

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Agronomia

Área de Concentração Fruticultura de Clima Temperado



Dissertação

Propagação de Goji Berry (*Lycium barbarum* L.)

Camila Schwartz Dias

Pelotas, 2017.

Camila Schwartz Dias

Propagação de Goji Berry (*Lycium barbarum* L.)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre em Agronomia (área de concentração: Fruticultura de Clima Temperado).

Comitê de orientação

Orientadora: Prof^a. Dra. Márcia Wulff Schuch

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Adriane de Assis Marinho

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Lilian Vanusa Tunes Madruga

Pelotas, 2017.

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

D541p Dias, Camila Schwartz

Propagação de Goji Berry (*Lycium barbarum* L.) /
Camila Schwartz Dias ; Márcia Wulff Schuch, orientadora ;
Lilian Vanusa Tunes Madruga, Adriane de Assis Marinho,
coorientadoras. — Pelotas, 2017.

60 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação
em Agronomia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel,
Universidade Federal de Pelotas, 2017.

1. Solanaceae. 2. In vitro. 3. Sementes. 4. Germinação.
I. Schuch, Márcia Wulff, orient. II. Madruga, Lilian Vanusa
Tunes, coorient. III. Marinho, Adriane de Assis, coorient. IV.
Título.

CDD : 631.521

Banca examinadora

Márcia Wulff Schuch, Dra, Universidade Federal de Pelotas (UFPeI/FAEM)

Zeni Fonseca Pinto Tomaz, Dra, Universidade Federal de Pelotas UFPeI/FAEM)

Aline Ritter Curti, Dra, Universidade Federal de Pelotas (UFPeI/FAEM)

Cláudia Simone Madruga Lima, Dra, Emater/RS- Ascar

*Dedico este trabalho à minha mãe Elisabete,
ao meu pai Celso e a minha irmã Luiza, pelo
amor incondicional, incentivo e carinho em
todos os momentos da minha vida.*

Agradecimentos

À Deus, por todo aprendizado e superação, aqui concedido.

A minha família Celso, Elisabete, Luiza e Marcelo, meu bem mais valioso, por sempre estarem ao meu lado, pelo carinho de sempre e pelo incentivo em mais um passo na minha formação acadêmica.

Ao meu namorado e melhor amigo Thiago pela dedicação e apoio em todos os momentos, independente das circunstâncias.

Aos meus amigos Fernanda, Savana, Andrio, Laura, Mariana, Juliana e Jacqueline pela amizade e companheirismo. Em especial à Jéssica Gonsales e Flávia Loy, pela ajuda em todas as etapas deste trabalho, pelos momentos e ensinamentos compartilhados comigo.

Aos colegas do LabAgro e às estagiárias, Micheli e Bruna, pela ajuda na condução dos experimentos.

Ao laboratório de Análises de Sementes, em especial à Ireni, Raimunda e Carla por terem me acolhido e auxiliado na realização dos experimentos.

A Universidade Federal de Pelotas, pela oportunidade de realizar o mestrado.

A minha orientadora, Dr^a Márcia Wulff Schuch pelo apoio e orientação no desenvolvimento dos trabalhos.

A co-orientadora, Dra Adriane Marinho de Assis pela sua atenção, paciência e suas colaborações nos trabalhos.

A co-orientadora Dra Lilian Madruga Tunes, que se mostrou muito atenciosa desde o princípio, pela sua disponibilidade, ajuda e atenção.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Agronomia, área de concentração em Fruticultura de Clima Temperado, pelos ensinamentos que contribuíram para a minha formação profissional e pessoal.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por conceder bolsa de estudos.

Resumo

Dias Camila Schwartz. **Propagação de Goji Berry (*Lycium barbarum* L.)** 2017. 60f. Dissertação (Mestre em Agronomia)- Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

Os métodos de obtenção de mudas de qualidade de Goji Berry ainda não estão estabelecidos no Brasil. Assim, este estudo teve como objetivo desenvolver metodologias para análise de sementes desta frutífera bem como para a micropropagação. No primeiro experimento buscou-se verificar a temperatura para germinação e estabelecer a primeira e última contagem das sementes. Para tanto, foram testadas quatro temperaturas: 20°C, 25°C, 30°C e 20-30°C e o tempo de emergência a 25°C. Verificou-se que a primeira contagem deve ser realizada no 3º dia após a instalação do teste de germinação e a última deve ser realizada no 10º dia; que as temperaturas de 25°C e alternada de 20-30°C são consideradas ideais para o teste de germinação e que a temperatura alternada proporcionou o maior valor para as variáveis analisadas. O segundo experimento foi realizado no Laboratório de Propagação de Plantas Frutíferas da UFPel e foi utilizado o meio de cultura MS como meio base. O objetivo foi avaliar a multiplicação *in vitro* para obtenção de explantes em condições fotoautotróficas utilizando diferentes tipos de vedações (algodão, alumínio e Parafilm®) e distintas concentrações de sacarose (0, 15, 30, 45 g L⁻¹). Os dados foram submetidos à análise de variância através do teste F ($p \leq 0,05$). Constatando-se significância estatística, os efeitos das vedações foram comparados pelo teste de Waller-Duncan ($p \leq 0,05$) e concentrações por modelos de regressão ($p \leq 0,05$). Concluiu-se que a vedação do tipo algodão associado ao uso de sacarose na concentração de 30 g L⁻¹, propiciou os maiores resultados para o número de brotações, comprimento da maior brotação e matéria seca. Em ausência de sacarose no meio de cultura o algodão proporcionou as maiores médias de matéria fresca e seca.

