

Sementes recalcitrantes: intolerantes a baixas temperaturas? Embriões recalcitrantes de *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T. D. Penn. toleram temperatura sub-zero¹

MARCIO R. BONJOVANI² e CLAUDIO J. BARBEDO^{3,4}

(recebido: 04 de julho de 2007; aceito: 21 de maio de 2008)

ABSTRACT – (Recalcitrant seeds: intolerant to low temperatures? Recalcitrant embryos of *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T. D. Penn., a tropical species, are tolerant to subzero temperature). Recalcitrant seeds are intolerant to both desiccation and low temperatures, the most important mechanisms of seed conservation, consequently their storage is difficult. *Inga vera* subsp. *affinis* produces the so-called recalcitrant seeds, since they do not survive to water content lower than 35%. In this work it is demonstrated that these seeds are tolerant to temperatures as low as -2 °C. Embryos of *I. vera* of different stages of maturity were stored at temperatures varying from 8 to -18 °C for until 45 days. Non-dried embryos and both dried to -4 MPa and -6 MPa were stored. Results showed that, despite all embryos died at -18 °C, some cold tolerance was obtained by mature embryos when stored at -2 °C, as long as they are dried to -4 MPa.

Key words - freezing, recalcitrant, seed germination, storability, tropical tree

RESUMO – (Sementes recalcitrantes: intolerantes a baixas temperaturas? Embriões recalcitrantes de *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T. D. Penn. toleram temperatura sub-zero). Sementes recalcitrantes são intolerantes à dessecação e a baixas temperaturas, que são as principais formas de conservação de sementes e, portanto, são de difícil armazenamento. *Inga vera* subsp. *affinis* produz sementes denominadas recalcitrantes, uma vez que não toleram redução do teor de água para valores inferiores a 35%. Neste trabalho é demonstrada a tolerância desses embriões a temperatura de -2 °C. Embriões de *I. vera* de diferentes estádios de maturação foram armazenados por até 45 dias nas temperaturas de 8 °C a -18 °C, com ou sem secagens prévias até -4,0 e -6,0 MPa. Os resultados permitiram observar que, embora nenhum tratamento tenha proporcionado resistência à temperatura de -18 °C, a secagem dos embriões maduros a -4 MPa proporcionou maior tolerância à redução de temperatura até níveis de congelamento da água (-2 °C).

Palavras-chave - armazenamento, congelamento, espécie tropical, germinação de semente, recalcitrante

Introdução

O agrupamento das sementes em dois tipos, proposto inicialmente por Roberts (1973), considera, basicamente, a intolerância à dessecação, a curta longevidade e a intolerância às temperaturas baixas de um grupo de sementes, então denominadas recalcitrantes, em contraste com as ortodoxas. Esse conceito é aceito, ainda, por muitos autores, acrescentando-se a categoria das intermediárias, que também seriam intolerantes às temperaturas de congelamento e, ainda, intolerantes à secagem até 10% de água (Ellis *et al.* 1990, Mai-Hong *et al.* 2006, Usberti *et al.* 2006). Por outro lado, há autores que consideram a existência de níveis de

recalcitrância (Berjak & Pammenter 1994, Pammenter & Berjak 1999, Pammenter *et al.* 2003), demonstrando a diversidade de respostas das sementes enquadradas em apenas um ou dois grupos (recalcitrantes e/ou intermediárias). Essas formas de classificação ou agrupamentos são importantes, por exemplo, para que se definam estratégias e técnicas diferenciadas de conservação de germoplasma.

Segundo o agrupamento em apenas três categorias, as sementes de *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T. D. Penn., popularmente conhecida como ingá, seriam enquadradas dentre as recalcitrantes, não tolerando mesmo pequenas reduções do teor de água e apresentando baixa capacidade de armazenamento, perdendo a viabilidade em menos de 15 dias (Carvalho 1994, Bilia & Barbedo 1997). Essa característica torna difícil a conservação de germoplasma na forma de sementes, uma vez que a metodologia convencional de conservação de sementes freqüentemente utiliza a secagem e o armazenamento em câmaras a temperaturas abaixo de zero como forma de preservar a viabilidade das sementes (Barbedo & Bilia 1998, Santos 2001, Rocha 2004). Essas sementes

1. Parte da dissertação de mestrado do primeiro autor, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
2. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Caixa Postal 510, 18618-000 Botucatu, SP.
3. Instituto de Botânica, Av. Miguel Estéfno 3687, 04301-012 São Paulo, SP, Brasil.
4. Autor para correspondência: claudio.barbedo@pesquisador.cnpq.br

geralmente apresentam atividade metabólica intensa, tanto durante sua formação, quanto após sua colheita (Barbedo & Marcos Filho 1998, Castro *et al.* 2004). Assim, métodos para o armazenamento das sementes recalcitrantes devem obrigatoriamente considerar a redução do metabolismo (Andréo *et al.* 2006).

Acima de determinados níveis de hidratação, a água torna-se congelável, tanto nas sementes intolerantes à dessecação quanto nas tolerantes, podendo ocasionar danos devido à formação de cristais de gelo nos tecidos e levando à perda da viabilidade (Fonseca & Freire 2003). A principal consequência da formação de cristais de gelo é a ruptura mecânica, tanto da estrutura citoplasmática quanto da membrana celular, pela expansão da água congelada, resultando na desagregação celular (Taiz & Zeiger 2004). Pode ocorrer, ainda, enorme tensão e estresse físico em células vegetais submetidas ao congelamento. Isso porque, durante a transição de fase do líquido extracelular, com a consequente formação de gelo, há dessecação dos tecidos vegetais pela migração da água do interior da célula para o meio extracelular (Guy 2003).

As sementes que toleram desidratação quase completa podem suportar, conseqüentemente, temperaturas extremamente baixas, o que supostamente não ocorre com as sementes intolerantes à dessecação. Contudo, ainda não foram estabelecidos os limites de redução da temperatura para estas sementes. A aquisição da tolerância à dessecação é um fenômeno complexo, envolvendo a interação de ajustes metabólicos e estruturais, permitindo que as células resistam a perdas consideráveis de água sem a ocorrência de prejuízos. A maior ou menor eficiência desses fatores poderia, dessa forma, acarretar a formação de sementes com diferentes níveis de tolerância à dessecação (Marcos Filho 2005). Possivelmente, tal fato poderia ocorrer, também, em relação à tolerância à redução da temperatura.

Estudos realizados por Barbedo & Cicero (2000) mostraram que sementes de *Inga uruguensis* armazenadas hidratadas e embebidas em solução de ácido abscísico 10^{-4} M, a 10°C , podem apresentar germinação superior a 80% após 40 dias. Andréo *et al.* (2006), por sua vez, controlando a mobilização de água entre a semente e o meio, obtiveram embriões com germinação superior a 80% após 90 dias de armazenamento, também a 10°C , quando mantidos em substratos com soluções de PEG a $-2,4$ MPa. Bilia *et al.* (1998), estudando os limites de tolerância à dessecação dessas sementes, conseguiram armazená-las, na mesma temperatura utilizada por aqueles autores, por até 60 dias quando o teor de água foi reduzido até 50%.

