

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
GOIANO – CAMPUS RIO VERDE PROGRAMA DE PÓS-  
GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS – AGRONOMIA

ABORDAGEM MULTIVARIADA DA QUALIDADE FÍSICA  
E FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE MILHO HÍBRIDO  
AFETADAS POR MOLICUTES MRFV

Autor: Jhonata Cantuária Medeiros  
Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Juliana de Fátima Sales

Rio Verde – GO  
janeiro – 2020

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
GOIANO – CAMPUS RIO VERDE PROGRAMA DE PÓS-  
GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS – AGRONOMIA

ABORDAGEM MULTIVARIADA DA QUALIDADE FÍSICA  
E FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE MILHO HÍBRIDO  
AFETADAS POR MOLICUTES MRFV

Autor: Jhonata Cantuária Medeiros  
Orientadora: Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Juliana de Fátima Sales

Dissertação apresentada como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS – AGRONOMIA no Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias – Agronomia do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde – Área de concentração em Produção Vegetal Sustentável no Cerrado.

Rio Verde – GO  
janeiro – 2020

Sistema desenvolvido pelo ICMC/USP  
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
**Sistema Integrado de Bibliotecas - Instituto Federal Goiano**

MM488a Medeiros, Jhonata Cantuária  
ABORDAGEM MULTIVARIADA DA QUALIDADE FÍSICA E  
FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE MILHO HÍBRIDO AFETADAS POR  
MOLICUTES MRFV / Jhonata Cantuária  
Medeiros; orientadora Juliana de Fátima Sales;  
coorientador Jacson Zuchi. -- Rio Verde, 2020.  
67 p.

Dissertação (em Mestrado em Ciências Agrárias -  
Agronomia) -- Instituto Federal Goiano, Campus Rio  
Verde, 2020.

1. análise de cluster. 2. análise fatorial. 3.  
atividade enzimática. 4. complexo do enfezamento do  
milho. 5. vigor. I. Sales, Juliana de Fátima,  
orient. II. Zuchi, Jacson, co-orient. III. Título.

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
GOIANO – CAMPUS RIO VERDE  
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
AGRÁRIAS-AGRONOMIA**

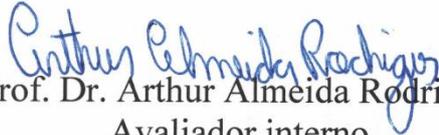
**ABORDAGEM MULTIVARIADA DA QUALIDADE FÍSICA  
E FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE MILHO HÍBRIDO  
AFETADAS POR MOLICUTES MRFV**

Autor: Jhonata Cantuária Medeiros  
Orientadora: Dra. Juliana de Fátima Sales

TITULAÇÃO: Mestre em Ciências Agrárias-Agronomia - Área de  
Concentração em Produção Vegetal Sustentável no Cerrado

APROVADA em, 24 de janeiro de 2020.

  
Prof. Dr. Jacson Zuchi  
Avaliador externo  
IF Goiano - Polo de Inovação

  
Prof. Dr. Arthur Almeida Rodrigues  
Avaliador interno  
IF Goiano – Campus Rio Verde

  
Prof.ª Dra. Juliana de Fátima Sales  
Presidente da banca  
IF Goiano – Campus Rio Verde

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por guiar meus passos.

À minha mãe Neuza, pelo amor incondicional.

À minha orientadora professora Juliana de Fátima Sales, fonte de inspiração e aprendizado, por todas às vezes que me escutou, aconselhou e principalmente pela confiança depositada que me fez sentir mais forte e seguro em momentos difíceis.

Aos meus coorientadores Jacson Zuchi e Fernando Higino, por todos os ensinamentos, profissionalismo, humildade e parceira.

Aos pós-doutorandos Arthur e Kelly, pela prontidão, conselhos, apoio e dedicação durante a execução do projeto.

Aos colegas do Laboratório de Sementes e Laboratório de Pós-Colheita de Produtos Agrícolas, pelo auxílio e contribuição nos trabalhos e análises. Em especial a bolsista de Iniciação científica Stella. Além dos colegas de laboratório, Deyner, Pablio, Geovane, Douglas, Anailda, Ana Clara e Natielly.

Aos colegas da pós-graduação, pela amizade e troca de experiência.

Aos amigos de Minas Gerais e Goiás, pelo apoio e momentos de descontração.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Instituto Federal Goiano - Campus Rio Verde e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias – Agronomia, pela oportunidade de fazer parte do corpo discente e aprimorar meus conhecimentos.

A todos os tutores da Unimontes, Helix Sementes e Advanta Seeds, pelos ensinamentos e amadurecimento profissional proporcionados.

Minha eterna gratidão a todos vocês.

## BIOGRAFIA DO AUTOR

Jhonata Cantuária Medeiros, filho de Mauro Medeiros da Silva e Neuza Nogueira Cantuária, nasceu no dia 19 de abril de 1994, na cidade de Janaúba, Minas Gerais. Em 2012, ingressou no curso de graduação em Agronomia pela Universidade Estadual de Montes Claros – Campus Janaúba, graduando-se em 2017. No qual participou de projetos de iniciação científica, sendo membro do grupo de pesquisa em grandes culturas com estudos voltados principalmente aos ensaios fitotécnicos com a cultura do feijão comum e feijão caupi. No último período de graduação, foi aprovado no estágio supervisionado na empresa Helix Sementes em Patos de Minas no qual pode acompanhar atividades de desenvolvimento, produção, beneficiamento e comercialização de sementes milho e sorgo híbridos. Antes de finalizar o estágio em junho de 2017, foi contratado pela Advanta seeds como assistente de produção e mudou para Santa Helena de Goiás, durante esse período foi responsável por acompanhar, auxiliar e reportar todo o processo de beneficiamento das sementes de milho híbrido em conjunto com *supply chain team* da empresa. Em março de 2018, iniciou no curso de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias – Agronomia na Área de Concentração em Produção Vegetal Sustentável no Cerrado, no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde, sob a orientação da Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Juliana de Fátima Sales, concluindo em janeiro de 2020 o mestrado.

## ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE TABELAS.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	ix
LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES.....	xi
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xvi
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	18
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	22
2. OBJETIVOS .....	25
CAPÍTULO I: Abordagem multivariada da qualidade física e fisiológica de sementes de milho híbrido afetadas por Molicutes e MRFV .....	26
<b>1. Introdução</b> .....	26
<b>2. Material e Métodos</b> .....	28
2.1. <i>Atributos de qualidade física</i> .....	32
2.2. <i>Atributos de qualidade fisiológica</i> .....	32
2.3. <i>Análises bioquímica</i> .....	34
2.4. <i>Análises estatística</i> .....	36
<b>3. Resultados</b> .....	37
3.1. <i>Germinação</i> .....	37
3.2. <i>Análise fatorial</i> .....	38
3.3. <i>Teste de agrupamento de médias</i> .....	44
3.4. <i>Cluster análise</i> .....	47
<b>4. Discussão</b> .....	51
<b>5. Conclusões</b> .....	55

<b>6. Agradecimentos</b> .....	55
<b>7. Referências</b> .....	56

## ÍNDICE DE TABELAS

### Página

CAPÍTULO 1. Abordagem multivariada da qualidade física e fisiológica de sementes de milho híbrido afetadas por Molicutes e MRFV

Tabela 1. Incidência média do complexo do enfezamento do milho (molicutes e MRFV) nas espigas dos campos de produção de sementes utilizados.....30

Tabela 2. Classificação em níveis de severidade de espigas, considerando aspectos biométricos como comprimento e diâmetro de espigas, e coloração de sementes de espigas provenientes de plantas de campo de produção com sintomas do complexo do enfezamento do milho (molicutes e MRFV). \*Após a classificação previa por meio de diagnose visual da mudança na coloração, as sementes foram submetidas a leitura das coordenadas colorimétricas, croma e ângulo de cor Hue para aferir a existência de alteração na coloração alaranjada das sementes dos tratamentos.....30

Tabela 3. Teor de água de sementes provenientes de três híbridos de milho (H1, H2 e H3) apresentando três níveis de severidade de espigas (sadio, severidade média e severidade alta) e abreviação dos tratamentos.....31

Tabela 4. Médias da porcentagem de germinação ao 7º dia (G7) das sementes provenientes de espigas com três níveis de severidade (sadio, severidade média, severidade alta) do complexo do enfezamento do milho (molicutes e MRFV) de três híbridos de milho (H1, H2 e H3). <sup>1</sup>Valores seguidos de mesma letra maiúsculas na linha comparam as médias dos híbridos entre si, e minúscula na coluna comparam as médias entre os níveis de severidade e não diferem entre si segundo o teste de Scott – Knott ( $p < 0,05$ ). <sup>2</sup>Erro padrão.....38

Tabela 5. Classificação dos fatores, autovalores, porcentagem da variância e porcentagem acumulada da variância gerada para avaliar a qualidade de sementes de milho híbridas afetadas pelo complexo-do-enfezamento (molicutes e MRFV).....38

Tabela 6. Cargas fatoriais das variáveis no fator I e fator II, comunalidade e variância específica dos 37 atributos de qualidade físico e fisiológico utilizados na avaliação da qualidade de sementes de três híbridos de milho provenientes de espigas com diferentes níveis de severidade do complexo do enfezamento do milho (molicutes e MRFV).....39

Tabela 7. Escores de três híbridos (H1, H2 e H3) de milho provenientes de espigas com diferentes níveis de severidade (sadio, severidade média e severidade alta) do complexo do enfezamento do milho (molicutes e MRFV) para o fator I e fator II.....43

Tabela 8. Média dos atributos de qualidade selecionados para três híbridos (H1, H2 e H3) com três níveis de severidade (sadio, severidade média e severidade alta) do complexo do enfezamento do milho (molicutes e MRFV). <sup>1</sup>Valores seguidos de mesma letra maiúsculas na linha comparam as médias dos híbridos entre si, e minúscula na coluna comparam as médias entre os níveis de severidade e não diferem entre si segundo o teste de Scott – Knott ( $p < 0,05$ ). \*Erro padrão. TSM, massa de mil sementes; H, ângulo de matiz Hue; RDM, massa seca de radícula; SDM, massa seca de parte área; SDMSL, relação entre SDM e SL; AA, envelhecimento acelerado;  $\beta$ -amy, beta amilase.....45

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
<b>CAPÍTULO 1. Abordagem multivariada da qualidade física e fisiológica de sementes de milho híbrido afetadas por Molicutes e MRFV</b>	
Figura 1. Espigas provenientes de plantas saudias com desenvolvimento normal, oriundas de plantas com ausência dos sintomas do complexo do enfezamento do milho (molicutes e MRFV) (Fig. 1A, B e C). Espigas com sintomas da doença, embonecamento, subdesenvolvimento e descoloração de espigas e sementes proveniente de plantas com sintomas do complexo do enfezamento do milho (Fig. 1D, E e F). Ambas as espigas (com e sem sintomas da doença) oriundas do mesmo campo de produção.....	29
Figura 2. Classificação da severidade de espigas em saudias, severidade média e severidade alta do complexo do enfezamento do milho (molicutes e MRFV).....	31
Figura 3. Gráfico dos autovalores dos 37 fatores gerados com a análise fatorial.....	39
Figura 4. Gráficos bidimensionais de dispersão da matriz das cargas fatoriais e scores dos 37 atributos de qualidade física e fisiológica utilizados para avaliação da qualidade de sementes de três híbridos de milho provenientes de espigas com diferentes níveis de severidade do complexo do enfezamento do milho. A) Gráfico de dispersão da matriz das cargas fatoriais dos 37 atributos de qualidade física e fisiológica. B) Gráfico de dispersão da matriz dos escores dos híbridos com diferentes níveis de severidade. C) Gráfico de dispersão biplot dos atributos de qualidade e híbridos com diferentes níveis de severidade do complexo do enfezamento do milho. H1S, híbrido 1 sadio; H1M, híbrido 1 severidade média; H1H, híbrido 1 severidade alta; H2S, híbrido 2 sadio; H2M, híbrido 2 severidade média; H2H, híbrido 2 severidade alta; H3S, híbrido 3 sadio; H3M, híbrido 3 severidade média; H3H, híbrido 3 severidade alta; TSM, massa de mil sementes; Wid, largura de semente; Len, comprimento de semente; Thi, espessura da semente; Dg, diâmetro geométrico médio; S, área superficial; Vg, volume da sementes; SUM, massa específica unitária; L, luminosidade; A, índice de cor A; B, índice de cor B; C, croma; H, ângulo Hue; G4, germinação 4° dia; G7, germinação 7° dia; CT, vigor a frio; GL4, germinação em baixa temperatura 4° dia; GL7, germinação em baixa temperatura 7° dia; AA, envelhecimento acelerado; SDM, massa seca de parte aérea; RDM, massa seca de parte radícula; SL, comprimento de parte aérea; RL, comprimento de radícula; SDMSL, relação entre SDM e SL; RDMRL, relação entre RDM e RL; EC, condutividade elétrica; SOD,	

superóxido dismutase; CAT, catalase; APX, ascorbato peroxidase; POX, peroxidase; TP, proteínas totais; MDA, malonaldeído; PPO, polifenoloxidase; PAL, fenilalanina amônia liase; TSPC, compostos fenólicos solúveis totais;  $\alpha$  = (a-amy), alfa amilase;  $\beta$  = (b-amy), beta amilase.....41

Figura 5. Dendograma para os três híbridos (H1, H2 e H3) com três níveis de severidade de espigas (sadio (S), severidade média (M) e severidade alta (H)) do enfezamento do milho (molicutes e MRFV). Análise de cluster baseada no modelo de agrupamento Ward.D2. H1S, híbrido 1 sadio; H1M, híbrido 1 severidade média; H1H, híbrido 1 severidade alta; H2S, híbrido 2 sadio; H2M, híbrido 2 severidade média; H2H, híbrido 2 severidade alta; H3S, híbrido 3 sadio; H3M, híbrido 3 severidade média; H3H, híbrido 3 severidade alta.....48

Figura 6. Dendograma dos 37 atributos de qualidade físico e fisiológico usados para avaliar a qualidade de sementes de milho híbridas provenientes de espigas com diferentes níveis de severidade (sadio, severidade média e severidade alta) do complexo do enfezamento do milho (molicutes e MRFV). Análise de cluster baseada no modelo de agrupamento “Complete”. TSM, massa de mil sementes; Wid, largura de semente; Len, comprimento de semente; Thi, espessura da semente; Dg, diâmetro geométrico médio; S, área superficial; Vg, volume da sementes; SUM, massa específica unitária; L, luminosidade; A, índice de cor A; B, índice de cor B; C, cor; H, ângulo Hue; G4, germinação 4° dia; G7, germinação 7° dia; CT, vigor a frio; GL4, germinação em baixa temperatura 4° dia; GL7, germinação em baixa temperatura 7° dia; AA, envelhecimento acelerado; SDM, massa seca de parte aérea; RDM, massa seca de parte radícula; SL, comprimento de parte aérea; RL, comprimento de radícula; SDMSL, relação entre SDM e SL; RDMRL, relação entre RDM e RL; EC, condutividade elétrica; SOD, superóxido dismutase; CAT, catalase; APX, ascorbato peroxidase; POX, peroxidase; TP, proteínas totais; MDA, malonaldeído; PPO, polifenoloxidase; PAL, fenilalanina amônia liase; TSPC, compostos fenólicos solúveis totais;  $\alpha$  = (a-amy), alfa amilase;  $\beta$  = (b-amy), beta amilase.....50

## LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES

Símbolo ou sigla	Significado	Unidade de medida
A	Índice de cor A	
AA	Envelhecimento acelerado	%
APX	Ascorbato peroxidase	$\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$ proteína
B	Índice de cor B	
B.O.D	Biological Oxygen Demand	
C	Croma	
CA	Cluster análise	
CAT	Catalase	$\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$ proteína
cm	Centímetro	
CT	Vigor a frio	%
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico	
$D_g$	Diâmetro geométrico médio	mm
EC	Condutividade elétrica	$\mu\text{S.cm}^{-1}.\text{g}^{-1}$
EC <sup>®</sup>	Emulsificante concentrado	
EDTA	Etilenodiaminotetracético	
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio	
FA	Análise fatorial	
Fig	Figura	
g	Gramas	
<i>g</i>	Giro	
G4	Germinação 4 <sup>o</sup> dia	%
G7	Germinação 7 <sup>o</sup> dia	%
GL4	Germinação em baixa temperatura 4 <sup>o</sup> dia	%
GL7	Germinação em baixa temperatura 7 <sup>o</sup> dia	%
h	Horas	
H	Ângulo Hue	°
H1	Híbrido 1	
H2	Híbrido 2	
H3	Híbrido 3	

kg	Quilo grama	kg
L	Luminosidade	
Len	Comprimento de semente	mm
M	Molar	
MDA	Malonaldeído	$\mu\text{mol g}^{-1}$
mg	Miligrama	
min	Minuto	
mL	Mililitro	
mm	Milimetro	
mM	Milimolar	
m/v	Massa por volume	
N <sub>2</sub>	Nitrogênio líquido	
NBT	Azul de p-nitro-tetrazólio	
nm	Nanômetro	
PAL	Fenilalanina amônia liase	$\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$ proteína
pH	Potencial Hidrogeniônico	
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfônico	
POX	Peroxidase	$\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$ proteína
PPO	Polifenoloxidase	$\text{mmol min}^{-1} \text{g}^{-1}$ proteína
PVPP	Polivinilpirrolidona	
RDM	Massa seca de radícula	mg
RDMRL	Relação entre RDM e RL	$\text{mg}\cdot\text{mm}^{-1}$
RL	Comprimento de radícula	mm
S	Área superficial	Mm
s	Segundo	
SC	Suspensão concentrada	
SDM	Massa seca de parte aérea	mg
SDMSL	Relação entre SDM e SL	$\text{mg}\cdot\text{mm}^{-1}$
SL	Comprimento de parte aérea	mm
SOD	Superóxido dismutase	$\text{U mL}^{-1}$
SUM	Massa específica unitária	$\text{kg m}^{-3}$
TCA	Ácido tricloroacético	
Thi	Espessura da semente	mm
TP	Proteínas totais	$\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
TSM	Massa de mil sementes	%
TSPC	Compostos fenólicos solúveis totais	$\text{mg kg}^{-1}$
UBS	Unidade de Beneficiamento de Sementes	
v	Volume	

$V_g$	Volume das sementes	$\text{mm}^2$
Wid	Largura de semente	mm
$\mu\text{L}$	Micrôlitro	
$\alpha\text{-amy}$	Alfa amilase	mg maltose $\text{g}^{-1}$ proteína
$\beta\text{-amy}$	Beta amilase	mg maltose $\text{g}^{-1}$ proteína
%	Porcentagem	
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius	

---

## RESUMO

MEDEIROS, JHONATA CANTUÁRIA. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde, janeiro de 2020. **Abordagem multivariada da qualidade física e fisiológica de sementes de milho híbrido afetadas por Molicutes MRFV.** Orientadora: Professora Dra. Juliana de Fátima Sales. Coorientadores: Dr. Jacson Zuchi, Dr. Fernando Higino de Lima e Silva e Dra. Kelly Juliane Teles Nascimento.

