (Figura 13).

Quando se avalia a planta estratificada, é notável a contribuição do tratamento de sementes na nutrição de cada estrutura, demonstrando o grande potencial que essa técnica representa no fornecimento de Zn para as plantas; quando é considerada a planta toda, verifica-se que, para plântulas e plantas nos estádios fenológicos de V2, V4 e V6, a maior parte do Zn na planta é proveniente do tratamento de sementes, com contribuição de aproximadamente 89%, 90%, 76,7% e 57,5% do Zntotal, respectivamente. A partir do estágio V8, o tratamento de sementes deixa de ser a maior fonte de Zn para as plantas, todavia ainda possui grande participação na sua nutrição, com cerca de 44% do Zn total na planta, valor semelhante foi encontrado no estágio V10. Quando a planta inicia o ciclo reprodutivo, a participação do ZnPTS reduz consideravelmente para cerca de 14% e 6% em VT e R2 / R3, respectivamente (Figura 14); entretanto, apesar dessa redução, o Zn disponibilizado via tratamento de sementes tem grande contribuição no teor de Zn nos grãos.

Figura 14. Acúmulo de Zn total ($\Sigma Zntotal$) e de Zn proveniente do tratamento de sementes ($\Sigma ZnPTS$) e percentual do Zn proveniente do tratamento de sementes (% ZnPTS) na planta toda de milho em cada estágio fenológico.

A alta contribuição do tratamento de sementes na nutrição das plantas pode ser explicada pelo fato das plantas cultivadas em solo com baixa disponibilidade de Zn responderem mais eficientemente a uma fonte externa de Zn do que aquelas em cultivo sob quantidades adequadas, isto porque a deficiência de Zn no solo afeta parâmetros cinéticos de absorção do Zn, levando a um maior V_{max} (HACISALIHOGU et al., 2001; RENGEL; WHEAL 1997; HEGELUND et al., 2012). Plantas com baixo teor de Zn absorvem 3 vezes mais Zn do que plantas com médio e alto teor de Zn, quando as raízes são expostas a uma fonte de Zn (HEGELUND et al., 2012).

4.3.2 Partição do Zn proveniente do tratamento de sementes (PZnPTS) nas plantas

A avaliação da partição do nutriente disponibilizado por meio do tratamento (PZnPTS) é uma maneira de determinar a sua contribuição em cada parte da planta em relação ao Zn total proveniente do tratamento, considerando a massa seca de cada parte (HIPPLER et al., 2015). A análise da partição do Zn confirmou o resultado observado, quando se avaliou a concentração do ZnPTS em cada parte; as raízes, em todos os estádios de desenvolvimento da planta, têm um papel importante no acúmulo do nutriente disponibilizado via tratamento (Figura 15); esse é um aspecto positivo, pois a capacidade de as plantas de cereais crescerem e produzirem rendimentos satisfatórios sobre condições com disponibilidade de Zn limitante depende da aquisição (absorção) de Zn pelas raízes, da redistribuição de Zn a partir de órgãos vegetativos para o desenvolvimento dos grãos e da quantidade de massa seca de grãos produzidas por unidade de Zn importado (HEGELUND et al., 2012).

Partes da planta ¹	Plântula	V2	V4	V6	V8	V10	VT	R2/R3
■ Pi	32,7	22,3	57,8	--	--	--	--	--
■ R	67,3	77,7	42,2	36,6	25,2	20,2	33,4	30,1
■ F1	--	--	--	14,7	9,5	4,7	0,8	2,9
■ F2	--	--	--	10,6	5,3	7,2	4,0	2,1
■ F3	--	--	--	25,8	9,9	13,3	8,2	8,0
■ F4	--	--	--	--	25,6	21,9	--	--
■ C1	--	--	--	7,9	8,5	5,9	17,0	1,5
■ C2	--	--	--	4,4	11,0	14,2	10,6	4,0
■ C3	--	--	--	--	5,0	12,6	13,9	3,8
■ Gr	--	--	--	--	--	--	--	10,7
■ Ep	--	--	--	--	--	--	--	29,7
■ Fc	--	--	--	--	--	--	3,4	0,4
■ Pd	--	--	--	--	--	--	8,8	7,0

Figura 15. Partição do ZnPTS (PZnPTS) em cada estágio fenológico e partes da planta de milho. ¹ Pi: planta inteira; R: raiz; F1: folhas do terço inferior da planta; F2: folhas do terço médio da planta; F3: folhas do terço superior da planta; F4: folhas novas não expandidas; C1: colmo do terço inferior da planta; C2: colmo do terço médio da planta; C3: colmo do terço superior da planta; Fc: folhas caídas ao final do ciclo; Pd: pendão; Ep: espiga sem os grãos; Gr: grãos. Média e desvio padrão de 3 repetições.

No estágio V2, as raízes possuem maior acúmulo de ZnPTS, porém, em V4, a parte aérea apresenta maior percentual, devido à maior massa seca; o mesmo comportamento ocorre nos estágios V6, V8 e V10 para as folhas mais novas (“F3”) e folhas em desenvolvimento (“F4”), nas quais se observa o maior acúmulo de ZnPTS, influenciado pela maior massa seca dessas partes (Figuras 15 e 16).

Figura 16. Massa seca de cada parte e estágio fenológico das plantas de milho. ¹ Pi: planta inteira; R: raiz; F1: folhas do terço inferior da planta; F2: folhas do terço médio da planta; F3: folhas do terço superior da planta; F4: folhas novas não expandidas; C1: colmo do terço inferior da planta; C2: colmo do terço médio da planta; C3: colmo do terço superior da planta; Fc: folhas caídas ao final do ciclo; Pd: pendão; Ep: espiga sem os grãos; Gr: grãos. Média e desvio padrão de 3 repetições.

Quando a planta inicia o ciclo reprodutivo, grande parte do ZnPTS das folhas é fornecido ao pendão, assim como observado quando se avaliaram as concentrações do ZnPTS (Figura 13). Pela avaliação da partição do ZnPTS, fica evidente que o ZnPTS acumulado nas folhas no estágio VT é menor em comparação com os estádios anteriores. Esse resultado provavelmente está relacionado ao fato do solo ter pouco Zn disponível ($0,2 \text{ mg Zn.dm}^{-3}$), propiciando que o Zn acumulado nas folhas seja redistribuído para o fornecimento desse nutriente ao pendão. O ZnPTS no colmo também reduziu, mas manteve-se mais alto do que os teores das folhas (Figura 15).

Para propiciar a melhor compreensão da redistribuição do ZnPTS na planta, foi avaliada a partição do ZnPTS por estrutura da planta (órgãos). Observa-se que, do estágio V6 ao V10, as folhas configuram-se como um importante local de acúmulo do ZnPTS, concentrando 51,1%, 50,3% e 47,1% de todo o Zn disponibilizado pelo tratamento de sementes e absorvido pelas plantas; contudo, no estágio VT, o colmo concentra a maior parte, cerca de

41% do Zn e no estágio R2 / R3, a espiga, por atuar como um forte dreno, acumula cerca de 40,3% do Zn proveniente do tratamento de sementes (Figura 17A).

Os resultados não permitem a diferenciação clara entre o ZnPTS que chega aos grãos devido à redistribuição, que consiste na remobilização do Zn de outros órgãos e é fornecido aos grãos via floema ou pela absorção direta das raízes. Todavia, pelo fato das raízes terem reduzido o ZnPTS nos estádios VT e R2 / R3, infere-se que a absorção do ZnPTS diminuiu e também, devido ao ZnPTS das folhas e colmos terem reduzido nesses estádios (Figura 11 e 13), acredita-se que o ZnPTS encontrado no pendão e nas espigas é proveniente, principalmente, da redistribuição do ZnPTS acumulado nessas estruturas.

A redistribuição do ZnPTS acumulado em folhas e colmos para o pendão e para as espigas é notória quando se avalia a partição do ZnPTS em cada estrutura da planta (raízes, folhas, colmos, pendão e espiga). Até o estágio V10, as folhas apresentavam cerca da metade de todo ZnPTS absorvido pelas raízes; quando ocorre a emissão do pendão, em VT, cerca de 16% do ZnPTS está acumulado nas folhas; em contrapartida, colmos apresentam grande acúmulo de ZnPTS, cerca de 41%, e o pendão cerca de 8,8%. Em R2 / R3, as espigas (espiga e grãos) acumulam a maior parte do ZnPTS, com valor de cerca de 40,3%, indicando alta remobilização do ZnPTS existente em folhas e colmos, os quais reduzem para aproximadamente 13% e 9%, respectivamente (Figura 17A).