A capacidade de armazenamento é ampliada para muitas espécies, quando a redução do teor de água das sementes está associada à diminuição de temperatura do ambiente (Walters 1998). Contudo, há espécies que não toleram grande redução da temperatura, principalmente o congelamento (Chin *et al.* 1989). Considerando a dificuldade no armazenamento de sementes intolerantes à dessecação e, ainda, o fato de não terem sido estabelecidos os limites inferiores de temperatura suportados por essas sementes, no presente trabalho foram avaliados os limites de tolerância à baixa temperatura de embriões de *Inga vera* subsp. *affinis* de diferentes estádios de maturação, associados a diferentes níveis de secagem, com vistas à ampliar o período de armazenamento das sementes dessa espécie.

Material e métodos

Obtenção do material vegetal – Frutos de *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T. D. Penn. foram coletados em janeiro de 2007, a partir de dez matrizes plantadas no Município de Santo André, SP ($23^{\circ}37'$ S, $46^{\circ}31'$ W).

Os frutos foram levados em sacos de algodão ao Laboratório de Sementes do Instituto de Botânica, São Paulo, SP ($23^{\circ}37'$ S, $46^{\circ}32'$ W) e abertos manualmente para retirada das sementes. Estas foram classificadas segundo o estágio de maturação, baseando-se em informações de Figliolia (1993) e Barbedo & Cicero (2000); assim, as sementes foram agrupadas em quatro estádios conforme a espessura da sarcotesta (tegumento carnoso) que as reveste. A seguir, essa sarcotesta foi removida, também manualmente uma a uma, obtendo-se os embriões excisados utilizados nos experimentos. Os embriões foram, então, avaliados quanto à sua qualidade fisiológica, por meio da determinação do seu teor de água e o seu potencial hídrico e, ainda, por testes de germinação e vigor, conforme descrito abaixo.

Secagem – Os embriões obtidos, separados por estágio de maturação, após retirada amostra controle (sem secagem), foram submetidos a dois níveis de secagem, em estufa a $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$ com circulação de ar forçada (Bilia *et al.* 1998), denominadas secagem leve e secagem severa, procurando-se levar os embriões aos potenciais hídricos de, respectivamente, -4 e -6 MPa. Para tanto, amostras de embriões foram retiradas periodicamente e avaliadas quanto ao seu potencial hídrico, até que atingissem valores próximos aos desejados.

Ao final de cada nível de secagem, os embriões foram novamente avaliados quanto à sua qualidade fisiológica, conforme descrito anteriormente.

Temperaturas de armazenamento – Após a obtenção dos níveis de secagem desejados, os embriões foram embalados em sacos de polietileno (0,05 mm) fechados, etiquetados e armazenados nas temperaturas de 8°C , 4°C , 2°C , -2°C e -18°C .

Após 15, 30 e 45 dias, amostras dos embriões foram removidas das câmaras de armazenamento, mantidas em

ambiente de laboratório com temperatura constante de 20 ± 2 °C por 24 horas para aclimação e, em seguida, avaliados novamente quanto à sua qualidade fisiológica.

Avaliações fisiológicas – O teor de água dos embriões foi avaliado pelo método da estufa a 103 ± 2 °C / 17 horas (ISTA 1985). O potencial hídrico dos embriões foi avaliado em potenciômetro WP4 (Dewpoint Potentiometer, Decagon), baseando-se na temperatura de espelho no ponto de orvalho da atmosfera, após equilíbrio higroscópico com a amostra. Para aferição do potencial hídrico real dos embriões e do potencial registrado pelo potenciômetro, amostras foram incubadas em soluções de polietileno glicol 6000 (PEG) com diferentes potenciais osmóticos, segundo Michel & Kaufmann (1973), até peso constante, sendo então avaliadas no potenciômetro.

O teste de germinação foi realizado em rolo de papel Germitest, com duas folhas para a base e outra para cobertura, pré-umedecidas na proporção de duas vezes e meia o peso do papel (Brasil 1992), colocados em germinadores Marconi tipo MA400, com circulação interna de água, regulados para a temperatura constante de 25 °C e luz constante (Bilia & Barbedo 1997). As avaliações foram realizadas aos sete e aos 14 dias, sendo computados os embriões germinados (protrusão de raiz primária com, no mínimo, 1 cm) e as plântulas normais (plântulas com sistema radicular e eófilos desenvolvidos e sem defeitos aparentes). Como a espécie produz sementes poliembriônicas, os embriões contidos em cada semente foram mantidos juntos em todas as avaliações. Mesmo quando houve protrusão de mais de uma raiz primária ou surgimento de mais de uma plântula por embrião, apenas uma raiz e/ou plântula por embrião foram registradas (Bilia & Barbedo 1997).

Delineamento experimental e análise estatística dos dados – O delineamento experimental utilizado para as avaliações fisiológicas foi o inteiramente casualizado, com três repetições para todos os testes, em esquema fatorial $4 \times 3 \times 5$ (estádio de maturação \times níveis de secagem \times temperatura de armazenamento), para cada período de armazenamento. Os resultados obtidos foram analisados pelo teste F e as médias foram comparadas entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% (Santana & Ranal 2004). A correção da normalidade e da heterogeneidade dos dados em porcentagem, quando necessária, foi feita pela transformação para $\arcsin(x/100)^{0.5}$.

Resultados e discussão

Os embriões de *Inga vera* dos quatro estádios de maturação avaliados apresentaram elevado teor de água inicial (55,4% a 76,8%), correspondendo a potencial hídrico de -1,3 MPa (tabela 1), indicando que, por ocasião da colheita, tinham ainda água livre, ou seja, água do tipo 5, retida em potencial de 0 a -1,5 MPa (Vertucci 1993). As características deste tipo de água

correspondem a soluções diluídas, não se ligando às macromoléculas e sendo suficiente para que ocorra germinação (Vertucci & Farrant 1995, Castro *et al.* 2004, Marcos Filho 2005).

As alterações no teor de água e no potencial hídrico desses embriões, decorrentes das secagens, segundo a análise de variância, não foram influenciadas pelo estágio de maturação. Após a secagem leve, os embriões apresentaram, em média, 55,3% de água, correspondendo a água retida com tensões de cerca de -3,9 MPa (tabela 1). Nesse potencial hídrico (-1,5 a -4,0 MPa), que caracteriza ainda água do tipo 4 (Vertucci 1993), tem-se solução mais concentrada, ocupando os espaços intercapilares entre as macromoléculas, mas ainda não interagindo com sua superfície. Essa água tem importância relevante, uma vez que é favorável à conservação de sementes intolerantes à dessecação (Marcos Filho 2005), como são as da espécie em estudo. A remoção dessa água, obtida com a secagem severa, levou os embriões a teores de água e potenciais hídricos próximos a, respectivamente, 47% e -6 MPa (tabela 1) caracterizando, portanto, presença apenas de água do tipo 3 (-4 a -11 MPa, segundo Vertucci 1993). Essa água se caracteriza por já se associar aos sítios hidrofóbicos das macromoléculas, formando pontes de união (Marcos Filho 2005).

Dessa forma, pode-se assumir que as secagens dos embriões dos quatro estádios de maturação levaram a modificações nas propriedades da água, inicialmente do tipo 5 (sem secagem), para os tipos 4 (secagem leve) e 3 (secagem severa). Contudo, é importante salientar que, mesmo no maior nível de secagem, os embriões não atingiram o teor crítico de água descrito por Bilia *et al.* (1999), ou seja, próximo a 37%.