Diante dos danos causados pelo complexo do enfezamento do milho (molicutes e MRFV) ao desenvolvimento de plantas da cultura, faz-se necessário esclarecer seu efeito sob a qualidade de suas sementes. Assim, este estudo teve como objetivo investigar por meio da abordagem multivariada dos atributos de qualidades físicas e fisiológicas, alterações no vigor de sementes de diferentes híbridos e níveis de severidade decorrentes do complexo do enfezamento do milho (molicutes e MRFV), com intuito de selecionar sementes de alto vigor e híbridos mais tolerantes a doença. Além de identificar por meio da estatística multivariada as principais variáveis indicadoras de vigor. Foram utilizados para o estudo sementes de três híbridos de milho, híbrido 1 (H1), híbrido 2 (H2) e híbrido 3 (H3), cada um com três níveis de severidade de espigas sendo sadio, severidade média e severidade alta provenientes de espigas de campos de produção de sementes afetados pelo patógeno. A qualidade das sementes foi avaliada mediante atributos de qualidade física e fisiológica. Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância e quando significativo, estudados através da análise fatorial (FA), teste de scott-knott ( $p < 0.05$ ) para as variáveis indicadores selecionadas e análise de cluster (CA). A classificação em níveis de severidade de espigas e análise conjunta dos dados por meio das análises multivariadas, FA e CA, mostrou-se eficiente para distinguir diferença no vigor das sementes neste estudo, pois foi possível detectar redução gradativa dos atributos de

qualidade utilizados para avaliar o vigor das sementes. Sendo as sementes provenientes de espigas com severidade média e alta do complexo do enfezamento do milho (molicutes e MRFV) menos vigorosas em relação as sadias (assintomáticas, com desenvolvimento normal) para os híbridos testados. Comparando os híbridos entre si em função do nível de severidade, o híbrido H2 mostrou-se mais suscetível e o híbrido H1 mais tolerante ao molicutes e MRFV. Das 37 variáveis analisadas, sete foram consideradas com maior potencial indicador, mais relevantes em explicar as alterações do desempenho das sementes (H, TSM, SDMSL, RDM, SDM, AA e  $\beta$ -amy), sendo essas pertencentes aos dois diferentes atributos estudados, físico e fisiológico, enfatizando a importância dos dois segmentos para os programas de controle de qualidade e melhoramento genético durante a seleção de sementes de alto vigor e híbridos mais tolerantes ao enfezamento do milho.

**PALAVRAS-CHAVES:** análise de cluster, análise fatorial, atividade enzimática, complexo do enfezamento do milho, vigor.

## ABSTRACT

MEDEIROS, JHONATA CANTUÁRIA. Goiano Federal Institute of Education, Science, and Technology - Rio Verde Campus, January 2020. **Multivariate approach to the physical and physiological of hybrid corn seeds affected by Molicutes and MRFV**  
Advisor: Dr<sup>a</sup>. Juliana de Fátima Sales. Co-advisor: Dr. Jacson Zuchi, Dr Fernando Higino de Lima e Silva e Dr<sup>a</sup>. Kelly Juliane Teles Nascimento.

In view of the damage caused by the corn stunt complex disease (molicutes and MRFV) to the crop plants development, it is necessary to exclude its effect on its seeds quality. Thus, this study aimed to investigate through the multivariate approach to the attributes of physical and physiological qualities, changes in the vigor of seeds of different hybrids and severity levels resulting from the corn stunt complex (molicutes and MRFV), with the goal to select seeds of high vigor and hybrids more tolerant to the disease. In addition to identifying through multivariate statistics the main indicators of vigor. Seeds of three corn hybrids, hybrid 1 (H1), hybrid 2 (H2) and hybrid 3 (H3), were used for the study, each one with three levels of ear severity being sound, medium severity and high severity from ears of seed production fields affected by the pathogen. Seed quality was assessed using attributes of physical and physiological quality. The data obtained were subjected to analysis of variance and, when significant, studied through factor analysis (FA), scott-knott test ( $p < 0.05$ ) for the selected indicator variables and cluster analysis (CA). The classification in ear severity levels and joint analysis of the data through multivariate analyzes, FA and CA, proved to be efficient to distinguish difference in seed vigor in this study, as it was possible to detect a gradual reduction in the quality attributes used to evaluate seed vigor. The seeds coming from ears with medium and high severity of the corn stunt complex (molicutes and MRFV) were less vigorous than the sound ones

(asymptomatic, with normal development) for the tested hybrids. Comparing the hybrids to each other depending on the severity level, the H2 hybrid was more susceptible and the H1 hybrid more tolerant to molicutes and MRFV. Of the 37 variables analyzed, seven were considered to have the greatest indicator potential, most relevant in explaining changes in seed performance (H, TSM, SDMSL, RDM, SDM, AA and  $\beta$ -amy), these belonging to the two different attributes studied, physical and physiological, emphasizing the importance of the two segments for quality control and genetic improvement programs during the selection of high vigor seeds and hybrids more tolerant to corn stunt complex disease.

**KEY-WORDS:** cluster analysis, corn stunt complex, enzymatic activity, factor analysis, vigor.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Tendo como maiores produtores Estados Unidos, China e Brasil, o milho (*Zea mays*) é considerado uma das culturas mais difundidas e produzidas no mundo (Dowd e Johnson, 2018; USDA, 2019). No Brasil a cultura é responsável por mais de 100 milhões de toneladas, representando 41,7% de toda produção de grãos da última safra (2018/2019), atrás apenas da soja com produção superior a 115 milhões de toneladas representando 47,5% (Conab, 2019). Grande parte do sucesso da cultura está nas tecnologias agregadas as sementes que possibilitam a germinação e a formação de plantas vigorosas e produtivas no campo (Wu et al., 2017).

As plantas e sementes estão sujeitas ao estresse provocados por pragas e patógenos durante seu desenvolvimento, como os causados pelo complexo do enfezamento do milho registrado em vários países produtores da região tropical e subtropical do continente americano (Lee et al., 2000; Pérez-López et al., 2016). Transmitidos pela cigarrinha do milho (*Dalbulus maidis*), a cigarrinha é responsável por disseminar o fitoplasma (*Maize bushy stunt phytoplasma*), o espiroplasma (*Spiroplasma kunkelli*) e o vírus da risca do milho (*Maize rayado fino virus*) que são introduzidos no floema das plantas de milho através do processo de sucção de seiva do inseto vetor (Oliveira et al., 2013).

A junção desses patógenos induz de forma agressiva a tradução de genes e a produção de proteínas modificadoras e danosas da atividade de vias metabólicas como a via glicolítica, além de reduzir a translocação fotoassimilados das plantas infectadas prejudicando o desenvolvimento das mesmas (Oshima et al., 2013; Oliveira et al., 2015a). Com isso, o complexo do enfezamento do milho leva ao surgimento de sintomas como vassoura-de-bruxa, nanismo, proliferação, filodia, virescência, esterilidade das flores, topos roxos, amarelecimento generalizado e necrose do floema nas plantas infectadas,

podendo variar com a intensidade da contaminação e da suscetibilidade do genótipo (Junqueira et al., 2004; Hogenhout et al., 2008). Estudos como o de Costa et al. (2019a) constaram que a diminuição na produtividade pode chegar a 43% dependendo da incidência da doença, das condições climáticas e da suscetibilidade do híbrido ou linhagem.

O sistema de produção de sementes de milho híbrido em função da alta demanda tecnológica deve ter atenção especial (Costa et al., 2019b), pela sensibilidade das linhagens a condições ambientais adversas, ataques de pragas e doenças (Ferreira et al., 2013), que por seu caráter endogâmico podem contribuir para agravar o processo de deterioração das sementes e afetar negativamente a qualidade fisiológica das sementes (Oliveira et al., 2015b).

Portanto, dada a importância da cultura, todo o processo de produção e beneficiamento de sementes devem ser monitorados, para que campos de produção de sementes afetados com o complexo do enfezamento do milho não comprometam o vigor ou intensifiquem a deterioração de lotes de sementes de milho. Uma vez que sementes com variação na qualidade, resulta em maior competição intraespecífica pela menor capacidade competitiva das plantas não vigorosas, sendo estas dominadas pelas originadas de alto vigor, levando a desuniformidade na lavoura de milho, refletindo negativamente na produção por planta (Mondo et al., 2012).

Para isso, programas de controle de qualidade, melhoramento genético e órgãos de pesquisa com sementes contam com análises para identificar possíveis alterações no seu vigor, tais como mensurações dos atributos de qualidade física como massa, tamanho, uniformidade, coloração e pureza, pois as propriedades físicas influenciam na limpeza, classificação, secagem, massa de mil sementes, densidade, capacidade armazenamento e porosidade (Babic et al., 2013).

Destaque também para o atributo de qualidade fisiológico, como potencial germinativo sob condições ótimas e subótimas de temperatura e umidade, velocidade de emergência, comprimento e massa de plântulas. Esses atributos permitem avaliar o máximo do potencial germinativo das espécies, uma vez que se baseia em induzir a atividade metabólica para o crescimento do embrião por meio de condições ideais de temperatura, água, oxigênio e CO<sub>2</sub>, mas também avaliam seu desempenho por meio de teste que preconizam condições fora daquelas ditas como adequadas para a espécie, como observados no teste de vigor a frio, germinação a baixa temperatura (Krzyzanowski et al., 1999), envelhecimento acelerado, desempenho de plântulas (Pairochteerakul et al., 2018),

que possibilita distinguir lote de sementes de alto e baixo vigor (Brasil, 2009). Esses testes buscam respostas complementares as fornecidas pelo teste de germinação cujas manifestações dependem do vigor (Marcos Filho, 2015).

Ainda dentro da qualidade fisiológica, podem ser utilizadas análise bioquímicas de sementes que através da determinação da atividade de proteínas relacionadas a hidrólise de reservas como alfa e beta amilase, enzimas do sistema antioxidativo como superóxido dismutase, catalase, ascorbato peroxidase, malonaldeído, polifenoloxidase (Verma et al., 2015) e condutividade elétrica (Matthews e Powell, 2006), podem ser relacionadas com o desempenho germinativo das sementes que por sua vez são influenciados pelo ataque de pragas e patógenos (Mastouri et al., 2010). Sendo assim, estudos da atividade e perfil de proteínas e enzimas são utilizados para identificar genótipos mais tolerantes, pois, estão diretamente envolvidas nas respostas ao estresse das sementes e plântulas (Zenda et al., 2018).

Exemplo disso, são as alterações na homeostase de espécies reativas de oxigênio (EROs) como peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), radicais livres superóxido ( $O_2^-$ ) e hidroxilo ( $OH^-$ ) (Wojtyla et al., 2016). Uma vez que as EROs desempenham duplo papel na fisiologia das sementes, comportando-se por um lado, como atores de vias de sinalização celular da síntese de proteínas e substâncias precursora na mobilização de reservas benéficas para germinação, por outro lado, podem atuar como produtos fitotóxicos que se acumulam sob condições de estresse como provocados por pragas e patógenos (Mastouri et al., 2010), levando a ampla gama de biomoléculas a danos oxidativos, necroses, disfunção de membranas, proteínas, perda da viabilidade e morte celular (Bailly et al., 2008). Resultando na deterioração e perda da eficiência da germinação (Wang et al., 2015).

Nesse sentido, métodos que permitam a observação combinada dos dados de todos os testes, como a aplicação de métodos multivariados análise fatorial e análise de cluster nos atributos de qualidade podem ser uma alternativa eficiente para otimizar a avaliação, classificação e seleção de sementes vigorosas. A análise fatorial, visa condensar as informações contidas nas variáveis, explicando a variação com número reduzido de fatores com os maiores autovalores (Wijewardana et al., 2015). Enquanto a análise de cluster explora semelhanças entre indivíduos, unindo os que mostram semelhanças em agrupamentos, estabelecendo assim homogeneidade dentro do grupo e heterogeneidade entre grupos (Marinho et al., 2019).

Assim, a determinação dos atributos de qualidade física e fisiológica, junto as análises fatorial e de cluster podem auxiliar na seleção de lotes de sementes e materiais genéticos de milho com alto vigor e mais tolerantes ao complexo do enfezamento do milho. Além de identificar por meio da estatística multivariada as principais variáveis indicadoras de vigor.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Babic, L.J., Radojein, M., Pavkov, I., Babic, M., Turan, J., Zoranovic, M., Stanistic, S., 2013. Physical properties and compression loading behaviour of corn seed. *Int. Agrophysics* 27, 119–126. <https://doi.org/10.2478/v10247-012-0076-9>
- Bailly, C., El-Maarouf-Bouteau, H., Corbineau, F., 2008. From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology. *Comptes Rendus - Biol.* 331, 806–814. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2008.07.022>.
- Brasil, 2009. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária, Coordenação de Laboratório Vegetal. Regras para análise de sementes. Brasília, 2009. ISBN 978-85-99851-70-8.
- Conab – Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos. 2019. v.7, Safra 2019/20, n.1, Primeiro levantamento, outubro, 2019.
- Costa, L.B.O., Carvalho, I.R., Ferreira, L.L., Szarecki, V.J., Pimentel, J.R., Troyjack, C., Barbosa, M.H., Da Silva, J.A.G., Conte, G.G., Villela, F.A., Pedó, T., Aumonde, T.Z., 2019a. The effects of different mechanical detasseling methods on hybrid maize seed production. *Genet. Mol. Res.* 18, 1–8. <https://doi.org/10.4238/gmr18207>.
- Costa, L.B.O., Carvalho, I.R., Ferreira, L.L., Szarecki, V.J., Pimentel, J.R., Troyjack, C., Barbosa, M.H., Da Silva, J.A.G., Conte, G.G., Villela, F.A., Pedó, T., Aumonde, T.Z., 2019b. The effects of different mechanical detasseling methods on hybrid maize seed production. *Genet. Mol. Res.* 18, 1–8. <https://doi.org/10.4238/gmr18207>.
- Dowd, P.F., & Johnson, E., 2018. Overexpression of a maize (*Zea mays*) defensin-like gene in maize callus enhances resistance to both insects and fungi. *Agri Gene*, 9, 16–23. doi:10.1016/j.aggene.2018.07.003.
- Ferreira, V. de F., Oliveira, J.A., Ferreira, T.F., Reis, L.V., Andrade, V. de, Costa Neto, J., 2013. Quality of maize seeds harvested and husked at high moisture levels. *J. Seed Sci.* 35, 276–283. <https://doi.org/10.1590/s2317-15372013000300001>.
- Hogenhout S.A., Oshima K., Ammar E.D., Kakizawa S., Reino H.N., Namba S. 2008. Phytoplasmas: bacteria that manipulate plants and insects 9, 403–423. <https://doi.org/10.1111/J.1364-3703.2008.00472.X>.

