

**Procedimento para a
Criopreservação de Sementes de
Citrullus lanatus (Cucurbitaceae)**

Foto: Izulmé Rita Imaculada Santos e Antonieta Nassif Salomão



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 323

Procedimento para a Criopreservação de Sementes de *Citrullus lanatus* (Cucurbitaceae)

Izulmé Rita Imaculada Santos
Antonieta Nassif Salomão
Rosângela Caldas Mundim

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Brasília, DF
2017

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Endereço: Parque Estação Biológica – PqEB – Av. W5 Norte
Caixa Postal 02372 – Brasília, DF – Brasil – CEP: 70770-917
Fone: (61) 3448-4700 / Fax: (61) 3340-3624
Home page: <http://www.cenargen.embrapa.br/>
E-mail (sac): sac@cenargen.embrapa.br

Comitê Local de Publicações

Presidente: Maria Isabela Lourenço Barbirato
Secretário-Executivo: Thales Lima Rocha
Membros: Daniela Aguiar de Souza Kols
 Lúgia Sardinha Fortes
 Lucas Machado de Souza
 Márcio Martinelli Sanches
 Rosameres Rocha Galvão
Suplentes: Ana Flávia do Nascimento Dias Côrtes
 João Batista Tavares da Silva

Revisão de texto: José Cesamildo Cruz Magalhães

Normalização bibliográfica: Ana Flávia do Nascimento Dias Côrtes

Editoração eletrônica e tratamento das imagens: José Cesamildo Cruz Magalhães

1ª edição (*online*)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**

Santos, Izulmé Rita Imaculada

Procedimento para a criopreservação de sementes de *Citrullus lanatus* (Cucurbitaceae). Izulmé Rita Imaculada Santos, Antonieta Nassif Salomão e Rosângela Caldas Mundim – Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2017.

18 p.: il. – (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 323).

1. *Citrullus lanatus*. 2. Melancia – Criopreservação. I. Salomão, Antonieta Nassif. II. Mundim, Rosângela Caldas. III. Série.

581.15 – CDD 21

Sumário

Resumo.....	05
Abstract.....	07
Introdução.....	09
Material e Métodos.....	10
Resultados e Discussão.....	12
Conclusões.....	15
Referências Bibliográficas.....	16

Procedimento para a Criopreservação de Sementes de *Citrullus lanatus* (Cucurbitaceae)

Izulmé Rita Imaculada Santos¹

Antonietta Nassif Salomão²

Rosângela Caldas Mundim³

Resumo

Citrullus lanatus (Thumb.) Matsum. e Nakai (melancia), Cucurbitaceae, é uma trepadeira rastejante originária da região do deserto de Kalahari, na África. As sementes de melancia são classificadas como ortodoxas, uma vez que são tolerantes à desidratação e ao armazenamento em câmaras frias a -18°C. O objetivo deste trabalho foi testar a tolerância de sementes de melancia ao congelamento em nitrogênio líquido. Quatro amostras de vinte sementes com teor de água de 6,45% foram colocadas em criotubos, mergulhadas diretamente em nitrogênio líquido (-196°C) e armazenadas por sete dias. Após este período, as sementes foram descongeladas e avaliadas por meio de testes de germinação, em que as sementes (4x20) foram semeadas em caixa Gerbox, sobre papel mata-borrão umedecido e incubadas a 25°C. Observou-se 100% de germinação das sementes criopreservadas e do controle. As plântulas obtidas apresentaram morfologia normal. Estes resultados indicam que o procedimento testado pode ser utilizado para a criopreservação de sementes de melancia.

Palavras-chave: *Citrullus lanatus*, criopreservação, melancia.

¹ Bióloga, Ph.D, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

² Engenheira Florestal, MsC, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

³ Geógrafa, Graduação, técnica da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Procedure for the Cryopreservation of Seeds of *Citrullus lanatus* (Cucurbitaceae)

Abstract

Citrullus lanatus (Thumb.) Matsum. and Nakai (watermelon), Cucurbitaceae, is a ground vine likely originated in the Kalahari desert region, Africa. Watermelon seeds are tolerant of dehydration and storage in cold rooms, at -18°C , being therefore classified as orthodox. The objective of this work was to test watermelon seed tolerance to freezing in liquid nitrogen. Four samples of twenty seeds with 6,45% water content were packed in cryovials, submerged directly in liquid nitrogen (-196°C) and stored for seven days. After this time seeds were thawed out and their viability was assessed using germination tests carried out using whole seeds (4x20) which were sowed in germination boxes Gerbox, over paper soaked with sterilized water and incubated at 25°C . It was observed that 100% of the control and cryopreserved seeds germinated and the seedlings obtained showed normal morphology. These results indicate that the procedure tested can be used for cryopreservation of watermelon seeds.