Uma das razões para o transporte e a redistribuição do Zn para os grãos serem estimulados após a fase de floração pode estar relacionada ao aumento significativo da síntese de proteínas durante a fase inicial de formação dos grãos (MARTRE et al. 2003; OZTURK et al. 2006). Como discutido por Cakmak et al. (2010b), o aumento da concentração de proteína no grão cria um dreno para o Zn, gerando uma correlação positiva entre as concentrações de proteína e desse elemento nos grãos.

Figura 17. Partição do ZnPTS (PZnPTS) em cada estágio fenológico considerando raízes, folhas, colmos, pendão e espiga (A) e as estruturas novas e velhas da planta (B). ¹Partes novas: folhas e colmos do terço superior; partes velhas: folhas e colmos dos terços inferior e médio.

Não existe um consenso na literatura sobre qual a fonte que mais contribui para a composição em Zn nos grãos; alguns autores indicaram que a absorção de Zn pelas raízes após o florescimento possui a mesma importância que a remobilização do Zn de outros tecidos para os grãos (JIANG et al., 2007; 2008ab; PALMGREN et al., 2008; IMPA et al., 2013; MABESA et al., 2013); entretanto, em alguns trabalhos em que foi utilizada a marcação isotópica, observou-se que a redistribuição do Zn armazenado em caules e folhas é essencial para o fornecimento desse elemento aos grãos (JIANG et al., 2008a; WU et al., 2010; HEGELUND et al., 2012). Contudo, pelo fato do desenvolvimento dos grãos atuar como um dreno, alguns autores afirmaram que os grãos podem ser alimentados diretamente pela absorção radicular e pela remobilização de outras partes vegetativas da planta (PEARSON et al. 1996; JIANG et al. 2007; WU et al. 2010; XUE et al., 2015), pois o Zn é móvel tanto no xilema quanto no floema (WOLSWINKEL, 1999; RENGEL, 2001; STOMPH et al., 2014).

A redistribuição do Zn acumulado nos órgãos vegetativos pode configurar-se como a forma mais importante de fornecimento desse elemento aos grãos, isto porque a atividade da raiz ou a disponibilidade do Zn no solo podem diminuir durante a fase reprodutiva da planta (HEGELUND et al., 2012; STOMPH et al., 2014). Nesse sentido, ressalta-se a grande importância da nutrição adequada das plantas nos estádios iniciais de desenvolvimento e, pelos resultados, observa-se que o ZnPTS contribui com o valor nutricional em Zn dos grãos de forma significativa; cerca de 31 e 33% da concentração de Zntotal nas espigas e grãos, respectivamente, é proveniente do tratamento de sementes; provavelmente, tal teor provém do que foi acumulado em folhas e colmos durante os estádios vegetativos (Figura 13).

Esses resultados, além de demonstrarem com clareza a grande participação do ZnPTS no valor nutricional dos grãos, também indicam que as condições de crescimento da planta têm um papel importante na contribuição do Zn nos grãos. Conforme relatado em alguns trabalhos, em condições com fornecimento adequado de Zn durante toda a fase de crescimento da planta, ocorre uma contínua absorção pelas raízes e o transporte de Zn para os grãos, sendo esse o caminho dominante para o acúmulo desse elemento nesse órgão. Entretanto, no caso de fornecimento limitado de Zn, como, por exemplo, em condição de seca ou em baixa disponibilidade de Zn nos solos, como apresentado neste estudo, a remobilização de Zn a partir dos tecidos vegetativos para os grãos seria a forma dominante para o acúmulo de Zn nos grãos (WATERS; GRUSAK 2008; CAKMAK et al. 2010a; IMPA et al., 2013).

Stomph et al. (2014) afirmaram que apenas uma parte do que é acumulado nos tecidos é remobilizada para os grãos, a outra parte permanece acumulada em tecidos vegetativos e

estruturais, como os colmos, pois é incorporada a estruturas ou moléculas de proteínas, ficando indisponível para a mobilização. Dessa forma, tecidos fontes, como folhas e colmos, teriam que acumular minerais em quantidade superior a este montante mínimo para permitir a mobilização para tecidos em desenvolvimento, tais como os grãos (WATERS; GRUSAK, 2008).

Nesse sentido, observa-se que parte do ZnPTS, inicialmente acumulado no colmo e nas folhas, parece ser mantido. Esse aspecto foi muito importante, pois as plantas entre os estádios V10 e R2 / R3 sofreram estresse pelas altas temperaturas da casa de vegetação (Figura 3) e o Zn mantido, especialmente, nos colmos, pode ter auxiliado no metabolismo das plantas durante essa condição de estresse. Uma parte do Zn, acumulado em caules de plantas com alto teor desse elemento, pode entrar nos vacúolos de células companheiras ou de células do parênquima próximas ao floema, deixando o Zn disponível para remobilização e participando ativamente do estabelecimento e da integridade da planta (JIANG et al., 2007; HEGELUND et al., 2012; RAES et al., 2014). Em um estudo da divisão dos minerais em *Arabidopsis*, foram encontrados elevados teores de Zn nos tecidos do caule, aumentando com a idade da planta (WATERS; GRUSAK, 2008).

Embora as concentrações de Zn total na espiga e grãos tenham sido bem diferentes (Figura 11), as concentrações de ZnPTS foram semelhantes nos dois órgãos (Figura 13); segundo Boonchuay et al. (2013), que avaliaram a concentração de Zn nos grãos de arroz, o Zn na pálea e lema (casca) tem grande contribuição para as concentrações de Zn nos grãos de arroz. O sistema vascular que liga a casca com a cariopse fornece o canal para os fotossintatos e nutrientes; entretanto, os autores afirmaram que o caminho pelo qual o Zn na casca é redistribuído para dentro dos grãos de arroz necessita ser melhor investigado. Em plantas de trigo cultivadas em condições de campo, o Zn é principalmente transportado para o endosperma por meio do vinco do floema ("*crease phloem*") (CAKMAK et al. 2010a).

Quando é avaliada a partição do ZnPTS em relação às partes novas e velhas da planta, considerando folhas e colmos, conforme exposto na Figura 17B, verifica-se que, no estágio V6, grande parte do Zn proveniente do tratamento de sementes estava acumulado em folhas e colmos do terço inferior e médio da planta (partes mais velhas), contudo, nos estádios V8 e V10, observa-se uma redistribuição do Zn para estruturas mais novas da planta – folhas e colmo em desenvolvimento. Em VT, quando a planta inicia a fase reprodutiva, as partes mais velhas possuem cerca de 13% a mais de ZnPTS do que as partes mais novas.

Conforme mencionado anteriormente, o Zn é móvel no floema e sua remobilização está intimamente relacionada com a senescência foliar (UAUY et al., 2006); portanto, assim como ocorre a redistribuição deste elemento do colmo e folhas para o desenvolvimento dos

grãos, foi verificado que também ocorre a sua redistribuição de estruturas mais velhas para as mais jovens (PAGE; FELLER, 2005). Wu et al. (2011), em estudo com o fornecimento de ^{68}Zn em solução nutritiva em plantas de arroz, demonstraram que o Zn depositado em caules pode ser redistribuído para tecidos em crescimento sob cultivo em condição com baixa disponibilidade de Zn. Pearson et al. (1995; 1996) relataram grande participação da redistribuição do Zn de folhas em senescência para os grãos de trigo. Segundo Gregersen et al. (2008), a senescência de tecidos estimula a redistribuição dos nutrientes, mas não é um pré-requisito para a remobilização.

4.3.3 Eficiência do uso do fertilizante disponibilizado via tratamento de sementes (FUE)

Apesar da alta contribuição do tratamento na nutrição das plantas e do valor nutricional dos grãos, a recuperação do Zn disponibilizado via tratamento de sementes ou a eficiência do uso do fertilizante aplicado via semente (FUE) foi muito baixa, variando de 0,94 no estágio V2 a 1,94% no estágio R2 / R3. Foi realizado um cálculo hipotético da eficiência de utilização do fertilizante aplicado via semente, considerando o acúmulo total de Zn pelas plantas (FUE / Zn_{total}) e observou-se que esse valor aumenta nos estádios VT e R2 / R3 (Figura 18), nos quais o ZnPTS contribui com cerca de 13,7% e 6,1% em relação ao Zn_{total} nas plantas (Figura 14).