Palavras-chave: Solanaceae, *in vitro*, sementes, germinação.

Abstract

DIAS Camila Schwartz. **Propagation of Goji Berry (*Lycium barbarum* L.)** 2017. 60f. Dissertation (Masters)- Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

The methods to acquire Goji Berry seedling has not been established in Brazil up to this date. Thereby, this study's aim is to create a methodology to analyze seeds from this fruitful tree as well as to do its micropropagation. In the first experiment, it was intended to verify the germination temperature and to establish the first and last seed count. Therefore, four temperatures were tested: 20°C, 25°C, 30°C and 20-30°C and the emergency time at 25°C. It was verified that the first count should be performed on the 3rd day after the germination test was installed and the last one should be performed on the 10th day. It was also seen that the temperatures of 25°C and the alternated 20-30°C are considered ideal for the germination test and that the alternated temperature has provided the highest value for the analyzed variables. The second experiment was performed at UFPel's Laboratório de Propagação de Plantas Frutíferas, and it was used MS medium culture as medium base. In the *in vitro* multiplication phase, was verified the explants obtainment under photoautotrophic conditions using different types of sealing (cotton, aluminum and Parafilm®) and different concentrations of sucrose (0, 15, 30, 45 g L⁻¹). Data was submitted to variance analysis using the F test ($p \leq 0.05$). Being verified statistical significance, the effect of the variation of sealings were compared by the Waller-Duncan test ($p \leq 0.05$) and concentrations by regression models ($p \leq 0.05$). It was concluded that the cotton-type sealing associated with the use of sucrose at the concentration of 30 g L⁻¹ provided the highest results for the number of budding and length of the longest budding. This combination was also efficient in obtaining a higher number of leaves, but the highest value was obtained using Parafilm as sealing and the sucrose concentration of 45 g L⁻¹. Vitrification was observed to a lesser extent in flasks sealed with aluminum. In the absence of sucrose in the culture medium, cotton has provided the highest averages of fresh and dry matter.

Key-words: Solanaceae, *in vitro*, seeds, temperature.

Lista de Figuras

Figura 1	<i>Lycium barbarum</i> L. flor e fruto	17
Figura 2	Germinação acumulada (%) de sementes de Goji Berry, sob diferentes temperaturas. UFPel, Pelotas/RS, 2016	32
Figura 3	Germinação acumulada (%) de sementes de Goji Berry, sob 25°C e alternada de 20-30°C. UFPel, Pelotas/RS, 2016	33
Figura 4	Emergência acumulada (%) de sementes de Goji Berry, sob 25°C. UFPel, Pelotas/RS, 2016	34
Figura 5	Sobrevivência (%) (A), número de brotações (B), comprimento da maior brotação cm (C), número de folhas (D) de Goji Berry em função das vedações com algodão (Alg), alumínio (Alu) e Parafilm (Par) e diferentes concentrações de sacarose. UFPel/RS, 2016. (As barras verticais representam os intervalos de confiança a 95%)	46
Figura 6	Vitrificação(%) (A), matéria fresca (B) e seca (C) de Goji Berry em função das vedações com algodão (Alg, alumínio (Alu) e Parafilm (Par) e diferentes concentrações de sacarose. UFPel/RS, 2016. (As barras verticais representam os intervalos de confiança a 95%)	48

Lista de Tabelas

Tabela 1	Germinação (%), IVG e TMG de sementes de Goji Berry em função de diferentes temperaturas. UFPel, Pelotas/RS, 2016	35
Tabela 2	Sobrevivência (%), número de brotações, comprimento de brotações (cm), número de folhas, vitrificação (%), matéria fresca e seca (g), de Goji Berry em função de diferentes vedações e concentrações de sacarose. UFPel/RS, 2016	43
Tabela 3	Coeficiente de correlação de Pearson e valores de p entre as variáveis dependentes. UFPel/RS, 2016	51

INTRODUÇÃO GERAL

Os mercados nacional e internacional mostram uma demanda cada vez maior para o consumo de alimentos vegetais em razão das suas propriedades nutricionais. Dentro da fruticultura brasileira, as pequenas frutas vêm despertando a atenção dos produtores e do mercado consumidor mundial, devido aos benefícios que proporcionam ao organismo, tais como a presença de elevado teor de compostos fenólicos com poder antioxidante (GUIMARÃES et al., 2013).