Key words: *Citrullus lanatus*, cryopreservation, watermelon.

Introdução

Citrullus lanatus (Thumb.) Matsum. e Nakai (melancia) é uma planta trepadeira rastejante da família Cucurbitaceae, originária da África, provavelmente da região do deserto de Kalahari.

A cultura da melancia tem grande importância socioeconômica no Brasil, onde é cultivada principalmente por pequenos agricultores, sob condições irrigadas e de chuva, devido ao seu fácil manejo e baixo custo de produção, quando comparada a outras hortaliças. A variedade mais comum da melancia produz um fruto com polpa vermelha bastante doce e saborosa mais consumida in natura, mas em alguns países a polpa (e a casca) é consumida cozida, usada no preparo de conservas (pickles) e xaropes (SINGH et al., 2001). Apesar da percepção popular de que melancia contém apenas água (constitui 90% do fruto) e açúcares (aproximadamente 6%), o fruto na verdade apresenta valor nutritivo muito bom, contendo níveis elevados de vitaminas como vitaminas A e C, minerais e antioxidantes (vitamina C, licopeno) e um baixo nível de calorias, de 30 a 32 calorias em uma porção de 100 gramas. O fruto e as sementes de melancia têm propriedades diuréticas, e o chá de sementes é indicado para o tratamento de hipertensão, problemas de circulação e impotência sexual (ALMEIDA, 2003). Adicionalmente, suas sementes apresentam elevado teor de proteínas e podem ser usadas como uma fonte alternativa deste nutriente (WANI et al., 2010).

As sementes de melancia são cotiledonares e apresentam germinação epígea (SINGH et al., 2001). Do ponto de vista do seu comportamento em condições de armazenamento para conservação de recursos genéticos, as sementes de melancia são classificadas como ortodoxas, uma vez que são tolerantes à desidratação e à manutenção em temperaturas abaixo de zero por períodos prolongados (ROBERTS, 1973).

A criopreservação é uma técnica de congelamento em nitrogênio

líquido (temperatura de -196°C) que viabiliza a conservação de germoplasma de espécies de plantas diversas, e garante a manutenção da integridade biológica e da estabilidade genética das amostras preservadas por períodos de tempo muito longos (SANTOS, 2000 e 2001). Recentemente a criopreservação em nitrogênio líquido tem sido recomendada para a conservação de sementes ortodoxas devido à possibilidade de estender o período de armazenamento das sementes, uma vez que sob temperatura do nitrogênio líquido (-196°C) o metabolismo celular é paralisado e com isto a integridade biológica e a estabilidade genética das amostras preservadas seriam mantidas por períodos de tempo muito mais longos em comparação com a conservação em câmaras frias a -18°C (PRITCHARD, 1995; SANTOS, 2001).

O objetivo deste trabalho foi testar a tolerância de sementes de melancia ao congelamento em nitrogênio líquido. Até onde sabemos, este é o primeiro relato de criopreservação de sementes de melancia.

Material e Métodos

No Laboratório de Criobiologia Vegetal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, foram testados os procedimentos abaixo descritos com sementes não congeladas (controle) ou sementes congeladas a -196°C da espécie.

Material vegetal

Sementes de melancia foram extraídas de fruto maduro de uma cultivar comercial de *C. lanatus* proveniente do CEASA, Brasília, DF. As sementes foram retiradas do fruto (maduro e em perfeitas condições) e lavadas com detergente de cozinha sob água corrente. As sementes foram friccionadas levemente sobre peneira de metal repetidas vezes para a completa remoção da solução de detergente e de resíduos do fruto e do arilo. Em seguida, foram colocadas para secar sobre

papel, na bancada do laboratório, em condições ambientes ($25 \pm 2^\circ\text{C}$, UR = 15%). Na manhã seguinte, as sementes foram coletadas, transferidas para caixa Gerbox, que foi fechada com filme plástico e guardada em estufa tipo BOD, sob temperatura constante de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

Métodos

Desinfecção das sementes

Antes da realização dos testes de germinação, as sementes foram imersas em frasco contendo solução comercial de hipoclorito de sódio (2,0-2,5% de cloro ativo) e detergente (10 mL detergente/1L água), o frasco foi tampado e transferido para agitador orbital por 15 minutos para atuação do produto. Em seguida os frascos foram levados à cabine de fluxo laminar e as sementes foram enxaguadas três vezes com água destilada esterilizada.