Ainda pelos resultados da tabela 1 pode-se verificar que os embriões do estágio I apresentaram teor de água superior ao dos estádios II e III e estes, por sua vez, superiores ao do estágio IV. As modificações sugerem que, do estágio I ao IV, as sementes estivessem amadurecendo pois, segundo Figliolia & Kageyama (1994), essa redução no teor de água é comum entre as sementes de *Inga uruguensis* (sinonímia da espécie em estudo no presente trabalho) à medida que amadurecem. Contudo, os resultados de conteúdo de matéria seca desses embriões (tabela 1) demonstram que o máximo acúmulo foi obtido já no estágio III. Diversos autores consideram que o máximo acúmulo de matéria seca nas sementes caracteriza o ponto de maturidade fisiológica (Carvalho & Nakagawa 2000, Marcos Filho 2005, Mai-Hong *et al.* 2006). No caso das sementes em estudo, que não apresentam a clássica dessecação ao final da maturação (Barbedo & Marcos Filho 1998), poderia-se

Tabela 1. Teor de água (% base úmida), potencial hídrico (-MPa), conteúdo de matéria seca (g embrião⁻¹), germinação (%), desenvolvimento de plântulas normais (%) e condutividade elétrica da solução de embebição ($\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$) de embriões de *Inga vera* subsp. *affinis* de quatro estádios de maturação, sem secagem ou após dois níveis de secagem. Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas entre secagens, maiúsculas entre estádios de maturação) não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%.

Table 1. Water content (% wet basis) and potential (-MPa), dry matter content (g embryo⁻¹), germination (%), normal seedling development (%) and electrical conductivity of the imbibition solution ($\mu\text{S g}^{-1} \text{cm}^{-1}$) of embryos of *Inga vera* subsp. *affinis* at different levels of maturity, without drying or after two drying levels. Means followed by the same letter (small for dryings, capital for maturation) did not differ by Tukey at 5%.

Níveis de secagem	Estádios de maturação				Médias
	Estádio I	Estádio II	Estádio III	Estádio IV	
TEOR DE ÁGUA (%)					
Sem secagem	76,8	70,3	65,4	55,4	67,0 a
Secagem leve	60,7	57,8	53,5	49,3	55,3 b
Secagem severa	51,6	48,9	46,8	42,2	47,4 c
Médias	63,0 A	59,0 B	55,2 B	49,0 C	
Coefficiente de variação (%)	3,85				
POTENCIAL HÍDRICO (-MPa)					
Sem secagem	1,5	1,1	0,9	1,6	1,3 c
Secagem leve	3,7	3,9	3,9	4,1	3,9 b
Secagem severa	6,0	5,6	5,2	8,1	6,2 a
Médias	3,7 AB	3,5 B	3,3 B	4,6 A	
Coefficiente de variação (%)	19,29				
CONTEÚDO DE MATÉRIA SECA (g semente⁻¹)					
Sem secagem	0,165 aC	0,255 aB	0,339 aA	0,308 bAB	
Secagem leve	0,171 aB	0,212 aB	0,364 aA	0,354 bA	
Secagem severa	0,154 aB	0,201 aB	0,332 aA	0,397 aA	
Coefficiente de variação (%)	10,65				
GERMINAÇÃO (%)					
Sem secagem	100	100	100	100	100 a
Secagem leve	78	100	100	95	97 a
Secagem severa	60	91	98	84	77 b
Médias	85 B	98 A	97 AB	96 AB	
Coefficiente de variação (%)	15,40				
PLÂNTULAS NORMAIS (%)					
Sem secagem	98 aA	100 aA	98 aA	100 aA	
Secagem leve	73 bB	93 aA	96 aA	71 bB	
Secagem severa	47 bB	76 bAB	93 aA	73 bB	
Coefficiente de variação (%)	12,58				
CONDUTIVIDADE ELÉTRICA ($\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$)					
Sem secagem	20,1 cB	9,8 cC	6,8 bC	34,0 bA	
Secagem leve	56,0 aA	35,4 bB	12,6 abC	38,3 bB	
Secagem severa	36,9 bC	71,0 aA	17,7 aD	52,0 aB	
Coefficiente de variação (%)	13,70				

supor, portanto, que os embriões do estágio IV já teriam condições de iniciar o processo de germinação, tendo suficientes maturidade e água disponível. Essa informação concorda com a hipótese de Faria (2006) de que essas sementes não têm comportamento típico, aproximando-se mais ao comportamento de plântulas em crescimento. A máxima qualidade fisiológica das sementes de *Inga vera* subsp. *affinis*, dessa forma, ocorreria bem antes de sua dispersão, hipótese considerada, também, por Mai-Hong *et al.* (2006) para sementes de *Mimusopis elengi* L.

Considerando os resultados do teste de germinação dos embriões dos quatro estádios e nos três níveis de desidratação (tabela 1), pode-se verificar que todos apresentavam, inicialmente, a mesma capacidade em germinar e produzir plântulas normais. Com a secagem, os embriões demonstraram comportamento diferenciado, sendo que os do estágio III foram os únicos a suportar a secagem severa sem apresentar alterações na germinação ou na capacidade de desenvolver plântulas normais (tabela 1). Tal fato reforça a idéia de que esses embriões estariam mais próximos ao ponto de maturidade fisiológica que os dos outros três estádios. Para sementes de *Inga uruguensis*, a identificação do estágio de maturidade fisiológica das sementes e, conseqüentemente, o momento ideal para a colheita são condições ideais para a conservação da sua viabilidade durante o armazenamento (Barbedo & Cicero 2000).

Os resultados de condutividade elétrica da solução de embebição dos embriões, que avalia a integridade das membranas celulares (Marcos Filho 2005), demonstraram os danos promovidos a essas membranas com a remoção de água, principalmente após a secagem severa (tabela 1), uma vez que, de modo geral, aumentaram com o progresso da secagem. De acordo com a classificação de Barbedo & Cicero (1998), baseada na condutividade elétrica, no presente trabalho apenas os embriões dos estádios II e III seriam de elevada qualidade fisiológica.

Comparando-se os resultados de germinação, de plântulas normais e de condutividade elétrica com os de potencial hídrico dos embriões (tabela 1) nota-se que os embriões do estágio III (supostamente maduros) com água ainda do tipo 4 mas já sem a do tipo 5 (secagem leve) não demonstraram qualquer perda na qualidade fisiológica. Já com a remoção da água do tipo 4 (secagem severa) apresentaram os primeiros sinais de danos nas membranas (condutividade elétrica), embora sem alterações nos valores de germinação, concordando com Marcos Filho (2005) quanto à necessidade da presença de água do tipo 4 para conservação de sementes recalcitrantes.

