

ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS EM SEMENTES DE ALGODÃO SUBMETIDAS AO ENVELHECIMENTO ARTIFICIAL

PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL ALTERATIONS IN COTTON SEEDS SUBMITTED TO THE ARTIFICIAL AGING

Raquel Alves de FREITAS¹; Denise Cunha Fernandes dos Santos DIAS²; Luiz Antônio dos Santos DIAS³; Maria Goreti de Almeida OLIVEIRA²; Inês Chamel JOSÉ⁴

RESUMO: A Pesquisa teve por objetivo avaliar as alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes do algodoeiro submetidas ao envelhecimento acelerado. As sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L.) das variedades Fabrika-lote 1, Fabrika-lote 2, Deltaopal, IAC-20 RR e Makina, deslindadas quimicamente, foram submetidas a 42°C e 100% UR por períodos de 0, 24, 48, 72, 96 e 120 horas. Após cada período de envelhecimento, foram realizadas avaliações da qualidade fisiológica (germinação, envelhecimento acelerado e germinação a baixa temperatura) e determinações bioquímicas (conteúdo de lipídios, atividade das enzimas lipoxigenase e fosfatase ácida). O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado, num esquema de parcelas subdivididas. Os resultados permitiram concluir que o aumento do período de envelhecimento artificial acarretou decréscimos na viabilidade, no vigor, nas atividades de lipoxigenase, fosfatase ácida e nos teores de lipídios das sementes. As alterações fisiológicas e bioquímicas, foram eficientes para mostrar o efeito deteriorativo que o envelhecimento artificial provoca nas sementes de algodão.

UNITERMOS: *Gossypium hirsutum*; Sementes; Vigor; Envelhecimento artificial; Alterações bioquímicas.

INTRODUÇÃO

O teste de envelhecimento acelerado, amplamente utilizado em sementes de diversas culturas (McDonald Júnior, 1995), consta da submissão das sementes a condições de temperatura e umidade relativa elevadas (envelhecimento artificial) anteriormente à realização do teste de germinação (ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSTS, AOSA, 1983). Apesar de originalmente desenvolvido para determinar o potencial de armazenamento das sementes, tem sido verificado que seus resultados estão correlacionados com a emergência de plântulas de algodão, ervilha, feijão e soja (VENTER, 2000).

Lago (1985), avaliando a eficiência de testes de vigor na predição do potencial de armazenamento de sementes de algodoeiro, observando que, em sementes tratadas com fungicidas, o teste de envelhecimento acelerado (42°C/72 h) destacou-se positivamente dos

demais. Na mesma espécie, Laposta, Vieira e Carvalho (1995) detectaram que o teste de envelhecimento acelerado foi eficiente para permitir a separação de lotes em diferentes níveis de vigor.

Sung e Jeng (1994) observaram que o envelhecimento acelerado, estimulando a peroxidação de lipídios e reduzindo a atividade de enzimas removedoras de peróxido, promove a acumulação de peróxidos e a redução na atividade de lipoxigenase nas sementes.

Basavarajappa, Shetty e Prakash (1991), avaliaram a deterioração de membranas celulares e mudanças bioquímicas específicas em sementes de milho submetidas ao envelhecimento acelerado, verificando decréscimos nas atividades de peroxidase, de fosfatase ácida, de fosfomonoesterase e de desidrogenases. Trabalhando com a mesma espécie, Spinola, Cícero e Melo (2000) verificaram que as alterações nas isoenzimas fosfatase ácida e peroxidase foram mais efetivas do que os testes de vigor para avaliar a qualidade das sementes.

¹ Técnica de Nível Superior, Embrapa Hortaliças, raquel@cnph.embrapa.br.

² Professora dos Departamentos de Fitotecnia e de Bioquímica e Biologia Molecular / UFV, dcdias@ufv.br.

³ Pesquisador do BIOAGRO / UFV, lasdias@ufv.br.

⁴ Estudante de doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos / UFV.

Received: 23/06/05 Accepted: 29/09/05

Em sementes de feijão, a alteração nos padrões eletroforéticos de proteínas totais, ocorreram após 72 horas de exposição ao envelhecimento acelerado, enquanto que sementes naturalmente envelhecidas só apresentaram alterações após dois anos de armazenamento a 15°C (Machado Neto, Custódio e Takaki, 2001).

Com a intensificação do processo deteriorativo, a oxidação reduz a quantidade de lipídios nas sementes. (Koostra e Harrington, 1973; Basavarajappa, Shetty e Prakash, 1991; Kalpana e Madhava Rao, 1996). Por outro lado, Powell e Harman (1985) não detectaram redução deste componente em sementes deterioradas.

