

**ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM PLÂNTULAS DE *Eucalyptus grandis* PROVENIENTES DE SEMENTES ENVELHECIDAS ARTIFICIALMENTE E NATURALMENTE<sup>1</sup>**

**ENZYME ACTIVITIES FROM ACCELERATED AGING AND STORED SEEDS OF *Eucalyptus grandis***

Maria Letícia Pereira de Camargo<sup>2</sup> Edson Seizo Mori<sup>3</sup> Eduardo José de Mello<sup>4</sup>  
Shinitiro Oda<sup>4</sup> Giuseppina Pacce Lima<sup>5</sup>

**RESUMO**

O presente estudo empregou o procedimento de envelhecimento artificial, submetendo sementes por 96 horas à 42° C e 100% de UR para compará-las com sementes estocadas por 5, 10 e 15 anos e utilizou eletroforese de isoenzimas e atividade de peroxidase por método colorimétrico. Houve um decréscimo significativo na germinação das sementes envelhecidas artificialmente, quando comparadas com as sementes estocadas. A atividade da peroxidase foi baixa, porém houve uma curva ascendente que acompanhou a idade das sementes. Observou-se um aumento nas atividades da malato desidrogenase e  $\alpha$ -esterase 2 e 3 e uma diminuição acentuada para  $\alpha$ -esterase 1 e baixa para a fosfatase ácida. Os resultados acompanharam o aumento do tempo de estocagem das sementes e do estresse que ocorre por causa das condições de temperatura e umidade empregadas no processo de envelhecimento artificial.

**Palavras-chave:** envelhecimento, sementes, *Eucalyptus grandis*, atividade enzimática.

**ABSTRACT**

This research studied the standard procedure developed for crop seeds to examine the biochemical processes in accelerated aging seeds (kept for 96 hours at 42°C and 100% RH) and stored seeds (from 5, 10 and 15 years) using isoenzyme electrophoresis and peroxidase activity by colorimetric assay. There was significant decrease (z-test) in the vigor of accelerated aging seeds (54,9%) when compared to the stored ones (97,25%, 95,22% and 89,25%). The peroxidase (PER, EC 1.11.1.7) activity was low, however there was an increase in activity with seed aging.

1. Trabalho realizado durante estágio de Iniciação Científica na Cia. Suzano de Papel e Celulose - Centro de Pesquisas Florestais.
2. Engenheira Florestal, Acadêmica de Pós-Grauação em Genética, Instituto de Biociências, Universidade Estadual de São Paulo, Fazenda Experimental Lageado, Caixa Postal 237, CEP 18618-00, Botucatu (SP).
3. Dr., Professor do Departamento de Agricultura e Melhoramento Vegetal, Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de São Paulo, Fazenda Experimental Lageado, Caixa Postal 237, CEP 18618-00, Botucatu (SP).
4. Engenheiro Florestal, Técnico da Cia. Suzano de Papel e Celulose, Centro de Pesquisas Florestais, Divisão de Recursos Naturais, Caixa Postal 28, CEP 18200-000, Itapetininga (SP).
5. Dr<sup>a</sup>, Professora do Departamento de Bioquímica, Instituto de Biociências, Universidade Estadual de São Paulo, Ribeirão Júnior, CEP 18618-000, Botucatu (SP).

There was a simultaneous increase in both malate dehydrogenase (MDH, EC 1.1.1.37) and esterase (EST, EC 3.1.1.1) activities. The results followed the increase in the seeds storage period of time and of the stress which occurs due to the temperature and humidity conditions utilized in accelerated aging.

**Key words:** accelerated aging, seeds, *Eucalyptus grandis*, enzyme activities.

## INTRODUÇÃO

A técnica de envelhecimento precoce tem utilidade como teste de vigor em sementes agrícolas e florestais (RAMOS *et al.*, 1992; BANGARWA *et al.*, 1995 e TODD-BOCKARIE & DURYEY, 1993) e pode ser também utilizada como meio para avaliar a eficácia da conservação *ex situ* de espécies florestais (CHASURISRI *et al.*, 1993) e de estudar as mudanças bioquímicas que acompanham os processos de deterioração (SELVA MEENA & SEN-MANDI, 1992 e BASAVARAJAPPA *et al.*, 1991).