- Junqueira, A., Bedendo, I., Pascholati, S., 2004. Biochemical changes in corn plants infected by the maize bushy stunt phytoplasma. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 65, 181–185. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2005.01.005>.
- Krzyzanowski, F.C., Vieira, R.D., França-Neto, J.B., 1999. Vigor de sementes: conceitos e testes. *Abrates, Londrina.*, 1-218.
- Lee, I., Davis, R.E., Gundersen-Rindal D.E., 2000. Phytopathogenic Mollicutes. *Annu. Rev. Microbiol.* 54, 221–255.
- Marcos-Filho, J., 2015. Seed vigor testing: An overview of the past, present and future perspective. *Sci. Agric.* 72, 363–374. <https://doi.org/10.1590/0103-9016-2015-0007>.
- Marinho, J. de L., Costa, D.S. da, Carvalho, D.U. de, Cruz, M.A. da, Zucareli, C., 2019. Evaluation of vigor and tolerance of sweet corn seeds under hypoxia. *J. Seed Sci.* 41, 180–186. <https://doi.org/10.1590/2317-1545v41n2209568>.
- Mastouri, F., Björkman, T., Harman, G.E., 2010. Seed treatment with *Trichoderma harzianum* alleviates biotic, abiotic, and physiological stresses in germinating seeds and seedlings. *Phytopathology* 100, 1213–1221. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-03-10-0091>.
- Matthews, S., Powell, A., 2006. Electrical conductivity vigour test: physiological basis and use. *Seed Test. Int.* 131, 32–35.
- Mondo, V.H.V., Cicero, S.M., Dourado-Neto, D., Pupim, T.L., Dias, M.A.N., 2012. Vigor de sementes e desempenho de plantas de milho. *Rev. Bras. Sementes* 34, 143–155. <https://doi.org/10.1590/S0101-31222012000100018>.
- Oliveira, C.M. De, Oliveira, E. De, Souza, I.R.P. De, Alves, E., Dolezal, W., Paradell, S., Lenicov, A.M.M.D.R., Frizzas, M.R., 2013. Abundance and Species Richness of Leafhoppers and Planthoppers (Hemiptera: Cicadellidae and Delphacidae) in Brazilian Maize Crops. *Florida Entomol.* 96, 1470–1481. <https://doi.org/10.1653/024.096.0427>.
- Oliveira E., Landau E.C., Souza S.M., 2015a. Simultaneous transmission of phytoplasma and spiroplasma by *Dalbulus maidis* leafhopper and symptoms of infected maize. *Phytopat Mollicutes* 5, 99-100. <http://dx.doi.org/10.5958/2249-4677.2015.00042.0>.
- Oliveira, G.E., Von Pinho, E.V.R., Andrade, T., Souza, J.C., Caixeta, F., Ferreira, R.A.D.C., 2015b. Relationship among physiological quality, heterosis, and amylase gene expression in maize seeds. *Genet. Mol. Res.* 14, 8623–8633. <https://doi.org/10.4238/2015.July.31.10>.
- Oshima, K., Maejima, K., Namba, S., 2013. Genomic and evolutionary aspects of phytoplasmas 4, 1–8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00230>.

- Pairochteerakul, P., Jothityangkoon, D., Ketthaisong, D., Simla, S., Lertrat, K., Suriharn, B., 2018. Seed germination in relation to total sugar and starch in endosperm mutant of sweet corn genotypes. *Agronomy* 8. <https://doi.org/10.3390/agronomy8120299>.
- Pérez-López, E., Olivier, C.Y., Luna-Rodríguez, M., Rodríguez, Y., Iglesias, L.G., Castro-Luna, A., Adame-García, J., Dumonceaux, T.J., 2016. Maize bushy stunt phytoplasma affects native corn at high elevations in Southeast Mexico. *Eur. J. Plant Pathol.* 145, 963–971. <https://doi.org/10.1007/s10658-016-0883-0>.
- Verma, G., Mishra, S., Sangwan, N., Sharma, S., 2015. Reactive oxygen species mediate axis-cotyledon signaling to induce reserve mobilization during germination and seedling establishment in *Vigna radiata*. *J. Plant Physiol.* 184, 79–88. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2015.07.001>.
- United States Department of Agriculture (USDA)., 2019. World agricultural production. Circular Series WAP 11-19.
- Wang, W.Q., Liu, S.J., Song, S.Q., Møller, I.M., 2015. Proteomics of seed development, desiccation tolerance, germination and vigor. *Plant Physiol. Biochem.* 86, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.11.003>.
- Wijewardana, C., Hock, M., Henry, B., Reddy, K.R., 2015. Screening corn hybrids for cold tolerance using morphological traits for early-season seeding. *Crop Sci.* 55, 851–867. <https://doi.org/10.2135/cropsci2014.07.0487>.
- Wojtyla, L., Lechowska, K., Kubala, S., Garnczarska, M., 2016. Different modes of hydrogen peroxide action during seed germination. *Front. Plant Sci.* 7, 1–16. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00066>.
- Wu, X., Ning, F., Hu, X., Wang, W., 2017. Genetic modification for improving seed vigor is transitioning from model plants to crop plants. *Front. Plant Sci.* 8, 1–7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00008>.
- Zenda, T., Liu, S., Wang, X., Jin, H., Liu, G., Duan, H., 2018. Comparative proteomic and physiological analyses of two divergent maize inbred lines provide more insights into drought-stress tolerance mechanisms. *Int. J. Mol. Sci.* 19. <https://doi.org/10.3390/ijms19103225>.

## 2. OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi investigar por meio da abordagem multivariada dos atributos de qualidades físicas e fisiológicas, alterações no vigor de sementes de diferentes híbridos e níveis de severidade decorrentes do complexo do enfezamento do milho, com intuito de selecionar sementes de alto vigor e híbridos mais tolerantes ao enfezamento do milho. Além de identificar por meio da estatística multivariada as principais variáveis indicadoras de vigor.

# CAPÍTULO I: Abordagem multivariada da qualidade física e fisiológica de sementes de milho híbrido afetadas por Molicutes e MRFV

(Normas de acordo com a revista *Industrial Crops and Products*)

## 1. Introdução

Com produção mundial superior a 1.125 milhões de toneladas, o milho (*Zea mays* L.) é considerado uma das culturas mais importantes, difundidas e produzidas em todo o planeta (Dowd e Johnson, 2018; USDA, 2019). Grande parte desse sucesso deve-se a utilização de sementes de qualidade que dão origem as plântulas vigorosas no campo (Marcos Filho, 2015a). Entretanto, fatores bióticos relacionados com a fitossanidade da cultura como o complexo do enfezamento do milho registrado em vários países produtores da região tropical e subtropical do continente americano (Lee et al., 2000; Pérez-López et al., 2016), podem comprometer a produtividade, pois a doença sistêmica infectam tecidos vasculares causando distúrbios a fisiologia, metabolismo e ao desenvolvimento das plantas de milho (Lamichhane et al., 2018; De-Oliveira et al., 2018).

Transmitida através do inseto vetor cigarrinha-do-milho *Dalbulus maidis*, a doença do enfezamento do milho é desencadeada pela infecção simultânea dos molicutes fitoplasma (*Maize bushy stunt phytoplasma*), espiroplasma (*Spiroplasma kunkelli*) e o vírus da risca do milho (*Maize rayado fino virus*) (MRFV) (Oliveira et al., 2013a; Torres-Moreno et al., 2015). A severidade e os danos da doença no campo podem variar de acordo com a quantidade de vetores contaminados (Moya-Raygoza et al., 2007) e suscetibilidade das linhagens ou dos híbridos, ocasionando a redução com diferentes intensidades no desenvolvimento das espigas e na produção do cereal (Pérez-López et al., 2016; De-Oliveira et al., 2018).

Estudos como o de Costa et al. (2019) constaram que a diminuição na produtividade pode chegar a 43% dependendo da incidência da doença, das condições

climáticas e da suscetibilidade do híbrido ou linhagem. O que torna eminente a necessidade de investigar os efeitos danosos da doença sob o vigor de sementes provenientes de plantas afetadas pelo patógeno. Principalmente, quando se trata da produção de sementes híbridas de milho em razão da utilização de linhagens puras homozigóticas que apresentam atividade transcriptoma e metabólica inferior se comparados com híbridos (Oliveira et al., 2015). Tornando-os mais suscetíveis ao ataque de pragas e patógenos.

Assim, visto há escassez de informações por se tratar de uma doença com surtos epidêmicos apenas recentes (Costa et al., 2019), análises da qualidade física e fisiológica, associadas aos métodos estatísticos multivariados, podem permitir compreender quais são as prováveis alterações no desempenho das sementes provenientes de campos afetados pela doença. Como as análises físicas, fisiológicas que levam em consideração a uniformidade, massa, tamanho, cor, densidade (Babic et al., 2013), potencial germinativo, desenvolvimento de plântulas, resistência as condições de estresse (Finch-Savage e Bassel, 2015; Grzybowski et al., 2015), lixiviação de eletrólitos (Silva et al., 2019), atividade de enzimas antioxidantes e compostos secundários de proteção (Verma et al., 2015) e a atividade de enzimas hidrolíticas de reserva (Oliveira et al., 2015), podem ser utilizadas para identificar aquelas com maior potencial indicador de vigor de sementes é híbridos tolerantes a doença.

Com isso, diante do grande número de dados fornecidos com o estudo dos atributos da qualidade, investigá-los de forma individual pode dificultar a interpretação do comportamento dos tratamentos. Nesse cenário, métodos estatísticos complexos como as técnicas estatísticas multivariadas se fazem necessárias pois ampliam as possibilidades de exploração das informações (Lorentz e Nunes, 2013), fornecem uma visão holística sobre o que as variáveis representam, e seu comportamento em razão de permitir visualizar e analisar grandes matrizes de dados complexos de forma simultânea, a exemplo da análise fatorial (FA) e análise de cluster (CA), facilitando a interpretação dos dados (Mingoti, 2005; Gergen e Harmanescu 2012).

Com base nas cargas fatoriais da FA é possível entender como certas variáveis físicas e fisiológicas das sementes se caracterizam e se associam entre si em função dos híbridos, permitindo identificar quais são as análises mais relevantes para distinguir alterações na qualidade das sementes (Wijewardana et al., 2015). Enquanto a CA explora as semelhanças entre os indivíduos ou objetos, unindo na forma de grupos hierárquicos que mostram semelhanças, estabelecendo assim a homogeneidade dentro do grupo e a

heterogeneidade entre os grupos, o que ajuda a elucidar como os diferentes atributos e híbridos se comportam (Silva-Torres et al., 2006; Marinho et al., 2019).

Embora tanto a FA quanto a CA sejam ferramentas amplamente utilizadas na segregação de genótipos de milho dentro do melhoramento genético de plantas, ainda é incipiente sua exploração na área de qualidade de sementes, principalmente no que se refere ao complexo do enfezamento, enfatizando a necessidade de desenvolver estudos com esse enfoque.

Considerando o potencial de uso da abordagem multivariada para compreender a severidade dos mollicutes e MRFV sobre a qualidade física e fisiológica de sementes de milho, o estudo teve como objetivo testar a hipótese de que a abordagem multivariada dos atributos de qualidade de sementes é de grande valia para identificar e agrupar níveis de vigor de sementes, além de eleger os híbridos mais tolerantes e as variáveis com maior potencial indicador de mudança no vigor de sementes híbridas com diferentes níveis de severidade do complexo do enfezamento do milho (mollicutes e MRFV). O que permitirá ajudar produtores, pesquisadores e sementeiras a compreenderem o efeito da doença sobre o vigor de sementes provenientes de campos que foram atingindo pelo patógeno. E dar subsídio aos programas de controle de qualidade e melhoramento genético na seleção de sementes de alto vigor e híbridos mais tolerantes ao complexo do enfezamento do milho.

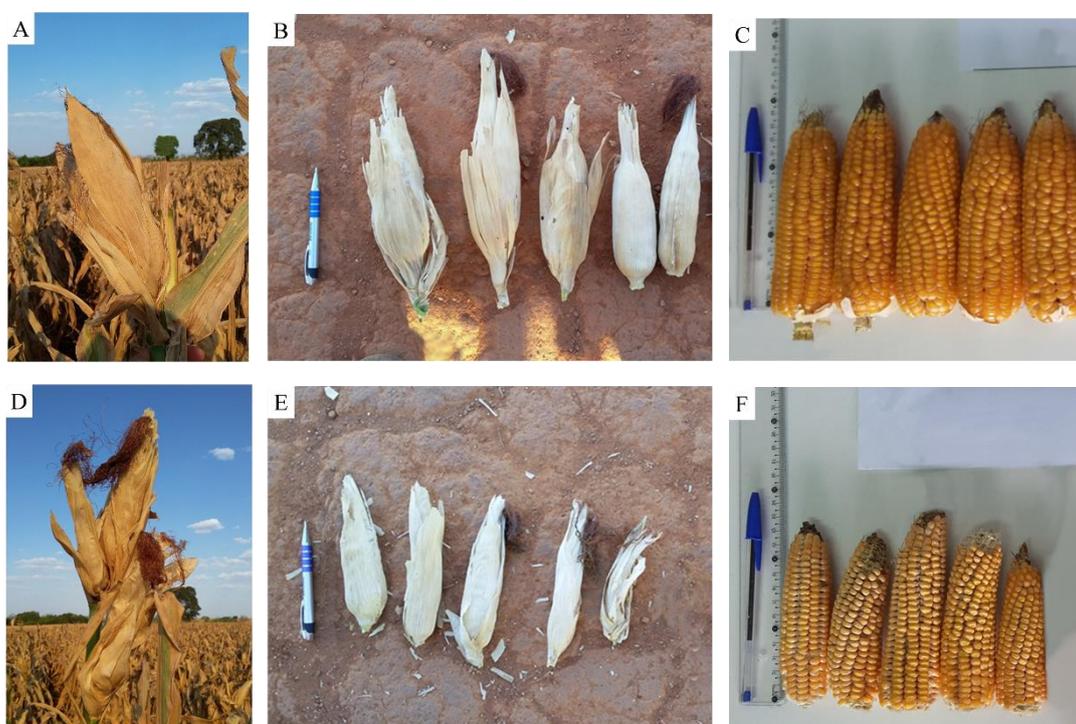
## **2. Material e Métodos**

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Sementes do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano (IF Goiano), localizado no município de Rio Verde, GO, Brasil.

Sementes de três híbridos simples, provenientes do cruzamento entre linhagens puras, denominados Híbrido 1 (H1), Híbrido 2 (H2) e Híbrido 3 (H3), foram utilizadas neste estudo, todos de grão tipo semiduro, coloração alaranjado, com aptidão para produção de grãos, ciclo precoce. Os híbridos foram oriundos de três campo de produção de sementes da zona rural do município de Paraúna (com a seguinte localização: campo do híbrido 1: 17°02'33.2"S 50°25'08.8"O, campo do híbrido 2: 17°02'26.6"S 50°24'43.8"O, campo do híbrido 3: 17°00'16.1"S 50°20'50.9"O), na região do sudoeste

do estado do Goiás, Brasil. Os campos foram semeados no mês de maio e colhidos no mês de julho da safra de inverno de 2017.

As espigas das plantas de milho foram selecionadas a partir de campos que apresentavam o inseto vetor, a cigarrinha *Dalbulus maidis*, e foram diagnosticadas com as seguintes sintomatologias do complexo do enfezamento do milho: plantas com internódios mais curtos, estriamento e seca prematura de folhas, em alguns casos foram observadas plantas com superbrotamento de espigas, espigas menores, mais leves, com sementes chochas, ausentes ou mal formadas e de coloração visualmente menos alaranjada em relação a plantas assintomáticas dentro do mesmo campo de produção de semente do híbrido (Fig. 1).



**Fig. 1.** Espigas provenientes de plantas saudáveis com desenvolvimento normal, oriundas de plantas com ausência dos sintomas do complexo do enfezamento do milho (molicutes e MRFV) (Fig. 1A, B e C). Espigas com sintomas da doença, embonecamento, subdesenvolvimento e descoloração de espigas e sementes proveniente de plantas com sintomas do complexo do enfezamento do milho (Fig. 1D, E e F). Ambas as espigas (com e sem sintomas da doença) oriundas do mesmo campo de produção.

Para cada um dos três híbridos, realizou-se a incidência do complexo do enfezamento do milho nas espigas, determinada com base na média do percentual de espigas em 10 kg de amostra  $ha^{-1}$ , escolhidas de forma aleatória, de cada campo de produção com sintomas da doença (Tabela 1). A severidade do complexo do enfezamento do milho foi determinada durante o recebimento das mesmas em uma unidade de beneficiamento de sementes (UBS), atribuindo-se níveis referentes aos sintomas das

espigas da amostra em: sadias (ausência de sintomas), severidade média e severidade alta do complexo do enfezamento, classificação essa que levou em consideração aspectos biométricos como comprimento e diâmetro de espigas e visuais como aparente perda de coloração alaranjada das sementes provenientes de espigas com sintomas (Tabela 2). De acordo com protocolo estabelecido pelo controle de qualidade da UBS adaptado para espigas, do trabalho de Silva et al. (2003).

### **Tabela 1**

Incidência média do complexo do enfezamento do milho (molicutes e MRFV) nas espigas dos campos de produção de sementes utilizadas.

Campo de produção de sementes	Sadio	Severidade média	Severidade Alta
	(Porcentagem em 10 kg ha <sup>-1</sup> )		
Campo do Híbrido 1	78	14	8
Campo do Híbrido 2	72	16	12
Campo do Híbrido 3	75	15	10

### **Tabela 2**

Classificação em níveis de severidade de espigas, considerando aspectos biométricos como comprimento e diâmetro de espigas, e coloração de sementes de espigas provenientes de plantas de campo de produção com sintomas do complexo do enfezamento do milho.

Níveis de severidade de espigas	Descrição, caracterização do desenvolvimento das espigas
Sadio	Espigas com ausência de sintomas, com 12 a 14 cm de comprimento, 4 a 5 cm de diâmetro e coloração visual alaranjada*.
Severidade média	Espigas comprometidas pelo complexo do enfezamento com 10 a 12 cm de comprimento, 3 a 4 cm de diâmetro e coloração aparente menos alaranjada em relação ao nível sadio.
Severidade alta	Espigas comprometidas pelo complexo do enfezamento com 8 a 10 cm de comprimento, 2 a 3 cm de diâmetro e coloração aparente menos alaranjada em relação ao nível sadio.

\*Após a classificação prévia por meio de diagnose visual da mudança na coloração, as sementes foram submetidas a leitura das coordenadas colorimétricas, croma e ângulo de cor Hue para aferir a existência de alteração na coloração alaranjada das sementes dos tratamentos.



**Fig. 2.** Classificação da severidade de espigas em sadias, severidade média e severidade alta do complexo do enfezamento do milho (molicutes e MRFV).