Determinação do teor de água das sementes

Após a desinfecção, as sementes foram colocadas sobre papel, na bancada do laboratório, onde pernoitaram (± 18 horas) para secagem. Em seguida determinou-se o teor de água (TU) das sementes utilizando-se o método da estufa (BRASIL, 2009), em que três amostras de cinco sementes foram pesadas para a obtenção do peso fresco (PF) e levadas à estufa sob temperatura de 105°C por 24 horas, e em seguida pesadas novamente para a obtenção do peso seco (PS). Os valores de PF e PS foram utilizados para calcular o TU das sementes. O teor inicial de água foi de 6,45%.

Congelamento

Amostras de vinte sementes foram transferidas para criotubos e em seguida foram submersas diretamente em nitrogênio líquido, a -196°C , por sete dias. Cada amostra de vinte sementes representa uma repetição, e no total foram utilizadas quatro repetições.

Descongelamento

Utilizou-se o método de descongelamento lento, em que os criotubos foram removidos do criotank e mantidos na bancada do LCV por aproximadamente quatro horas para descongelar gradualmente sob temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$).

Testes de germinação

Os testes de germinação foram conduzidos com quatro repetições de 20 sementes, em caixa Gerbox, sobre papel mata-borrão umedecido com 12,0 mL de água esterilizada. As caixas foram colocadas em sala de crescimento com fotoperíodo de 12 horas e temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Os testes foram observados diariamente, e a primeira contagem foi feita aos cinco dias após a instalação do teste, seguindo-se com contagens diárias até 25 dias após o semeio.

Análise estatística

Os dados de germinação foram submetidos à análise de variância $P < 0,05\%$, seguida do teste de Bonferroni (comparação múltipla das médias) (ANOVA).

Resultados e Discussão

O armazenamento de sementes é um procedimento eficiente para a conservação de germoplasma de plantas de interesse. Quanto ao seu comportamento em condições de armazenamento, as sementes ortodoxas são aquelas que toleram redução do seu teor de umidade para 5-7% e conservação em câmaras frias, sob temperatura de -18°C , sendo que nestas condições estima-se que sua viabilidade se mantenha por muitas décadas (ROBERTS, 1973). As sementes de melancia são classificadas como ortodoxas, uma vez que são tolerantes à desidratação e ao armazenamento em temperaturas abaixo de zero

por períodos prolongados (ROBERTS, 1973).

Recentemente a criopreservação em nitrogênio líquido tem sido recomendada também para a conservação de sementes ortodoxas com a finalidade de prolongar sua longevidade e proteger a integridade biológica e a estabilidade genética das sementes preservadas, uma vez que existem relatos de perda da qualidade em amostras de sementes de algumas espécies após o armazenamento por longos períodos em câmaras frias a -18°C (PRITCHARD, 1995).

Não foram encontrados relatos de criopreservação de sementes de *Citrullus lanatus* na literatura. Entretanto, Alsadon et al. (2014) observaram 65-100% de germinação de nove lotes de sementes de *Citrullus colocynthis* L. (teor de umidade variando de 6,4 a 8,9%) após a criopreservação em nitrogênio líquido, sendo que as sementes submetidas à criopreservação apresentaram maior velocidade média de germinação do que os controles.

No caso do presente trabalho, observou-se 100% de germinação das sementes (6,45% de teor de umidade) após a criopreservação em nitrogênio líquido por sete dias, o mesmo porcentual de germinação apresentado pelas sementes não criopreservadas (controles) (Tabela 1). O teste de germinação foi realizado em sala de crescimento com fotoperíodo de 12 horas e temperatura constante de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$. A protrusão radicular foi observada aos cinco dias, tanto para as sementes expostas ao nitrogênio líquido quanto para os controles (Figura 1A e B), e o surgimento dos epicótilos foi observado aos 14 dias após o semeio. As plântulas obtidas a partir de sementes criopreservadas ou não (controles) apresentaram morfologia normal.

As sementes são um germoplasma valioso, pois contêm genes que potencialmente podem ser utilizados em programas de melhoramento da uma espécie. O uso das técnicas de criopreservação para a conservação de sementes ortodoxas é de interesse de bancos genéticos, pois amplia a capacidade de conservação em longo

prazo de material genético de interesse. No caso da melancia, a criopreservação de sementes foi utilizada com sucesso e poderia ser adotada para a conservação de germoplasma desta espécie de grande valor socioeconômico. Seria interessante testar este procedimento de criopreservação com amostras de sementes de outras procedências para avaliar a ocorrência de diferenças entre lotes em decorrência da origem do material.