São escassos os trabalhos que buscam determinar as alterações decorrentes do envelhecimento acelerado em algodão. Dessa forma, o trabalho objetivou estudar as alterações fisiológicas e bioquímicas ocorridas em sementes dessa espécie submetidas ao envelhecimento acelerado.

MATERIAL E MÉTODOS

Sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L.) deslindadas quimicamente, por via úmida, das variedades Fabrika-lote 1, Fabrika-lote 2, Deltaopal, IAC-20 RR e Makina, foram distribuídas em camada única sobre tela de alumínio, fixada em caixa plástica tipo “gerbox”, contendo 40mL de água. As caixas contendo as sementes, foram fechadas e mantidas a 42°C por períodos de 0, 24, 48, 72, 96 e 120 horas, para a obtenção de tratamentos (períodos) de envelhecimento artificial.

Os tratamentos foram avaliados com o emprego das seguintes determinações:

Germinação: conduzido com oito subamostras de 25 sementes, em rolo de papel toalha, umedecido com água na proporção de 2,5 vezes o peso do papel seco, em germinador a 25°C. Foram realizadas contagens aos quatro e sete dias após a instalação do teste e as avaliações feitas conforme critérios estabelecidos pelas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 1992).

Germinação a baixa temperatura: adotou-se a metodologia recomendada pela AOSA (1983) e descrita por Dias e Alvarenga (1999). Conduzido com quatro subamostras de 50 sementes, adotando o mesmo procedimento descrito para o teste de germinação, sendo que os rolos foram acondicionados em sacos plásticos e mantidos a 18°C, na ausência de luz. A avaliação, realizada oito dias após a instalação do teste, considerou a porcentagem de plântulas normais que apresentavam comprimento do eixo hipocótilo-radícula maior ou igual a 4,0cm;

Determinação da atividade de lipoxigenase: para obtenção do extrato, as sementes foram maceradas em almofariz em banho de gelo, utilizando tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,5, na proporção 1:10 (p/v). Posteriormente, o extrato foi centrifugado a 17.200 xg por 30 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi utilizado para determinação da atividade de lipoxigenase e de proteína. A concentração de proteína foi determinada pelo método do ácido bicinonínico desenvolvido por Smith et al. (1985). A atividade de lipoxigenase sobre o ácido linoléico foi determinada segundo o método descrito por Axelrod, Cheesbrough e Laasko (1981). Para tanto, misturaram-se 1,0 µL do extrato e 4,0 µL de uma solução-estoque de linoleato de sódio 10 mM em 1,0 mL de tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 5,0 a 25°C, de acordo com os resultados de experimentos preliminares. A absorvância da mistura de reação foi determinada de 15 em 15 segundos, a 234 nm, por um período de 2,5 minutos. O mesmo procedimento foi usado para o branco, o qual não continha o extrato da semente. As velocidades iniciais, obtidas pela medida de absorção a 234 nm, em função do tempo, foram determinadas utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 25.000 M⁻¹ cm⁻¹ para o produto formado. Todas as incubações foram feitas em triplicata.

Determinação da atividade de fosfatase ácida: para obtenção do extrato, as sementes foram maceradas em almofariz em banho de gelo, utilizando tampão acetato de potássio 0,1 M, pH 5,0, na proporção 1:10 (p/v). Posteriormente, o material foi centrifugado a 24.700 xg por 15 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi utilizado para determinação da atividade de fosfatase ácida, a qual foi determinada seguindo a metodologia descrita por Maia, Moraes e Moraes (2000). Para tanto, 50 µL do extrato foi adicionado a uma mistura contendo 100 µL do substrato p-nitrofenil fosfato 0,018 M e 800 µL do tampão acetato de potássio 0,1 M, pH 5,0. Os tubos foram incubados a 30°C por 5 minutos. Posteriormente, adicionou-se 1,0 mL de hidróxido de sódio 0,5 M e procedeu-se à leitura em espectrofotômetro a 400 nm, após o branco (1,0 mL da solução tampão e 2 mL de água destilada). Os resultados foram expressos em unidades de absorvância a 400 nm min⁻¹ mg⁻¹ de semente. Todas as análises foram feitas em triplicata,

Determinação de lipídios: Foi realizada em aparelho extrator de Soxhlet, utilizando éter de petróleo como solvente, segundo o procedimento descrito em Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985), com refluxo por 24 horas.

As sementes das diferentes variedades foram usadas apenas para dar suporte aos testes avaliados, uma vez que as mesmas não foram produzidas sob as mesmas

condições; assim, a variação pode não ser inerente à variedade.