A busca por alternativas que atendam à demanda por novas fontes geradoras de renda na propriedade rural tem nas pequenas frutas opções de cultivo, haja vista o grande interesse dos consumidores, devido às qualidades nutraceuticas apresentadas pelas mesmas (RASEIRA et al, 2004).

A espécie *Lycium barbarum* L. é uma frutífera de hábito arbustivo, pertencente à família Solanaceae que abrange outras culturas como a fisalis (*Physalis peruviana*) e o tomate (*Solanum lycopersicum*). Possui como provável centro de origem o continente asiático, mais precisamente a região do Tibete e da China (AGAMASE et. al., 2011). O gênero *Lycium*, com cerca de 85 espécies, ocorre em todo o mundo e tem a sua área de distribuição natural nos continentes que apresentam clima temperado e tropical. O centro de diversidade do gênero pode ser encontrado no sul da América do Sul, África do Sul, no sudoeste da América do Norte (LEVIN et al., 2011) e Ásia oriental (MILLER et al., 2011)

Conhecido mundialmente como “Goji berry”, bem como Wolberry em inglês, Gouqizi em chinês e bayas Goji em espanhol despertaram interesse mundial em virtude de suas propriedades benéficas ao organismo. Estudos revelaram que os frutos apresentam conteúdo de antioxidantes, incluindo carboidratos, carotenoides, flavonoides, betaína, aminoácidos e vitaminas (AGAMASE et al, 2011).

As bagas desta frutífera fazem parte da medicina tradicional chinesa além de serem utilizadas no preparo de sopas, de pratos com vegetais e carne, chás, sucos, vinho, consumidas *in natura* ou como fruto seco (POTTERAT, 2010). No Brasil não há relatos de produção da frutífera, embora haja um mercado consumidor e um clima favorável ao desenvolvimento da cultura, o produto é importado e chega ao mercado com altos valores. Em virtude do exposto, para que haja uma produção da

frutífera no país, é necessária a obtenção de mudas de qualidade para assim atender a demanda do mercado.

Na propagação de espécies frutíferas, podemos obter plantas via sexuada, através da utilização de sementes ou assexuada, através de técnicas de propagação como estaquia, enxertia, alporquia, mergulhia e micropropagação.

A utilização de sementes em fruticultura é restrita devido à variabilidade entre as plantas descendentes, mesmo quando as sementes são coletadas da mesma planta matriz (FRANZON et al., 2010). Por outro lado, Fachinello (2005), propõem que a utilização de sementes para propagação de frutíferas pode ser justificada quando há estudos de espécies em fases iniciais de exploração.

A germinação depende de fatores internos e externos que podem atuar de forma independente ou inter-relacionada. De acordo com Carvalho e Nakagawa (2000), os fatores internos são intrínsecos da semente, como longevidade e viabilidade; já os fatores externos dizem respeito às condições ambientais como a temperatura, a água e o oxigênio constituem os principais fatores externos que influenciam na germinação da semente.

A faixa de temperatura dentro das quais as sementes podem germinar é característica de cada espécie. A temperatura ótima propicia a máxima porcentagem de germinação em menor espaço de tempo, enquanto que sob temperaturas máximas e mínimas as sementes pouco germinam (BEWLEY e BLACK, 1994).

A propagação assexuada, por sua vez, permite a obtenção de plantas idênticas à planta mãe. O uso de clones, ou seja um grupo de plantas que apresenta a mesma constituição genética, é de extrema importância na formação de pomares comerciais pois assim, as características agrônômicas da planta mãe serão mantidas.

A micropropagação é um método de propagação vegetativa amplamente estudado nas mais diversas espécies vegetais, sendo a modalidade dentro da cultura de tecidos, que mais tem difundido e encontrado aplicações práticas comprovadas (ERIG et al., 2005). A micropropagação ou cultura de tecidos é a ciência que estuda o crescimento das células, tecidos ou órgãos, retirados de uma planta matriz, sob um meio artificial (GEORGE et al., 2008).

As etapas da micropropagação consiste no estabelecimento da cultura *in vitro*, multiplicação das brotações, enraizamento das microestacas e aclimação (GEORGE e DEBERGH, 2008). Na etapa de multiplicação, é comum o uso de hormônios crescimento pertencentes ao grupo das citocininas, dentre elas o BAP tem sido bastante empregado para promover a multiplicação em diversas espécies. A concentração deste regulador de crescimento no meio de cultura pode variar em função da espécie e do tipo de explante (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

A hipótese principal a ser testada é de que as diferentes temperaturas influenciem o processo de germinação de sementes de Goji Berry, e a utilização de reguladores de crescimento e tipos de vedação na multiplicação *in vitro* desta cultura interfiram na obtenção de explantes para as fases seguintes do cultivo *in vitro*.