Figura 18. Eficiência do uso do fertilizante aplicado via sementes em relação ao acúmulo de Zn_{total} (FUE / Zn_{total}) e do acúmulo de ZnPTS (FUE / Zn_{PTS}) e massa seca da planta de milho.

A eficiência do uso do fertilizante aplicado via semente reduz com a maturidade da planta e com o aumento da massa seca, isto porque a relação Zn_{PTS} / Z_{ntotal} reduz à medida que a planta atinge a fase reprodutiva, pois a proporção de Zn absorvido pela planta proveniente do tratamento de sementes (Zn_{PTS}) reduz em relação ao Zn absorvido de outras fontes (solo) (Figura 11); dessa forma, a eficiência de utilização do Zn total ($FUE / Z_{n\ total}$) aumenta, atingindo cerca de 34% (Figura 18). Em contraste com esse resultado, McBeath et al. (2013) constataram que a eficiência de utilização do Zn, aplicado ao solo no cultivo de trigo, utilizando uma fonte marcada com o ^{67}Zn , aumentou quando a planta atingiu a fase reprodutiva e com o aumento da massa seca; entretanto, a eficiência da recuperação do Zn nos grãos foi menor do que a observada neste estudo, de apenas 0,08%, contra 0,21% observado para a recuperação do Zn aplicado via semente.

Segundo McBEATH et al. (2013), fertilizantes aplicados no solo possuem, normalmente, um baixo percentual de recuperação pelas culturas das plantas, porque a absorção e a recuperação do Zn no solo pelas plantas durante todo o ciclo da planta dependem de vários fatores, tais como da solubilidade do fertilizante, da labilidade da fonte de Zn solubilizada, da concentração de Zn natural no solo e, por fim, do acesso das raízes das plantas ao Zn lábil. A baixa recuperação do Zn adicionado via tratamento de sementes, especialmente na fase reprodutiva, sugere que uma grande parte desse elemento não estava na forma lábil no solo, mesmo cultivando as plantas em um sistema isolado, no qual a terra dos vasos foi mantida dentro de sacos de plástico e, ao final do ciclo das plantas, as raízes apresentavam um grande volume, pois, provavelmente, o Zn adicionado não estava disponível para as plantas. As reações que reduzem a labilidade do fertilizante no solo, incluem precipitação e fixação no solo (McBEATH et al., 2013).

Outro aspecto importante que pode explicar a baixa eficiência de recuperação do Zn disponibilizado pelo tratamento diz respeito à fase na qual ocorre maior acúmulo de Zn na planta; conforme verificado neste trabalho, grande parte do Zn total da planta é obtida entre a antese e a maturidade da planta. Conforme relatado por Bender et al. (2013) em seu estudo, a maior parte da absorção de P, S, Zn e Cu por plantas de milho ocorre após o florescimento.

4.3.4 Relação das concentrações de Zn total (Z_{ntotal}) e do Zn proveniente do tratamento de sementes (Zn_{PTS}) com os demais nutrientes nas plantas

Foi utilizada a análise multivariada para promover a comparação entre o Z_{ntotal} e o Zn_{PTS} com os demais elementos nas amostras. A variação de macro e micronutrientes nas amostras de partes da planta em cada estágio fenológico foi 84% explicada pelas 4 componentes

principais, adotando-se o critério sugerido por Jolliffe (2002), no qual o número de componentes selecionadas devem responder a pelo menos 80% da variabilidade das amostras.

A componente principal 1 (CP1) com o maior autovalor, corresponde a cerca de 36% da variação entre as amostras, representando a componente que reflete melhor a variação entre as amostras. Segundo os coeficientes dessa componente, todos os elementos tiveram participação de forma semelhante; apenas o Mn e o B apresentaram menor participação, por isso ela foi denominada de composição total das amostras (Tabela 2).

Tabela 2. Coeficientes das componentes principais (CP) 1, 2, 3 e 4 para cada variável, autovalores e percentual de variação.

Variáveis	Coeficientes			
	CP1	CP2	CP3	CP4
Fósforo	0,33	-0,13	-0,43	-0,05
Potássio	0,25	0,07	-0,49	-0,07
Cálcio	0,25	0,50	-0,04	-0,01
Magnésio	0,24	0,43	0,11	-0,32
Enxofre	0,42	0,02	-0,23	0,25
Ferro	0,23	-0,30	0,37	0,31
Cobre	0,41	-0,17	-0,07	0,43
Manganês	0,06	0,57	0,13	0,10
Boro	0,11	0,22	0,38	0,49
Zntotal	0,38	-0,17	0,33	-0,37
ZnPTS	0,38	-0,16	0,31	-0,41
Autovalores	3,92	2,49	1,94	0,93
Percentual de variação (Cumulativa)	35.62%	58.23%	75.89%	84.36%

A componente principal 2 (CP2), com autovalor igual a 2,49, explicou cerca de 22,61% da variação das amostras; ao avaliar os coeficientes da CP2, observa-se que os elementos Ca, Mg, Mn e B apresentaram coeficientes positivos e os elementos Fe, Cu, Zntotal e ZnPTS apresentaram coeficientes negativos. Devido a este comportamento, denominou-se esta componente de concentração de íons que competem pela absorção de Zn, isto porque os íons Ca^{2+} , Mg^{2+} e Mn^{2+} possuem raio iônico semelhante ao Zn^{2+} e, por isso, competem pelo mesmo sítio de ligação nas raízes (SAGARDOY et al., 2009) e o B tem efeito interiônico de inibição não competitiva com o Zn (MALAVOLTA et al., 2006).

Por meio da observação do gráfico *biplot* para as CP1 e CP2 plotadas no eixo da abscissa e da ordenada, respectivamente, é possível observar que não ocorre uma separação nítida por estruturas avaliadas (planta inteira, raízes, folhas, colmos, pendão, espiga e grãos),

contudo, as amostras dos estádios V2, V4, V6, V8 e V10 apresentaram maior concentração de todos os nutrientes. As amostras dos demais estádios, pela maior massa seca, apresentaram valores negativos para a CP1, porque o aumento do crescimento das plantas ou do rendimento dos grãos geralmente reduz a concentração do nutriente, o que é chamado de efeito de diluição (JARRELL; BEVERLY, 1981). Da mesma forma, a CP2 não separou as estruturas, mas observa-se que as folhas, de modo geral, apresentaram maiores concentrações de Mn, Ca, Mg e B e os colmos, as folhas (números: 6, 7, 11, 14, 19 e 22), as raízes e as espigas apresentaram maiores concentrações de Zntotal, ZnPTS, Fe, Cu e P (Figura 19).

Figura 19. Gráfico *biplot* obtido por meio do agrupamento das concentrações de macro e micronutrientes nas partes da planta. Identificação: (■) planta inteira; (■) raízes; (■) folhas; (■) colmos; (■) pendão; (■) espiga e (■) grãos.

CP1 – Componente Principal 1, CP2 – Componente principal 2. Variáveis agrupadas: fósforo, potássio, cálcio, magnésio, enxofre, ferro, cobre, mangânes, boro, Zntotal e ZnPTS.

¹Estádio V2: parte aérea (1) e raízes (2); estágio V4: parte aérea (3) e raízes (4); estágio V6: folhas do terço inferior da planta (5), folhas do terço médio da planta (6), folhas do terço superior da planta (7), raízes (8), colmo do terço inferior da planta (9), colmo do terço médio da planta (10); estágio V8: folhas novas não expandidas (11), folhas do terço inferior da planta (12), folhas do terço médio da planta (13), folhas do terço superior da planta (14), raízes (15), colmo do terço inferior da planta (16), colmo do terço médio da planta (17), colmo do terço superior da planta (18); estágio V10: folhas novas não expandidas (19), folhas do terço inferior da planta (20), folhas do terço médio da planta (21), folhas do terço superior da planta (22), raízes (23), colmo do terço inferior da planta (24), colmo do terço médio da planta (25), colmo do terço superior da planta (26); estágio VT: pendão (27), folhas caídas ao final do ciclo (28), folhas do terço inferior da planta (29), folhas do terço médio da planta (30), folhas do terço superior da planta (31), colmo do terço inferior da planta (32), colmo do terço médio da planta (33), colmo do terço superior da planta (34); estágio R2 / R3: pendão (35), folhas caídas ao final do ciclo (36), folhas do terço inferior da planta (37), folhas do terço médio da planta (38), folhas do terço superior da planta (39), raízes (40), colmo do terço inferior da planta (41), colmo do terço médio da planta (42), colmo do terço superior da planta (43), grãos (44) e espiga sem os grãos (45).