O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado e analisado num esquema de parcelas subdivididas. As variedades (Fabrika-lote 1, Fabrika-lote 2, Deltaopal, IAC-20 RR e Makina) foram alocadas nas parcelas e as subparcelas foram constituídas pelos períodos de envelhecimento artificial (0, 24, 48, 72, 96 e 120 horas). Os testes de avaliação da qualidade fisiológica das sementes foram conduzidos com quatro repetições, enquanto que os bioquímicos foram conduzidos com três repetições. Os dados não foram transformados por terem atendidos às pressuposições dos testes de normalidade (Lilliefors) e de homogeneidade (Cochran). Em seguida, foram então submetidos à análise de variância, efetuando-se os respectivos desdobramentos da interação, quando necessário. A comparação entre a qualidade fisiológica das sementes das diferentes variedades foi feita pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade, e para o período de envelhecimento foi aplicada análise de regressão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela 1 encontram-se os dados referentes aos testes de germinação e germinação a baixa temperatura. Não foram apresentados os dados para cada período de envelhecimento porque a interação entre variedades e períodos de envelhecimento foi não significativa. Com relação ao teste de germinação pode-se observar que as sementes das variedades Fabrika-lote 1, Deltaopal e Fabrika-lote 2 mostraram-se estatisticamente iguais e superiores as demais, no entanto as sementes da variedade Fabrika-lote 2 também não diferiram das da variedade IAC-20 RR e esta mostrou-se semelhante as da variedade Makina. Os resultados obtidos no teste de germinação a baixa temperatura, evidenciaram as sementes da variedade Fabrika-lote1 como de alta qualidade fisiológica superando as das variedades Fabrika-lote 2, Deltaopal e IAC-20 RR, de qualidade intermediária e as sementes da variedade Makina, de qualidade inferior. Desta forma, o teste de germinação a baixa temperatura mostrou-se eficiente para discriminar níveis de qualidade fisiológica das sementes.

Tabela 1. Médias em porcentagem de plântulas normais, obtidas nos testes de germinação e germinação a baixa temperatura de sementes de algodoeiro correspondentes aos cinco períodos de envelhecimento.

Variedades	Testes	
	Germinação (%)	Germinação a baixa temperatura (%)
Fabrika-Lote 1	81,50 a	57,83 a
Fabrika-Lote 2	78,75 ab	48,42 b
Deltaopal	81,83 a	51,42 b
IAC-20 RR	76,33 bc	52,00 b
Makina	72,92 c	44,08 c
CV (%)	4,47	10,11

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Dias e Alvarenga (1999) relataram a importância do teste de germinação a baixa temperatura para a avaliação da qualidade de sementes de algodoeiro. Dentre os testes utilizados por Freitas *et al.* (2000) o teste de germinação a baixa temperatura mostrou-se o mais eficiente para avaliar o vigor dessas sementes.

Pelas figuras 1 e 2, observa-se que a germinação

e a germinação a baixa temperatura, apresentaram respostas lineares e decrescentes com o aumento do período de envelhecimento. Segundo Roberts (1981), o aumento do tempo de exposição a condições de alta temperatura e alta umidade relativa acelera o processo de deterioração, com reflexos sobre a germinação das sementes.

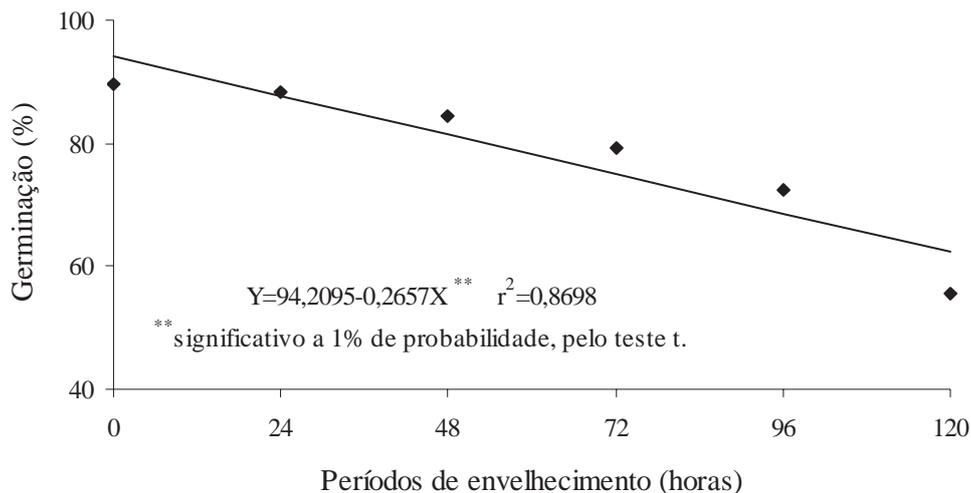


Figura 1. Estimativa da porcentagem de plântulas normais, obtidas no teste de germinação, em função do período de envelhecimento.