Diante do exposto, objetivou-se com o presente trabalho estabelecer a metodologia para a germinação de sementes desta frutífera, bem como para a fase de multiplicação na micropropagação.

Sumário

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
1 Fruticultura	14
2 A família Solanaceae	16
2.1 O gênero <i>Lycium</i>	17
2.2 Goji berry (<i>Lycium barbarum</i> L)	17
2.3 Propriedades nutracêuticas	19
3 Propagação Sexuada	20
3.1 Qualidade de sementes	20
3.2 Fatores que afetam a germinação	21
4 Propagação assexuada	23
4.1 Métodos de propagação vegetativa	23
CAPÍTULO 1	
Metodologia para germinação de sementes de Goji Berry	27
Introdução	27
Material e Métodos	29
Resultados e Discussão	32
Conclusão	37
CAPÍTULO 2	
Micropropagação fotoautotrófica e tipos de vedações na multiplicação	38
<i>in vitro</i> de Goji Berry	
Introdução	38
Materiais e Métodos	41
Resultados e discussões	42
Conclusão	52
Considerações finais	53
Referências Bibliográfica.....	55

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 A Fruticultura

A demanda interna de frutas frescas, incluindo a produção própria e as importações, está estimada em cerca de 18,5 milhões de toneladas por ano. Nos últimos cinco anos, esse consumo tem evoluído entre 1,9% e 2,1% (ANUÁRIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 2016).

O mundo todo produz anualmente mais de 800 milhões de toneladas de frutas. O Brasil é o terceiro colocado no *ranking* das principais nações produtoras, colhendo aproximadamente 40 milhões de toneladas de frutos. Está atrás apenas da China e da Índia, respectivamente. A China, maior produtora mundial, produz principalmente melancias e maçãs. Já a Índia, que ocupa a segunda posição, possui produções expressivas de bananas e de cocos. O Brasil é maior produtor mundial de laranjas e o segundo país que mais colhem mamões e limões Tahiti e ainda, o terceiro na lista dos que mais colhem tangerinas. A Indonésia aparece em quarto lugar, destacando-se pela sua grande produção de coco. O cenário dos maiores produtores mundiais não tende a se alterar a médio prazo, uma vez que na fruticultura, principalmente de espécies tropicais, o cultivo é perene (ANUÁRIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 2015).

O Brasil possui um vasto território e uma posição geográfica privilegiada, que proporciona o cultivo de uma ampla diversidade de frutas tropicais, subtropicais e também de clima temperado. As frutas são produzidas principalmente na região nordeste, sudeste e sul do país e as principais espécies cultivadas no território nacional são manga, melão, uva, banana, abacaxi, limão, mamão e maçã (BUSTAMANTE, 2009).

O nordeste brasileiro apresenta um clima semiárido e em virtude dos avanços no uso de sistemas de irrigação proporcionou o cultivo de diversas frutas de clima tropical.

O Submédio do Vale do São Francisco, polo de Juazeiro Petrolina, é uma região que tem sua economia centrada na fruticultura irrigada, destacando-se

principalmente na produção de mangas e uvas, tanto para mercado interno quanto para exportação. No entanto, outras espécies, embora em menor proporção, são também cultivadas, a exemplo da goiabeira, do maracujazeiro, da aceroleira, além de outras fruteiras (SILVA, et al., 2016).

A região Sudeste é a maior produtora de frutas do país. O estado de São Paulo é o grande responsável pela elevada produção desta região, tendo a laranja papel fundamental no setor frutícola. A tradicional citriculturapaulista contribuiu com 12,2 milhões de toneladas de laranjas no ano de 2014 (ANUÁRIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 2016).

Já a região Sul do Brasil, em contraste com o restante do país, apresenta um clima mais ameno, com temperaturas mais baixas, favorável ao cultivo de frutíferas de clima temperado. Em 2014, de acordo com o IBGE, o Rio Grande do Sul se destacou como maior produtor nacional de maçã (690.422 toneladas) e um dos maiores produtores de uva (812.517 toneladas). A região Nordeste do estado onde se encontra a cidade de Vacaria, produziu aproximadamente 226 mil toneladas de maçãs (IBGE, 2014).

A Serra gaúcha é responsável por grande parte da produção de uvas do estado. Atualmente o cultivo de uvas vem se expandindo para a região da Campanha, fronteira com o Uruguai e Argentina. Esta região apresenta um clima mais seco e com maior incidência de luminosidade em comparação a Serra Gaúcha. Estes atributos contribuem para a acumulação de açúcares e aumento na produção de compostos fenólicos, importantes características na elaboração de vinhos (DAUDT et al., 1973).