Mudanças enzimáticas ocorrem durante a deterioração das sementes, seja por envelhecimento artificial (condições forçadas de temperatura, umidade e luz) ou natural, durante o armazenamento. Com o envelhecimento, a membrana citoplasmática sofre alterações na sua permeabilidade, e alguns componentes podem extravasar para o meio externo; além desse processo, pode ainda ocorrer denaturação de biomoléculas e acumulação de substâncias tóxicas (BASAVARAJAPPA *et al.*, 1991).

Um número elevado de estudos, em espécies agrícolas, demonstrou que, com o envelhecimento das sementes, alguns sistemas isoenzimáticos têm sua atividade diminuída, como por exemplo, peroxidase, fosfatase ácida, malato desidrogenase, glutamato desidrogenase, álcool desidrogenase e succinato desidrogenase para arroz, cevada, trigo e milho, ou aumentada, como no caso das fosfolipases para milho (PRIESTLEY, 1986 e BASAVARAJAPPA *et al.*, 1991).

O monitoramento dessas mudanças pode ser feito com a ajuda de marcadores moleculares, pois, além de fornecerem dados úteis sobre a estrutura e diversidade genética das populações de plantas, possibilitam a visualização da atividade das enzimas nos diferentes estádios da planta. (SCHWARZMANN & GERHOLD, 1991; ALFENAS *et al.*, 1991 e HAASE, 1992).

Monitorar a variabilidade genética em sementes de plantas anuais é mais simples por causa do curto período vegetativo e facilidade para obtenção de resultados com os cruzamentos e retrocruzamentos entre suas progênies. PITEL (1982) citado por PRIESTLEY (1986), estudando a variabilidade isoenzimática de *Pinus banksiana* cujas sementes foram envelhecidas artificialmente em câmara úmida a 43°C, não encontrou diferenças qualitativas nem quantitativas significativas nos diferentes sistemas estudados (esterase, glutamato desidrogenase, leucina aminopeptidase e peroxidase. Porém, STOYANOVA (1991), estudando uma população de trigo, cujas sementes foram submetidas ao envelhecimento precoce, verificou por meio de eletroforese de proteínas e análises citológicas que houve variação nos genótipos, sendo que a perda da viabilidade e a sobrevivência diferencial dos biotipos resultaram em seleção e variabilidade genética nos acessos.

O objetivo desse trabalho foi investigar as possíveis alterações bioquímicas que acompanham a deterioração das sementes de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden em resposta ao envelhecimento artificial e natural, monitorando a atividade isoenzimática e a atividade total de peroxidase.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Testes de germinação e envelhecimento artificial

As sementes utilizadas foram as maiores que 0,71 e menores que 0,84 mm, sendo colocadas 2 gramas por tratamento em gerbox sobre um suporte com tela, sendo utilizado papel de filtro e água destilada como substrato. Para o tratamento de envelhecimento artificial (T1) (as sementes foram tratadas com o fungicida Captan) e foram estocadas em caixas que foram vedadas com plástico. Essas sementes foram coletadas em 1995. Foram colocadas em estufa incubadora, sem-luz, numa temperatura de 42°C por 96 horas. Posteriormente, as sementes foram armazenadas em câmara seca (21°C) e realizou-se testes de germinação com quatro repetições sob temperatura de 25°C e 12 horas de luz; o teste de germinação foi realizado no 15º dia mediante contagem das plântulas, medindo-se a viabilidade dos lotes. Esse tratamento funcionou como testemunha para este trabalho. Para os tratamentos de envelhecimento natural, foram escolhidas as sementes coletadas em 1985 (T2), 1990 (T3) e 1995 (T4). Em ambos os tratamentos (natural e artificial), foram utilizadas sementes de progênies de meios irmãos de uma única árvore matriz e do mesmo lote da Cia. Suzano de Papel e Celulose, sendo também realizado teste de germinação, nas mesmas condições descritas acima, para as sementes envelhecidas naturalmente.

### Eletrforese de isoenzimas

Para a realização dos testes com isoenzimas, foram escolhidos, aleatoriamente, 20 indivíduos de cada tratamento que permaneceram em casa de vegetação.

A extração das enzimas foi feita por meio da maceração manual de 0,2 g de limbo foliar das plântulas com 90 dias e adição de 500 µl de solução de extração número 1 de ALFENAS *et al.* (1991), sendo que o líquido extraído era acondicionado em “ependorffs” mantidos dentro do gelo.