As sementes de cada tratamento (três híbridos com três níveis de severidade) descritos acima com detalhes, foram colhidas nos campos de produção manualmente, ainda na espiga com 28% de teor de água e submetidas a secagem separadas por tratamento, em câmara de secagem estacionária apropriada para espigas a temperatura de 35°C, até atingirem aproximadamente 10,5% de teor de água (Tabela 3), seguindo o procedimento operacional padrão da UBS. Em seguida, as espigas foram debulhadas manualmente e armazenadas em câmara fria a 10°C, até a realização dos testes de qualidade. O teor de água das sementes foi determinado conforme metodologia prescrita nas Regras para Análise de Sementes - RAS (Brasil, 2009), utilizando o método da estufa, a  $105 \pm 3^\circ\text{C}$ , durante 24 horas, sendo os resultados expressos em porcentagem.

**Tabela 3**

Teor de água de sementes provenientes de três híbridos de milho (H1, H2 e H3) apresentando três níveis de severidade de espigas (sadio, severidade média e severidade alta) e abreviação dos tratamentos.

Híbrido	Nível	Abreviação	Teor de Água da Sementes
H1	Sadio	H1S	10,0%
	Severidade média	H1M	10,8%
	Severidade alta	H1H	10,7%
H2	Sadio	H2S	10,4%
	Severidade média	H2M	10,9%
	Severidade alta	H2H	10,6%
H3	Sadio	H3S	10,5%
	Severidade média	H3M	10,2%
	Severidade alta	H3H	10,8%

Neste estudo, a qualidade das sementes foi avaliada por meio de 37 atributos, sendo 13 físicos e 24 fisiológicos.

### 2.1. Atributos de qualidade física

A massa de mil sementes (TSM) foi determinada por meio da contagem de oito replicatas de 100 sementes, com quatro repetições, provenientes da porção de sementes pura. Ao final das pesagens realizou-se a média e proporção para 1000 sementes (Brasil, 2009).

A biometria de sementes foi obtida com o auxílio de um paquímetro de precisão 0,01 mm. Foram medidos os eixos ortogonais, comprimento (Len), largura (Wid) e a espessura (Thi) de 50 sementes de milho com quatro repetições para cada tratamento. Utilizando os eixos ortogonais das sementes de milho e por meio de equações foram determinados: diâmetro geométrico médio ( $D_g$ ):  $D_g = (Len * Wid * Thi)^{1/3}$ , área superficial (S):  $S = \pi * D_g$ , volume de sementes ( $V_g$ ):  $V_g = [((\pi (Len * Wid * Thi))/6)]$ . E a massa específica unitária (SUM) de sementes, expressa em  $kg\ m^{-3}$ , calculada indiretamente pela relação SUM e  $V_g$  (Mohsenin, 1986; Coradi et al., 2016).

Avaliações colorimétricas das sementes foram realizadas pela leitura direta de refletância das seguintes coordenadas: luminosidade (L), índice de cor A (A), índice de cor B (B), empregando o colorímetro *ColorFlex EZ*, com sistema Hunter de cor, com quatro repetições. De posse dos índices colorimétricos foram calculados o índice de intensidade ou pureza do tom (croma) (C), por meio da equação  $C = [(A^2 + B^2)]$ , e o ângulo de cor Hue (H), por meio da equação  $H = [tan^{-1}(B/A)]$  (Hill et al., 1997; Khamphan et al., 2018).

### 2.2. Atributos de qualidade fisiológica

As sementes aos testes fisiológicos, foram submetidas a tratamento químico prévio com fungicida Maxim Advanced® (Fludioxonil 2,5% + Metalaxyl-M 2,0% + Thiabendazole 15,0%) 150 mL, os inseticidas K-Obiol 250 SC® (Deltamethrin 2,5%) 8,0 mL e Actelic 50 EC® (Pirimifos-methyl 50%) 1,6 mL considerando a proporção para 100 kg de sementes, a fim de evitar a proliferação de fungos e infestação de pragas.

No teste de germinação a semeadura foi realizada em folhas de papel germitest, umedecidos com água destilada, em quantidade equivalente a 2,5 vezes a massa do substrato seco com quatro repetições de 50 sementes. Os rolos foram mantidos em B.O.D. (*Biochemical Oxygen Demand*) regulada à temperatura de 25°C, com fotoperíodo de 12/12 h (Brasil, 2009). A porcentagem de plântulas germinadas normais (representada por plântulas que possuíam todas as estruturas essenciais desenvolvidas como sistema radicular, parte aérea e coleóptilo sem nenhum tipo de dano, bem desenvolvidas, completas, proporcionais e sadias) foram computadas na primeira contagem da germinação ao 4º dia (G4) e na contagem final ao 7º dias (G7). Foram contabilizadas também durante a contagem final, além das plântulas normais, as plântulas anormais (aquelas que não mostram potencial para continuar seu desenvolvimento e dar origem a plantas normais, mesmo crescendo em condições favoráveis), sementes duras (sementes que permanecem sem absorver água por um período mais longo que o normal e se apresentam, portanto, no final do teste com aspecto de sementes recém-colocadas no substrato, não intumescidas) e mortas (sementes que no final do teste não germinaram, não estão duras, apresentam-se amolecidas e não apresentam nenhum sinal de início de germinação) (Brasil, 2009).

No teste de frio (CT), primeiramente foi confeccionado o teste de germinação de acordo com Brasil (2009). Os rolos foram colocados em sacos plásticos, vedados e mantidos durante sete dias a 10°C, decorrido esse período foram transferidos para o germinador, a 25°C por um período de quatro dias e, em seguida foram efetuadas a contagem de plântulas normais (Barros et al., 1999; Brasil, Egli e Rucker, 2012).

O teste de germinação a baixa temperatura foi realizado de acordo com Brasil (2009), mantidos à temperatura de 18°C por 7 dias. A avaliação da porcentagem das plântulas normais germinadas a baixa temperatura foi realizada no quarto dia (GL4) e no sétimo (GL7), após a instalação do teste (Dias e Alvarenga, 1999).

O teste de envelhecimento acelerado (AA) foi realizado pelo método do “gerbox”, com quatro repetições. Em cada uma das quatro gerbox foram colocadas 50 sementes sobre uma tela de aço inox e no fundo do gerbox, colocados 40 mL de água destilada. Posteriormente, foram colocadas em B.O.D. regulada a temperatura de 42°C, e permaneceram por 96 horas (Marcos Filho, 1999; Marcos Filho, 2015b). Transcorrido esse período, cada repetição de 50 sementes foi semeada, conforme descrição para o teste de germinação, e as plântulas normais foram avaliadas no 4º dia (Brasil, 2009).

O desempenho de plântulas foi averiguado via testes de germinação, realizado de acordo com Brasil (2009), com modificações, sendo semeada 10 sementes por rolo em papel germitest no terço superior das folhas, com quatro repetições por tratamento. Na primeira leitura do teste, no quarto dia após a semeadura, foram aferidas o comprimento de parte aérea (SL) e radícula (RL) das plântulas com uso de régua milimétrica, em seguida as estruturas de reserva foram destacadas obtendo apenas as plântulas, que foram separadas a parte aérea do sistema radicular e colocadas em estufa a 80°C por 24 horas. Logo após, colocou-se para resfriar em dessecador e pesadas em uma balança de precisão 0,001 g. A massa obtida foi dividida pelo número de plântulas para se obter a massa médio da matéria seca por plântula da parte aérea (SDM) e do sistema radicular (RDM) (Nakagawa, 1999; Soleymani, 2017). A relação entre massa de parte aérea por milímetro (SDMSL), e a relação massa de radícula por milímetro (RDMRL) ( $\text{mg mm}^{-1}$ ) foram obtidas dividindo seu comprimento com a sua massa respectivamente.

### 2.3. Análises bioquímica

A condutividade elétrica (EC) foi realizada conforme descrito por Vieira e Krzyzanowski (1999), utilizando quatro amostras de 25 sementes de cada tratamento. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$  de sementes.

A atividade das enzimas foi realizada a partir de amostras de 30 sementes inteiras (embrião/endosperma) de milho de cada tratamento, esterilizadas superficialmente com hipoclorito de sódio a 2,5% (v/v) por 15 minutos e lavadas e enxaguadas em água destilada. As sementes foram armazenadas individualmente em papel alumínio e mantidas em nitrogênio ( $\text{N}_2$ ) líquido, em seguida, armazenadas em ultrafreezer a  $-80^\circ\text{C}$  para posterior análise.

A obtenção do extrato enzimático utilizados na determinação da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX), peroxidases (POX), polifenoloxidase (PPO), fenilalanina amônia-liase (PAL),  $\alpha$ -amilase ( $\alpha$ -amy) e  $\beta$ -amilase ( $\beta$ -amy) foi realizada a partir de 0,200 a 0,250 g de sementes maceradas em  $\text{N}_2$  líquido das que haviam sido armazenadas no ultrafreezer a  $-80^\circ\text{C}$ , homogeneizadas em 2 mL de tampão fosfato de potássio (100 mM) (pH 6,8), contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1 mM, polivinilpirrolidona (PVPP) 5% (m/v) e fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) 1 mM. O homogeneizado foi mantido *overnight*

durante 14 h na geladeira a 10°C e em seguida centrifugado a  $12000 \times g$ , por 15 min, a 4°C, sendo o sobrenadante foi usado como extrato para as determinações enzimáticas.

A atividade da SOD foi determinada segundo metodologia proposta por Giannopolitis e Ries (1977). Uma unidade da SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a fotoredução do NBT (Beauchamp e Fridovich, 1971). A atividade da SOD foi expressa em unidades de SOD  $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$  de proteína.

A atividade da Catalase (CAT) foi determinada pelo método de Cakmak e Marschner (1992). O coeficiente de extinção molar de  $36 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Anderson et al., 1995) foi usado para determinar a atividade da CAT, a qual foi expressa em  $\text{mmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  de proteína.

A atividade da APX foi determinada pelo método de Nakano e Asada (1981). O coeficiente de extinção molar de  $2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Nakano e Asada, 1981) foi usado para calcular a atividade da APX, expressa em  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  de proteína.

A atividade da POX foi determinada pela oxidação do pirogalol, de acordo com a metodologia proposta por Kar e Mishra (1976). O coeficiente de extinção molar de  $2,47 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Chance e Maehley, 1955) foi usado para calcular a atividade da POX, que foi expressa em  $\mu\text{mol}$  de purpurogalina produzida  $\text{min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  de proteína.

A atividade da polifenoloxidase (PFO) foi determinada conforme metodologia proposta por Kar e Mishra (1976). O coeficiente de extinção molar de  $2,47 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Chance e Maehley, 1955) foi usado para calcular a atividade da PFO, que foi expressa em  $\mu\text{mol}$  de purpurogalina produzida  $\text{min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  de proteína.

A atividade da fenilalanina amônia-liase (PAL) foi determinada de acordo com a metodologia proposta por Guo et al. (2007), com algumas modificações. A reação foi iniciada após a adição de 200  $\mu\text{L}$  do extrato de tecidos de reservas e embrionários das sementes ao meio de reação constituído de tampão TRIS-HCl 50 mM (pH 8,8) e *L*-fenilalanina 30 mM em um volume de 800  $\mu\text{L}$ . A mistura da reação foi incubada em banho-maria a 37°C durante 1 h. Após esse período, a reação foi paralisada pela adição de 25  $\mu\text{L}$  de HCl 6 N. A absorvância dos derivados do ácido trans-cinâmico foi determinada a 290 nm e o coeficiente de extinção molar de  $100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  foi usado para calcular a atividade da PAL (Zucker, 1965).

Para determinação da concentração de compostos fenólicos solúveis totais (TSPC), amostras de 0,200 a 0,250 g de tecidos de reserva e embrionário das sementes foram maceradas com  $\text{N}_2$  líquido até a obtenção de um pó fino, ao qual foi adicionado 2 mL de metanol 80% e mantidos em repouso por 1 h, em seguida a solução foi centrifugada

a 17.000 g por 30 min. O sobrenadante foi utilizado como extrato metanólico para a determinação da concentração de TSPC. A concentração de TSPC foi determinada através do método desenvolvido por Zieslin e Ben-Zaken (1993) com algumas modificações. A reação foi iniciada com a adição de Fenol Folin-Ciocalteu 150  $\mu\text{L}$  (1:3) do extrato metanólico e mantido a 25°C por 7 min. Em seguida, adicionou-se à solução carbonato de sódio na concentração de 10%, que permaneceu incubada por 10 min a 25°C. Logo após, 300  $\mu\text{L}$  de água destilada foi adicionada à mistura, e procedeu-se novamente a incubação a 25°C por 1 h. A absorbância foi lida a 725 nm.

A atividade da  $\alpha$ -amilase ( $\alpha$ -amy) e  $\beta$ -amilase ( $\beta$ -amy) foi determinada pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico 1% (DNS), segundo descrito por Bernfeld (1955), Tárrago e Nicolás (1976) e Kishorekumar et al. (2007). Os açúcares redutores formados pela ação da alfa e beta amilase foram quantificados pela leitura da absorbância em 540 nm e os cálculos foram realizados utilizando a curva padrão de maltose 0,5  $\text{mg}^{-1} \text{mL}^{-1}$  2% (Bernfeld, 1955; Tárrago e Nicolás, 1976; Kishorekumar et al., 2007).

A concentração de proteínas totais foi determinada pela adição de 10  $\mu\text{L}$  dos extratos brutos utilizados na determinação da atividade enzimática das sementes em 1190  $\mu\text{L}$  de solução de Bradford, as absorbâncias foram determinadas a 595 nm (Bradford 1976) expressa em  $\text{g.g}^{-1}$ .

Determinação da concentração de aldeído malônico (MDA) foi realizada conforme descrito por Cakmak e Horst (1991). A absorbância inespecífica foi mensurada a 600 nm e subtraída do valor da absorbância específica. A concentração de MDA foi calculada usando o coeficiente de extinção de 155  $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$  e foi expressa em  $\mu\text{mol kg}^{-1}$  de massa fresca (Heath e Packer, 1968).

#### *2.4. Análises estatística*

Todos os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente ao acaso (DIC), com quatro repetições por tratamento, em arranjo fatorial 3 x 3, consistindo de três híbridos (H1, H2 e H3) x sementes provenientes de três níveis de severidade de espigas (sadio, severidade média e severidade alta). Todas as variáveis de qualidade (física e fisiológica) foram submetidas à análise de variância.

Utilizou-se os métodos de análises multivariadas análise fatorial e análise em cluster realizadas a partir das médias dos resultados das quatro repetições de cada tratamento para cada variável. Para FA foram realizadas a padronização dos dados por

meio do  $((\text{valor observado} - \text{média}) / \text{desvio})$ . Em seguida, realizou-se a correlação fenotípica das variáveis e partir da matriz de correlação, os autovalores e autovetores foram calculadas e então obtidas as cargas fatoriais para os híbridos e para as variáveis. Os resultados foram plotados em gráfico de dispersão com base nos valores obtidos para os dois fatores de maior relevância, fator I e fator II.

Para a seleção dentre as 37 variáveis realizadas, optou-se como critério as maiores cargas fatoriais (acima de 0,9), provenientes do fator com maior autovalor, fator I, ou seja, as variáveis com o maior poder de explicação, representatividade e importância. Além do teste padrão de germinação final sétimo dia (G7) que serviu como base de comparação. As médias das variáveis selecionadas foram comparadas pelo teste de Scott-knott ( $p < 0.05$ ).

Para as análises de agrupamento foram empregados o modelo hierárquico, através do cálculo de distância euclidiana, e, utilizou-se como critério de seleção do modelo de agrupamento com a maior correlação cofenética e adequação aos dados. Os coeficientes de correlação cofenética foram obtidos comparando-se as matrizes de dissimilaridade com os modelos de agrupamento, as informações foram expressas na forma de dendograma hierárquico sendo um para as observações (tratamentos - híbridos com diferentes níveis de severidade) e outro para as variáveis (atributos de qualidade física e fisiológica).

O software computacional R versão 3.5.1. e os pacotes MVar.pt e ExpDes.pt foram utilizados para realizar todas as análises e gráficos (Ferreira et al., 2014; R Development Core Team, 2016; Ossani et al., 2019).

### **3. Resultados**

#### *3.1. Germinação*

Ao 7º dia, após a semeadura do teste de germinação, o híbrido H1 apresenta, de modo geral, maior desempenho germinativo em comparação aos demais, independentemente do nível de severidade das espigas (Tabela 4). As sementes oriundas de espigas com desenvolvimento normal, sadio, tiveram as maiores médias de germinação em relação aos demais níveis tanto no híbrido 1 quanto no 3, ao passo que para o híbrido 2 não houve diferença entre as sementes providas dos níveis sadio e com

severidade média. No entanto, o nível com alta severidade apresentou menor potencial germinativo do que o nível de severidade sadio e média. É digno de nota que a queda desse potencial ocorreu de forma mais drástica no híbrido 2, que exibiu queda de 90 para 36% (Tabela 4).

**Tabela 4**

Médias da porcentagem de germinação ao 7º dia (G7) das sementes provenientes de espigas com três níveis de severidade (sadio, severidade média, severidade alta) do complexo do enfezamento do milho (molicutes e MRFV) de três híbridos de milho (H1, H2 e H3).

Nível	G7 (%)		
	Híbrido		
	H1	H2	H3
Sadio	96Aa <sup>1</sup> ± 1,50*	91Ba ± 2,84	90Ba ± 0,82
Severidade média	90Ab ± 1,41	88Aa ± 2,29	80Bb ± 1,50
Severidade alta	91Ab ± 1,29	38Cb ± 1,06	74Bc ± 0,96

<sup>1</sup>Valores seguidos de mesma letra maiúsculas na linha comparam as médias dos híbridos entre si, e minúscula na coluna comparam as médias entre os níveis de severidade e não diferem entre si segundo o teste de Scott – Knott ( $p < 0,05$ ). <sup>2</sup>Erro padrão.