Na região da Campanha gaúcha outra frutífera que tem despertado interesse nos últimos anos, são as oliveiras. Atualmente, Embrapa Clima Temperado tem se empenhado no desenvolvimento e adequação de tecnologias para a cultura de oliveira, visando dar suporte técnico aos olivais implantados, assim como para futuros empreendimentos, com o intuito de melhorar a qualidade dos produtos colhidos. O cultivo é recente e têm se mostrado uma alternativa promissora aos agricultores da Campanha gaúcha que já iniciaram as primeiras colheitas (SANTOS et al., 2015).

Na metade Sul, o pêssego é predominante nos pomares de Pelotas e cidades vizinhas. A colheita inicia-se em fins de novembro e se estende até fevereiro. Os frutos apresentam dupla finalidade, sendo utilizados pela indústria na fabricação de compotas, geleias e para o consumo *in natura*.

O cultivo de pequenas frutas no Brasil vem crescendo e diversificando-se nos últimos anos, principalmente nos Estados das regiões Sul e Sudeste, que apresentam áreas com clima propício para o cultivo dessas espécies (VIGNOLO et al., 2014). No Rio Grande do Sul, o cultivo de morango apresenta acentuada relevância, pois essa é a principal fonte de renda de muitas famílias. É uma atividade consolidada e direcionada para consumo *in natura* nas regiões do Vale do Caí e Serra Gaúcha e para industrialização na região de Pelotas. Nos últimos anos também foi verificado um crescimento importante na produção da região dos Campos de Cima da Serra (LAZZAROTTO e FIORAVANÇO, 2011).

2 Família Solanaceae

Entre as famílias de angiospermas, a família Solanaceae é uma das mais importantes para os seres humanos. As espécies desta família são utilizadas na alimentação (*Solanum tuberosum* L. a batata, *S. lycopersicum* L. o tomate), tabaco (*Nicotiana tabacum* L. e *N. rustica* L.) e como plantas ornamentais (*Petunia hybrida*, a petúnia). Possui um tamanho médio com aproximadamente 90 gêneros e 3000 – 4000 espécies, grande parte pertencente ao gênero *Solanum*. Os membros desta família são extremamente diversificados, em termos de hábito, variando de árvores a herbáceas anuais; no habitat, de desertos a chuvosas florestas tropicais, e na morfologia, com uma variação surpreendente de muitos caracteres de flores e frutos (KNAPP et al., 2004).

A família *Solanaceae* ocorre em várias partes do mundo e possui como centro de diversidade a América do Sul. No Brasil, ocorrem 31 gêneros e cerca de 500 espécies nativas (HUNZIKER, 2001).

2.1 Gênero *Lycium*

O gênero *Lycium* (Família Solanaceae) foi descrito pela primeira vez por Carl Linnaeus em 1753 (DHARMANANDA, 2007). O gênero compreende aproximadamente 80 espécies que se distribuem principalmente na América do Sul, África do Sul e algumas regiões de clima temperado da Europa e Ásia. Na China existem sete espécies e três variedades, a maioria distribuída no noroeste e norte do país.

Frutas, casca da raiz e folhas das espécies *Lycium barbarum* e *Lycium chinense* fazem parte da medicina tradicional chinesa (YAO et al., 2011). Essas duas espécies são importantes fontes de flavonoides, antioxidantes e possui ação antimicrobiana (MOCAN et al., 2014).

2.2 Goji Berry (*Lycium barbarum*)

Goji Berry (Figura 1) como é chamada atualmente a espécie *Lycium barbarum* L., é uma derivação do nome “Gouqi” em chinês. Esta frutífera é classificada como um arbusto com porte de um a três metros de altura (POOTERAT, 2010).



Figura 1 – Folha, flor e fruto de *Lycium barbarum* L.

Fonte: Hummer et al. 2012, p.130.

Segundo Agamase (2011), a frutífera possui folhas de coloração verde acinzentadas, alternadas, lanceoladas que se estreitam gradualmente para o pecíolo. Apresenta de uma a três flores, axilares, radiais. O cálice e os pistilos são fundidos, a coroa é em forma de funil, com coloração roxa ou violeta, com cinco pétalas, nela estão contidos quatro estames e o ovário que contém duas câmaras (Figura 1). O fruto tem formato oblongo e sua coloração varia de laranja a vermelho escuro. Pode medir até 2 cm com sabor agridoce (POTTERAT, 2010).

As frutas são colhidas no período do verão a outono. Após a colheita, os frutos são secos primeiramente à sombra e em seguida expostas ao sol para uma última secagem, onde a polpa deve permanecer macia para o armazenamento e o consumo (PDR, 2007).

As espécies do gênero *Lycium* crescem em distintas regiões de clima temperado e subtropical (FUKUDA, YOKOYAMA & OHASHI, 2001 apud AGAMASE, 2011). *Lycium barbarum* L. é a única planta halófito ou seja, resistente a salinidade e perene do gênero (LU e WANG, 2003 apud ZHENG et al., 2010). A espécie apresenta alta tolerância a seca podendo ser encontrada também em regiões áridas e semiáridas (XU et al., 2003 apud ZHENG et al., 2010).