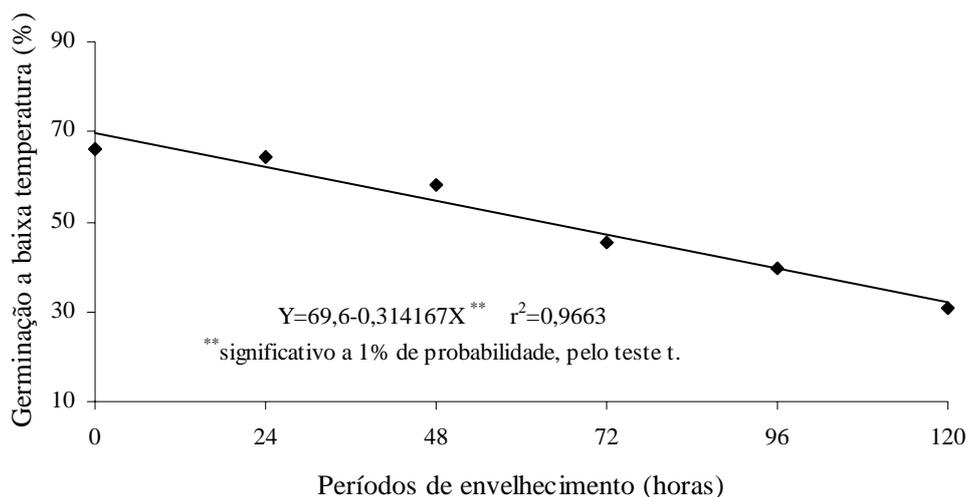


Figure 2. Estimativa da porcentagem de plântulas normais, obtidas no teste de germinação a baixa temperatura, em função do período de envelhecimento.

Observa-se que as sementes das variedades Fabrika-lote 1 e Deltaopal apresentaram, de modo geral, maior atividade específica de lipoxigenases, comparando-se às sementes das demais variedades (tabela 2), sendo

que as sementes da variedade Makina, as quais apresentaram qualidade fisiológica inferior às sementes das demais variedade, também apresentaram a menor atividade dessa enzima.

Tabela 2. Médias ($\text{mM s}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína) da atividade específica de lipoxigenases de sementes de algodoeiro, em diferentes períodos de envelhecimento.

Variedades	Períodos de envelhecimento (horas)					
	0	24	48	72	96	120
Fabrika-Lote 1	13,83 ab	13,25 a	11,54 a	11,39 a	9,55 a	8,51 a
Fabrika-Lote 2	12,46 bc	10,45 b	9,48 b	8,46 b	8,41 bc	6,30 b
Deltaopal	15,06 a	13,75 a	12,52 a	10,37 a	8,65 ab	8,06 a
IAC-20 RR	11,32 cd	9,45 c	8,68 bc	8,33 b	7,57 c	5,35 c
Makina	10,59 d	8,53 c	7,66 c	5,48 c	5,37 d	4,49 d
CV (%)	4,31	3,16	3,82	4,48	4,79	4,84

Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Com o aumento do período de envelhecimento artificial verifica-se que ocorreu redução na atividade específica de lipoxigenases (figura 3). Sung e Jeng (1994) também observaram redução na atividade de lipoxigenases em sementes de amendoim com o prolongamento do período de envelhecimento acelerado. O papel das lipoxigenases ainda não está claro. Enquanto alguns autores afirmam que essas enzimas e seus produtos formados estão diretamente relacionados ao processo de

envelhecimento das sementes, para Sung e Jeng (1994) isso parece pouco provável, pelo menos em sementes de amendoim, uma vez que tanto o eixo embrionário quanto os cotilédones mostraram um rápido declínio na atividade desta enzima com o aumento do período de envelhecimento acelerado. No entanto, de acordo com Kalpana e Madhava Rao (1993) não são necessários altos níveis de atividade de lipoxigenase para propagar o processo peroxidativo, pois, uma vez desencadeado, o processo é auto propagativo.