A absorção radicular é mediada por transportadores ZIPs (*iron-regulated transporter-like proteins*), que incluem o transportador IRT1 (*iron-regulated transporter 1*), o qual contribui para a absorção dos nutrientes – ferro (Fe^{2+}), zinco (Zn^{2+}), manganês (Mn^{2+}), cobalto (Co^{2+}) e cádmio (Cd^{2+}) via simplasto na membrana plasmática da epiderme das raízes ou células corticais (KORSHUNOVA et al., 1999; ISHIMARU et al., 2005; PALMER; GUERINOT, 2009). Em alguns casos, o excesso de um dos metais, que compartilham o mesmo transportador, pode resultar na redução da absorção dos demais elementos; nesse contexto, em alguns trabalhos, foi constatado que o excesso de Zn causou a redução da absorção de Fe, pois ambos os elementos competem pelo mesmo sistema de absorção (FUKAO et al., 2011; SHANMUGAM et al., 2011, 2013). Pela análise da CP2, especialmente com a observação de como as raízes (pontos em cinza) enquadram-se em relação a esta componente, é possível tirar conclusões com relação à absorção dos cátions que competem pela absorção de Zn; as raízes expressam valores negativos da CP2, dessa forma apresentaram alta absorção de Zn, Cu, Fe e P e baixa absorção de Mn, Ca, Mg e B (Figura 19).

Ao avaliar a componente principal 3 (CP3), os maiores coeficientes positivos foram obtidos para os elementos Fe, B, Zntotal e ZnPTS (micronutrientes) e valores negativos para P, K e S (macronutrientes); pela contribuição das variáveis, essa componente foi denominada de concentração de micronutrientes *versus* de macronutrientes. A CP3 explicou cerca de 17,67% da variação de concentração nas partes das plantas. Já a componente principal 4 (CP4), a qual explicou 8,46% da variação das concentrações de nutrientes nos tecidos das plantas, os maiores coeficientes foram obtidos para as variáveis S, Fe, Cu e B e os menores para Mg, Zn total e ZnPTS (Tabela 2). Atribui-se a essa componente o nome de composição do colmo das plantas, pela separação dessas estruturas em todos os estádios fenológicos avaliados, apresentando, prioritariamente, valores negativos (Figura 20).

No gráfico *biplot* relacionando a CP3 e CP4, de modo geral, raízes e partes da planta do estágio VT e R2 / R3 apresentaram valores positivos da CP3, ou seja, possuem maiores concentrações de micronutrientes do que de macronutrientes. Para a CP4, verifica-se uma evidente separação dos colmos, apesar das folhas caídas (“Fc”) em VT, das folhas dos terços inferior e médio do estágio R2 / R3, da espiga e dos grãos também terem apresentado valores positivos da CP4, estas estruturas possuem maiores concentrações de Mg, Zntotal e ZnPTS (Figura 20).

Figura 20. Gráfico *biplot* obtido por meio do agrupamento das concentrações de macro e micronutrientes nas partes da planta. Identificação: (■) planta inteira; (■) raízes; (■) folhas; (■) colmos; (■) pendão; (■) espiga e (■) grãos.

CP3 – Componente Principal 3, CP4 – Componente principal 4. Variáveis agrupadas: fósforo, potássio, cálcio, magnésio, enxofre, ferro, cobre, mangânes, boro, Zntotal e ZnPTS.

¹Estádio V2: parte aérea (1) e raízes (2); estágio V4: parte aérea (3) e raízes (4); estágio V6: folhas do terço inferior da planta (5), folhas do terço médio da planta (6), folhas do terço superior da planta (7), raízes (8), colmo do terço inferior da planta (9), colmo do terço médio da planta (10); estágio V8: folhas novas não expandidas (11), folhas do terço inferior da planta (12), folhas do terço médio da planta (13), folhas do terço superior da planta (14), raízes (15), colmo do terço inferior da planta (16), colmo do terço médio da planta (17), colmo do terço superior da planta (18); estágio V10: folhas novas não expandidas (19), folhas do terço inferior da planta (20), folhas do terço médio da planta (21), folhas do terço superior da planta (22), raízes (23), colmo do terço inferior da planta (24), colmo do terço médio da planta (25), colmo do terço superior da planta (26); estágio VT: pendão (27), folhas caídas ao final do ciclo (28), folhas do terço inferior da planta (29), folhas do terço médio da planta (30), folhas do terço superior da planta (31), colmo do terço inferior da planta (32), colmo do terço médio da planta (33), colmo do terço superior da planta (34); estágio R2 / R3: pendão (35), folhas caídas ao final do ciclo (36), folhas do terço inferior da planta (37), folhas do terço médio da planta (38), folhas do terço superior da planta (39), raízes (40), colmo do terço inferior da planta (41), colmo do terço médio da planta (42), colmo do terço superior da planta (43), grãos (44) e espiga sem os grãos (45).

Com base na análise de agrupamento, os nutrientes foram colocados em grupos similares em relação à menor distância euclidiana. O primeiro grupo foi formado por Zntotal e ZnPTS que apresentam alta similaridade. O próximo cluster composto por Zn engloba Zntotal, ZnPTS e Fe. Em seguida, o cluster formado entre Fe, Zntotal e ZnPTS foi agrupado ao cluster formado por P, K, S e Cu (Figura 21).

Figura 21. Agrupamento de nutrientes segundo as suas concentrações nas partes dos tecidos das plantas de milho em função da distância euclidiana.

A alta similaridade do Zn com o Fe também foi relatada por Wu et al. (2011) que analisaram o conteúdo de Fe nos grãos de arroz e encontraram a mesma tendência na acumulação desse elemento e do Zn. Em outro trabalho, os autores observaram uma relação oposta entre Fe e Zn; Sperotto et al. (2012) compararam a partição dos nutrientes pelo fornecimento de Fe em arroz e os resultados obtidos demonstraram que o baixo fornecimento de Fe permite o maior acúmulo de Zn, Cu e Ni em raízes e de Zn em caules. Por outro lado, pelo baixo fornecimento de Fe, foi observado menor acúmulo de Zn e Ni em folhas. Em concordância com os resultados obtidos por Sperotto et al. (2012), Silveira et al. (2007) detectaram maior concentração de Zn na parte aérea de plantas sob excesso de Fe. Pongrac et al. (2013), pela aplicação de Zn no solo, encontraram altas concentrações de Ca, Fe e Zn nos grãos de trigo.

Pode existir uma relação de oposição entre Fe e Zn, uma vez que ambos são cátions bivalentes e formam complexos com fitosideróforos (ZHANG et al. 1998); portanto, sob baixo fornecimento de um dos nutrientes (tanto do Fe quanto do Zn), pode ocorrer o alto acúmulo do

outro nutriente pelas raízes, aquele com nível mais elevado. Outro aspecto relacionado à interação de Fe e Zn refere-se ao fato de os transportadores de Fe serem também capazes de transportar Zn conforme comentado para o IRT1 (KORSHUNOVA et al., 1999; ISHIMARU et al., 2005; PALMER; GUERINOT, 2009); dessa forma, a indução dos transportadores de Fe, sob baixa concentração desse elemento, pode resultar em aumento da absorção de Zn e no seu transporte para a parte aérea.

Segundo Sperotto et al. (2012), ocorreu uma alta correlação entre Zn-Cu e Zn-Ni em praticamente todos os órgãos analisados, os autores sugeriram que Cu, Zn e Ni compartilham um mesmo sistema de absorção. Ainda em relação ao Zn e ao Cu, as enzimas envolvidas na síntese e na manutenção do DNA e do RNA e a enzima superóxido dismutase requerem estes dois elementos para a sua atividade (HANSCH; MENDEL, 2009); por isso, a presença de Cu pode estar intimamente relacionada à presença de Zn nos tecidos e vice-versa. Apesar dessa relação entre Cu e Zn, em um trabalho recente os autores não encontraram efeito na concentração de Cu em grãos de *Eleusine coracana* L. pela aplicação de Zn no solo, ocorrendo apenas o aumento das concentrações Fe nos grãos (YAMUNARANI et al., 2016).