O gênero *Lycium*, e seus dois principais representantes, *Lycium barbarum* e *Lycium chinense*, são amplamente cultivadas na China, em Ningxia, Xinjiang, Inner Mongólia, Heber e algumas províncias ao norte da China (CUI e XING, 1999 apud ZHENG et al., 2010). Mais precisamente na Província de Ningxia, uma pequena região autônoma anteriormente parte de Gansu em 1987 iniciou projetos de produção da cultura. A frutífera é cultivada na região do Mediterrâneo, nas regiões Sudoeste e Central da Ásia e também na América do Norte e Austrália (POTTERAT, 2008).

A China produz mais de 5 milhões de quilos de frutas secas de *Lycium* por ano, a maior parte para uso doméstico. Os frutos são secos para serem comercializados como erva no mercado, ou frescos para serem consumidos como fruta *in natura* ou preservá-lo para fabricação de bebidas (POTTERAT, 2010).

2.3 Propriedades nutracêuticas

A busca por alimentos benéficos a saúde é uma tendência mundial. Desde o início do século 21, o goji berry é utilizado como alimento e medicamento no Leste da Ásia, ganhou popularidade na Europa e América do Norte. Vários produtos são comercializados sob o nome “Goji” no mercado de alimentos saudáveis (POTTERAT, 2010).

O consumo de goji berry faz parte da Medicina Tradicional Chinesa (Tradicional Chinese Medicine- TCM), onde é utilizado há muitos séculos (LIU et al., 2014). Os frutos secos podem ser prontamente consumidos, ou serem adicionados a chás, sopas e ensopados, prática mais comum (CHENG, 2005).

A coloração vermelho-alaranjado do fruto é derivada dos carotenoides que compõem de 0,03- 0,5% dos frutos secos de Gojiberry. A zeaxatina dipalmitate é o mais abundante e representa 31- 52% dos carotenoides totais (PENG, 2005) também podemos encontrar a luteína (LEUNG, 2001).

Extratos de *Lycium barbarum* contendo polissacarídeos apresentam atividade biológica e estão associados ao tratamento de doenças crônicas como controle de diabetes (LUO, 2004), câncer (GAN, 2003), degeneração macular (CHENG, 2004) além de atividade antioxidante (LIN, 2009), combate aos radicais livres (AGAMASE, 2009). Os polissacarídeos, também chamado de *Lycium barbarum* polissacarídeo ou LBP, representam 5- 8% em frutos secos de goji (AGAMASE, 2011).

De acordo com Le et al., (2007), a fruta possui atividade antioxidante e é rica em flavonoides. Seu trabalho identificou três tipos de flavonoides, myrcetina, quercetin e kaempferol, que somados equivalem a 43% do teor total de flavonoides. Ono et al., (2004) verificou a presença de ácido ascórbico (vitamina C) e isolou o ácido ascórbico 2-O-(β -D-glucopyranosyl). Segundo o autor, o teor de ácido ascórbico encontrado em frutos secos de Goji Berry é comparável ao teor de ácido ascórbico de limões frescos.

3 Propagação Sexuada

A propagação sexuada é uma das formas de obtenção de mudas desta frutífera e se caracteriza pela utilização de sementes. Segundo Franzon et al. (2010), as plantas obtidas por sementes geralmente apresentam uma grande variabilidade entre si, mesmo quando coletados da mesma planta matriz. Na maioria dos casos, não é recomendado seu uso para a produção de mudas na implantação de pomares comerciais.

Segundo Fachinello et al. (2005), a propagação por sementes é usada para a obtenção de porta-enxertos, também conhecido como “cavalo” em espécies como citros, abacateiro, caju, mangueira, pessegueiro, pequi, mangabeira, entre outras; a propagação de plantas que não podem ser propagadas por outros métodos e cuja semente é a única forma viável de propagação. Formação de mudas de espécies que suportam bem a propagação sexuada como o maracujá e estudos com espécies em fase inicial de estudos, melhoramento genético na obtenção de novas cultivares.

Para alcançar melhores resultados na obtenção de plantas por esse método de propagação, as sementes devem ser provenientes de plantas saudáveis, adultas, possuírem um bom vigor e características varietais bem definidas (FACHINELLO et al. 2008).

3.1 Qualidade de sementes:

A qualidade das sementes pode ser definida como o conjunto de todos os atributos genéticos, físicos, fisiológicos e sanitários que afetam a sua capacidade de originar plantas de alta produtividade, podendo ser analisada sob todos estes aspectos e por sua capacidade de desempenhar funções vitais, sendo caracterizada pela longevidade, pelo poder germinativo e pelo vigor (BEWLEY e BLACK, 1983; FOSSATI, 2007; VERA, 2015).