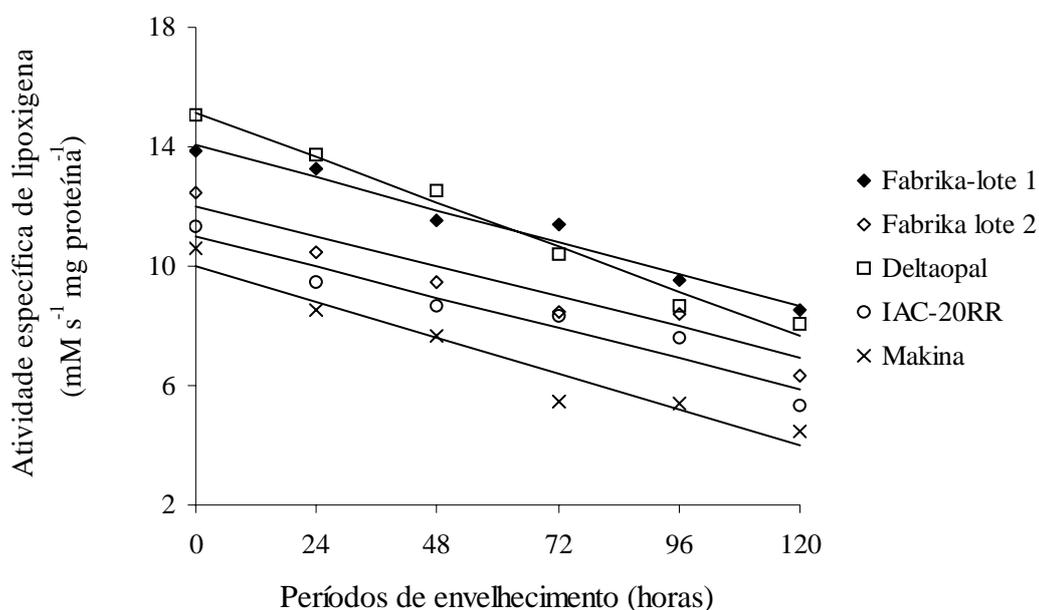


Figura 3. Estimativa da atividade específica de lipoxigenases ($\text{mM s}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína), em função do período de envelhecimento.

Na tabela 3, observa-se que as sementes da variedade IAC-20 RR apresentaram maior atividade da enzima fosfatase ácida ao longo do período de envelhecimento. Cabe ressaltar que, as sementes dessa variedade, foram consideradas no teste de germinação a baixa temperatura como de qualidade intermediária em relação às das demais variedades. Os resultados obtidos

indicam que a atividade de fosfatase ácida parece ser uma característica de cada variedade. Contudo, parece também haver uma relação entre redução na atividade da fosfatase ácida e decréscimo no vigor das sementes, uma vez que nas sementes da variedade IAC-20 RR a redução da atividade enzimática foi um pouco mais acentuada que para as sementes das demais variedades (figura 4).

Tabela 3. Médias (Unidade de absorvância a 400 nm. Minuto⁻¹ mg⁻¹ de semente) da atividade fosfatase ácida de sementes de algodoeiro, em diferentes períodos de envelhecimento.

Variedades	Períodos de envelhecimento (horas)					
	0	24	48	72	96	120
Fabrika-Lote 1	64,91 c	63,84 d	61,67 c	59,29 c	53,23 d	51,21 d
Fabrika-Lote 2	69,58 b	67,73 b	65,12 b	61,41 b	56,59 c	53,38 c
Deltaopal	69,16 b	65,91 c	59,37 d	62,14 b	59,62 b	56,78 b
IAC-20 RR	82,32 a	77,89 a	73,78 a	70,06 a	66,65 a	64,15 a
Makina	69,88 b	57,47 e	52,16 e	48,39 d	44,70 e	41,98 e
CV (%)	1,01	0,94	1,07	1,16	1,43	1,30

Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

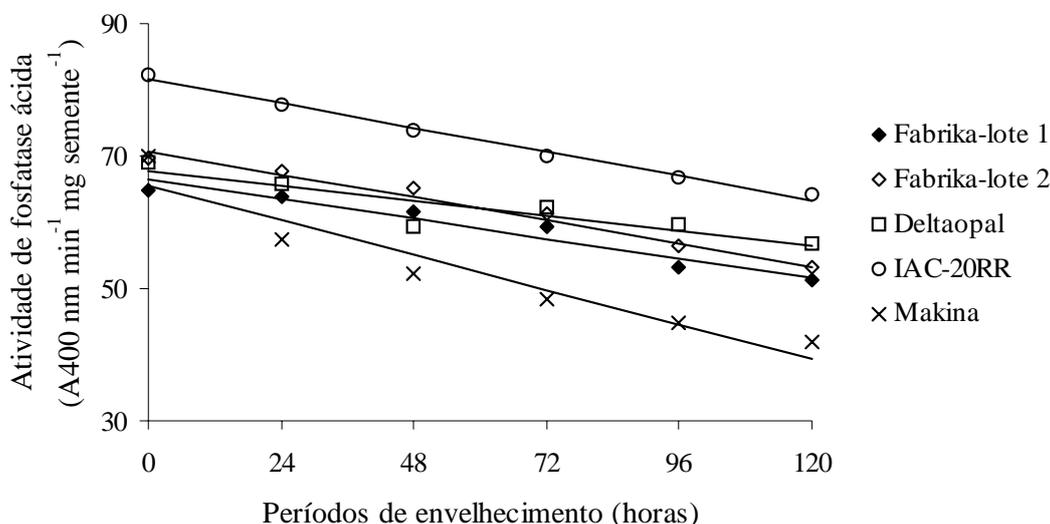


Figura 4. Estimativa da atividade de fosfatase ácida (Unidade de absorvância a 400 nm. min⁻¹ mg⁻¹ de semente), em função do período de envelhecimento.