Após 15 dias de armazenamento, notou-se que o teor de água (figura 1) e o potencial hídrico (tabela 2),

em geral, não apresentaram grandes diferenças entre as temperaturas utilizadas e, ainda, que o teor de água inicial (tabela 1) manteve-se praticamente constante após esse período de armazenamento (figura 1), o potencial hídrico apresentando pequenas alterações (tabelas 1 e 2). Entre os estádios de maturação, os embriões do estágio I mantiveram-se mais hidratados e os do estágio IV mais desidratados (figura 1), conforme observado

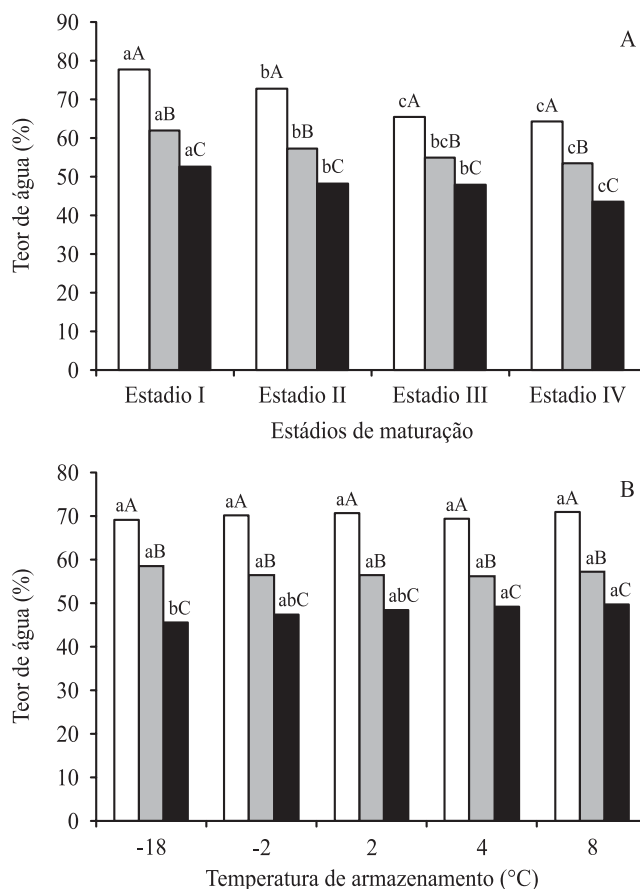


Figura 1. Teor de água (% base úmida) de embriões de *Inga vera* subsp. *affinis* após 15 dias de armazenamento. (□ = embriões não submetidos à secagem; ▒ = submetidos à secagem leve antes do armazenamento; ■ = submetidos à secagem severa). A. Estádios de maturação. B. Temperaturas de armazenamento. Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas entre estádios de maturação ou entre temperaturas de armazenamento; maiúsculas entre níveis de secagem) não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%.

Figure 1. Water content (% wet basis) of embryos of *Inga vera* subsp. *affinis* after 15 days of storage. (□ = embryos without drying, ▒ = soft dried embryos; ■ = hard dried ones. A. Different maturity of the embryos. B. Storage temperatures. Means followed by the same letter (small for both maturity and temperatures, capital for drying levels) did not differ by Tukey at 5%.

Tabela 2. Potencial hídrico (-MPa) de embriões de *Inga vera* subsp. *affinis* de quatro estádios de maturação, sem secagem ou após dois níveis de secagem, após armazenamento por 15 dias a cinco diferentes temperaturas constantes. Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas dentro das colunas, maiúsculas dentro de linhas) não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%.

Table 2. Water potential (-MPa) of embryos of *Inga vera* subsp. *affinis* at different levels of maturity, without drying or after two drying levels, after 15 days of storage at five different temperatures. Means followed by the same letter (small for columns, capital for lines) did not differ by Tukey at 5%.

	Estádios de maturação			
	Estádio I	Estádio II	Estádio III	Estádio IV
Temperatura de armazenamento				
8 °C	2,34 aC	2,84 abBC	3,13 aAB	3,41 aA
4 °C	2,54 aC	2,74 abBC	3,18 aAB	3,35 aA
2 °C	2,69 aB	2,76 abB	3,37 aA	3,78 aA
-2 °C	2,64 aC	2,93 aBC	3,46 aA	3,24 aAB
-18 °C	2,32 aB	2,29 bB	2,45 bB	3,35 aA
Níveis de secagem				
Sem secagem	1,26 cB	1,65 cAB	1,61 cAB	1,88 cA
Secagem leve	2,36 bB	2,52 bB	3,48 bA	3,25 bA
Secagem severa	3,89 aB	3,96 aB	4,25 aB	5,15 aA
	Níveis de secagem			
	Sem secagem	Secagem leve	Secagem severa	
Temperatura de armazenamento				
8 °C	1,51 aC	3,02 aB	4,26 abA	
4 °C	1,44 aC	3,02 aB	4,39 aA	
2 °C	1,63 aC	3,23 aB	4,59 aA	
-2 °C	1,67 aC	2,99 aB	4,54 aA	
-18 °C	1,75 aC	2,26 bB	3,79 bA	
Coefficiente de variação (%)	14,72			

inicialmente (tabela 1), comportamento semelhante ao observado para potencial hídrico, com os embriões do estágio I apresentando maiores valores (menos negativos) e os do IV, menores (tabelas 1 e 2).

A manutenção da viabilidade dos embriões foi influenciada pela temperatura já nos primeiros 15 dias de armazenamento (tabela 3), demonstrando a sensibilidade dos embriões de qualquer estágio e qualquer nível de desidratação a -18 °C. Esse resultado já era esperado, uma vez que todos os embriões apresentavam água congelável (tipos 3, 4 e 5), ou seja, com potencial hídrico igual ou superior a -11 MPa (Vertucci & Farrant 1995, Marcos Filho 2005). Surpreendentemente, porém, os embriões suportaram o armazenamento a -2 °C, principalmente os do estágio III (tabela 3), inclusive

mantendo elevada capacidade de desenvolver plântulas normais (tabela 4).

Os embriões dos estádios I e IV apresentaram redução nos valores de germinação e de desenvolvimento de plântulas normais nas temperaturas de 2 e -2 °C (tabelas 3 e 4), principalmente nesta última. Em contraste, os embriões do estágio III, submetidos a secagens leve e crítica, apresentaram tolerância à redução da temperatura para -2 °C, com germinabilidade acima dos 80% (tabela 3), porém apenas os submetidos a secagem leve mantendo elevada capacidade de produzir plântulas normais (tabela 4).

Segundo o agrupamento das sementes em ortodoxas, recalcitrantes e intermediárias, as sementes de *Inga vera* não suportariam baixas temperaturas (abaixo de 15 °C),

Tabela 3. Germinação de embriões de *Inga vera* subsp. *affinis* de quatro estádios de maturação, sem secagem ou após dois níveis de secagem, após 15 dias de armazenamento a cinco diferentes temperaturas. Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas dentro das colunas, entre níveis de secagem; maiúsculas dentro de linhas, entre estádios de maturação; itálico entre temperaturas de armazenamento) não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%.

Table 3. Germination (%) of embryos of *Inga vera* subsp. *affinis* at different levels of maturity, without drying or after two drying levels, after 15 days of storage at five different temperatures. Means followed by the same letter (small for columns, capital for lines; italic for storage temperatures) did not differ by Tukey at 5%.