4.3.5 Concentrações de Zn proveniente do tratamento de sementes (ZnPTS) no solo

As concentrações de Zn no solo da rizosfera também foram determinadas; contudo, quando são observados os valores tanto das concentrações de Zn total em cada estágio (Zn natural no solo + ZnPTS) quanto apenas do ZnPTS não há um decréscimo ou aumento regular ao longo do ciclo da planta (Figura 22). Isso pode ser atribuído a dois aspectos importantes: o primeiro dele diz respeito à composição do solo da rizosfera que pode ter grande variação dos nutrientes; outro ponto refere-se à utilização de uma curva ácida preparada em meio de HNO_3 2 % v.v⁻¹ para calibração. Como o extrator utilizado para o solo foi o DTPA, seria adequada a preparação de uma curva de calibração contendo o extrator utilizado para minimizar o efeito matricial nas determinações por ICP-MS.

Figura 22. Concentrações de Zn proveniente de outras fontes e do tratamento de sementes (ZnPTS) no solo da rizosfera em cada estágio fenológico das plantas. Percentuais representam %ZnPTS no solo.

4.4 Conclusões

Plântulas de milho com cinco dias de idade e plantas de milho nos estádios fenológicos de V2, V4 e V6 apresentam a maior parte da sua constituição em Zn, proveniente do tratamento de sementes.

Nos estádios V8 e V10, a contribuição do ZnPTS é de cerca de 44% da composição total em Zn da planta. Quando a planta inicia o ciclo reprodutivo, a contribuição reduz para cerca de 14% e 6% nos estádios VT e R2 / R3, respectivamente.

O ZnPTS é redistribuído de tecidos velhos para tecidos mais novos, bem como para órgãos reprodutivos como o pendão e a espiga.

Apesar da alta contribuição do tratamento de sementes na nutrição das plantas e no valor nutricional dos grãos, a recuperação do fertilizante aplicado na planta é baixa.

O Zntotal e ZnPTS apresentam maior relação com o Fe e, na sequência, com o P, K, S e Cu.

Referências

- ADAMS, C.; HAMBIDGE, M.; RABOY, V.; DORSCH, J.A.; SIAN, L.; WESTCOTT, J.L.; KREBS, N.F. Zinc absorption from a low-phytic acid maize. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 76, p. 556-559, 2002.
- ALLOWAY, B.J. Soil factors associated with zinc deficiency in crops and humans. **Environmental Geochemistry and Health**, v. 31, p. 537-548, 2009.
- BENDER, R.R.; HAEGELE, J.W.; RUFFO, M.L.; BELOW, F.E. Nutrient uptake, partitioning, and remobilization in modern, transgenic insect-protected maize hybrids. **Agronomy Journal**, v. 105, p. 161-170, 2013.
- BENEDICTO, A.; HERNÁNDEZ-APAOLAZA, L.; RIVAS, I.; LUCENA, J.J. Determination of ^{67}Zn distribution in Navy bean (*Phaseolus vulgaris* L.) after foliar application of ^{67}Zn – lignosulfonates using isotope pattern deconvolution. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 8829-8838, 2011.
- BOARETTO, A. E.; MURAOKA, T.; BOARETTO, R.M. Absorção e translocação de micronutrientes, aplicados via foliar, pelos citros. **Laranja**, v.24, n.1, p.177-197, 2003.
- BOARETTO, A.E.; BOARETTO, R.M.; MURAOKA, T.; NASCIMENTO, V.F.; TIRITAN, C.S.; MOURAO, F.A.A. Foliar micronutrient application effects on citrus fruit yield, soil and leaf Zn concentrations and Zn-65 mobilization within the plant. **Acta Horticulturae**, v. 594, p. 203-209, 2002.
- BOARETTO, A.E.; OLIVEIRA, M.W.; MURAOKA, T.; NASCIMENTO, V.F. Absorption and translocation of ^{65}Zn applied to common bean leaves. **Journal of Nuclear Agriculture and Biology**, v. 27, p. 225-230, 1998.
- BOONCHUAY, P.; CAKMAK, I.; RERKASEM, B.; PROM-U-THAI, C. Effect of different foliar zinc application at different growth stages on seed zinc concentration and its impact on seedling vigor in rice, **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 59, n. 2, p. 180-188, 2013.
- BROADLEY, M.R.; WHITE, P.J.; HAMMOND, J.P.; ZELKO, I.; LUX, A. Zinc in plants. **New Phytologist**, v. 173, p. 677-702, 2007.
- BROADLEY, M.; BROWN, P.; CAKMAK, I.; RENGEL, Z.; ZHAO, F. **Function of Nutrients: Micronutrients**. Chapter 7. p. 191-248. In: MARSCHNER, H. Marchner's mineral nutrition of higher plants. 3rd ed. Oxford: Elsevier, 2012. 643 p.
- BROEKAERT, J.A.C. **Analytical atomic spectrometry with flames and plasmas**. Wiley-VCH, Weinheim, 2002, 375p.

- CAKMAK, I.; KALAYCI, M.; KAYA, Y.; TORUN, A.A.; AYDIN, N.; WANG, Y.; ARISOY, Z.; ERDEM, H.; YAZICI, A.; GOKMEN, O.; OZTURK, L.; HORST, W.J. Biofortification and localization of zinc in wheat grain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 9092-9102, 2010a.
- CAKMAK, I.; PFEIFFER, W.H.; McCLAFFERTY, B. Biofortification of durum wheat with zinc and iron. **Cereal Chemistry**, 87, 10–20. 2010b:
- CAKMAK, I.; TORUN, B.; ERENOGLU, B.; OZTÜRK, L.; MARSCHNER, H.; KALAYCI, M.; EKIZ, H.; YILMAZ, A. Morphological and physiological differences in cereals in response to zinc deficiency. **Euphytica**, v. 100, p. 349-357, 1998.
- COCUCCI A.E.; MARIATH, J.E.A. 2004. **Gametogêneses, fecundação, seleção do gametófito mais apto, embriogênese e diásporo maduro**. In: FERREIRA AG AND BORGHETTI F (Eds), Germinação: do básico ao aplicado, Porto Alegre: Artmed Porto Alegre, Brasil, p.15-30.
- DIAS, M.A.N.; TAYLOR, A.G.; CICERO, S.M. Uptake of systemic seed treatments by maize evaluated with fluorescent tracers. **Seed Science and Technology**, v. 42, p. 101-107, 2014.
- DIESING, W.E.; SINAJ, S.; SARRET, G.; MANCEAU, A.; FLURA, T.; DEMARIA, P.; SIEGENTHALER, A.; SAPPIN-DIDIER, V.; FROSSARD, E. Zinc speciation and isotopic exchangeability in soils polluted with heavy metals. **European Journal of Soil Science**, v. 59, p. 716-729, 2008).
- ERENOGLU, B.; CAKMAK, I.; RÖMHELD, V.; DERICI, R.; RENGEL, Z. Uptake of zinc by rye, bread wheat and durum wheat cultivars differing in zinc efficiency. **Plant and Soil**, v. 209, p. 245-252, 1999.
- ERENOGLU, B.; NIKOLIC, M.; RÖMHELD, V.; CAKMAK, I. Uptake and transport of foliar applied zinc (^{65}Zn) in bread and durum wheat cultivars differing in zinc efficiency. **Plant and Soil**, v. 241, p. 251-257, 2002.
- ERENOGLU, E.B.; KUTMAN, U.B.; CEYLAN, Y.; YILDIZ, B.; AND CAKMAK, I. Improved nitrogen nutrition enhances root uptake, root-to-shoot translocation and remobilization of zinc (^{65}Zn) in wheat. **New Phytologist**, v. 189, p. 438-448, 2011.
- FANCELLI, A.L.; DOURADO NETO, D. **Produção de milho**. 2. ed. Guaíba: Agropecuária, 2004. 360 p.
- FUKAO, Y.; FERJANI, A.; TOMIOKA, R.; NAGASAKI, N.; KURATA, R.; NISHIMORI, Y.; FUJIWARA, M.; MAESHIMA, M. iTRAQ analysis reveals mechanisms of growth defects due to excess zinc in Arabidopsis. **Plant Physiologist**, v. 155, p. 1893-1907, 2011.