Spinola, Cícero e Melo (2000) observaram que a enzima fosfatase ácida mostrou menor atividade nos períodos de 0h e 24h de envelhecimento acelerado para o lote considerado pelos testes determinantes da qualidade fisiológica como o de qualidade superior em relação aos

outros lotes analisados. Porém, no período 48h de envelhecimento acelerado, a redução de intensidade das bandas foi, também, observada nos demais lotes e o desaparecimento por completo das referidas bandas foi constatado para todos os lotes a partir do período de 72h

de envelhecimento acelerado. Segundo estes autores, esta enzima é uma hidrolase que participa das reações de hidrólise de ésteres, podendo atuar sobre fosfolípidios de membrana, provocando a peroxidação destes. Também Chauhan, Gopinathan e Babu (1985) e Jeng e Sung (1994), confirmaram redução na atividade desta enzima com o envelhecimento de sementes de amendoim. Em contrapartida, Rajagopal e Sen-Mandi (1992) observaram alta atividade desta enzima em embriões de arroz após o

envelhecimento artificial, o que também foi constatado por Brandão Júnior, Carvalho e Vieira (1999) em sementes de milho a partir de 96 horas de envelhecimento. Segundo estes autores, o aumento da peroxidação de lípidios pode ser explicado pelo aumento da atividade da fosfatase ácida.

As sementes das variedades Fabrika- lote 2 e Makina apresentaram, em geral, teores de lípidios inferiores aos das outras variedades (tabela 4).

Tabela 4. Médias, em porcentagem, do teor de lípidios de sementes de algodoeiro, em diferentes períodos de envelhecimento.

Variedades	Períodos de envelhecimento (horas)					
	0	24	48	72	96	120
Fabrika-Lote 1	25,80 a	24,42 a	23,92 ab	23,85 bc	23,55 ab	23,07 b
Fabrika-Lote 2	24,05 c	23,36 b	23,35 b	23,11 c	23,05 b	22,88 b
Deltaopal	25,21 ab	25,13 a	25,04 a	25,04 a	24,31 a	24,32 a
IAC-20 RR	24,97 ab	25,07 a	25,02 a	24,64 ab	24,18 a	24,06 a
Makina	24,74 bc	24,22 ab	23,91 ab	23,85 bc	24,02 ab	23,35 b
CV (%)	1,25	1,60	2,00	1,74	1,65	0,88

Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

O teor de lípidios nas sementes decresceu com o aumento do período de envelhecimento artificial das sementes (figura 5). Esse resultado pode ser explicado pela oxidação dos lípidios presentes nas sementes, reação esta provocada pela intensificação do processo deteriorativo. Wilson Júnior e McDonald Júnior (1986) apresentaram um modelo que considera a peroxidação dos lípidios uma das principais causas da deterioração das sementes, uma vez que o armazenamento das sementes submete os lípidios a um lento e consistente ataque por oxigênio, formando hidroperóxidos, outros ácidos graxos oxigenados e radicais livres, sendo este

processo acelerado pela presença das isozimas lipoxigenases. Os radicais livres são instáveis e reagem com as moléculas próximas, transformando-as. Os hidroperóxidos, produtos primários da oxidação, decompõem-se com o rompimento da cadeia hidrocarbonada, formando diversos produtos intermediários, aldeídos, cetonas e álcoois. Os ácidos graxos oxigenados, por sua vez, acumulam-se na semente seca e, posteriormente, durante o processo de germinação, ocorre a sua degradação enzimática, resultando na formação de radicais livres e produtos secundários tóxicos.