O componente genético faz referência a atributos da variedade analisada, como a pureza varietal, o potencial de produtividade, a resistência a pragas e doenças, precocidade, entre outros (PESKE et al., 2012). Como o aspecto físico se avalia a pureza do lote e a condição física da semente, que envolve o teor de

umidade, os danos mecânicos, o peso de 1.000 sementes e a aparência do lote. O componente sanitário se refere à ocorrência de microrganismos patogênicos nas sementes, principalmente os fungos. O atributo fisiológico refere-se à longevidade da semente e a sua capacidade de gerar uma planta perfeita e vigorosa, avaliados pelo teste de germinação e vigor (ABREU, 2005).

O processo de germinação de sementes é um fenômeno biológico que para os botânicos, se caracteriza pela retomada do crescimento do embrião, com o subsequente rompimento do tegumento pela radícula. Entretanto, para os tecnólogos de sementes, a germinação é definida como a emergência e o desenvolvimento das estruturas essenciais do embrião, manifestando a sua capacidade em dar origem a uma planta normal, sob condições ambientais favoráveis (NASSIF et al., 1998).

De acordo com Brasil (2009), a germinação de sementes, em teste de laboratório é a emergência e o desenvolvimento das estruturas essenciais do embrião, demonstrando sua aptidão para produzir uma planta normal sob condições favoráveis de campo.

3.2 Fatores que afetam a germinação:

A germinação depende de fatores internos e externos que podem atuar de forma independente ou inter-relacionada. De acordo com Carvalho e Nakagawa (2000), os fatores internos são intrínsecos da semente, como longevidade e viabilidade; já os fatores externos dizem respeito às condições ambientais. A temperatura, juntamente com a água e o oxigênio constituem os principais fatores externos que influenciam na germinação da semente.

Alguns autores citam a disponibilidade de água como principal fator externo para a germinação de sementes visto que a retomada do crescimento do embrião, em função da absorção de água, envolve a reativação de algumas enzimas, já presentes nas sementes; e a síntese de outras que irão hidrolisar as substâncias de reserva que suprirão o embrião com sacarose, aminoácidos e íons (PESKE et al., 2012).

A temperatura influi na velocidade e no percentual de germinação, especialmente por alterar a velocidade de absorção de água e modificar a velocidade das reações químicas que irão mobilizar ou degradar as reservas

armazenadas e a síntese de várias substâncias para o crescimento das plântulas (BEWLEY e BLACK, 1994).

A faixa de temperatura dentro das quais as sementes podem germinar é característica de cada espécie. A temperatura ótima propicia a máxima porcentagem de germinação em menor espaço de tempo, enquanto que sob temperaturas máximas e mínimas as sementes pouco germinam (BEWLEY e BLACK, 1994). Para Brancalion et al. (2010), a temperatura ótima para germinação de uma determinada espécie é resultado da adaptação fisiológica das sementes às condições ambientais dos locais de ocorrência ou de cultivo da espécie.

Sementes e frutos de algumas espécies não germinam em temperaturas constantes, algumas espécies germinam melhor em condições que incluem flutuações diárias de temperaturas (THOMPSON, P. A., 1974), como o Maracujá – doce (*Passiflora alata* Dryander) onde a germinação é favorecida pelo uso de temperaturas alternadas atuando na superação da dormência das sementes (OSIPI & NAKAGAWA, 2005).

A temperatura influencia diretamente a germinação das sementes. Podendo ser avaliados na porcentagem de germinação, velocidade e frequência relativa de germinação (CARVALHO e NAKAGAWA, 2000).

Algumas sementes germinam somente com extensa exposição à luz e outras com breve exposição apesar de muitas se apresentarem indiferentes a luminosidade e algumas apenas germinam no escuro (NASSIF, 1998). A resposta à luz pode manifestar-se por um incremento na germinação (fotoblastismo positivo) enquanto para outras espécies, a ausência de luz é o que promove a germinação (fotoblastismo negativo) (ROSA et al., 2001).

A luz promove o controle respiratório, a síntese de enzimas e de hormônios, exerce efeito sobre a permeabilidade dos tegumentos e o metabolismo dos lipídios (TOLEDO e MARCOS FILHO, 1977).

Em relação ao substrato, as Regras de Análises de Sementes (2009) recomendam que na escolha do substrato deve ser levado em consideração o tamanho da semente, sua exigência com relação a quantidade de água, sua sensibilidade à luz, a facilidade que o mesmo oferece para a realização das contagens e para avaliação das plântulas. Os substratos mais comuns são: papel, areia e solo (BRASIL, 2009).

4 Propagação assexuada

A propagação assexuada, ou vegetativa consiste na formação de uma nova planta através de partes vegetativas da planta matriz, garantindo a preservação das características agronômicas desejáveis. A formação de uma nova muda de forma vegetativa é baseada no conceito de totipotência, na qual uma única célula viva contém as informações necessárias para regenerar uma nova planta, semelhante a que lhe deu origem (HARTMANN, 2002).