- GONZALEZ, D.; OBRADOR, A.; LOPEZ-VALDIVIA, L.M.; ALVAREZ, J.M. Effect of zinc source applied to soils on its availability to navy bean. **Soil Science Society of America Journal**, v. 72, p. 641-649, 2008.
- GREGERSEN, P.L.; HOLM, P.B.; KRUPINSKA, K. Leaf senescence and nutrient remobilisation in barley and wheat. **Plant Biology**, v. 10, p. 37-49, 2008.
- HACISALIHOGU, G.; HART, J.J.; KOCHIAN, L.V. High- and low affinity zinc transport systems and their possible role in zinc efficiency in bread wheat. **Plant Physiologist**, v. 125, p. 456-463, 2001.
- HALLIDAY, A.N.; LEE, D.C.; CHRISTENSEN, J.N.; REHKAEMPER, M.; YI, W.; LUO, X.; HALL, C.M.; BALLENTINE, C.J.; PETTKE, T.; STIRLING, C. Applications of multiple collector-ICPMS to cosmochemistry, geochemistry and paleoceanography. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 62, p. 919-940, 1998.
- HANSCH, R.; MENDEL, R.R. Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). **Current Opinion in Plant Biology**, v. 12, p. 259-266, 2009.
- HASLETT, B.S.; REID, R.J.; RENGEL, Z. Zinc mobility in wheat: uptake and distribution of zinc applied to leaves or roots. **Annals of Botany**, v. 87, p. 379-386, 2001.
- HEGELUND, J.N.; PEDAS, P.; HUSTED, S.; SCHILLER, M.; SCHJOERRING, J.K. Zinc fluxes into developing barley grains: use of stable Zn isotopes to separate root uptake from remobilization in plants with contrasting Zn status. **Plant Soil**, v. 361, p. 241-250, 2012.
- HIPPLER, F.W.R.; BOARETTO, R.M.; QUAGGIO, J.A.; BOARETTO, A.E.; ABREU-JUNIOR, C. H.; MATTOS JUNIOR D. Uptake and distribution of soil applied zinc by citrus trees-addressing fertilizer use efficiency with ⁶⁸Zn labeling. **PLoS ONE**, v. 10, n.3, 2015.
- IMPA, S.M.; MORETE, M.J.; ISMAIL, A.M.; SCHULIN, R.; JOHNSON-BEEBOUT, S.E. Zn uptake, translocation, and grain Zn loading in rice (*Oryza sativa* L.) genotypes selected for Zn deficiency tolerance and high grain Zn. **Journal of Experimental Botany**, p. 1-13, 2013.
- ISHIMARU, Y.; SUZUKI, M.; KOBAYASHI, T.; TAKAHASHI, M.; NAKANISHI, H.; MORI, S.; NISHIZAWA, N.K. Os ZIP4, a novel zinc-regulated zinc transporter in rice. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, p. 3207-3214, 2005.
- JANGHORBANI, M.; WEAVER, C.M.; TING, B.T.G.; YOUNG, V.R. Labeling of soybeans with the stable isotope ⁷⁰Zn for use in human metabolic studies. **Journal of Nutrition**, v. 113, p. 973-978, 1983.

- JARRELL, W.M.; BEVERLY, R.B. The Dilution Effect in Plant Nutrition Studies. **Advances in Agronomy**, v. 34, p. 197-224, 1981.
- JIANG, W.; STRUIK, P.C.; LINGNA, J.; VANKEULEN, H.; ZHAO, M.; STOMPH, T.J. Uptake and distribution of root-applied or foliar-applied ^{65}Zn after Flowering in aerobic rice. **Annals of Applied Biology**, v. 150, p. 383-391, 2007.
- JIANG, W.; STRUIK, P.C.; VANKEULEN, H.; ZHAO, M.; JIN, L.N.; STOMPH, T.J. Does increased zinc uptake enhance grain zinc mass concentration in rice? **Annals of Applied Biology**, v. 153, p. 135-147, 2008a.
- JIANG, W.; STRUIK, P.C.; ZHAO, M.; VANKEULEN, H.; FAN, T.Q.; STOMPH, T.J. Indices to screen for grain yield and grain zinc mass concentrations in aerobic rice at different soil-Zn levels. **NJAS - Wageningen Journal of Life Sciences**, v. 55, p. 181-197, 2008b.
- JOLLIFFE, I.T. **Principal Component Analysis**. 2nd ed. New York: Springer-Verlag New York, 2002, 487p.
- KORSHUNOVA, Y.; EIDE, D.; CLARK, W.; GUERINOT, M.; PAKRASI, H. The IRT1 Protein from *Arabidopsis thaliana* is a metal transporter with abroad substrate range. **Plant Molecular Biology**, v. 40, p. 37-44, 1999.
- KRANNER, I.; COLVILLE, L. Metals and seeds: Biochemical and molecular implications and their significance for seed germination. **Environmental and Experimental Botany**, v. 72, p. 93-105, 2011.
- LIU, A.; JONES, R.J.; MALZER, G.L.; REHM, G.W. Fate of zinc ammonia acetate in soils and its uptake by corn. **Journal of Plant Nutrition**, v. 29, p. 1003-1019, 2006.
- LU, L.L.; TIAN, S.K.; ZHANG, J.; YANG, X.E.; LABAVITCH, J.M.; WEBB, S.M.; LATIMER, M.; BROWN, P.H. Efficient xylem transport and phloem remobilization of Zn in the hyperaccumulator plant species *Sedum alfredii*. **New Phytologist**, v. 198, p. 721-731, 2013.
- MABESA, R.L.; IMPA, S.M.; GREWAL, S.; JOHNSON-BEEBOUT, S.E. Contrasting grain-Zn response of biofortification rice (*Oryza sativa* L.) Breeding lines to foliar Zn application. **Field Crops Research**, v. 149, p. 223-233, 2013.
- MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2006. 638p.
- MARENCO, R.A.; LOPES, N.F. **Fisiologia vegetal: fotossíntese, respiração, relação hídricas e nutrição mineral**. Viçosa, MG: Editora UFV, 2005. 541 p.

- MARTRE, P.; PORTER, J.R.; JAMIESON, P.D.; TRIBO, E. Modeling grain nitrogen accumulation and protein composition to understand the sink/source regulations of nitrogen remobilization for wheat. **Plant Physiology**, v. 133, p. 1959-1167, 2003.
- McBEATH, T.M.; McLAUGHLIN, M.J.; KIRBY, J.K.; DEGRYSE, F. A stable-isotope methodology for measurement of soil-applied zinc-fertilizer recovery in durum wheat (*Triticum durum*). **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 176, p. 756-763, 2013.
- MEIJA, J.; COPLEN, T.B.; BERGLUND, M.; BRAND, W.A.; BIÈVRE, P. D.; GRÖNING, M.; HOLDEN, N.E.; IRRGEHER, J.; LOSS, R.D.; WALCZYK, T.; PROHASKA, T. Isotopic compositions of the elements 2013 (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 88, n. 3, p. 293-306, 2016.
- MESTEK, O.; KOMÍNKOVÁ, J.; KOPLÍK, R.; SUCHÁNEK, M. Determination of zinc in plant samples by isotope dilution inductively coupled plasma mass spectrometry. **Talanta**, v. 54, p. 927-934, 2001.
- MORTVEDT, J.J. Crop response to level of water soluble zinc in granular zinc fertilizers. **Fertilizer Research**, v. 33, p. 249-255, 1992.
- MURAOKA, T. **Solubilidade do zinco e do manganês em diversos extratores e disponibilidade desses dois micronutrientes para o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. Carioca**. 1981. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.
- OZTURK, L.; YAZICI, M.A.; YUCEL, C.; TORUN, A.; CEKIC, C.; BAGCI, A.; OZKAN, H.; BRAUN, H.J.; SAYERS, Z.; CAKMAK, I. Concentration and localization of zinc during seed development and germination in wheat. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 128, p. 144-152, 2006.
- PAGE, V.; FELLER, U. Selective transport of zinc, manganese, nickel, cobalt and cadmium in the root system and transfer to the leaves in young wheat plants. **Annals of Botany**, v. 96, n. 3, p. 425-34, 2005.
- PALMER, C.M.; GUERINOT, M.L. Facing the challenges of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants. **Nature Chemical Biology**, v. 5, p. 333-340, 2009.
- PALMGREN, M.G.; CLEMENS, S.; WILLIAMS, L.; KRAMER, U.; BORG, S.; SCHJORRING, K.; SANDERS, D. Zinc biofortification of cereals: problems and solutions. **Trends Plant Science**, v. 13, p. 464-473, 2008.