### 3.2. Análise fatorial

A análise fatorial evidenciou que as porcentagens da variação dos autovalores dos dois principais fatores I e II acumulados foram responsáveis por explicarem 76,93% de toda a variação dos dados, pertencendo 64,25% ao fator I e 12,68% do fator II (Tabela 5). A partir do segundo componente principal os autovalores apresentam estabilização e representam apenas pequena fração do restante da variância (Fig. 3).

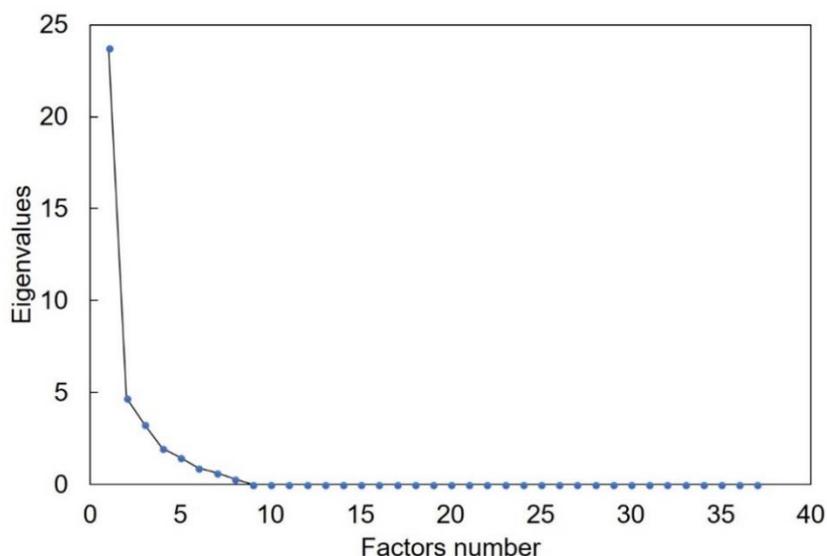
**Tabela 5**

Classificação dos fatores, autovalores, porcentagem da variância e porcentagem acumulada da variância gerada para avaliar a qualidade de sementes de milho híbridas afetadas pelo complexo do enfezamento (molicutes e MRFV).

Fator	Autovalores	Porcentagem da variância	Porcentagem acumulada
I	23,77	64,25	64,25
II	4,69	12,68	76,93
III	3,26	8,81	85,74
IV	1,97	5,34	91,08
V	1,46	3,94	95,02
VI	0,89	2,40	97,42
VII	0,64	1,73	99,15

VIII                      0,31                      0,85                      100,00

---



**Fig. 3.** Gráfico dos autovalores dos 37 fatores gerados com a análise fatorial.

Neste estudo, considerando as 37 variáveis estudadas, 34 possuem maiores cargas para o fator I em relação ao fator II, demonstrando que o fator I representa 91,89 % das variáveis (Tabela 7). Esses resultados ressaltam a importância desse fator para explicar a relação entre os atributos de qualidade e o comportamento dos híbridos. Exceto os atributos físicos C, B e Thi possuem maiores cargas fatoriais para o fator II (Tabela 6).

**Tabela 6**

Cargas fatoriais das variáveis no fator I e fator II, comunalidade e variância específica dos 37 atributos de qualidade física e fisiológica utilizados na avaliação da qualidade de sementes de três híbridos de milho provenientes de espigas com diferentes níveis de severidade do complexo do enfezamento do milho (molicutes e MRFV).

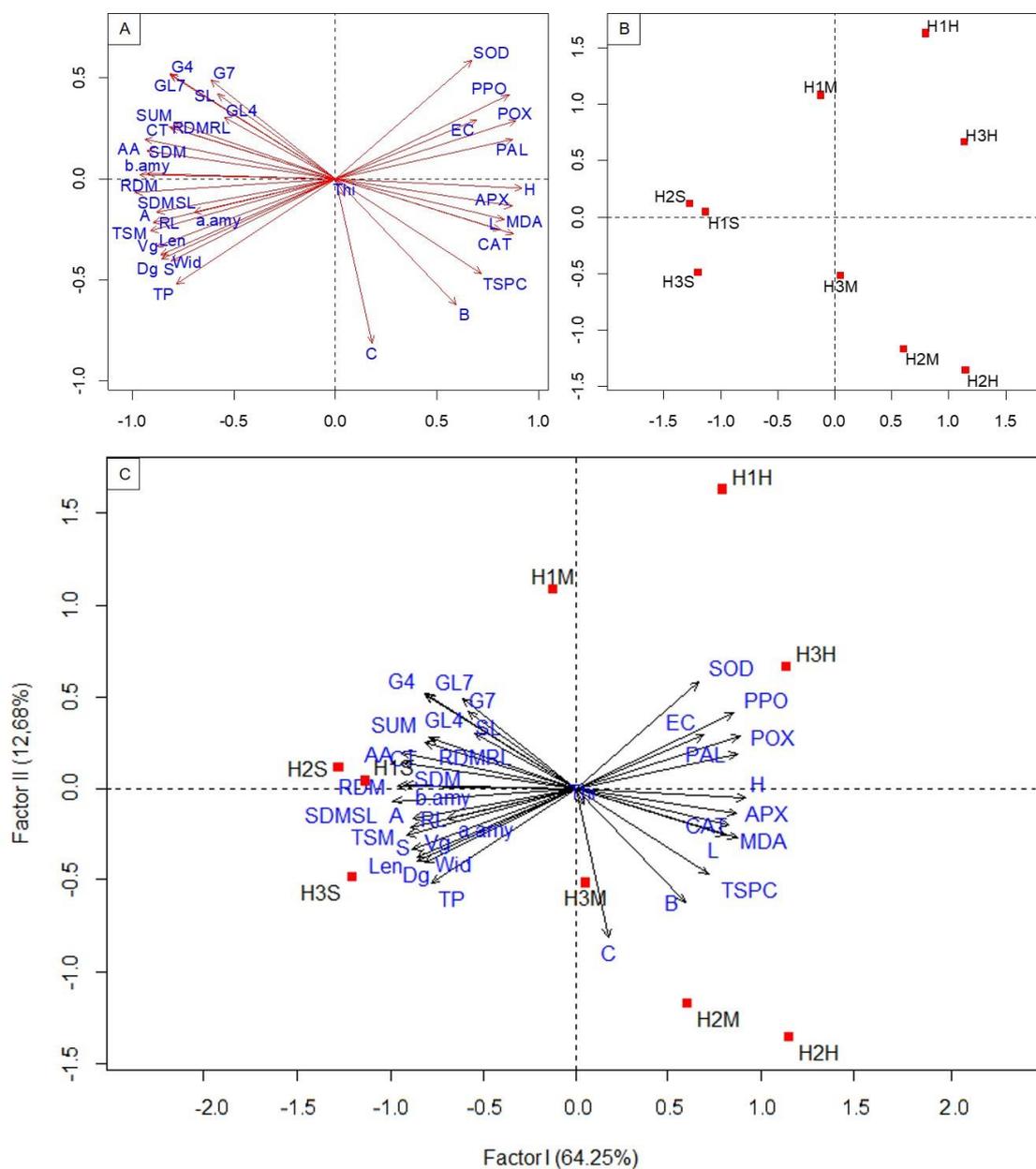
Variável	Fator I	Fator II	Comunalidade	Variância específica
TSM*	-0,913	-0,261	0,965	0,035
Wid	-0,812	-0,407	0,886	0,114
Len	-0,884	-0,338	0,895	0,105
Thi	0,044	-0,087	0,732	0,268
D <sub>g</sub>	-0,857	-0,400	0,972	0,028
S	-0,858	-0,397	0,971	0,029
V <sub>g</sub>	-0,859	-0,375	0,976	0,024
SUM	-0,793	0,279	0,724	0,276
L	0,811	-0,256	0,791	0,209
A	-0,895	-0,219	0,871	0,129
B	0,594	-0,623	0,897	0,103

C	0,181	-0,814	0,951	0,049
H	0,916	-0,046	0,845	0,155
G4	-0,816	0,519	0,967	0,033
G7	-0,613	0,489	0,621	0,379
CT	-0,811	0,250	0,731	0,269
GL4	-0,548	0,303	0,970	0,030
GL7	-0,812	0,511	0,925	0,075
AA	-0,940	0,197	0,923	0,077
SDM	-0,927	0,140	0,885	0,115
RDM	-0,964	0,018	0,930	0,070
SL	-0,584	0,420	0,535	0,465
RL	-0,880	-0,166	0,851	0,149
SDMSL	-0,987	-0,067	0,979	0,021
RDMRL	-0,818	0,257	0,792	0,208
EC	0,696	0,293	0,766	0,234
SOD	0,668	0,585	0,900	0,100
CAT	0,874	-0,274	0,838	0,162
APX	0,868	-0,138	0,879	0,121
POX	0,887	0,287	0,902	0,098
PT	-0,782	-0,520	0,961	0,039
MDA	0,829	-0,205	0,747	0,253
PPO	0,854	0,413	0,955	0,045
PAL	0,873	0,193	0,869	0,131
TSPC	0,718	-0,470	0,842	0,158
$\alpha$ -amy	-0,696	-0,168	0,529	0,471
$\beta$ -amy	-0,928	0,024	0,950	0,050
Variância	23,77	4,69	3,72	
Variância (%)	64,25	12,68	85,74	
Soma do quadrado dos resíduos			6,074	

\* TSM, massa de mil sementes; Wid, largura de semente; Len, comprimento de semente; Thi, espessura da semente; Dg, diâmetro geométrico médio; S, área superficial; Vg, volume da sementes; SUM, massa específica unitária; L, luminosidade; A, índice de cor A; B, índice de cor B; C, cor; H, ângulo Hue; G4, germinação 4º dia; G7, germinação 7º dia; CT, vigor a frio; GL4, germinação em baixa temperatura 4º dia; GL7, germinação em baixa temperatura 7º dia; AA, envelhecimento acelerado; SDM, massa seca de parte aérea; RDM, massa seca de parte radícula; SL, comprimento de parte aérea; RL, comprimento de radícula; SDMSL, relação entre SDM e SL; RDMRL, relação entre RDM e RL; EC, condutividade elétrica; SOD, superóxido dismutase; CAT, catalase; APX, ascorbato peroxidase; POX, peroxidase; TP, proteínas totais; MDA, malonaldeído; PPO, polifenoloxidase; PAL, fenilalanina amônia liase; TSPC, compostos fenólicos solúveis totais;  $\alpha$  = (a-amy), alfa amilase;  $\beta$  = (b-amy), beta amilase.

No gráfico de dispersão, o fator I representando na horizontal e o fator II representado na vertical (Fig. 4). Observa-se que as cargas fatoriais das variáveis

segregaram os híbridos H1, H2 e H3 nos níveis de severidade sadio, média e alta (Fig. 4A-C).



**Fig. 4A-C.** Gráficos bidimensionais de dispersão da matriz das cargas fatoriais e scores dos 37 atributos de qualidade física e fisiológica utilizados para avaliação da qualidade de sementes de três híbridos de milho provenientes de espigas com diferentes níveis de severidade do complexo do enfezamento do milho. A) Gráfico de dispersão da matriz das cargas fatoriais dos 37 atributos de qualidade física e fisiológica. B) Gráfico de dispersão da matriz dos escores dos híbridos com diferentes níveis de severidade. C) Gráfico de dispersão biplot dos atributos de qualidade e híbridos com diferentes níveis de severidade do complexo do enfezamento do milho. H1S, híbrido 1 sadio; H1M, híbrido 1 severidade média; H1H, híbrido 1 severidade alta; H2S, híbrido 2 sadio; H2M, híbrido 2 severidade média; H2H, híbrido 2 severidade alta; H3S, híbrido 3 sadio; H3M, híbrido 3 severidade média; H3H, híbrido 3 severidade alta; TSM, massa de mil sementes; Wid, largura de

semente; Len, comprimento de semente; Thi, espessura da semente; Dg, diâmetro geométrico médio; S, área superficial; Vg, volume da sementes; SUM, massa específica unitária; L, luminosidade; A, índice de cor A; B, índice de cor B; C, croma; H, ângulo Hue; G4, germinação 4° dia; G7, germinação 7° dia; CT, vigor a frio; GL4, germinação em baixa temperatura 4° dia; GL7, germinação em baixa temperatura 7° dia; AA, envelhecimento acelerado; SDM, massa seca de parte aérea; RDM, massa seca de parte radícula; SL, comprimento de parte aérea; RL, comprimento de radícula; SDMSL, relação entre SDM e SL; RDMRL, relação entre RDM e RL; EC, condutividade elétrica; SOD, superóxido dismutase; CAT, catalase; APX, ascorbato peroxidase; POX, peroxidase; TP, proteínas totais; MDA, malonaldeído; PPO, polifenoloxidase; PAL, fenilalanina amônia liase; TSPC, compostos fenólicos solúveis totais;  $\alpha$  = (a-amy), alfa amilase;  $\beta$  = (b-amy), beta amilase.

Os 34 diferentes atributos de qualidade que apresentaram maiores cargas para o fator I foram divididos em dois grandes subgrupos de relação, sendo o subgrupo do lado esquerdo, de cargas negativas, composto por 23 variáveis, constituindo por todos os atributos de qualidade fisiológica como os que avaliam desempenho de plântulas (SDMSL, RDMRL, RDM, SDM, RL e SL) e os que avaliam o potencial germinativo (G7, G4, GL4, GL7, CT e AA) (Fig. 4A). Também fazem parte desse subgrupo os atributos físicos relacionados com a biometria de sementes (Wid, Len, S, Dg e Vg), os atributos físicos que levam em consideração a massa de sementes (TSM e SUM) e as coordenada colorimétrica (A e E) (Fig. 4A). Do lado esquerdo foram classificados os atributos bioquímicos (atividade das enzimas hidrolíticas de amido  $\beta$ -amy,  $\alpha$ -amy) e as proteínas totais (TP) (Fig. 4A).

No lado direito, considerando as cargas fatoriais positivas, foram 11 os atributos de qualidade, sendo os bioquímicos relacionados com a atividade do sistema antioxidante as enzimas (SOD, CAT, POX e APX), e o teor de MDA, cujo é indicador do grau de integridade das membranas celulares (Fig. 4A). As enzimas relacionadas com a ativação de rotas metabólicas de resposta a estresse bióticos como a PAL e PPO, além de compostos fenólicos totais TSPC, relacionado com a defesa de plantas ao estresses bióticos e abióticos, e o teste de EC, relacionado a lixiviação de eletrólitos e integridade das membranas celulares (Fig. 4A). Os atributos físicos de coloração (H e L) também foram agrupados no lado direito do gráfico de dispersão (Fig. 4A). Portanto, o fator I pode ser classificado em variáveis dispostas para o lado esquerdo, chamadas variáveis indicadoras de vigor de sementes, e variáveis dispostas do lado direito, chamadas de variáveis indicadoras de baixo vigor ou deterioração de sementes.

Para os scores estimados para os híbridos em função dos diferentes níveis de severidade considerando a sintomatologia da doença, os híbridos H1, H2 e H3 sadios,

apresentaram associação com as variáveis do fator I indicadoras de vigor (Fig. 4C). Sendo os híbridos H1 e H2 sadios associados aos testes fisiológicos SDMSL, RDM, SDM, AA e bioquímico  $\beta$ -amy (Fig. 4C), além disso, estão plotados próximos um ao outro, indicando similaridade de desempenho entre os híbridos (Fig. 4B). Já o H3 sadio se relacionou com os atributos físicos TSM, Wid, Len, S, Dg, Vg e A e os bioquímicos  $\alpha$ -amy e TP (Fig. 4C). Os híbridos H1 e H3 com severidade média apresentaram cargas fatoriais intermediárias para o fator I (Fig. 4B), não possuindo os valores mais expressivos para as variáveis indicadoras de vigor, nem tão pouco os valores mais expressivos para as variáveis indicadoras de baixo vigor e deterioração de sementes (Fig. 4C).

Entre os híbridos classificados severidade média, o híbrido H2 foi o que mais se distanciou dos atributos indicadores de vigor, aproximando-se dos híbridos classificados com alta severidade, e indica menor vigor em relação aos híbridos H1 e H3. Embora o híbrido H2 com nível de severidade sadio de espigas, apresentar o maior score para o lado esquerdo, variáveis de indicadoras de vigor, este também apresentou os scores mais elevados para os níveis média e alta severidade, indicando maior suscetibilidade ao complexo do enfezamento do milho (Fig. 4C) (Tabela 7).

### Tabela 7

Escores de três híbridos (H1, H2 e H3) de milho provenientes de espigas com diferentes níveis de severidade (sadio, severidade média e severidade alta) do complexo do enfezamento do milho (molicutes e MRFV) para o fator I e fator II.

Híbrido x Nível	Fator I	Fator II
H1S	-1,136	0,043
H1M	-0,122	1,083
H1H	0,795	1,628
H2S	-1,277	0,118
H2M	0,603	-1,172
H2H	1,151	-1,358
H3S	-1,203	-0,486
H3M	0,053	-0,518
H3H	1,137	0,662

H1S, híbrido 1 sadio; H1M, híbrido 1 severidade média; H1H, híbrido 1 severidade alta; H2S, híbrido 2 sadio; H2M, híbrido 2 severidade média; H2H, híbrido 2 severidade alta; H3S, híbrido 3 sadio; H3M, híbrido 3 severidade média; H3H, híbrido 3 severidade alta.