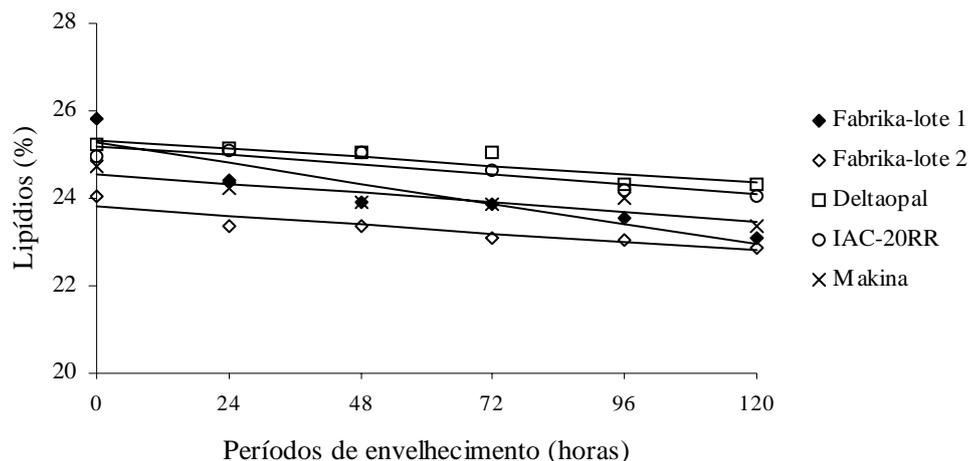


Figura 5. Estimativa do teor (%) de lipídios, em função do período de envelhecimento.

Tabela 5. Equações de regressão ajustadas do teste de envelhecimento acelerado e determinações da atividade de lipoxigenase, fosfatase ácida e teor de lipídios (Y) de sementes de algodão, em função do período de envelhecimento (X), expresso em horas, para as respectivas variedades e coeficiente de determinação.

Testes	Variedades	Equações ajustadas	r ²
Atividade de lipoxigenase	Fabrika-lote 1	Y=14,0486-0,0450369X**	0,9697
	Fabrika-lote 2	Y=11,9708-0,041706X**	0,9424
	Deltaopal	Y=15,1459-0,0624127X**	0,9836
	IAC-20RR	Y=11,0134-0,0427079X**	0,9326
	Makina	Y=10,029-0,0501786X**	0,9428
Atividade de fosfatase ácida	Fabrika-lote 1	Y=66,361-0,122266X**	0,9445
	Fabrika-lote 2	Y=70,7372-0,14591X**	0,9801
	Deltaopal	Y=67,7337-0,0928572X*	0,8179
	IAC-20RR	Y=81,6398-0,152738X**	0,9919
	Makina	Y=65,3998-0,216155X**	0,9142
Lipídios	Fabrika-lote 1	Y=25,2649-0,019396X**	0,8563
	Fabrika-lote 2	Y=23,8017-0,00835275X**	0,8351
	Deltaopal	Y=25,3358-0,00824323X*	0,8025
	IAC-20RR	Y=25,2007-0,0091985X**	0,8331
	Makina	Y=24,5571-0,0090583X**	0,7882

**Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste t.; *Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste t.

CONCLUSÕES

O aumento do período de envelhecimento artificial promoveu decréscimos na viabilidade, no vigor, nas atividades de lipoxigenase, fosfatase ácida e nos teores

de lipídios das sementes.

Ambas as alterações fisiológicas e bioquímicas, se apresentaram eficientes para mostrar o efeito deteriorativo que o envelhecimento artificial provoca nas sementes de algodão.

ABSTRACT: The objective of this study was to evaluate the physiological and biochemical alterations in seeds of the cotton plant submitted to the accelerated aging test. The cotton seeds (*Gossypium hirsutum* L.) of the Fabrika-lot 1, Fabrika-lot 2, Deltaopal, IAC-20 RR and Makina varieties were chemically delinted and submitted to 42° C and 100% UR for periods of 0, 24, 48, 72, 96 and 120 hours. After each aging period were carried out evaluations of the physiological quality (germination, accelerated aging and cool germination) and biochemical determination (lipids content and activities of the lipoxygenase and phosphatase acid enzymes). The experiment was lead in the completely randomized delineation with subdivided parcels. The results had allowed concluding that the increase of the artificial aging period caused decreases in the viability, vigor, activities of lipoxygenase and phosphatase acid and lipids content of the seeds. Both the physiological and biochemical alterations were efficient to show the deterioration effect that the artificial aging provokes in the cotton seeds.

UNITERMS: *Gossypium hirsutum*; Seeds; Vigor; Artificial aging; Biochemical alterations.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSTS - AOSA. **Seed vigor testing handbook**. East Lasing, 1983. 88 p. (Handbook on seed testing. Contribution, 32).

AXELROD, B.; CHEESBROUGH, T. M.; LAASKO, S. Lipoxygenases from soybeans. **Methods in Enzymology**, New York, v. 71, p. 441-451, 1981.

BASAVARAJAPPA, B. S.; SHETTY, H. S.; PRAKASH, H. S. Membrane deterioration and other biochemical changes associated with accelerated ageing of maize seeds. **Seed Science and Technology**, Zürich, v. 19, n. 2, p. 279-286, 1991.

BRANDÃO JÚNIOR, D. S.; CARVALHO, M. L. M.; VIEIRA, M. G. G. C. Variações eletroforéticas de proteínas e isoenzimas relativas à deterioração de sementes de milho envelhecidas artificialmente. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 21, n. 1, p. 114-121, 1999.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 1992. 365 p.