Os extratos obtidos eram centrifugados e o sobrenadante micropipetado em pedaços de papel de filtro com 5 x 10 mm sendo, em seguida, colocados no gel. Foi feita a quantificação de proteína pelo método de BRADFORD (1976), utilizando albumina bovina como padrão, sendo que em cada papel de filtro foi colocado 0,104 µg de proteína retirados dos extratos. Cada gel acondicionava vinte amostras, além de dois pedaços de papel de filtro contendo solução marcadora de azul de bromofenol a 0,1 % colocados nas extremidades. A solução marcadora serviu para padronizar as distâncias alcançadas pelas isoenzimas.

Os sistemas isoenzimáticos realizados foram:  $\alpha$ -esterase (EST - EC 3.1.1.1), fosfatase ácida (ACP - EC 3.1.3.2), peroxidase (PER - EC 1.11.1.7) e malato desidrogenase (MDH - EC 1.1.1.37). Os sistemas de tampão gel/eletrodo utilizados foram: tris-citrato (SOLTIS *et al.* 1982) e citrato-morfolina (CLAYTON e TRETIAK, 1972).

O meio suporte empregado foi o gel horizontal de penetrose de milho 30 e amido de batata (Sigma) numa concentração de 11,5% na proporção 3:1, mantido sob refrigeração durante toda a corrida. Após 30 minutos do início da corrida os papéis de filtro contendo o extrato eram retirados, e o tempo total da corrida era de 12 a 14 horas, quando o marcador de bromofenol atingia 8,0 cm de migração em média.

Feito isso, os géis eram cortados em duas fatias de 2,0 mm de espessura e preparados para coloração. Após a revelação, estes eram colocados em bastidores de madeira envoltos em papel celofane para que secassem, permitindo a realização das leituras em espectrofotômetro.

### Atividade específica e total da peroxidase

A atividade da peroxidase foi feita segundo metodologia descrita por ALLAIM *et al.* (1974) e modificado por LIMA (1994). Cinco plântulas de cada tratamento foram maceradas em tampão fosfato de sódio 0,2 M (pH 6,7) e centrifugados a 10.000 rpm por vinte minutos. Do sobrenadante, 0,5 ml era pipetado em tubos de ensaio, sendo adicionado 0,5 ml de tampão fosfato de potássio e mais 0,5 ml de dois tipos de soluções, uma contendo água oxigenada e outra contendo 4-aminoantipirina (AAP). Após 5 minutos em banho-maria a 30°C a reação era interrompida com álcool absoluto e a absorbância era lida a 505 nm, sendo que:

$$U = V_s \times \Delta_{505} \times (6,58 \times T)^{-1}$$

Em que: U = atividade específica;

$V_s$  = volume final da solução;

$\Delta_{505}$  = absorbância lida a 505 nm;

6,58 = absorvidade molar;

T = tempo da reação.

$$U_t = U \div P$$

Em que:  $U_t$  = atividade total;

P = peso da amostra.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Testes de Germinação

A taxa de germinação decresceu com o aumento do tempo de armazenamento das sementes, sendo que as sementes envelhecidas artificialmente apresentaram menor vigor (54,9%), quando comparadas com os tratamentos das sementes envelhecidas naturalmente (Teste de Tukey, 5%), demonstrando que o tratamento das sementes colocadas a 42°C e 100% de UR por 96 horas provocou um declínio na germinação destas (Figura 1). O estresse do tratamento de envelhecimento artificial foi maior, causado provavelmente pela temperatura utilizada no método (42°C); apesar de ser prescrita em testes de envelhecimento precoce PELA ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSTS (1983), BLANCHE *et al.* (1988) e CHAISURISRI *et al.* (1993) recomendam temperaturas mais baixas, até 37°C para sementes florestais.