Tabela 1. Percentuais de germinação de sementes e de plântulas normais obtidas de sementes de *Citrullus lanatus* criopreservadas em nitrogênio líquido (NL +) ou não (NL-).

Teor de umidade (%)	Germinação (%)		Plântulas normais (%)	
	NL-	NL +	NL-	NL +
6,45	100	100	100	100

Fotos: ©Embrapa/LCV

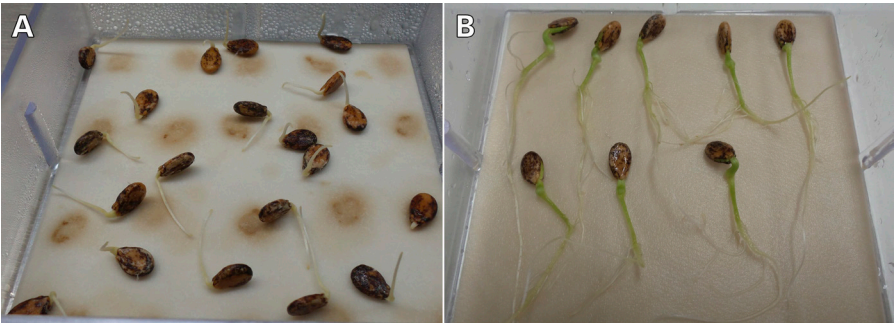


Figura 1. Aspecto de sementes de *Citrullus lanatus* (Thumb.) Matsum. e Nakai após o início da germinação. A: controle (NL-), sete dias após o semeio; B: criopreservadas em nitrogênio líquido (NL +) 15 dias após o semeio.

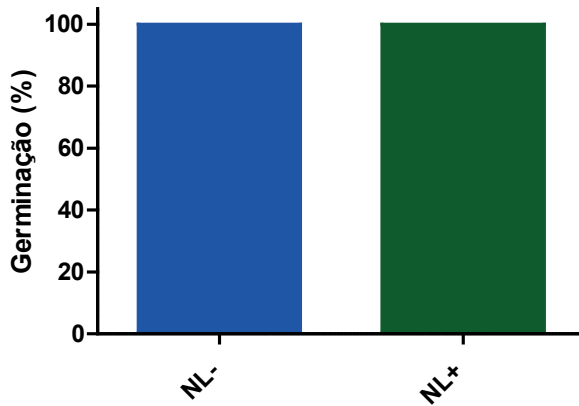


Figura 2. Percentuais de germinação de sementes de *Citrullus lanatus* (Thumb.) Matsum. e Nakai não congeladas (NL-) e congeladas em nitrogênio líquido (NL+).

Conclusões

Sementes de melancia apresentaram 100% de germinação após a criopreservação, e as plântulas obtidas apresentaram morfologia normal. Estes resultados indicam que o procedimento testado pode ser utilizado para a criopreservação de melancia.

Referências

- ALMEIDA, D. P. F. **Melancia**. Faculdade de Ciências. Universidade do Porto. Disponível em: <http://dalmeida.com/hortnet/Melancia.pdf>
Acesso em: 17 jun. 2016. p. 1-9. 2003.
- ALSADON, A. A.; SADDER, M. T.; ALI, A. A. M. Cryopreservation of wild bitter apple (*Citrullus colocynthis* L.). In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON PLANT CRYOPRESERVATION, 2., **Proceedings...** Fort Collins, Colorado: ISHS, 2014. p. 281-288.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília: Mapa/ACS, 2009. 399 p.
- PRITCHARD, H. W. Cryopreservation of seeds. In: DAY, J. G.; MCLELLAN, M. R. (Eds.). **Cryopreservation and freeze-drying protocols**. Totowa, NJ: Humana, 1995. p. 133-144. (Methods in Molecular Biology; v. 38).
- ROBERTS, E. H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.1, p. 499-514, 1973.
- SANTOS, I. R. I. Criopreservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, p. 70-84, 2000.
- SANTOS, I. R. I. Criopreservação de germoplasma vegetal.

Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento, Brasília, v. 4, n. 20, 2001.
p. 60-65.

SINGH, S.; SINGH, P.; SANDERS, D. C.; WEHNER, T. C. Germination of watermelon seeds at low temperature. **Cucurbit Genetics Cooperative Report**, v. 24, p. 59-64, 2001.

WANI, A. A.; DALBIR, S. S.; PREETI, S.; IDREES, A. W.; UMA, S. S. Characterisation and functional properties of watermelon (*Citrullus lanatus*) seed proteins. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, p. 113-121, 2011.



***Recursos Genéticos e
Biotecnologia***

MINISTÉRIO DA
**AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO**