Níveis de secagem	Estádios de maturação			
	Estádio I	Estádio II	Estádio III	Estádio IV
ARMAZENAMENTO A 8 °C				
Sem secagem	47 aBab	98 aAa	100 aAa	95 aAa
Secagem leve	49 aBa	93 aAa	100 aAa	62 bBa
Secagem severa	17 bBa	27 bBa	83 bAa	37 cBa
ARMAZENAMENTO A 4 °C				
Sem secagem	60 aBa	93 aAa	96 aAa	71 aBb
Secagem leve	40 aCa	85 aBab	100 aAa	58 abCa
Secagem severa	7 bCab	37 bBa	73 bAa	42 bBa
ARMAZENAMENTO A 2 °C				
Sem secagem	47 aAab	36 bAb	49 bAb	36 bAc
Secagem leve	44 aCa	78 aBab	95 aAa	67 aBCa
Secagem severa	10 bCa	40 bABa	64 bAa	27 bBCab
ARMAZENAMENTO A -2 °C				
Sem secagem	31 aAb	47 aAb	33 bAb	0 bBd
Secagem leve	33 aCa	66 aBb	91 aAa	13 aCb
Secagem severa	13 aCa	47 aBa	82 aAa	7 aCbc
ARMAZENAMENTO A -18 °C				
Sem secagem	0 aAc	0 aAc	0 aAc	0 aAd
Secagem leve	0 aAb	0 aAc	0 aAb	0 aAc
Secagem severa	0 aAb	0 aAb	0 aAb	0 aAc
Coefficiente de variação (%)	19,67			

o que não condiz com os resultados obtidos no presente trabalho, pois suportaram temperaturas inferiores à de congelamento da água. Portanto, os resultados apresentados reforçam a hipótese da existência de níveis

Tabela 4. Plântulas normais desenvolvidas de embriões de *Inga vera* subsp. *affinis* de quatro estádios de maturação, sem secagem ou após dois níveis de secagem, após 15 dias de armazenamento a cinco diferentes temperaturas. Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas dentro das colunas, entre níveis de secagem; maiúsculas dentro de linhas, entre estádios de maturação; itálico entre temperaturas de armazenamento) não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%.

Table 4. Normal seedling development (%) of embryos of *Inga vera* subsp. *affinis* at different levels of maturity, without drying or after two drying levels, after 15 days of storage at five different temperatures. Means followed by the same letter (small for columns, capital for lines; italic for storage temperatures) did not differ by Tukey at 5%.

Níveis de secagem	Estádios de maturação			
	Estádio I	Estádio II	Estádio III	Estádio IV
ARMAZENAMENTO A 8 °C				
Sem secagem	42 aBab	33 aAa	100 aAa	49 aBa
Secagem leve	36 aCa	82 aBa	100 aAa	7 bDa
Secagem severa	7 bABa	3 bABa	13 bAa	0 bBa
ARMAZENAMENTO A 4 °C				
Sem secagem	53 aBa	89 aAa	91 aAa	42 aBa
Secagem leve	25 bCa	56 bBb	100 aAa	2 bDa
Secagem severa	0 cBa	0 cBa	24 bAa	3 bBa
ARMAZENAMENTO A 2 °C				
Sem secagem	40 aAab	13 bBc	42 bAb	11 aBb
Secagem leve	27 abBa	62 aAab	84 aAb	9 abBa
Secagem severa	10 bAa	7 bABa	16 cAa	0 bBa
ARMAZENAMENTO A -2 °C				
Sem secagem	29 aAb	46 aAb	27 bAb	0 aBc
Secagem leve	20 aBa	45 aBb	82 aAb	0 aCa
Secagem severa	0 bBa	7 bABa	18 bAa	0 aBa
ARMAZENAMENTO A -18 °C				
Sem secagem	0 aAc	0 aAc	0 aAc	0 aAc
Secagem leve	0 aAb	0 aAc	0 aAc	0 aAa
Secagem severa	0 aAa	0 aAa	0 aAb	0 aAa
Coefficiente de variação (%)	31,74			

de recalcitrância (Berjak & Pammenter 1994, Pammenter & Berjak 1999, Pammenter *et al.* 2003), demonstrando a diversidade de respostas das sementes enquadradas em apenas um ou dois grupos (reclacitrantes e/ou

intermediárias). De fato, parece mais apropriado o uso da categorização das sementes apenas para fins didáticos e para previsão genérica do tempo de armazenamento possível (Kermode & Finch-Savage 2002, Dickie & Pritchard 2002).

A secagem leve aumentou, aparentemente, a resistência da maioria dos embriões à redução da temperatura, diferentemente da secagem severa que prejudicou, principalmente, a capacidade dos embriões em desenvolver plântulas normais (tabela 4). Esse comportamento pode estar relacionado com o possível teor de água ótimo para a redução da temperatura, ou seja, com água disponível para prevenir os danos por dessecação, mas em teor de água baixo o suficiente para prevenir os danos por cristalização da água pelo congelamento (Eira *et al.* 1999). Os resultados obtidos para desenvolvimento de plântulas normais, principalmente os do armazenamento a 2 °C e a -2 °C (tabela 4) sugerem, também, que os embriões do estágio II foram mais tolerantes ao frio do que os do estágio IV, talvez indicando maior vigor. Tal fato reforça a idéia de que os embriões do estágio IV foram colhidos em fase bem posterior à sua maturidade fisiológica, conforme discutido anteriormente.

Aos 30 dias de armazenamento o teor de água apresentou tendência à uniformização por estágio e por nível de secagem (figura 2), praticamente não sendo influenciado pela temperatura de armazenamento. O potencial hídrico, por sua vez, que também foi pouco influenciado pela temperatura de armazenamento, apresentou tendência a manter-se mais negativo, para embriões submetidos a secagem severa, e menos negativos para os não submetidos a secagem, ficando os submetidos a secagem leve em posição intermediária (tabela 5).

A germinação e a produção de plântulas normais, após 30 dias de armazenamento, decresceram em todos os tratamentos, inclusive com a perda completa da viabilidade para os embriões dos estádios I, II e IV em temperatura igual ou inferior a -2 °C (tabelas 6 e 7), demonstrando a baixa longevidade das sementes de *Inga vera* subsp. *affinis*, conforme já descrito por outros autores (Bilia *et al.* 1999, Barbedo & Cicero 2000, Andréo *et al.* 2006). Após esse período de armazenamento, poucos tratamentos apresentaram valores iguais ou superiores a 50% para germinação e desenvolvimento de plântulas normais (estádio III, secagem leve, 8 °C, 4 °C e 2 °C; estágio IV, sem secagem ou secagem leve, 8 °C – tabelas 6 e 7). Após 45 dias de armazenamento, apenas dois tratamentos (estádios III e IV, submetidos a secagem leve) mantiveram germinação e desenvolvimento de plântulas normais com valores superiores a 50% (figura 3).