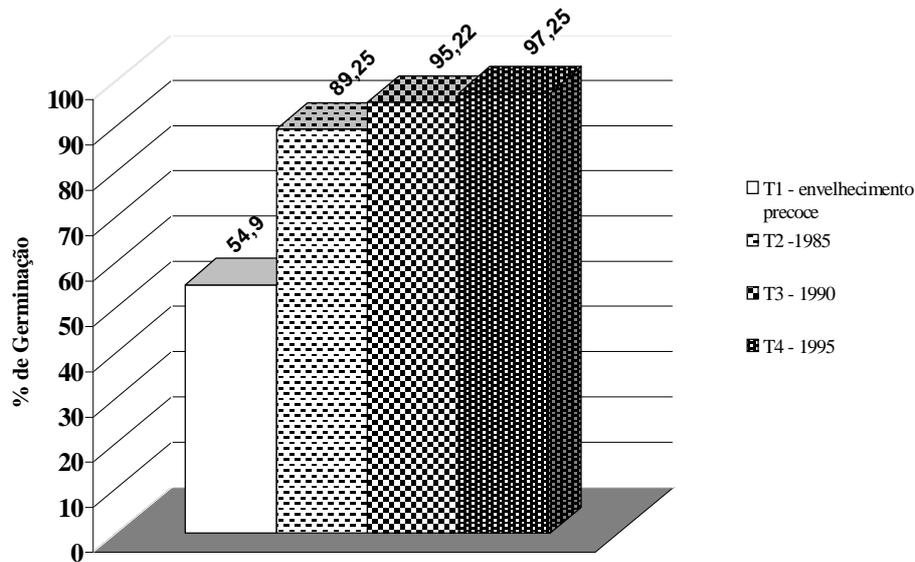


FIGURA 1: Germinação de sementes envelhecidas artificialmente (T1) e naturalmente (T2- colhidas em 1985, T3 – colhidas em 1990 e T4 – colhidas em 1995).

### Atividade da peroxidase

A peroxidase utiliza o peróxido de hidrogênio para oxidar uma grande variedade de substâncias doadoras de hidrogênio como fenóis, grupos com anéis aromáticos, diaminas, ácido ascórbico, aminoácidos e alguns íons inorgânicos (NKANG, 1996). São monômeros de peso molecular de 40.000 daltons constituídos de carboidratos e proteínas combinados com porfirina férrica. Sua mobilidade eletroforética pode ser alterada consideravelmente pela temperatura e pH (LIU, 1975).

Pelo fato dessa enzima possuir uma reação diferente para cada substrato empregado (O-dianisidina, guaiacol, benzidina, ácido ascórbico, etc.), o método eletroforético em gel de amido descrito por ALFENAS *et al.* (1991) não mostrou nenhuma atividade sendo, por isso, utilizado o método de atividade parcial e total de peroxidase descrito por ALLAIM *et al.* (1974) e modificado por LIMA (1994).

A atividade dessa enzima varia com o tipo de tecido e estágio de desenvolvimento da planta, sendo sua atividade inversamente proporcional ao crescimento do indivíduo. Esse sistema enzimático tem sido usado como modelo para estudar o controle hormonal e os processos de crescimento nas plantas (DENNA & ALEXANDER, 1975). Pode também estar relacionada à peroxidação de lipídios e, assim como as fosfatases ácidas, ao processo de envelhecimento (WILSON & MC DONALD Jr, 1986 e VIEIRA & CARVALHO, 1994).

TABELA 1: Média, desvio padrão e resultado da análise estatística dos valores da atividade total ( $U_t$ ) da peroxidase em  $\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2/\text{min}$ , conforme metodologia descrita por ALLAIM *et al.*, (1974) e modificada por LIMA (1994).

Tratamentos	$U_t(\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2/\text{min})$
Sementes envelhecidas artificialmente	0,0418 a $\pm$ 0,0026
Sementes coletadas em 1985	0,0386 a $\pm$ 0,0099
Sementes coletadas em 1990	0,029 b $\pm$ 0,0056
Sementes coletadas em 1995	0,0242 b $\pm$ 0,0049

Em que: CV = 7,85%; Médias seguidas de mesmas letras não diferem entre si no nível de 5% de significância (Teste de Tukey).

No presente trabalho a atividade da peroxidase foi muito baixa, variando de 0,024 a 0,041  $\mu\text{mol de peróxido/minuto}$  (Tabela 1 e Figura 2).