- PEARSON, J.N.; RENGEL, Z.; JENNER, C.F.; GRAHAM, R.D. Transport of zinc and manganese to developing wheat grains. **Physiologia Plantarum**, v. 95, n. 3, p. 449-455, 1995.
- PEARSON, J.N.; RENGEL, Z.; JENNER, C.F.; GRAHAM, R.D. Manipulation of xylem transport affects Zn and Mn transport into developing wheat grains of cultured ears. **Physiologia Plantarum**, v. 98, p. 229-234, 1996.
- PERUCHI, L.C.; NUNES, L.C.; CARVALHO, G.G.A.; GUERRA, M.B.B.; ALMEIDA, E.; RUFINI, I.A.; SANTOS JR., D.; KRUG, F.J. Determination of inorganic nutrients in wheat flour by laser-induced breakdown spectroscopy and energy dispersive X-ray fluorescence spectrometry, **Spectrochimica Acta Part B**, v. 100, p. 129-136, 2014.
- PIPISKA, M.; HORNIK, M.; SEKACOVA, J.; AUGUSTIN, J.; LESNY, J. Influence of complexing ligands and mineral nutrients on zinc foliar uptake and translocation in vascular plants. **Cereal Research Communications**, v. 36, p. 415-418, 2008.
- PONGRAC, P.; KREFT, I.; VOGEL-MIKUŠ, K.; REGVAR, M.; GERM, M.; VAVPETIČ, P.; GRLJ, N.; JEROMEL, L.; EICHERT, D.; BUDIC, B.; PELICON, P. Relevance for food sciences of quantitative spatially resolved elemental profile investigations in wheat (*Triticum aestivum*) grain. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 10, 2013.
- RAES, K.; KNOCKAERT, D.; STRUIJS, K.; VAN CAMP, J. Role of processing on bioaccessibility of minerals: influence of location of minerals and anti-nutritional factors in the plant. **Trends Food Science Technology**, v. 37, p. 32-41, 2014.
- RAIJ, B. van.; ANDRADE, J.C.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A. **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais**. Campinas: Instituto Agronômico, 2001. 285p.
- RAIJ, B. van; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A.; FURLANI, A.M.C. (Ed.). **Recomendações de adubação e calagem para o estado de São Paulo**. 2. ed. Campinas: Instituto Agronômico, 1996. 285 p. (IAC. Boletim Técnico, 100).
- RENGEL, Z.; MARSCHNER, H.; RÖMHELD, V. Uptake of zinc and iron by wheat genotypes differing in zinc efficiency. **Journal of Plant Physiology**, v. 152, p. 433-438, 1998.
- RENGEL, Z.; WHEAL, M.S. Kinetic parameters of Zn uptake by wheat are affected by the herbicide chlorsulfuron. **Journal of Experimental Botany**, v. 48, p. 935-941, 1997.
- RENGEL, Z. (2001). "Xylem and phloem transport of micronutrients," In: **Plant Nutrition—Food Security and Sustainability of Agro-Ecosystems**, ed W.J.Horst (Dordrecht: Kluwer Academic Publishers), p. 628-629.
- SANCHEZ, E.E.; RIGHETTI, T.L. Misleading zinc deficiency diagnoses in pome fruit and inappropriate use of foliar zinc sprays. **Acta Horticulturae**, v. 594, p. 363-368, 2002.

- SANCHEZ, E.E.; WEINBAUM, S.A.; JOHNSON, R.S. Comparative movement of labelled nitrogen and zinc in 1-year-old peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] trees following late-season foliar application. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 81, n. 5, p. 839-844, 2006.
- SAGARDOY, R.; MORALES, F.; LÓPEZ-MILLÁN, A. F.; ABADÍA, A.; ABADÍA, J. Effects of zinc toxicity on sugar beet (*Beta vulgaris* L.) plants grown in hydroponics. **Plant Biology**, v. 11, p. 339-350, 2009.
- SARTORI, R.H.; BOARETTO, A.E.; VILLANUEVA, F.C.A.; FERNANDES, H.M.G. Foliar and radicular absorption of Zn-65 and its redistribution in citrus plant. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, p. 523-527, 2008.
- SHANMUGAM, V.; LO, J.C.; WU, C.L.; WANG, S.L.; LAI, C.C.; CONNOLLY, E. L.; HUANG, J.L.; YEH, K.C. Differential expression and regulation of iron-regulated metal transporters in *Arabidopsis halleri* and *Arabidopsis thaliana* – the role in zinc tolerance. **New Phytologist**, v. 190, p. 125-137, 2011.
- SHANMUGAM, V.; LO, J.C.; YEH, K.C. Control of Zn uptake in *Arabidopsis halleri*: a balance between Zn and Fe. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, n. 281, p. 1-5, 2013.
- SHIEH, W. J.; McDONALD, M.B. The influence of seed size, shape and treatment on inbred seed corn quality. **Seed Science and Technology**, Zürich, v. 10, n. 2, p. 307-313, 1982.
- SHIVAY, Y.; PRASAD, R.; RAHAL, A. Relative efficiency of zinc oxide and zinc sulphate-enriched urea for spring wheat. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v. 82, p. 259-264, 2008.
- SILVEIRA, V.C.; OLIVEIRA, A.P.; SPEROTTO, R.A.; ESPINDOLA, L.S.; AMARAL, L.; DIAS, J.F.; CUNHA, J.B.; FETT, J.P. Influence of iron on mineral status of two rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 19, p. 127-139, 2007.
- SPEROTTO, R.A.; VASCONCELOS, M.W.; GRUSAK, M.A.; FETT, J.P. Effects of different Fe supplies on mineral partitioning and remobilization during the reproductive development of rice (*Oryza sativa* L.). **Rice**, v. 5, n. 27, p. 1-11, 2012.
- SRIVASTAVA, P.; SINGH, A.; KUMAR, S.; RAMACHANDRAN, V.; SHRIVASTAVA, M.; D'SOUZA, S. Desorption and transformation of zinc in a mollisol and its uptake by plants in a rice wheat rotation fertilized with either zinc enriched biosludge from molasses or with inorganic zinc. **Biology and Fertility of Soils**, v. 44, p. 1035-1041, 2008.

- STACEY, S.P.; MCLAUGHLIN, M.J.; CAKMAK, I.; HETTIARACHCHI, G.M.; SCHECKEL, K.; KARKKAINEN, M. Root uptake of lipophilic zinc rhamnolipid complexes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 2112-2117, 2008.
- STOMPH, T.J.; JIANG, W.; VAN DER PUTTEN, P.E.L.; STRUIK, P.C. Zinc allocation and re-allocation in rice. **Frontiers in plant science**. v. 5, 2014.
- STURUP, S.; HANSEN, H.R.; GAMMELGAARD, B. Application of enriched stable isotopes as tracers in biological systems: a critical review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 390, p. 541-554, 2008.
- TAYLOR, A.G.; SALANENKA, Y.A. Seed treatments: phytotoxicity amelioration and tracer uptake. **Seed Science Research**, v. 22, p. S86-S90, 2012.
- TREEBY, M.; MARSCHNER, H.; RÖMHELD, V. Mobilization of iron and other micronutrient cations from a calcareous soil by plant borne, microbial and synthetic metal chelators. **Plant Soil**, v. 114, p. 217-226, 1989.
- UAUY, C.; DISTELFELD, A.; FAHIMA, T.; BLECHL, A.; DUBCOVSKY, J. A NAC gene regulating senescence improves grains protein, zinc and iron content in wheat. **Science**, v. 314, n. 5803, p. 1298-1301, 2006.
- VON WIREN, N.; MARSCHNER, H.; RÖMHELD, V. Roots of iron efficient maize (*Zea mays* L.) take up also phytosiderophore chelated zinc. **Plant Physiologist**, v. 111, p. 1119-1125, 1996.
- WATERS, B.M.; GRUSAK, M.A. Whole-plant mineral partitioning throughout the life cycle in *Arabidopsis thaliana* ecotypes Columbia, Landsberg erecta, Cape Verde Islands, and the mutant line ysl1ysl3. **New Phytologist**, v. 177, p. 389-405, 2008.
- Welch, R.M. Micronutrient nutrition of plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 14, n. 1, p. 49-82, 1995.
- WOLF, R. E., TODD, A. S., BRINKMAN, S., LAMOTHE, P. J. Measurement of total Zn and Zn isotope ratios by quadrupole ICPMS for evaluation of Zn uptake in gills of brown trout (*Salmo trutta*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Talanta**, v. 80, p. 676-684, 2009.
- WOLSWINKEL, P. "Long-distance nutrient transport in plants and movement Into developing grains," In: **Mineral Nutrition of Crops: Fundamental Mechanisms and Implications**, ed Z.Rengel (New York, London, Oxford: The Haworthpress), p. 91-113, 1999.
- WU, C.; FENG, Y.; SHOHAG, J.I.; LU, L.; WEI, Y.; GAO, C.; YANG, X. Characterization of ⁶⁸Zn uptake, translocation, and accumulation into developing grains and young leaves of high Zn-density rice genotype. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 12, n. 5, p. 408-418, 2011.