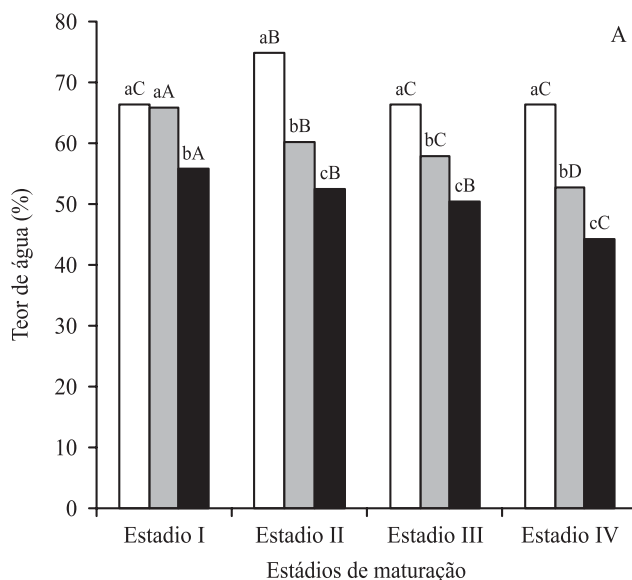


Figura 2. Teor de água (% base úmida) de embriões de *Inga vera* subsp. *affinis* de quatro estádios de maturação, após armazenamento por 30 dias a cinco diferentes temperaturas (□ = sem secagem; ■ = secagem leve; ■ = secagem severa). Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas para estádios de maturação, maiúsculas para secagens) não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%.

Figure 2. Water content (% wet basis) of embryos of *Inga vera* subsp. *affinis* at different levels of maturity, after 30 days of storage at five different temperatures (□ = without drying; ■ = soft drying; ■ = hard drying). Means followed by the same letter (small for maturity, capital for drying levels) did not differ by Tukey at 5%.

Evidencia-se, novamente, a relação positiva entre os embriões do estágio III e a secagem leve após 30 e 45 dias de armazenamento, sempre com melhor desempenho que os embriões dos estádios II e IV. A secagem leve pode ter produzido, também, um estresse osmótico semelhante ao freqüentemente encontrado em sementes ortodoxas ao final da maturação (Barbedo & Marcos Filho 1998, Castro *et al.* 2004). Nesse sentido, novos estudos poderiam incluir diferentes graus desse estresse analisando-se, também, alterações nos compostos de reserva dos embriões, como carboidratos, proteínas, ácido abscísico (ABA) e, ainda, a expressão de genes regulados pelo ABA e pelo potencial osmótico.

De maneira geral, a secagem leve (-4 MPa) proporcionou, aos embriões de *Inga vera*, maior tolerância à redução de temperatura até níveis de congelamento da água (-2 °C), principalmente para os estádios II e III. Contudo, tal tolerância não significou melhora na

Tabela 5. Potencial hídrico (-MPa) de embriões de *Inga vera* subsp. *affinis* de quatro estádios de maturação, sem secagem ou após dois níveis de secagem, após armazenamento por 30 dias a cinco diferentes temperaturas. Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas dentro das colunas, entre níveis de secagem; maiúsculas dentro de linhas, entre estádios de maturação; itálico entre temperaturas de armazenamento) não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%.

Table 5. Water potential (-MPa) of embryos of *Inga vera* subsp. *affinis* at different levels of maturity, without drying or after two drying levels, after 30 days of storage at five different temperatures. Means followed by the same letter (small for columns, capital for lines; italic for storage temperatures) did not differ by Tukey at 5%.

Níveis de secagem	Estádios de maturação			
	Estádio I	Estádio II	Estádio III	Estádio IV
ARMAZENAMENTO A 8 °C				
Sem secagem	1,68 aAa	1,29 bAa	2,29 bAa	1,57 bAa
Secagem leve	2,15 aBa	3,02 aBa	4,76 aAa	4,16 aAa
Secagem severa	2,43 aBb	2,55 aBb	2,90 bBab	4,44 aAa
ARMAZENAMENTO A 4 °C				
Sem secagem	1,21 bBa	2,08 aABa	1,67 cABa	2,47 bAa
Secagem leve	2,22 aBa	2,34 aBa	4,33 aAab	4,33 aAa
Secagem severa	3,05 aBab	2,30 aBb	2,84 bBb	4,98 aAa
ARMAZENAMENTO A 2 °C				
Sem secagem	2,00 bAa	1,74 bAa	1,76 bAa	2,20 bAa
Secagem leve	2,37 bBa	2,69 bBa	3,27 aABab	4,19 aAa
Secagem severa	3,51 aAab	3,81 aAa	4,06 aAa	4,58 aAa
ARMAZENAMENTO A -2 °C				
Sem secagem	1,88 bAa	1,53 bAa	1,97 bAa	2,37 bAa
Secagem leve	2,27 bBa	2,90 aBa	4,12 aAbc	4,34 aAa
Secagem severa	3,69 aBa	3,73 aABa	3,92 aABab	4,83 aAa
ARMAZENAMENTO A -18 °C				
Sem secagem	1,52 cAa	1,80 bAa	2,10 bAa	2,23 cAa
Secagem leve	2,59 bAa	2,75 bAa	2,72 abAc	3,25 bAa
Secagem severa	4,18 aBa	4,06 aBa	3,36 aBab	5,50 aAa
Coeficiente de variação (%)	17,68			

capacidade de armazenamento, uma vez que embriões armazenados a 8 °C conservaram-se por período superior aos armazenados sob temperaturas inferiores. Apesar disso, a possibilidade de submeter embriões dessa espécie a temperaturas próximas a 0 °C, sugere que seja possível reduzir substancialmente seu metabolismo, principal fonte de sua deterioração durante o armazenamento (Barbedo & Marcos Filho 1998) e, ainda, fomenta a possibilidade de armazená-los por períodos superiores aos maiores obtidos até o presente momento, ou seja, 90 dias (Andréo *et al.* 2006). A remoção de toda a água do tipo 5, ou seja,

água livre (Vertucci & Farrant 1995, Marcos Filho 2005), parece ser fundamental para o sucesso da redução da temperatura de armazenamento, assim como a identificação e obtenção de embriões com a máxima qualidade fisiológica e, principalmente, antes de iniciarem a germinação dentro do próprio fruto, ainda que não visível.

Futuros trabalhos para identificação desse ponto de colheita, bem como estudos associando-se níveis e tipos de secagem a temperaturas de armazenamento, podem trazer ainda maiores benefícios. A associação de outros processos de controle do metabolismo desses

Tabela 6. Germinação de embriões de *Inga vera* subsp. *affinis* de quatro estádios de maturação, sem secagem ou após dois níveis de secagem, após 30 dias de armazenamento a cinco diferentes temperaturas. Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas dentro das colunas, entre níveis de secagem; maiúsculas dentro de linhas, entre estádios de maturação; itálico entre temperaturas de armazenamento) não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%.

Table 6. Germination (%) of embryos of *Inga vera* subsp. *affinis* at different levels of maturity, without drying or after two drying levels, after 30 days of storage at five different temperatures. Means followed by the same letter (small for columns, capital for lines, italic for storage temperatures) did not differ by Tukey at 5%.