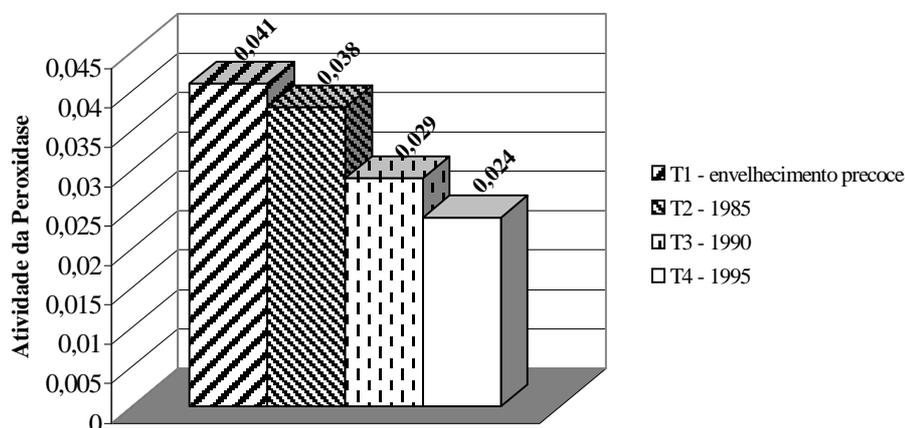


FIGURA 2: Atividade total da peroxidase ( $\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2/\text{min}$ ).

A baixa atividade da peroxidase em sementes ortodoxas também foi observada em coníferas por PITEL & CHELIAK (1986). Observou-se um aumento na atividade dessa enzima acompanhando o aumento no tempo de armazenamento, sendo maior para as sementes que sofreram envelhecimento artificial. Esse fato pode ser explicado pela oxidação imediata das substâncias tóxicas, principalmente fenóis, acumuladas no processo de deterioração.

### Atividade isoenzimática

Para a malato desidrogenase, nos dois locos observados (MDH-1 e MDH-2), a atividade foi lida a 340 nm e aumentou gradualmente com o tempo de armazenamento, mostrando-se mais alta nas sementes envelhecidas artificialmente (Figura 3). O loco mais rápido possui padrão monomórfico

e o mais lento, com 2 alelos, possui estrutura dimérica. Essa enzima tem uma importante função metabólica na regulação iônica, ajuste osmótico e produção de NADPH, participa da fotorrespiração e atua na fixação de CO<sub>2</sub>, sendo que cada função depende da localização da enzima dentro da planta (mitocôndrias, peroxissomas ou cloroplastos) (TING *et al.*, 1975). PITEL & CHELIAK (1986) também observaram um aumento gradual na atividade da MDH com a estratificação de sementes.

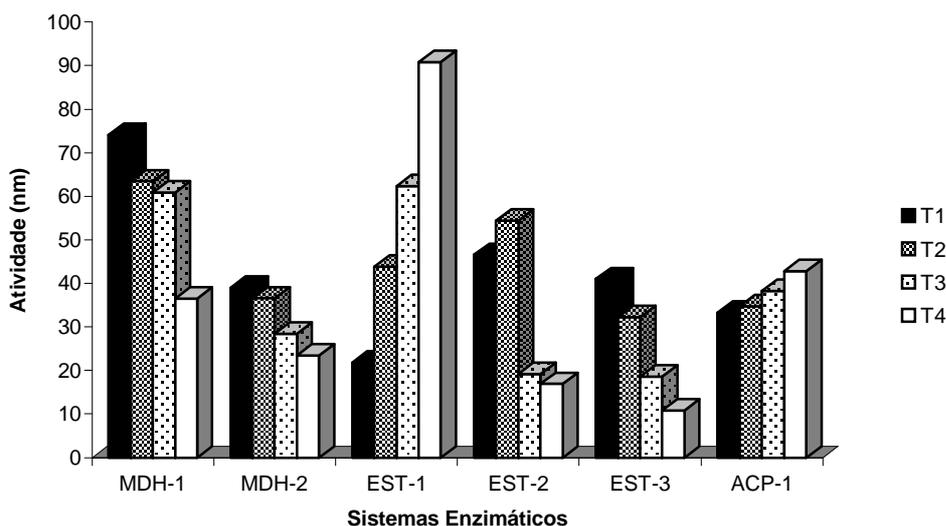


FIGURA 3: Atividade (nm) dos sistemas enzimáticos MDH,  $\alpha$ -EST e ACP por densitometria (T1 – sementes envelhecidas artificialmente; T2, T3 e T4 sementes colhidas em 1985, 1990 e 1995 respectivamente).