Em contrapartida, as maiores cargas fatoriais para as variáveis indicadoras de baixo vigor e deterioração de sementes foram pra os híbridos H2, H3 e H1 oriundos de espigas classificadas com alta severidade (Fig. 4C) (Tabela 7). Sendo observado que o H1 e H3 com alta severidade relacionaram-se com a maior atividade enzimática das

enzimas SOD, PPO, CE, POX, PAL, ao passo que o H2 severidade média e H2 severidade alta com APX, MDA, CAT e TSPC (Fig. 4C) (Tabela 7). Importante destacar que o atributo físico, colorimétrico expresso pelo ângulo H, foi a variável mais atenuante para identificar o subgrupo do lado direito do fator I, indicadores de baixo vigor.

Os três menores valores de escores, -1,277, -1,203, -1,136, foram observados, respectivamente, para os híbridos classificados como sadio H2, H3 e H1. As três notas medianas foram para os três híbridos classificados como severidade média H3, H1 e H2M com valores de -0,122, 0,053 e 0,603, respectivamente, e as três piores notas foram para os três híbridos classificados com alta severidade H1, H3, H2 com as respectivas notas 0,795, 1,137 e 1,151 (Tabela 7).

O fator II, com autovalor de 4,69, representa apenas 12,68% da variância dos dados, com os maiores valores de cargas fatoriais para os atributos físicos coroma e índice de cor B e biométrico Thi. Entretanto, essa resposta não apresentam comportamento biológico claro, ou seja, não possuem potencial indicador de aumento ou diminuição do vigor das sementes híbridas com diferentes níveis de severidade das espigas (Fig. 4C).

### *3.3 Teste de agrupamento de médias*

Com o intuito de reduzir o número de variáveis a serem analisadas pelo teste de agrupamento de médias, e que melhor explicasse as alterações na qualidade dos materiais testados, estabeleceu como critério utilizar as variáveis do fator com maior variância, autovalor, no caso o fator I, e com cargas fatoriais mais elevadas, acima de 0.9. Assim, selecionou-se sete variáveis, sendo duas de atributos físicos, relacionados a coloração e massa (H e TSM), com cargas +0,916 e -0,913, respectivamente. Cinco atributos de qualidade fisiológicas foram também selecionados, sendo três relacionados ao desempenho de plântulas (SDMSL, RDM e SDM), o teste de vigor sob condições de alta temperatura e umidade (AA), e a atividade da enzima hídrolítica ( $\beta$ -amy), com os seguintes valores -0,987, -0,964, -0,927, -0,940 e -0,928. Importante ressaltar que das sete variáveis, seis estão correlacionas para o lado esquerdo, variáveis indicadoras de vigor, exceto o atributo físico-colorimétrico H, que foi posicionado para o lado direito, representando as variáveis indicadoras de baixo vigor e deterioração de sementes (Tabela 6) (Fig. 4C).

Considerando a massa de mil sementes, as sementes oriundas de espigas sadias apresentaram maiores valores entre os níveis estudados, seguida do nível de severidade

média e com menor massa as sementes provenientes das espigas classificadas como severidade alta para os três híbridos estudados (Tabela 8A).

**Tabela 8**

Média dos atributos de qualidade selecionados para três híbridos (H1, H2 e H3) com três níveis de severidade (sadio, severidade média e severidade alta) do complexo do enfezamento do milho (molicutes e MRFV).

A) TSM (g)			
Nível	Híbrido		
	H1	H2	H3
Sadio	254,79Ca <sup>1</sup> ± 0,84*	319,14Aa ± 2,84	311,19Ba ± 2,74
Severidade média	204,69Cb ± 0,56	233,97Ab ± 2,29	211,42Bb ± 0,90
Severidade alta	160,03Bc ± 1,34	165,53Ac ± 1,06	147,45Cc ± 0,59
B) H (°)			
Nível	Híbrido		
	H1	H2	H3
Sadio	61,26Ab ± 1,12	58,95Ab ± 0,54	60,70Ab ± 1,15
Severidade média	65,24Aa ± 0,73	67,72Aa ± 0,63	67,20Aa ± 1,19
Severidade alta	65,8Aa ± 0,77	66,62Aa ± 0,69	68,72Aa ± 0,91
C) RDM (g)			
Nível	Híbrido		
	H1	H2	H3
Sadio	0,125Aa ± 0,005	0,130Aa ± 0,007	0,114Ba ± 0,004
Severidade média	0,089Ab ± 0,004	0,072Bb ± 0,003	0,095Ab ± 0,002
Severidade alta	0,064Bc ± 0,004	0,057Bc ± 0,004	0,074Ac ± 0,003
D) SDM (g)			
Nível	Híbrido		
	H1	H2	H3
Sadio	0,115Aa ± 0,003	0,125Aa ± 0,003	0,122Aa ± 0,004
Severidade média	0,113Aa ± 0,006	0,082Bb ± 0,003	0,104Ab ± 0,002
Severidade alta	0,076Bb ± 0,003	0,067Bc ± 0,003	0,088Ac ± 0,002
E) SDMSL (mg mm <sup>-1</sup> )			
Nível	Híbrido		
	H1	H2	H3
Sadio	3,41Aa ± 0,204	3,51Aa ± 0,053	3,53Aa ± 0,181
Severidade média	3,14Ab ± 0,105	2,77Ab ± 0,235	2,97Ab ± 0,131
Severidade alta	2,51Ac ± 0,102	2,53Ac ± 0,200	2,50Ac ± 0,116
F) AA (%)			
Nível	Híbrido		
	H1	H2	H3
Sadio	69Ca ± 0,58	83Aa ± 1,26	75Ba ± 1,29
Severidade média	54Ab ± 1,26	17Bb ± 0,96	17Bb ± 0,58

Severidade alta	31Ac $\pm$ 0,96	10Bc $\pm$ 0,82	8Bc $\pm$ 0,96
G) $\beta$ -amy (mg maltose g <sup>-1</sup> proteína)			
Nível	Hybrid		
	H1	H2	H3
Sadio	1,119Ba $\pm$ 0,043	1,478Aa $\pm$ 0,073	1,497Aa $\pm$ 0,073
Severidade média	1,019Aa $\pm$ 0,049	0,752Bb $\pm$ 0,043	1,002Ab $\pm$ 0,083
Severidade alta	0,722Ab $\pm$ 0,025	0,633Ab $\pm$ 0,045	0,823Ac $\pm$ 0,042

<sup>1</sup>Valores seguidos de mesma letra maiúsculas na linha comparam as médias dos híbridos entre si, e minúscula na coluna comparam as médias entre os níveis de severidade e não diferem entre si segundo o teste de Scott – Knott ( $p < 0,05$ ). \*Erro padrão. TSM, massa de mil sementes; H, ângulo de matiz Hue; RDM, massa seca de radícula; SDM, massa seca de parte aérea; SDMSL, relação entre SDM e SL; AA, envelhecimento acelerado;  $\beta$ -amy, beta amilase.

Independente do híbrido, a colorimetria medida pelo ângulo Hue, para o nível sadio apresentou menor nota angular se comparado com média e alta severidade para os três híbridos (Tabela 8B). O ângulo colorimétrico médio foi de 60,3° para os três híbridos nível sadios, e os classificam com coloração mais alaranjada se comparados com média e alta severidade, com ângulo colorimétrico médio de 66,72° e 67,04°, respectivamente, confirmando que o complexo do enfezamento do milho afeta na coloração das sementes. Não foram observadas diferenças na coloração entre os híbridos, demonstrando uniformidade da classificação proposta na metodologia deste estudo (Tabela 2).

Para a massa seca de radícula e massa seca de parte aérea, as sementes provenientes de espigas sadias apresentaram maior massa, seguidas da severidade média, e com menor desempenho as sementes provenientes de espigas com severidade alta, exceto para H1 com severidade média para a massa seca de radícula não diferiu do sadio. De modo geral, comparando os híbridos nos níveis, as sementes nível sadias apresentam comportamento similares entre os três híbridos. Porém, comparando as plântulas dos híbridos provenientes das espigas com os níveis de severidade média e alta, o híbrido H2 possui desempenho inferior, enquanto o H3 possui desempenho superior para massa de radícula e parte aérea (Tabela 8C e D).

Na relação entre SDM e SL (SDMSL) também foi observada a diminuição gradativa no desempenho das plântulas, sendo que as sementes sadias apresentaram a maior massa de matéria seca por milímetro de parte aérea entre os níveis (3,48 mg mm<sup>-1</sup>), seguido da severidade média com (2,96 mg mm<sup>-1</sup>) e com menor desempenho as sementes com severidade alta (2,51 mg mm<sup>-1</sup>) (Tabela 8E).

Contatou-se no envelhecimento acelerado decréscimo do percentual de plântulas normais germinadas com o aumento da severidade para todos os híbridos. Esta resposta

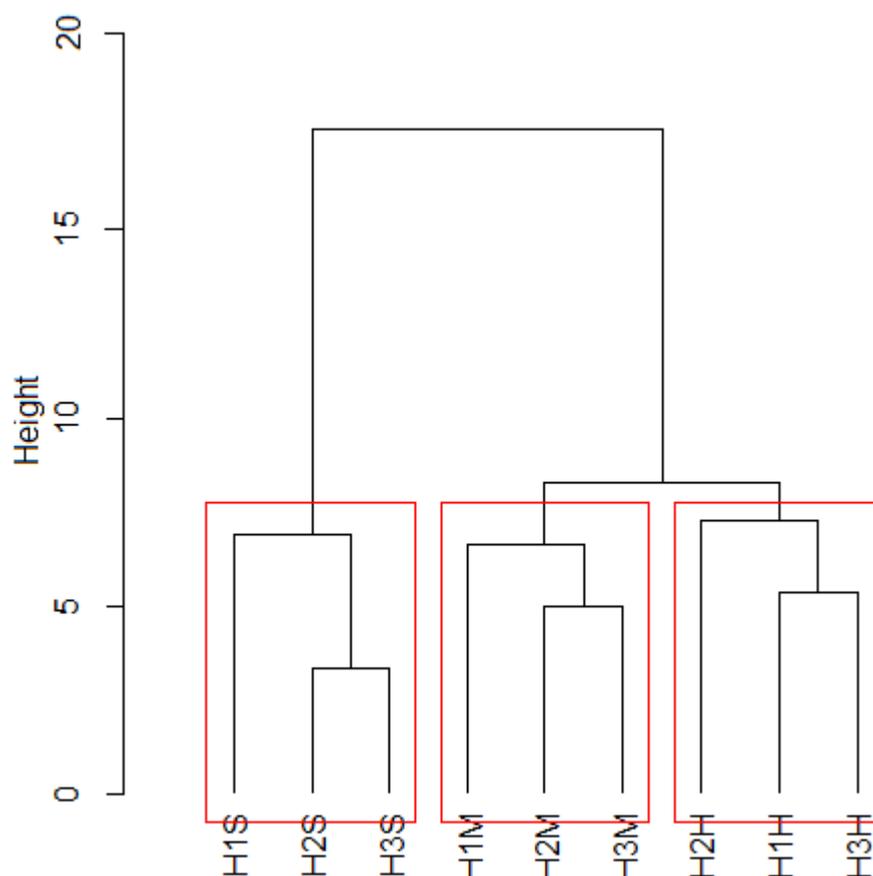
é mais expressiva na comparação do nível sadio com o nível alta severidade, sendo a redução de 69 para 31% no H1, de 83 para 10% no H2 e de 75 para 8% no H3. Interessante notar que apesar do H1 possuir o pior desempenho em relação aos outros híbridos sadios para o AA (69%). O H1 foi o que obteve o melhor desempenho para as sementes provenientes de espigas afetadas pelo complexo do enfezamento (54% de germinação para a severidade média e 31% de germinação para a severidade alta) (Tabela 8F).

As sementes provenientes de espigas de plantas afetadas pelo complexo do enfezamento do milho apresentaram redução na atividade da enzima beta-amilase em comparação ao nível de severidade sem sintomas (espigas sadias), resposta essa mais acentuada nas sementes de espigas com alta severidade da doença. A atividade da beta-amilase do híbrido H1 sadio foi de 1,119 (mg maltose  $g^{-1}$  proteína) e severidade média 1,019 (mg maltose  $g^{-1}$  proteína) tiveram maior atividade se comparado com a alta severidade 0,722 (mg maltose  $g^{-1}$  proteína). A atividade enzimática para o híbrido H2 nível sadio foi 1,478 mg (maltose  $g^{-1}$  proteína) superior ao média e alta severidade 0,752 e 0,633 (mg maltose  $g^{-1}$  proteína), ao passo que para H3 se observou diminuição gradativa na atividade da enzima beta-amilase com aumento da severidade nas espigas, com os seguintes valores 1,497, 1,002 e 0,823 (mg maltose  $g^{-1}$  proteína) para os níveis sadio, severidade média e severidade alta respectivamente.

### *3.4 Cluster análise*

De acordo com os modelos de agrupamento testados, optou-se pelo “ward.D2” para os híbridos com as espigas classificadas nos diferentes níveis de severidade e “complete” para as variáveis (atributos de qualidade física e fisiológica). A escolha se deu ao maior coeficiente de correlação cofenética, ambos com 0,85, e adequação desses modelos em comparação aos demais testados.

O dendograma construído se mostrou eficiente em caracterizar a variabilidade tanto entre quanto dentro dos híbridos. A organização hierárquica do dendograma dos híbridos permitiu formar três grupos: o primeiro com os híbridos H1, H2 e H3 sadios, espigas sem sintomas da doença, o segundo com H1, H2 e H3 severidade média e terceiro com os híbridos H2, H1 e H3 com alta severidade do complexo do enfezamento nas espigas. Essa análise possibilitou, assim como FA, distinguir diferença na qualidade entre os materiais testados, separando assim os híbridos por níveis de severidade (Fig. 5).

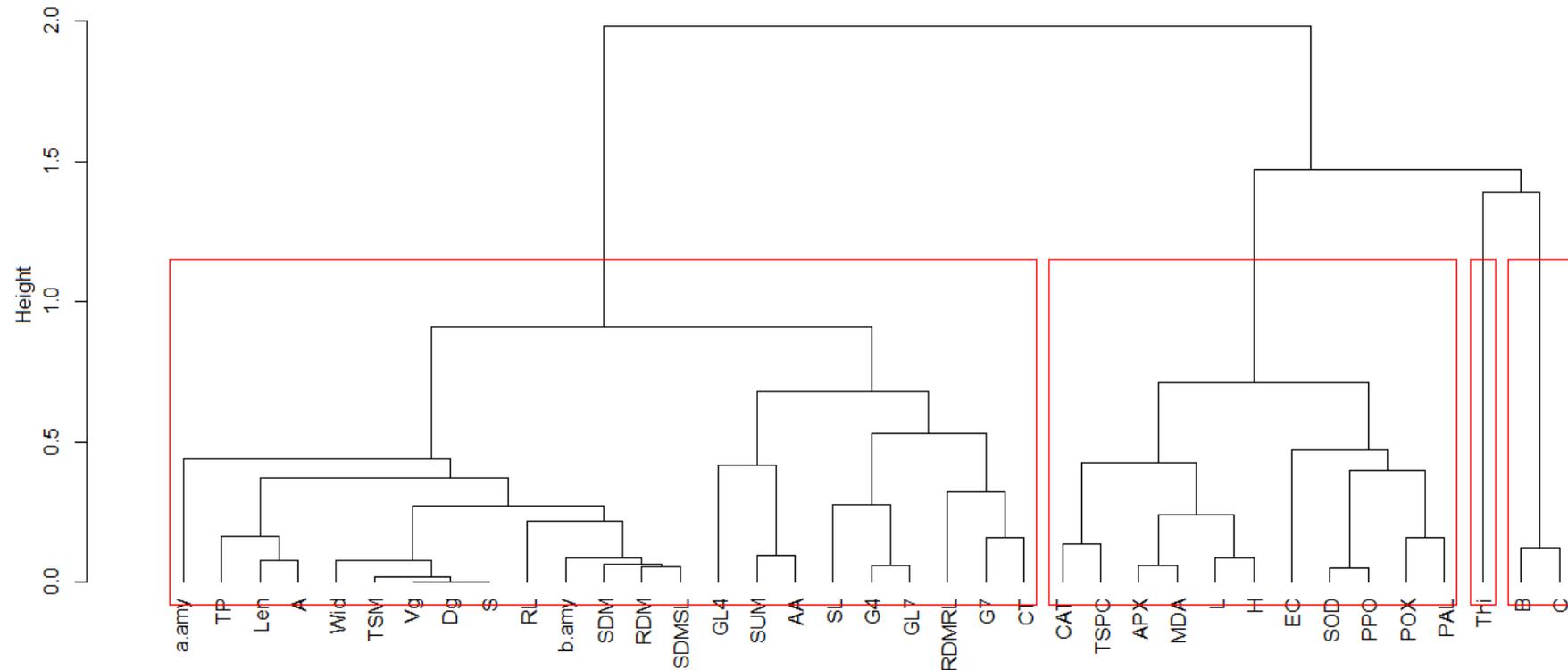


**Fig. 5.** Dendrograma para os três híbridos (H1, H2 e H3) com três níveis de severidade de espigas (sadio (S), severidade média (M) e severidade alta (H)) do enfezamento do milho (molicutes e MRFV). Análise de cluster baseada no modelo de agrupamento Ward.D2. H1S, híbrido 1 sadio; H1M, híbrido 1 severidade média; H1H, híbrido 1 severidade alta; H2S, híbrido 2 sadio; H2M, híbrido 2 severidade média; H2H, híbrido 2 severidade alta; H3S, híbrido 3 sadio; H3M, híbrido 3 severidade média; H3H, híbrido 3 severidade alta.