- WU, C.Y.; LU, L.L.; YANG, X.E.; FENG, Y.; WEI, Y.Y.; HAO, H.L.; STOFFELLA, P.J.; HE, Z.L. Uptake, translocation and remobilization of zinc absorbed at different growth stages by rice genotypes of different Zn densities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 6767-6773, 2010.
- XUE, Y.; XIA, H.; MCGRATH, S.P.; SHEWRY, P.R.; ZHAO, F. Distribution of the stable isotopes ^{57}Fe and ^{68}Zn in grain tissues of various wheat lines differing in their phytate content. **Plant Soil**, v. 396, p. 73-83, 2015.
- YAMUNARANI, R.; RAMEGOWDA, V.; GEETHA, G.; JALENDRAKUMAR, H.G.; UDAYAKUMAR, M.; SHANKAR, A.G. Effect of Zn application on its uptake, distribution and concentration of Fe and Cu in finger millet [*Eleusine coracana* (L.) Gaertn.]. **Journal of Plant Nutrition**, v. 39, n. 4, p. 569-580, 2016.
- YONEYAMA, T.; ISHIKAWA, S.; FUJIMAKI, S. Route and regulation of zinc, cadmium, and iron transport in rice plants (*Oryza sativa* L.) during vegetative growth and grain filling: metal transporters, metal speciation, grain Cd reduction and Zn and Fe biofortification. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, p. 19111-19129, 2015.
- ZHANG, F.; RÖMHELD, V.; MARSCHNER, H. Diurnal rhythm of release of phytosiderophores and uptake rate of zinc in iron deficient wheat. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 37, p. 671-678, 1991.
- ZHANG, X.; ZHANG, F.; MAO, D. Effect of iron plaque outside roots on nutrient uptake by rice (*Oryza sativa* L.): Zinc uptake by Fe-deficient rice. **Plant Soil**, v. 202, p. 33-39, 1998.
- ZHANG, Q.; BROWN, P.H. Distribution and transport of foliar applied zinc in pistachio. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 124, p. 433-436, 1999.
- ZIEGLER, E.E.; SERFASS, R.E.; NELSON, S.E.; FIGUEROA-COLON, R.; EDWARDS, B.B.; HOUK, R.S.; THOMPSON, J.J. Effect of low zinc intake on absorption and excretion of zinc by infants studied with ^{70}Zn as extrinsic tag. **Journal of Nutrition**, v. 119, p. 1647-1653, 1989.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a utilização do tratamento de sementes com Zn no fornecimento desse elemento para as plantas, bem como para esclarecer aspectos importantes relativos à qualidade das sementes tratadas; nesse sentido, no capítulo 1, verificou-se que em condição de armazenamento com temperatura e umidade relativa do ar não controladas, o tratamento de sementes com Zn, pode propiciar efeitos nocivos ao potencial fisiológico de sementes maiores, as quais também demonstraram pela análise de SR μ -XRF que o Zn disponibilizado em revestimento pode penetrar no pericarpo e encontrar-se em pontos específicos da semente (capítulo 2 - parte 1), dessa forma o efeito fitotóxico do Zn às sementes, pode estar relacionado com a entrada desse elemento durante o armazenamento.

Ainda com relação ao capítulo 1, os resultados demonstraram o efeito benéfico do Zn disponibilizado em tratamento no vigor das plântulas, especialmente para lotes de sementes com baixo potencial fisiológico. No capítulo 2 (parte 2), observou-se por meio dos mapas de SR μ -XRF que o Zn disponibilizado via tratamento é absorvido por plântulas e acumula-se, especialmente em tecidos meristemáticos, o que certamente explica este efeito no incremento do vigor das plântulas.

Embora em situações de teores adequados e baixos de Zn no solo, o tratamento de sementes não propicie o aumento do rendimento e da biofortificação dos grãos, conforme avaliou-se no capítulo 3, o Zn disponibilizado via tratamento contribui de forma significativa para a nutrição das plantas e composição química dos grãos, conforme apresentado no capítulo 4.

O tratamento de sementes com Zn representa uma técnica, sob o aspecto econômico e operacional vantajosa, pois pode fornecer esse nutriente para as plantas nos estádios iniciais de desenvolvimento, sobretudo porque o Zn pode encontrar-se em baixos teores na constituição das sementes (reserva) ou no solo, e nestes casos, o fornecimento desse elemento propiciaria um efeito propulsor ao desenvolvimento das plântulas. Com relação aos aspectos de rendimento e da biofortificação dos grãos, acredita-se que o tratamento de sementes com Zn poderá resultar em maiores rendimentos, quando a disponibilidade desse elemento no solo encontrar-se em um nível que limite a produção das culturas; quanto a biofortificação dos grãos, observa-se que o tratamento de sementes com Zn, pode auxiliar neste aspecto, haja visto os resultados obtidos no capítulo 4, contudo para propiciar o aumento do valor nutricional dos grãos, o fornecimento desse elemento deve exceder a quantidade requerida pela planta, dessa forma, o tratamento de

sementes com Zn pode apresentar-se como uma forma interessante de disponibilização de Zn aliado ao fornecimento desse elemento via foliar, visando ao aumento do valor nutricional dos grãos.

APÊNDICE A. Frações de massa dos elementos minerais encontrados na análise e valor de referência do Certificado de Análise.

Materiais de referência ¹	P ²	P ³	K ²	K ³	Ca ²	Ca ³	Mg ²	Mg ³	S ²	S ³
----- g.kg ⁻¹ -----										
NIST CRM 8412	0,42 ± 0,03	NI	14,3 ± 0,3	17,35	1,32 ± 0,07	2,16	1,33 ± 0,04	1,60	0,44 ± 0,03	NI
NIST CRM 3233	2,57 ± 0,12	2,59	3,09 ± 0,05	3,06	35,2 ± 0,6	36,91	0,89 ± 0,02	1,09	0,77 ± 0,02	NI
NIST CRM 1515	1,93 ± 0,05	1,59	17,92 ± 0,04	16,10	19,92 ± 0,15	15,26	3,040 ± 0,003	2,71	2,0 ± 0,2	1,80
NIST CRM 1547	1,54 ± 0,16	1,37	26,74 ± 0,13	24,30	19,9 ± 0,4	15,60	4,92 ± 0,04	4,32	1,8 ± 0,3	2,00
	Cu ²	Cu ³	Fe ²	Fe ³	Mn ²	Mn ³	B ²	B ³	Zn ²	Zn ³
----- mg.kg ⁻¹ -----										
NIST SRM 8412	7,82 ± 0,18	8,00	107 ± 4	139,00	13,0 ± 0,3	15,00	3,4 ± 0,3	NI	30 ± 1	32,00
NIST SRM 3233	3,95 ± 0,11	3,97	724 ± 23	766,00	30,5 ± 0,8	33,10	1,81 ± 0,12	NI	650 ± 13	628,00
NIST SRM 1515	7,7 ± 0,8	5,64	84,9 ± 0,8	83,00	62,9 ± 0,2	54,00	28,7 ± 0,2	27,00	9,2 ± 0,3	12,50
NIST SRM 1547	4,71 ± 0,13	3,70	234 ± 3	218,00	111,3 ± 0,7	98,00	28,2 ± 0,6	29,00	11,54 ± 0,06	17,90

¹ Materiais de referência: NIST CRM 8412: colmos de milho; NIST CRM 3233: cereais de café da manhã fortificado; NIST CRM 1515: folhas de macieira; NIST CRM 1547: folhas de pessegueiro. ² Valor encontrado (n = 3); ³ Valor de referência do Certificado de Análise. ⁴ NI: Não informado.

APÊNDICE B. Temperatura e umidade relativa do ar durante o armazenamento das sementes por 12 meses em ambiente não controlado.

APÊNDICE C. Dados analíticos do ICP-MS.

Dados analíticos	Isótopos de Zn	
	67	68
Limite de detecção (LOD) (µg/L)	0,015	0,026
Limite de quantificação (LOQ) (µg/L)	0,045	0,078

*LOD = $[(3 \times \text{BEC} \times \text{RSD}_{\text{branco}}) / 100, n=20]$. LOQ = $3 \times \text{LOD}$.