Níveis de secagem	Estádios de maturação			
	Estádio I	Estádio II	Estádio III	Estádio IV
ARMAZENAMENTO A 8 °C				
Sem secagem	47 aBa	0 bCa	0 bCb	70 bAa
Secagem leve	0 bCa	0 bCa	91 aAa	80 aBa
Secagem severa	0 bBa	50 aAa	0 bBb	0 cBa
ARMAZENAMENTO A 4 °C				
Sem secagem	0 aCa	0 aCa	33 bAa	13 bBb
Secagem leve	0 aCa	0 aCa	57 aAb	30 aBb
Secagem severa	0 aAa	0 aAc	0 cAb	0 cAa
ARMAZENAMENTO A 2 °C				
Sem secagem	0 aBb	0 bBa	0 bBb	7 bAc
Secagem leve	0 aCa	0 bCa	60 aAb	33 aBb
Secagem severa	0 aCa	40 aBb	53 aAa	0 cCa
ARMAZENAMENTO A -2 °C				
Sem secagem	0 aAb	0 aAa	0 bAb	0 aAd
Secagem leve	0 aBa	0 aBa	33 aAc	0 aBc
Secagem severa	0 aAa	0 aAc	0 bAb	0 aAa
ARMAZENAMENTO A -18 °C				
Sem secagem	0 aAb	0 aAa	0 aAb	0 aAd
Secagem leve	0 aAa	0 aAa	0 aAd	0 aAc
Secagem severa	0 aAa	0 aAc	0 aAb	0 aAa
Coeficiente de variação (%)	22,05			

embriões como, por exemplo, a utilização de inibidores da germinação (ABA, por exemplo) e o controle da mobilização de água (em soluções osmoticamente controladas, com o uso de PEG, por exemplo), já

Tabela 7. Plântulas normais desenvolvidas de embriões de *Inga vera* subsp. *affinis* de quatro estádios de maturação, sem secagem ou após dois níveis de secagem, após 30 dias de armazenamento a cinco diferentes temperaturas. Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas dentro das colunas, entre níveis de secagem; maiúsculas dentro de linhas, entre estádios de maturação; itálico entre temperaturas de armazenamento) não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%.

Table 7. Normal seedling development (%) of embryos of *Inga vera* subsp. *affinis* at different levels of maturity, without drying or after two drying levels, after 30 days of storage at five different temperatures. Means followed by the same letter (small for columns, capital for lines, italic for storage temperatures) did not differ by Tukey at 5%.

Níveis de secagem	Estádios de maturação			
	Estádio I	Estádio II	Estádio III	Estádio IV
ARMAZENAMENTO A 8 °C				
Sem secagem	30 aBa	0 bCa	0 bCb	60 aAa
Secagem leve	0 bBa	0 bBa	67 aAa	63 aAa
Secagem severa	0 bBa	47 aAa	0 bBb	0 bBa
ARMAZENAMENTO A 4 °C				
Sem secagem	0 aCb	0 aCa	23 bAa	7 bBb
Secagem leve	0 aCa	0 aCa	50 aAb	17 aBb
Secagem severa	0 aAa	0 aAc	0 cAb	0 cAa
ARMAZENAMENTO A 2 °C				
Sem secagem	0 aAb	0 bAa	0 bAb	0 bAc
Secagem leve	0 aCa	0 bCa	53 aAb	27 aBb
Secagem severa	0 aCa	23 aBb	47 aAa	0 bCa
ARMAZENAMENTO A -2 °C				
Sem secagem	0 aAb	0 aAa	0 bAb	0 aAc
Secagem leve	0 aBa	0 aBa	30 aAc	0 aBa
Secagem severa	0 aAa	0 aAc	0 bAb	0 aAa
ARMAZENAMENTO A -18 °C				
Sem secagem	0 aAb	0 aAa	0 aAb	0 aAc
Secagem leve	0 aAa	0 aAa	0 aAd	0 aAc
Secagem severa	0 aAa	0 aAc	0 aAb	0 aAa
Coeficiente de variação (%)	46,83			

iniciados por alguns autores (Bilia *et al.* 1999, Barbedo & Cicero 2000, Faria 2006, Andréo *et al.* 2006), também podem trazer benefícios. Contudo, os resultados obtidos até o presente momento são, ainda, insuficientes para a

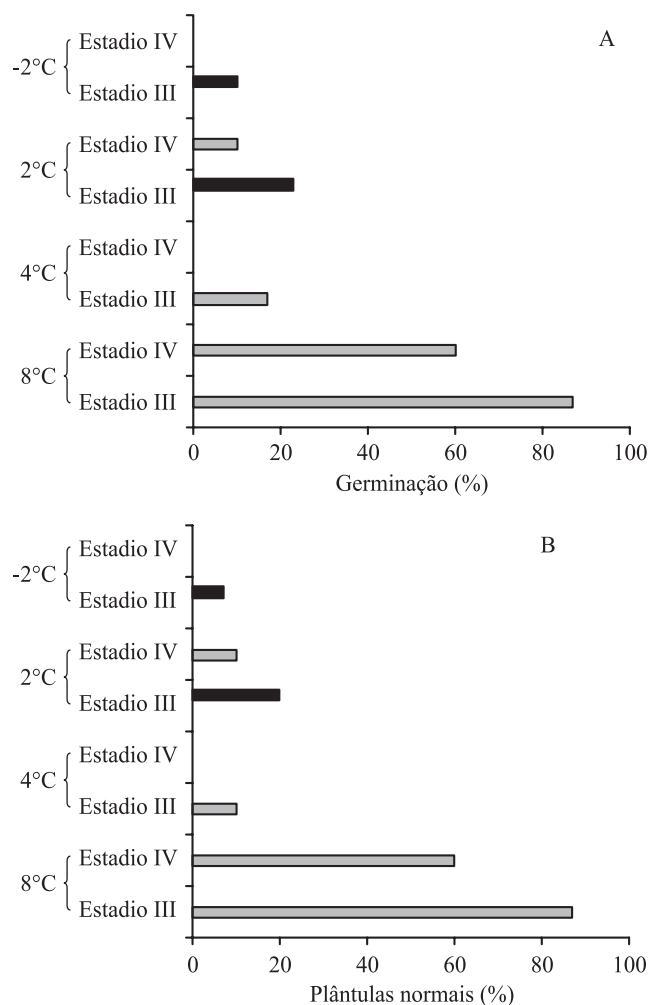


Figura 3. Germinação (A) e desenvolvimento de plântulas normais (B) de embriões de *Inga vera* subsp. *affinis* dos estádios III e IV de maturação e de dois níveis de secagem (□ = secagem leve; ■ = secagem severa), após 45 dias de armazenamento a quatro diferentes temperaturas.

Figure 3. Germination (A) and normal seedling development (B) of embryos of *Inga vera* subsp. *affinis* at levels III and IV of maturity, from two drying levels (□ = soft drying; ■ = hard drying), after 45 days of storage at four different temperatures.

adequada conservação da viabilidade dessas sementes durante seu armazenamento.

Agradecimentos – Os autores agradecem à Fapesp (Proc. 2005/04139-7) e ao CNPq (Proc. 481484/2007-8) pelo apoio financeiro ao projeto; à Secretaria de Educação do Estado de São Paulo/Projeto Bolsa-Mestrado, pela bolsa concedida a M.R. Bonjovani; ao CNPq, pela bolsa de produtividade em pesquisa concedida a C.J. Barbedo; à Prefeitura do Município de Santo André, pela permissão para as coletas de sementes.