A  $\alpha$ -esterase é uma enzima monomérica para os três locos observados ( $\alpha$ -EST-1,  $\alpha$ -EST-2 e  $\alpha$ -EST-3) (MORI, 1993 e MORAN & BELL, 1983). Na primeira zona de atividade ou loco houve uma diminuição na atividade da enzima com o tempo de armazenamento, sendo que a maior atividade foi de quase 100% para as sementes mais novas, coletadas em 1995 (T4). Na segunda, as sementes colhidas em 1985 mostraram maior atividade, porém, houve uma tendência de aumento da atividade com o armazenamento. O terceiro loco apresentou baixa atividade, sendo que a tendência foi de aumento para as sementes mais velhas (Figura 3).

A fosfatase ácida (ACP) atua no metabolismo de carboidratos e fosfatos, participa da mobilização das proteínas de reserva, principalmente durante a germinação e crescimento da plântula, estando presente nos corpos de proteína durante o desenvolvimento da semente e sendo ativada durante a germinação (DeMASON *et al.*, 1989). É uma enzima de estrutura monomérica com um loco e dois alelos. Sua atividade foi lida a 300 nm e mostrou decréscimo com o tempo de armazenamento, mostrando-se um pouco baixa em todos os tratamentos (menos de 50%) (Figura 3). SELVA MEENA & SEN-MANDI (1992) observaram que tratamentos severos de envelhecimento artificial podem resultar na ativação das fosfatases da membrana, possivelmente durante a exposição às altas temperaturas em consequência do choque térmico enquanto que nas sementes e/ou embriões envelhecidos naturalmente ocorre um processo gradual de inativação da atividade da ACP. Para essa

enzima as diferenças entre os tratamentos não foram significativas, não sendo um parâmetro eficiente de análise para tal estudo.

## CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstraram que:

Houve diminuição do vigor das sementes envelhecidas artificialmente, quando comparadas com as sementes armazenadas por treze anos.

A peroxidase possui atividade muito baixa, porém foi observado um crescimento na atividade com relação ao aumento da idade das sementes.

Houve um aumento na atividade para a maioria dos sistemas avaliados (PER, MDH-1 e 2,  $\alpha$ -EST -2 e 3).

Observou-se uma diminuição acentuada na atividade enzimática para  $\alpha$ -EST-1.

Em todos os tratamentos os valores da atividade enzimática para ACP -1 não foram significativos.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Técnica Florestal Maria Elisa Kovalski da Cia. Suzano de Papel e Celulose, pelos testes de envelhecimento precoce e de germinação das sementes; à Engenheira Florestal Andreia Henrique, pela colaboração nos testes de atividade de peroxidase, e à Companhia Suzano de Papel e Celulose, pelo suporte financeiro e bolsa concedida.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A.C.; PETERS, I.; BRUNE, W. *et al.* **Eletrforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa: UFV 1991. 242 p.
- ALLAIM, C.C.; POON, L.S.; CHAN, C.S.G. *et al.* Enzymatic determination of total serum cholestrol. **Clin. Chem.**, v. 20, p. 470-475, 1974.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSTS. **Seed vigor testing handbook**. 1993. (Contribution number 32).
- BANGARWA, K.S.; SINGH, V.P.; TOMER, R.P.S. Progeny testing for seed quality parameter in *Dalbergia sisso* Roxb. **Seed Sci. & Technol.**, v. 23, p. 253-257, 1995.
- BASAVARAJAPPA, B.S.; SHETTY, H.S.; PRAKASH, H.S. Membrane deterioration and other biochemical changes, associated with accelerated ageing of maize seeds. **Seed Sci. & Technol.**, v. 19, p. 279-286, 1991.
- BLANCHE, C.A.; ELAM, W.W.; HODGES, J.D. Accelerated aging of *Quercus nigra* seed: biochemical changes and applicability as a vigor test. **Can. J. For. Res.**, v. 20, n. 10, p. 1611-1615, 1990.

- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- CHAISURISRI, K.; EDWARDS, D.C.W.; EL-KASSABY, Y.A. Accelerated aging of Sitka Spruce seeds. **Silvae Genetica**, v. 42, n. 6, p. 303-308, 1993.
- CLAYTON, J. & TRETIAK, D. Amine-citrate buffers for pH control in starch gel electrophoresis. **Journal of Fisheries Research Board of Canada**, v. 29, p. 1169-1172, 1972.
- DEMASON, D.A.; STILLMAN, J.I. Acid phosphatase localization in seedling tissues of the palms, *Phoenix dactylifera* and *Washingtonia filifera*, and its relevance to controls of germination. **Can. J. Bot.**, v. 67, p. 1103-1110, 1989.
- DENNA, D.W.; ALEXANDER, M.B. The isoperoxidases of *Curcubita pepo* L. In: MARKET, C.L. **Isozymes II: physiological function**. New York: Academic Press, 1975. p. 851-864.
- HAASE, P. Isozyme variation and genetic relationships in *Phyllocladus trichomanoides* and *P. alpinus* (Podocarpaceae). **New Zealand Journal of Botany**. v. 30, p. 359-363, 1992.
- KIGEL, J. & GALILI, G. **Seed development and germination**. New York: Marcel Dekker, 1995. 853 p.
- LIMA, G. P.P. . **Efeito do cálcio sobre o teor de poliaminas, peroxidase e redutase de nitrato em calus de arroz (*Oryza sativa* L. Cv. IAC 44-40)**. 1994. 84 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu.
- LIU, E. Substrate specificities of plant peroxidase isozymes. In: MARKET, C.L. **Isozymes II: physiological function**. New York: Academic Press, 1975. p. 837-849.
- MORAN, G.F.; BELL, C.J. *Eucalyptus*. In: TANKSLEY, S.D.; ORTON, T.J. **Isozymes in plant genetic and breeding**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1983. p. 423-441.
- MORI, E.S. **Variabilidade genética isoenzimática em uma população de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden submetida a diferentes intensidades de seleção**. 1993. 119 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiróz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- NKANG, A. Effect of cyanide pretreatment on Peroxidase activity in germinating seeds of *Guilfoylia monostylis*. **J. Plant Physiol.**, v. 149, p. 3-8, 1996.
- PITEL, J.A.; CHELIAK, W.M. Enzyme activities during imbibition and germination of seeds of tamarack (*Larix laricina*). **Physiol. Plant.**, v. 67, p. 562-569, 1986.
- PRIESTLEY, D.A. **Seed aging**. Ithaca- NY: Cornell University Press, 1986. 304 p.
- RAMOS, A.; BIANCHETTI, A.; MARTINS, E.G. Viabilidade de lotes de sementes de bracatinga-comum (*Mimosa scabrella* Benth) e de bracatinga-argentina (*Mimosa scabrella* var. *aspericarpa*) após teste de envelhecimento precoce. **Bol. Pesq. Flor.**, v. 24/25, p. 79-82, 1992.
- SCHWARZMANN, J.F.; GERHOLD, H.D. Genetic structure and mating system of Northern red oak (*Quercus rubra* L.) in Pennsylvania. **Forest Science**, v. 37, n. 5 p. 1376-1389, 1991.

- SELVA MEENA RAJAGOPAL, A.; SEN-MANDI, S. Studies on acid and alkaline phosphatases in aged rice embryos. **Seed Sci. & Technol.**, v. 20, p. 215-222, 1992.
- SOLTIS, D.E.; HAUFLE, C.H.; DARROW, D.C. *et al.* Starch gel electrophoresis of ferns: a compilation of grinding buffers, gel and electrode buffers, and staining schedules. **American Fern Journal**, v. 73, n. 1, p. 9-26, 1983.
- STOYANOVA, S.D. Genetic shifts and variations of gliadins induced by seed ageing. **Seed Sci. & Technol.**, v. 19, p. 363-371, 1991.
- TING, I.P. FÜHR, I.; CURRY, R. *et al.* Malate dehydrogenase isozymes in plants: preparation, properties, and biological significance. *In: MARKET, C.L. Isozymes II: physiological function.* New York: Academic Press, 1975. p. 369-384.
- TODD-BOCKARIE, A.H.; DURYE, M.L. Seed pretreatment methods to improve germination of the multipurpose west African forest species *Dialium guineense*. **Forest Ecology and Management.**, v. 57, p. 257-273, 1993.
- VIEIRA, R.D.; CARVALHO, N.M. O conceito de vigor em sementes. *In: Testes de vigor em sementes.* Jaboticabal: FUNEP, 1994. p. 1-13.
- WILSON Jr., D.O.; McDONALD, Jr. The lipid peroxidation model of seed ageing. **Seed Sci. & Technol.**, v. 14, n. 2, p. 269-300, 1986.