CHAUHAN, K. P. S.; GOPINATHAN, M. C.; BABU, C. R. Electrophoretic variations of proteins and enzymes in relation to seed quality. **Seed Science and Technology**, Zürich, v. 13, n. 3, p. 629-641, 1985.

DIAS, D. C. F. S.; ALVARENGA, E. M. Teste de germinação a baixa temperatura. In: KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: Associação Brasileira de Tecnologia de Sementes, 1999. cap. 7. p. 1-4.

FREITAS, R. A.; DIAS, D. C. F. S.; CECON, P. R.; REIS, M. S. Qualidade fisiológica e sanitária de sementes de algodão durante o armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 22, n. 2, p. 94-101, 2000.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 3. ed. São Paulo, 1985. v. 1, 533 p.

JENG, T. L.; SUNG, J. M. Hydration effect on lipid peroxidation and peroxidase scavenging enzymes activity of artificially age peanut seed. **Seed Science and Technology**, Zürich, v. 22, n. 3, p. 531-539, 1994.

KALPANA, R.; MADHAVA RAO, K. V. Lipid changes during accelerated ageing of seeds of pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) cultivars. **Seed Science and Technology**, Zürich, v. 24, n. 3, p. 475-483, 1996.

KALPANA, R.; MADHAVA RAO, K. V. Lowered lipoxygenase activity in seeds of pigeonpea *Cajanus cajan* L. Millsp. cultivars during accelerated ageing. **Seed Science and Technology**, Zürich, v. 21, n. 1, p. 269-272, 1993.

KOOSTRA, P.; HARRINGTON, J. Biochemical effects of age on membranal lipids of *Cucumis sativus* L. seed. **Proceedings International Seed Testing Association**, Copenhagen, v. 34, p. 329-340, 1973.

LAGO, A. A. Testes de armazenabilidade para sementes de algodão. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 7, n. 2, p. 63-84, 1985.

LAPOSTA, J. A.; VIEIRA, M. G. G. C.; CARVALHO, M. L. M. Comparação entre métodos para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SEMENTES, 9., 1995, Florianópolis. **Resumos...** Brasília: ABRATES, 1995. p. 132.

MACHADO NETO, N. B.; CUSTÓDIO, C. C.; TAKAKI, M. Evaluation of naturally and artificially aged seeds of *Phaseolus vulgaris* L. **Seed Science and Technology**, Zürich, v. 29, n. 1, p. 137-149, 2001.

MAIA, F. C.; MORAES, D. M.; MORAES, R. C. P. Atividade total da fosfatase ácida e da α -amilase induzidas por ácido jasmônico em sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 22, n. 1, p. 259-263, 2000.

McDONALD JÚNIOR., M. B. Standardization of seed vigour tests. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION, 24., 1995, Copenhagen, **Proceedings...** Zürich: ISTA, 1995. p. 88-97.

POWELL, A. A.; HARMAN, G. E. Absence of a consistent association of changes in membranal lipids with the ageing of pea seeds. **Seed Science and Technology**, Zürich, v. 13, n. 3, p. 659-667, 1985.

RAJAGOPAL, A. S. M.; SEN-MANDI, S. Studies on acid and alkaline phosphatases in aged rice embryos. **Seed Science and Technology**, Zürich, v. 20, n. 2, p. 215-222, 1992.

ROBERTS, E. H. Physiology of ageing and its application to drying and storage. **Seed Science and Technology**, Zürich, v. 9, n. 2, p. 359-372, 1981.

SMITH, P. K.; KRHON, R. I.; HERMANSON, G. T.; MALLIA, A. K.; GARTNER, F. H.; PROVENZANO, M. D.; FUJIMOTO, E. K.; GOEKE, N. M.; OLSON, B. J.; KLENK, D. C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 150, n. 1, p.76-85, oct. 1985.

SPINOLA, M. C. M.; CÍCERO, S. M.; MELO, M. Alterações bioquímicas e fisiológicas em sementes de milho causadas pelo envelhecimento acelerado. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 57, n. 2, p. 263-270, abr./jun. 2000.

SUNG, J. M.; JENG, T. L. Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes associated with accelerated aging of peanut seed. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 91, n. 1, p. 51-55, may. 1994.

VENTER, A.V. Seed vigor testing. **Journal of New Seeds**, Pretoria, v. 24, n. 4, p. 51-58, jul. 2000.

WILSON JÚNIOR., D. O.; McDONALD JÚNIOR, M. B. The lipid peroxidation model of seed ageing. **Seed Science and Technology**, Zürich, v. 14, n. 2, p. 269-300, 1986.