Levando em consideração as variáveis, observou-se diferença no comportamento entre e dentro dos diferentes atributos físicos e fisiológicos na construção do dendrograma (Fig. 6). Houve a divisão em quatro subgrupos, sendo o primeiro composto por:  $\alpha$ -amy, TP, Len, A, Wid, TSM, Vg, Dg, S, RL,  $\beta$ -amy, SDM, RDM, SDMSL, GL4, SUM, AA, SL, G4, GL7, RDMRL, G7 e CT. O segundo abrangeu as variáveis CAT, TSPC, APX, MDA, L, H, EC, SOD, PPO, POX e PAL. O Terceiro composto por Thi e o quarto integrando por B e C (Fig. 6).

Assim, como na análise fatorial, os subgrupos formados na análise de cluster apresentaram contraste entre as variáveis, sendo o primeiro subgrupo da CA referente as variáveis do lado esquerdo do fator I, atributos indicadores de vigor de sementes, o segundo subgrupo da CA refere-se às variáveis do lado direito do fator I, variáveis

indicadoras de baixo vigor e deterioração, sendo estes dois primeiros grupos o foco de discussão do presente trabalho por sua adequação aos tratamentos. Já o terceiro e quarto subgrupo, formados apenas por três análises, representam as variáveis com maiores cargas fatoriais para o fator II em relação ao fator I, ou seja, variáveis de difícil explicação pela falta de comportamento biológico claro, localizadas na extremidade direita do dendograma, manifestando assim maior diferença entre os elementos (Fig. 6).



**Fig. 6.** Dendrograma dos 37 atributos de qualidade física e fisiológica usados para avaliar a qualidade de sementes de milho híbridas provenientes de espigas com diferentes níveis de severidade (sadio, severidade média e severidade alta) do complexo do enfezamento do milho (molicutes e MRFV). Análise de cluster baseada no modelo de agrupamento “Complete”. TSM, massa de mil sementes; Wid, largura de semente; Len, comprimento de semente; Thi, espessura da semente; Dg, diâmetro geométrico médio; S, área superficial; Vg, volume da sementes; SUM, massa específica unitária; L, luminosidade; A, índice de cor A; B, índice de cor B; C, cor; H, ângulo Hue; G4, germinação 4° dia; G7, germinação 7° dia; CT, vigor a frio; GL4, germinação em baixa temperatura 4° dia; GL7, germinação em baixa temperatura 7° dia; AA, envelhecimento acelerado; SDM, massa seca de parte aérea; RDM, massa seca de parte radícula; SL, comprimento de parte aérea; RL, comprimento de radícula; SDMSL, relação entre SDM e SL; RDMRL, relação entre RDM e RL; EC, condutividade elétrica; SOD, superóxido dismutase; CAT, catalase; APX, ascorbato peroxidase; POX, peroxidase; TP, proteínas totais; MDA, malonaldeído; PPO, polifenoloxidase; PAL, fenilalanina amônia liase; TSPC, compostos fenólicos solúveis totais;  $\alpha$  = (a-amy), alfa amilase;  $\beta$  = (b-amy), beta amilase.

#### 4. Discussão

As técnicas empregadas neste estudo para interpretação dos dados como agrupamento de médias e as multivariadas (análise fatorial e cluster), foram eficientes para elucidar as mudanças no vigor das sementes com diferentes níveis de severidade do complexo do enfezamento do milho em função do desempenho nos atributos de qualidade realizados.

Conforme a análise fatorial, a redução de 37 variáveis isoladas para dois fatores, representando 76,93% da variação total, mostrou-se satisfatória para representar a variação dos dados originais (Tabela 5). Pois, de acordo com Rencher (2002) recomenda-se que a soma do percentual da variância total dos dois principais fatores seja igual ou superior a 70%. E em relação aos valores de comunalidade e variância específica das variáveis, quanto mais próximo de 1 a comunalidade de uma variável, menor é seu erro. Neste estudo, apenas dois atributos (SL e  $\alpha$ -amy) das 37 variáveis analisadas apresentaram valores de comunalidade inferiores ao recomendado de 0,60 (MacCallum et al., 1999; Jung, 2013). O que demonstra adequação dos híbridos e atributos a análise.

As variáveis mais representativas segundo a FA, com as maiores cargas fatoriais (valor absoluto acima de 0,9), foram sete, sendo duas de atributos de qualidade física, a massa de mil sementes e a colorimetria, medida pelo ângulo Hue. A massa de mil sementes relacionou-se positivamente com os híbridos com espigas sem sintomas (Fig. 4C). As sementes de maior tamanho e massa normalmente são as que possuem embriões bem formados e com maior concentração de compostos de reservas (Carvalho e Nakagawa, 2000; Andrade et al., 2019). Essas produzem, plântulas mais vigorosas que se sobressaem em condições fora daquelas consideradas ideais (Finch-Savage e Bassel., 2015).

Como foi observado, as sementes provenientes de espigas com severidade média e alta do complexo do enfezamento apresentaram menor massa de mil sementes, por causa da diminuição da translocação de fotoassimilados provocado pela doença durante o seu desenvolvimento, comprometendo o enchimento das sementes e seu acúmulo energético. A menor translocação e concentração de açúcares solúveis reflete de maneira negativa na síntese de amilopectina, amido ramificado responsável pelo aspecto denso e cristalino das sementes (García-Lara et al., 2019), podendo explicar a diminuição da coloração alaranjada das sementes. Carwell et al. (2009) reportaram que a descoloração em sementes de milho híbrido, proveniente do ataque de pragas e patógenos, foram

correlacionadas com a diminuição da massa de sementes como observados no presente trabalho. As sementes provenientes das espigas afetadas também obtiveram os piores desempenhos fisiológico e físico, porém, a atividade mais expressiva do sistema antioxidativo, certamente pelo excesso na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em virtude do estresse provocados pelo complexo do enfezamento na formação de espigas (Fig. 4C).

Desse modo, a perda da coloração alaranjada medida através do ângulo Hue pode ser considerada indicador de diminuição do vigor das sementes pelo complexo do enfezamento do milho. Além de ser um parâmetro físico com potencial de ser utilizado como critério de segregação indireta da qualidade das sementes de milho e plantas afetadas pela doença. A análise desse parâmetro é fácil, rápida e não destrutiva, logo, podendo ser implementada nas análises rotineiras de qualidade nos laboratórios com sementes de milho que enfrentam problemas relacionados a pragas e patógenos.

Os atributos de qualidade fisiológica selecionados, que levam em consideração o desempenho de plântulas como massa seca de radícula, massa seca de parte aérea e relação entre massa SDM e SL também foram decisivos entre os diferentes atributos testados. A massa seca de estruturas primárias está relacionada com a mobilização de compostos solubilizados dos tecidos de reserva das sementes para o desenvolvimento da plântula, parte aérea e ou radícula (Tan-Wilson e Wilson, 2012; Mouzo et al., 2018). Dessa forma, a redução da massa das plântulas, provenientes de espigas com diferentes severidades do complexo do enfezamento do milho, pode ser associada com a redução no acúmulo de reservas, como carboidratos, proteínas e lipídios bem como a inibição da atividade catabólica e de translocação desses compostos para o desenvolvimento de estruturas essenciais (Rebolledo et al., 2015; El-Abady, 2015), levando a formação de plântulas menores e mais leves em função do aumento da severidade. Esses parâmetros e técnicas multivariadas também demonstraram eficiência na identificação de linhagens e híbridos tolerantes ao estresse hídrico, pois, permitem associar os genótipos aos melhores desempenhos de plântulas (Abreu et al., 2019).

O envelhecimento acelerado permitiu constatar que a alta temperatura e umidade afetaram propriedade físico-químicas de forma mais acentuada em sementes provenientes de espigas com o média e alta severidade da doença em relação às sementes provenientes de espigas saudáveis (Tabela 8F). Estudos apontam que isso se deve a diminuição da funcionalidade e oxidação de proteínas, reservas e membranas principalmente em

sementes de baixo vigor em condições de estresse como as do teste de AA (McDonough et al., 2004; Wu et al., 2011).

A atividade da enzima hidrolítica beta-amilase, também foi decisiva na classificação das espigas dos híbridos com diferentes níveis de severidade (Fig. 4C). Nesse caso, de forma geral, as sementes provenientes de espigas saudáveis, apresentaram maior atividade dessa enzima em relação às com média e alta severidade (Tabela 8G). A maior transcrição de genes e a atividade de enzimas amiláticas como beta e alfa amilase, são associadas com a rápida hidrólise do amido, tendo como resultado maior energia disponível para o crescimento inicial das plântulas de milho (Oliveira et al., 2013b). Nerling et al. (2018) reportaram que sementes com maior quantidade de açúcares solúveis apresentaram qualidade fisiológica superior se comparado com níveis menores desses compostos nas sementes. Portanto, a análise de amilases também possui potencial para auxiliar seleção de híbridos mais resistentes ao complexo do enfezamento do milho.

Pode assim, inferir que as sementes saudáveis para os híbridos H1, H2 e H3 possuem maior quantidade de reserva e atividade de enzimas hidrolíticas de amido, que disponibilizam maiores quantidades de açúcares utilizados para o desenvolvimento da parte aérea e radicular das plântulas, tendo como consequência maior aporte para suportar condições de estresse como altas temperaturas e umidade quando comparados com sementes do mesmo híbrido com média e alto nível de severidade ocasionados pelo complexo do enfezamento (molicutes e MRFV). Além disso, sabe-se que sementes de maior vigor tendem a se sobressair em relação às de baixo vigor, durante a germinação, por causa da maior eficiência no balanço da produção e remoção de substâncias danosas (Wang et al., 2015).

Independente do híbrido analisado, as sementes oriundas de espigas com média e sobretudo alta severidade sofreram estresse oxidativo. Isso pode ser constatado pelo incremento na atividade de enzimas SOD, CAT, APX e POX, todas atuantes no sistema de combate a esse tipo de estresse (Das e Roychoudhury, 2014; Wang et al., 2017). Concomitantemente ao incremento dessas enzimas, houve ativação de compostos secundários de defesa reguladoras de polifenóis como a PAL e PPO, além do próprio aumento nos níveis de TSPC. Tanto a PAL quanto a PPO são atuantes no mecanismo de desintoxicação e combate a produção exacerbada de espécies reativas de oxigênio (EROs). Isso porque a PAL é a primeira enzima que atua na rota dos fenilpropanoides (Rohde, 2004; Yuan et al., 2019), ao passo que a propriedade redox da PPO regula os

níveis endógenos de fenóis quando a oxida em quinona, isso lhes permitem atuar como agentes redutores de compostos tóxicos (Tattini et al., 2004; Hichem et al., 2009).

Importante ressaltar que embora tenha ocorrido maior atuação das enzimas e metabólicos secundários atuantes na resposta antioxidativa nas sementes dos híbridos estudados provenientes de espigas com severidade média e alta, esse incremento não foi bastante para mitigar os efeitos tóxicos das EROs desencadeados pelo complexo do enfezamento do milho. A exemplo disso, estruturas como membranas celulares dessas sementes, tiveram suas integridades comprometidas, via incremento de MDA, que afetou sua permeabilidade, comprovada pelo aumento da CE, indicando deterioração e diminuição do vigor das mesmas. Corroborando essa informação, os autores Bailly (2004), Tonel et al. (2013) e Cao et al. (2019) reportaram que o aumento na atividade da maquinaria antioxidante, na tentativa de amenizar a oxidação e danos celulares, não foi suficiente para impedir a intensificação da deterioração e, em consequência, a diminuição na germinação e vigor das sementes.

É digno de nota que as variáveis mais importantes selecionadas com base na FA, pertencem aos dois atributos de qualidade estudados físico e fisiológico, e ressalta a importância dos dois seguimentos para se avaliar a qualidade de sementes. Estudos com atributos de qualidade física como Wen et al. (2018) e fisiológica como Egli e Rucker, (2012) Oliveira et al. (2013) e Feng et al. (2018) reforçam essa premissa.

Com relação a análise de cluster, a análise se mostrou fundamental para agrupar os híbridos em função do nível de severidade das espigas. E embora essa análise seja pouco explorada no estudo de qualidade de sementes, neste trabalho se mostrou como uma técnica eficiente e com potencial na seleção de teste indicadores de vigor ou deterioração de sementes. Haja vista que, os dois dendogramas criados apresentaram coeficiente de correlação cofenética de 0,85, considerado bom o ajuste do modelo (Rohlf e Fisher, 1968; Mohammadi e Prasanna, 2003). Sendo a atividade da alfa amilase a variável que mais segregou entre as variáveis indicadoras de vigor, enquanto a atividade da peroxidase inespecífica e fenilalanina amônia-liase se destacou entre os indicadores de deterioração.

Com isso, as técnicas multivariadas, análise fatorial e cluster análise, foram decisivas para elucidar o comportamento da complexa relação entre híbridos, com diferentes níveis de severidade de espigas em função da ocorrência ou não de sintomas da doença do enfezamento do milho e o seu vigor. Ambas permitiram formar dois subgrupos principais de variáveis, indicadoras de vigor e indicadoras de deterioração.

Os resultados realçam ainda a seriedade da interferência do complexo que enfezamento do milho causados por molicutes e MRFV na qualidade de sementes em campos de produção afetados pelo patógeno. Com isso, tanto as técnicas multivariadas, como as análises selecionadas através delas, podem ser empregadas em programas de controle de qualidade do segmento sementeiro de milho, objetivando auxiliar na tomada de decisão na segregação de lotes de sementes híbridas de alto vigor daqueles com baixo vigor em função do complexo do enfezamento do milho.

## **5. Conclusões**

Considerando o vasto número avaliações deste estudo, a análise conjunta dos dados por meio dos métodos multivariados como análise fatorial e análise de cluster foram cruciais para compreender o comportamento das sementes frente ao complexo do enfezamento do milho (molicutes e MRFV), além de possibilitar, correlacionar e segregar os híbridos com diferentes níveis de severidade.

A classificação em níveis de severidade de espigas mostrou-se eficiente para distinguir diferença no vigor das sementes neste estudo, pois foi possível detectar redução gradativa dos atributos de qualidade utilizados para avaliar o vigor das sementes. Sendo as sementes provenientes de espigas com severidade média e alta do complexo do enfezamento do milho (molicutes e MRFV) menos vigorosas em relação as sadias (assintomáticas, com desenvolvimento normal) para os híbridos testados. Comparando os híbridos entre si em função do nível de severidade, o híbrido H2 mostrou-se mais suscetível e o híbrido H1 mais tolerante ao complexo do enfezamento do milho.

Das 37 variáveis analisadas, sete foram consideradas com maior potencial indicador, mais relevantes em explicar as alterações do desempenho das sementes (H, TSM, SDMSL, RDM, SDM, AA e  $\beta$ -amy), sendo essas pertencentes aos dois diferentes atributos estudados, físico e fisiológico, enfatizando a importância dos dois segmentos para os programas de controle de qualidade e melhoramento genético durante a seleção de sementes de alto vigor e híbridos mais tolerantes ao enfezamento do milho.

## **6. Agradecimentos**

Os autores gostariam de agradecer ao Instituto Federal Goiano de Educação, Ciência e Tecnologia, Campus Rio Verde (IF Goiano-RV, número de registro: CRV DPPG 114/2018), por fornecer todo suporte para realização do trabalho e agradecer a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado (número de registro: 88882.442114 / 2019-01).

## 7. Referências

- Anderson, M.D., Prasad, T.K., Stewart, C.R., 1995. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. *Plant Physiol.* 109, 1247–1257. <https://doi.org/10.1104/pp.109.4.1247>.
- Andrade, G.C. De, Maria, C., Coelho, M., 2019. Seed reserves reduction rate and reserves mobilization to the seedling explain the vigour of maize seeds. *J. Seed Sci.* 41, 488–497. <http://dx.doi.org/10.1590/2317-1545v41n4227354>.
- Babic, L.J., Radojein, M., Pavkov, I., Babic, M., Turan, J., Zoranovic, M., Stanistic, S., 2013. Physical properties and compression loading behaviour of corn seed. *Int. Agrophysics* 27, 119–126. <https://doi.org/10.2478/v10247-012-0076-9>.
- Bailly, C., 2004. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Sci. Res.* 14, 93–107. <https://doi.org/10.1079/ssr2004159>.
- Barros, S.R.B., Dias, M.C.L.L., Cicero, S.M., Krzyzanowski, F.C. 1999. Teste de frio. in: Krzyzanowski, F.C., Vieira, R.D., França Neto, J.B. (Eds.) *Vigor de sementes: conceitos e testes*. Abrates, Londrina, 99. 5.1–5.15.
- Brasil, 2009. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária, Coordenação de Laboratório Vegetal. *Regras para análise de sementes*. Brasília, 2009. ISBN 978-85-99851-70-8.
- Beauchamp, C., Fridovich, I., 1971. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 44, 276–287. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(71\)90370-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(71)90370-8).
- Bernfeld, P., 1955. Amylases  $\alpha$  and  $\beta$  In: *Methods in Enzymology* Vol. 1 12, 149–152.
- Bradford M.N., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* 72, 248-254.
- Cakmak, I., Marschner, H., 1992. Magnesium deficiency and high light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, and glutathione reductase in bean leaves. *Plant Physiol.* 98, 1222–1227. <https://doi.org/10.1104/pp.98.4.1222>.