Referências bibliográficas

- ANDRÉO, Y., NAKAGAWA, J. & BARBEDO, C.J. 2006. Mobilização de água e conservação da viabilidade de embriões de sementes recalcitrantes de ingá (*Inga vera* Will. subsp. *affinis* (DC.) T. D. Pennington). Revista Brasileira de Botânica 29:309-318.
- BARBEDO, C.J. & BILIA, D.A.C. 1998. Evolution of research on recalcitrant seeds. Scientia Agricola 55 (especial):121-125.
- BARBEDO, C.J. & CICERO, S.M. 1998. Utilização do teste de condutividade elétrica para previsão do potencial germinativo de sementes de ingá. Scientia Agricola 55:249-259.
- BARBEDO, C.J. & CICERO, S.M. 2000. Effects of initial quality, low temperature and ABA on the storage of seeds of *Inga uruguensis*, a tropical species with recalcitrant seeds. Seed Science and Technology 28: 793-808.
- BARBEDO, C.J. & MARCOS FILHO, J. 1998. Tolerância à dessecação em sementes. Acta Botanica Brasílica 12:145-164.
- BERJAK, P. & PAMMENTER, N.W. 1994. Recalcitrant is not an all-or-nothing situation. Seed Science Research 4:263-264.
- BILIA, D.A.C. & BARBEDO, C.J. 1997. Estudos de germinação e armazenamento de sementes de *Inga uruguensis* Hook. et Arn. Científica 25:379-391.
- BILIA, D.A.C., MARCOS FILHO, J. & NOVEMBRE, A.D.C.L. 1998. Conservação da qualidade fisiológica de sementes de *Inga uruguensis* Hook. et Arn. Revista Brasileira de Sementes 20:48-54.
- BILIA, D.A.C., MARCOS FILHO, J. & NOVEMBRE, A.D.C.L. 1999. Desiccation tolerance and seed storability of *Inga uruguensis* Hook. et Arn. Seed Science and Technology 27:77-89.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. 1992. Regras para análise de sementes. SNDA/DNDU/CLAV, Brasília.
- CARVALHO, P.E.R. 1994. Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira. Embrapa/CNPq, Brasília.
- CARVALHO, N.M. & NAKAGAWA, J. 2000. Sementes: ciência, tecnologia e produção. 4ª ed. Fundação Cargill, Campinas.
- CASTRO, R.D., BRADFORD, K.J. & HILHORST, H.W.M. 2004. Desenvolvimento de sementes e conteúdo de água. In Germinação: do básico ao aplicado (A.G. Ferreira & F. Borghetti, orgs.). Artmed, Porto Alegre. p.51-67.
- CHIN, H.F., KRISHNAPILLAY, B. & STANWOOD, P.C. 1989. Seed moisture: recalcitrant vs orthodox seeds. In Seed moisture (P.C. Stanwood & M.B. McDonald, eds.). Crop Science Society of America, Madison. p.15-22.

- DICKIE, J.B. & PRITCHARD, H.W. 2002. Systematic and evolutionary aspects of desiccation tolerance in seeds. *In* Desiccation and survival in plants: drying without dying (M. Black & H.W. Pritchard, eds.). CABI Publishing, New York. p.239-259.
- EIRA, M.T.S., WALTERS, C., CALDAS, L.S., FAZUOLI, L. C., SAMPAIO, J.B. & DIAS, M.C.L.L. 1999. Tolerance of *Coffea* spp. seeds to desiccation and low temperature. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 11:97-105.
- ELLIS, R.H., HONG, T.D. & ROBERTS, E.H. 1990. An intermediate category of seed storage behaviour? I. Coffee. *Journal of Experimental Botany* 41:1167-1174.
- FARIA, J.M.R. 2006. Desiccation tolerance and sensitivity in *Medicago truncatula* and *Inga vera* seeds. PhD thesis, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands.
- FIGLIOLIA, M.B. 1993. Maturação de sementes de *Inga uruguensis* Hook. et Arn. associada à fenologia reprodutiva e à dispersão de sementes em floresta ripária do rio Moji-Guaçu, município de Moji-Guaçu, SP. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- FIGLIOLIA, M.B. & KAGEYAMA, P.Y. 1994. Maturação de sementes de *Inga uruguensis* Hook. et Arn. em floresta ripária do rio Moji-Guaçu, Município de Moji-Guaçu. *Revista do Instituto Florestal* 6:15-52.
- FONSECA, S.C.L. & FREIRE, H.B. 2003. Sementes recalcitrantes: problemas na pós-colheita. *Bragantia* 62:297-303.
- GUY, C.L. 2003. Freezing tolerance of plants: current understanding and selected emerging concepts. *Canadian Journal of Botany* 81:1216-1223.
- ISTA. 1985. International rules for seed testing. *Seed Science and Technology* 13:356-513.
- KERMODE, A.R. & FINCH-SAVAGE, B.E. 2002. Desiccation sensitivity in orthodox and recalcitrant seeds in relation to development. *In* Desiccation and survival in plants: drying without dying (M. Black & H.W. Pritchard, eds.). CABI Publishing, New York. p.149-184.
- MAI-HONG, T., HONG, T.D., HIEN, N.T., HAI, H.H., TUNG, T.D., LE-TAM, V.T., NGOC-TAM, B. & ELLIS, R.H. 2006. Seed development, maturation and storage behaviour of *Mimusops elengi* L. *New Forest* 32:9-19.
- MARCOS FILHO, J. 2005. Fisiologia de sementes de plantas cultivadas. Fealq, Piracicaba.
- MICHEL, B.E. & KAUFMANN, M.R. 1973. The osmotic potential of polyethylene glicol 6000. *Plant Physiology* 51:914-916.
- PAMMENTER, N.W. & BERJAK, P. 1999. A review of recalcitrant seed physiology in relation to desiccation-tolerance mechanisms. *Seed Science Research* 9:13-37.
- PAMMENTER, N.W., NAIDOO, S. & BERJAK, P. 2003. Desiccation rate, desiccation response and damage accumulation: can desiccation sensitivity be quantified? *In* The biology of seeds: recent research advances (G. Nicolás, K.J. Bradford, D. Côme & H.W. Pritchard, eds.). CABI Publishing, Oxon/Cambridge. p.319-325.
- ROBERTS, E.H. 1973. Predicting the storage life of seeds. *Seed Science and Technology* 1:499-514.
- ROCHA, Y.T. 2004. Ibirapitanga: história, distribuição geográfica e conservação do pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam., Leguminosae) do descobrimento à atualidade. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo.
- SANTANA, D.G. & RANAL, M. 2004. Análise da germinação: um enfoque estatístico. Ed. Universidade de Brasília, Brasília.
- SANTOS, I.R.I. 2001. Criopreservação de germoplasma vegetal. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento* 20: 60-65.
- TAIZ, L. & ZEIGER, E. 2004. Fisiologia vegetal. 3ª ed. Artmed, Porto Alegre.
- USBERTI, R., ROBERTS, E.H. & ELLIS, R.H. 2006. Prediction of cottonseed longevity. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 41:1435-1441.
- VERTUCCI, C.W. 1993. Predicting the optimum storage conditions for seeds using thermodynamic principles. *Journal of Seed Technology* 17:41-53.
- VERTUCCI, C.W. & FARRANT, J.M. 1995. Acquisition and loss of desiccation tolerance. *In* Seed development and germination (J. Kigel & G. Galili, eds.). Marcel Dekker Inc., New York. p.237-271.
- WALTERS, C. 1998. Understanding the mechanisms and kinetics of seed aging. *Seed Science Research* 8:223-244.