- Cakmak, I., Horst, W.J., 1991. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiol. Plant.* 83, 463–468. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1991.tb00121.x>.
- Cao, Q., Li, G., Cui, Z., Yang, F., Jiang, X., Diallo, L., Kong, F., 2019. Seed Priming with Melatonin Improves the Seed Germination of Waxy Maize under Chilling Stress via Promoting the Antioxidant System and Starch Metabolism. *Sci. Rep.* 9, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51122-y>.
- Carvalho, N.M., Nakagawa, J., 2000. Sementes: ciência, tecnologia e produção. Fourth ed. UNEP, Jaboticabal.
- Chance, B., Maehly, A.C., 1955. [136] Assay of catalases and peroxidases. *Methods Enzymol.* 2, 764–775. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(55\)02300-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(55)02300-8).
- Costa, L.B.O., Carvalho, I.R., Ferreira, L.L., Szarecki, V.J., Pimentel, J.R., Troyjack, C., Barbosa, M.H., Da Silva, J.A.G., Conte, G.G., Villela, F.A., Pedó, T., Aumonde, T.Z., 2019. The effects of different mechanical detasseling methods on hybrid maize seed production. *Genet. Mol. Res.* 18, 1–8. <https://doi.org/10.4238/gmr18207>.
- da Silva Torres, E.A.F., Garbelotti, M.L., Moita Neto, J.M., 2006. The application of hierarchical clusters analysis to the study of the composition of foods. *Food Chem.* 99, 622–629. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.08.032>.
- Das, K., Roychoudhury, A., 2014. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Front. Environ. Sci.* 2, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2014.00053>.
- de Abreu, V.M., Von Pinho, É.V. de R., Mendes-Resende, M.P., Balestre, M., Lima, A.C., Santos, H.O., Von Pinho, R.G., 2019. Combining ability and heterosis of maize genotypes under water stress during seed germination and seedling emergence. *Crop Sci.* 59, 33–43. <https://doi.org/10.2135/cropsci2018.03.0161>.
- de Oliveira, E., Valiūnas, D., Jović, J., Bedendo, I.P., Urbanavičienė, L., de Oliveira, C.M., 2018. Occurrence and Epidemiological Aspects of Phytoplasmas in Cereals. *Phytoplasmas Plant Pathog. Bact.* - I 67–89. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-0119-3\\_3](https://doi.org/10.1007/978-981-13-0119-3_3).
- Dowd, P.F., Johnson, E.T., 2018. Overexpression of a maize (*Zea mays*) defensin-like gene in maize callus enhances resistance to both insects and fungi. *Agri Gene* 9, 16–23. <https://doi.org/10.1016/j.aggene.2018.07.003>.
- Dias, D.C.F.S., Alvarenga, E.M., 1999. Teste de germinação a baixa temperatura. in: Krzyzanowski, F.C., Vieira, R.D., França Neto, J.B. (Eds.), *Vigor de sementes: conceitos e testes*. Abrates, Londrina, pp. 71-74.
- Egli, D.B., Rucker, M., 2012. Seed vigor and the uniformity of emergence of corn seedlings. *Crop Sci.* 52, 2774–2782. <https://doi.org/10.2135/cropsci2012.01.0064>.

- El-Abady, M.I., 2015. Influence of maize seed size/shape, planted at different depths and temperatures on seed emergence and seedling vigor. *Res. J. Seed Sci.* 8, 1–11. <https://doi.org/10.3923/rjss.2015.1.11>.
- Feng, L., Zhu, S., Zhang, C., Bao, Y., Feng, X., He, Y., 2018. Identification of maize kernel vigor under different accelerated aging times using hyperspectral imaging. *Molecules* 23. <https://doi.org/10.3390/molecules23123078>.
- Ferreira, E.B., Cavalcanti, P.P., Nogueira, D.A., 2014. ExpDes: An R Package for ANOVA and Experimental Designs. *Appl. Math.* 05, 2952–2958. <https://doi.org/10.4236/am.2014.519280>.
- Finch-Savage, W.E., Bassel, G.W., 2016. Seed vigour and crop establishment: Extending performance beyond adaptation. *J. Exp. Bot.* 67, 567–591. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv490>.
- Gergen, I., Harmanescu, M., 2012. Application of principal component analysis in the pollution assessment with heavy metals of vegetable food chain in the old mining areas. *Chem. Cent. J.* 6, 1–13. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-6-156>.
- Giannopolitis C.N, Ries S.K., 1977. Superoxide dismutases I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiol.* 59:309-314. <https://doi.org/10.1104/pp.59.2.309>
- Grzybowski, C.R. de S., Vieira, R.D., Panobianco, M., 2015. Testes de estresse na avaliação do vigor de sementes de milho. *Rev. Cienc. Agron.* 46, 590–596. <https://doi.org/10.5935/1806-6690.20150042>.
- Guo, Y., Liu, L., Zhao, J., Bi, Y., 2007. Use of silicon oxide and sodium silicate for controlling *Trichothecium roseum* postharvest rot in Chinese cantaloupe (*Cucumis melo* L.). *Int. J. Food Sci. Technol.* 42, 1012–1018. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2006.01464.x>.
- Heath, R.L., Packer, L., 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. *Arch. Biochem. Biophys.* 125, 189–198. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(68\)90654-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1).
- Hichem, H., Mounir, D., Naceur, E.A., 2009. Differential responses of two maize (*Zea mays* L.) varieties to salt stress: Changes on polyphenols composition of foliage and oxidative damages. *Ind. Crops Prod.* 30, 144–151. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2009.03.003>.
- Hill, B., Roger, T., Vorrage, F.W., 1997. Comparative Analysis of the Quantization of Color Spaces on the Basis of the CIELAB Color-Difference Formula. *ACM Trans. Graph.* 16, 109–154. <https://doi.org/10.1145/248210.248212>.
- Jung, S., 2013. Exploratory factor analysis with small sample sizes: A comparison of three approaches. *Behav. Processes* 97, 90–95. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2012.11.016>.

- Kar, M., Mishra, D., 1976. Catalase, Peroxidase, and Polyphenoloxidase Activities during Rice Leaf Senescence. *Plant Physiol.* 57, 315–319. <https://doi.org/10.1104/pp.57.2.315>.
- Kishorekumar, A., Jaleel, C.A., Manivannan, P., Sankar, B., Sridharan, R., Panneerselvam, R., 2007. Comparative effects of different triazole compounds on growth, photosynthetic pigments and carbohydrate metabolism of *Solenostemon rotundifolius*. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 60, 207–212. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2007.06.008>.
- Lamichhane, J.R., Debaeke, P., Steinberg, C., You, M.P., Barbetti, M.J., Aubertot, J.N., 2018. Abiotic and biotic factors affecting crop seed germination and seedling emergence: a conceptual framework. *Plant Soil* 432, 1–28. <https://doi.org/10.1007/s11104-018-3780-9>.
- Lorentz, L.H., Nunes, U.R., 2013. Relationship between quality measuring of rice seed batches. *Rev. Cienc. Agron.* 44, 798–804. <https://doi.org/10.1590/S1806-66902013000400017>.
- MacCallum, R.C., Widaman, K.F., Zhang, S., Hong, S., 1999. Sample size in factor analysis. *Psychol. Methods* 4, 84–99. <https://doi.org/10.1037/1082-989X.4.1.84>.
- Marcos Filho, J., 2015b. *Fisiologia de Sementes de Plantas Cultivadas*. FEALQ, Piracicaba.
- Marcos-Filho, J., 2015a. Seed vigor testing: An overview of the past, present and future perspective. *Sci. Agric.* 72, 363–374. <https://doi.org/10.1590/0103-9016-2015-0007>.
- Marcos Filho, J., 2009. Teste de envelhecimento acelerado. in: Krzyzanowski, F.C., Vieira, R.D., França Neto, J.B. (Eds.), *Vigor de sementes: conceitos e testes*. Abrates, Londrina, pp. 3.1-3.24.
- Marinho, J. de L., Costa, D.S. da, Carvalho, D.U. de, Cruz, M.A. da, Zucareli, C., 2019. Evaluation of vigor and tolerance of sweet corn seeds under hypoxia. *J. Seed Sci.* 41, 180–186. <https://doi.org/10.1590/2317-1545v41n2209568>.
- McDonough, C.M., Floyd, C.D., Waniska, R.D., Rooney, L.W., 2004. Effect of accelerated aging on maize, sorghum, and sorghum meal. *J. Cereal Sci.* 39, 351–361. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2004.01.001>.
- Mingoti, S.A., 2005. *Análise de dados através de métodos de estatística multivariada: uma abordagem aplicada*. Editora UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais. ISBN 857041451X.
- Mohammadi, S.A., Prasanna, B.M., 2003. Analysis of genetic diversity in crop plants - Salient statistical tools and considerations. *Crop Sci.* 43, 1235–1248.
- Mohsenin, N.N., 1986. *Physical properties of plant and animal materials*. Gordon and Breach Publishers, New York.

- Mouzo, D., Bernal, J., López-Pedrouso, M., Franco, D., Zapata, C., 2018. Advances in the biology of seed and vegetative storage proteins based on two-dimensional electrophoresis coupled to mass spectrometry. *Molecules* 23, 1–28. <https://doi.org/10.3390/molecules23102462>.
- Moya-Raygoza, G., Palomera-Avalos, V., Galaviz-Mejia, C., 2007. Field overwintering biology of *Spiroplasma kunkelii* (Mycoplasmatales: Spiroplasmataceae) and its vector *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae). *Ann. Appl. Biol.* 151, 373–379. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2007.00185.x>.
- Nakagawa, J., 1999. Testes de vigor baseados na avaliação de plântulas, in: Krzyzanowski, F.C., Vieira, R.D., França-Neto, J.B. (Eds.), *Vigor de sementes: conceitos e testes*. Abrates, Londrina., pp. 2.1-2.21.
- Nakano, Y., Asada, K., 1981. Hydrogen Peroxide is Scavenged by Ascorbate-specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 22, 867–880. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076232>.
- Nerling, D., Coelho, C.M.M., Brümmer, A., 2018. Biochemical profiling and its role in physiological quality of maize seeds. *J. Seed Sci.* 40, 7–15. <https://doi.org/10.1590/2317-1545v40n1172734>.
- Oliveira, C.M. De, Oliveira, E. De, Souza, I.R.P. De, Alves, E., Dolezal, W., Paradell, S., Lenciov, A.M.M.D.R., Frizzas, M.R., 2013a. Abundance and Species Richness of *Leafhoppers* and *Planthoppers* (Hemiptera: Cicadellidae and Delphacidae) in Brazilian Maize Crops. *Florida Entomol.* 96, 1470–1481. <https://doi.org/10.1653/024.096.0427>.
- Oliveira, G.E., Pinho, R.G. Von, Andrade, T. de, Pinho, É.V. de R. Von, Santos, C.D. dos, Veiga, A.D., 2013b. Physiological quality and amylase enzyme expression in maize seeds. *Ciência e Agrotecnologia* 37, 40–48. <https://doi.org/10.1590/s1413-70542013000100005>.
- Oliveira, G.E., Von Pinho, E.V.R., Andrade, T., Souza, J.C., Caixeta, F., Ferreira, R.A.D.C., 2015. Relationship among physiological quality, heterosis, and amylase gene expression in maize seeds. *Genet. Mol. Res.* 14, 8623–8633. <https://doi.org/10.4238/2015.July.31.10>.
- Ossani P.C., Cirillo M.A., 2019. *Análise multivariada package*. R package version 2.1.1
- Pérez-López, E., Olivier, C.Y., Luna-Rodríguez, M., Rodríguez, Y., Iglesias, L.G., Castro-Luna, A., Adame-García, J., Dumonceaux, T.J., 2016. Maize bushy stunt phytoplasma affects native corn at high elevations in Southeast Mexico. *Eur. J. Plant Pathol.* 145, 963–971. <https://doi.org/10.1007/s10658-016-0883-0>.
- R Development Core Team, 2016. *R: a language and environment for statistical computing*. Foundation for Statistical Computing, Vienna.

- Rebolledo, M.C., Dingkuhn, M., Courtois, B., Gibon, Y., Clément-Vidal, A., Cruz, D.F., Duitama, J., Lorieux, M., Luquet, D., 2015. Phenotypic and genetic dissection of component traits for early vigour in rice using plant growth modelling, sugar content analyses and association mapping. *J. Exp. Bot.* 66, 5555–5566. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv258>.
- Rencher, A.C., 2002. *Methods of Multivariate Analysis*, Second Edition. ISBN: 978-0-471-46172-2.
- Rohde, A., Morreel, K., Ralph, J., Goeminne, G., Hostyn, V., De Rycke, R., Kushnir, S., Van Doorselaere, J., Joseleau, J.P., Vuylsteke, M., Van Driessche, G., Van Beeumen, J., Messens, E., Boerjan, W., 2004. Molecular phenotyping of the *pal1* and *pal2* mutants of *Arabidopsis thaliana* reveals far-reaching consequences on phenylpropanoid, amino acid, and carbohydrate metabolism. *Plant Cell* 16, 2749–2771. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.023705>.
- Rohlf, F.J., Fisher, D.R., 2010. Society of Systematic Biologists Tests for Hierarchical Structure in Random Data Sets IN. *Society* 17, 407–412.
- Silva, G.Z. da, Martins, C.C., Bruno, R. de L.A., Pereira, F.E.C.B., Jeromini, T.S., 2019. Multivariate analysis and vigor tests to determine the quality of *Brachiaria decumbens* seeds. *Rev. Ciência Agronômica* 50, 291–299. <https://doi.org/10.5935/1806-6690.20190034>.
- Silva, R.G., Galvão, J.C.C., Miranda, G.V., De Oliveira, E., 2003. Controle genético da resistência aos enfezamentos do milho. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 38, 921–928. <https://doi.org/10.1590/s0100-204x2003000800004>.
- Soleymani, A., 2019. Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seed vigor tests for the prediction of field emergence. *Ind. Crops Prod.* 131, 378–386. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.03.022>.
- Tan-Wilson, A.L., Wilson, K.A., 2012. Mobilization of seed protein reserves. *Physiol. Plant.* 145, 140–153. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2011.01535.x>.
- Tárrago, J.F., Nicolás, G., 1976. Starch Degradation in the Cotyledons of Germinating Lentils. *Plant Physiol.* 58, 618–621. <https://doi.org/10.1104/pp.58.5.618>
- Tonel, F.R., Marini, P., Bandeira, J.D.M., Moraes, D.M. De, Amarante, L., 2013. Salicylic acid : physiological and biochemical changes in seeds and maize seedlings subjected to salt stress 1 Ácido salicílico : modificações fisiológicas e bioquímicas em sementes e plântulas de milho submetidas ao estresse salino 457–465.
- Torres-Moreno, R., Moya-Raygoza, G., Pérez-López, E., 2015. Absence of *Corn Stunt Spiroplasma* and *Maize Bushy Stunt Phytoplasma* in Leafhoppers (Hemiptera: Cicadellidae) that Inhabit Edge Grasses Throughout Winter in Jalisco, Mexico. *Florida Entomol.* 98, 967–969. <https://doi.org/10.1653/024.098.0325>.
- Tattini, M., Galardi, C., Pinelli, P., Massai, R., Remorini, D., Agati, G., 2004. Differential accumulation of flavonoids and hydroxycinnamates in leaves of *Ligustrum vulgare*

- under excess light and drought stress. *New Phytol.* 163, 547–561. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.01126.x>.
- United States Department of Agriculture (USDA)., 2019. World agricultural production. Circular Series WAP 11-19.
- Vieira, R.D., Krzyzanowski, F.C., 1999. Teste de condutividade elétrica. in: Krzyzanowski, F.C., Vieira, R.D., França-Neto, J.B. (Eds.), *Vigor de sementes: conceitos e testes*. Abrates, Londrina pp, 1-26.
- Verma, G., Mishra, S., Sangwan, N., Sharma, S., 2015. Reactive oxygen species mediate axis-cotyledon signaling to induce reserve mobilization during germination and seedling establishment in *Vigna radiata*. *J. Plant Physiol.* 184, 79–88. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2015.07.001>.
- Wang, Y., Jia, D., Guo, J., Zhang, X., Guo, C., Yang, Z., 2017. Antioxidant metabolism variation associated with salt tolerance of six maize (*Zea mays* L.) cultivars. *Acta Ecol. Sin.* 37, 368–372. <https://doi.org/10.1016/j.chnaes.2017.08.007>.
- Wang, W.Q., Liu, S.J., Song, S.Q., Møller, I.M., 2015. Proteomics of seed development, desiccation tolerance, germination and vigor. *Plant Physiol. Biochem.* 86, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.11.003>.
- Wen, D., Hou, H., Meng, A., Meng, J., Xie, L., Zhang, C., 2018. Rapid evaluation of seed vigor by the absolute content of protein in seed within the same crop. *Sci. Rep.* 8, 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23909-y>
- Wijewardana, C., Hock, M., Henry, B., Reddy, K.R., 2015. Screening corn hybrids for cold tolerance using morphological traits for early-season seeding. *Crop Sci.* 55, 851–867. <https://doi.org/10.2135/cropsci2014.07.0487>.
- Wu, X., Liu, H., Wang, W., Chen, S., Hu, X., Li, C., 2011. Proteomic analysis of seed viability in maize. *Acta Physiol. Plant.* 33, 181–191. <https://doi.org/10.1007/s11738-010-0536-4>.
- Yuan, W., Jiang, T., Du, K., Chen, H., Cao, Y., Xie, J., Li, M., Carr, J.P., Wu, B., Fan, Z., Zhou, T., 2019. Maize phenylalanine ammonia-lyases contribute to resistance to Sugarcane mosaic virus infection, most likely through positive regulation of salicylic acid accumulation. *Mol. Plant Pathol.* 20, 1365–1378. <https://doi.org/10.1111/mpp.12817>.
- Zieslin N, Ben-Zaken R., 1993. Peroxidase activity and presence of phenolic substances in peduncles of rose flowers. *Plant Physiology and Biochemistry* 31, 333-339.
- Zucker, M., 1965. Induction of Phenylalanine Deaminase by Light and its Relation to Chlorogenic Acid Synthesis in Potato Tuber Tissue. *Plant Physiol.* 40, 779–784. <https://doi.org/10.1104/pp.40.5.779>.