O uso de clones, ou seja, um grupo de plantas que, por serem provenientes de uma mesma planta matriz, apresenta a mesma constituição genética, e com idênticas necessidades climáticas, edáficas, nutricionais e de manejo, é de extrema importância na formação de pomares comerciais (FACHINELLO et al., 2005)

A propagação vegetativa apresenta algumas vantagens em relação a sexuada: mantém o valor agronômico da planta matriz, reduz a fase juvenil e por consequência o período improdutivo, as áreas de produção mais uniformes, o que permite uma melhor definição e execução das práticas de manejo no pomar; permite a combinação de diferentes plantas em uma nova planta (enxertia) (FACHINELLO et al., 2005; FRANZON et al., 2010).

Silva et al. (2011) destaca como razões para a utilização deste método de propagação, a multiplicação em larga escala de uma planta selecionada como planta-matriz, propagação de espécies em que esta seja a única forma de propagação para sua obtenção, multiplicar espécies cuja propagação vegetativa é a mais fácil, rápida e econômica.

4.1 Métodos de Propagação Vegetativa

Dentre os principais métodos de propagação vegetativa das plantas frutíferas estão a estaquia, a enxertia, a mergulhia, as estruturas especializadas e a micropropagação.

O termo estaquia é usado para designar o processo de propagação no qual ocorre indução do enraizamento adventício em segmentos destacados da planta mãe, e que em condições favoráveis, originam uma nova planta. A estaca refere-se

a qualquer segmento de uma planta, com pelo menos uma gema vegetativa, podendo haver estacas de ramos, raízes e folhas (FACHINELLO et al., 1995).

A enxertia é uma associação íntima entre duas partes de diferentes plantas que continuam seu crescimento como um ser único. São consideradas duas plantas: o cavalo ou porta-enxerto que é a planta que contribui com o sistema radicular, assegurando a nutrição mineral, e o enxerto que é a planta de características nobres que se deseja reproduzir, que forma a copa e frutifica (RIBEIRO, et al., 2005).

Outro método de propagação vegetativa é a mergulhia. De acordo com Fachinello et al. (2005), a mergulhia é um processo de multiplicação no qual a planta a ser formada só será destacada da planta mãe após ter enraizadas.

Além desses métodos, algumas espécies possuem processos naturais de propagação por meio de estruturas especializadas que além de funcionarem como órgãos de reservas de alimentos podem também ser utilizados na propagação (SILVA et al., 2011).

Os estolões são caules aéreos especializados que surgem nas axilas das folhas, na base ou na coroa das plantas e que enraízam e formam uma nova planta. Já os rebentos são brotações que surgem das raízes, do caule ou dos frutos que podem ser utilizados na produção de novas plantas. O abacaxizeiro, a framboeseira e a amoreira são espécies que podem ser propagadas por rebentos (FRANZON, et al., 2010). Os rizomas são caules subterrâneos que possuem gemas para formação de novas brotações, as quais originarão novos pseudocaulis e passarão a ter seu próprio sistema radicular. É o principal método de multiplicação das bananeiras (SILVA, et al., 2011).

A micropropagação é a técnica que permite o crescimento e a multiplicação de células, tecidos, órgãos ou partes de órgãos de uma planta (explante) sobre um meio nutritivo, com condições assépticas e ambiente controlado (luz e temperatura). Essa técnica se baseia no aproveitamento da totipotência das células vegetais, ou seja, na capacidade de produzir órgãos, como brotos e/ou raízes (organogênese) ou embriões somáticos que regeneram uma planta completa (embriogênese somática) num meio de cultivo favorável (CARVALHO, 1999).

Entre as vantagens da micropropagação está a possibilidade de se obter várias plantas a partir de um único explante inicial, independentemente de condições climáticas; redução do tempo e da área necessária à propagação da espécie; melhores condições sanitárias e a propagação vegetativa de espécies difíceis de serem propagadas por outros métodos. Como desvantagens, este método pode apresentar variação somoclinal, perda de caracteres devido à intensa multiplicação, o elevado custo de produção, dificuldades na etapa de aclimação (SCHUCH & ERIG, 2005).

Esse método é amplamente estudado em diversas espécies vegetais, sendo a modalidade dentro da cultura de tecidos que mais se tem difundido e encontrado aplicações práticas comprovadas (SCHUCH & ERIG, 2005).

Os meios nutritivos utilizados para a cultura de células, tecidos e órgãos de plantas fornecem as substâncias essenciais para o crescimento dos tecidos e controlam, em grande parte, o padrão de desenvolvimentos *in vitro*. Para tanto, os meios nutritivos se baseiam nas exigências das plantas quanto aos nutrientes minerais. Complementando as substâncias biossintetizadas pelas células, vários compostos orgânicos são adicionados para suprirem as necessidades metabólicas, energéticas e estruturais das células (CALDAS et al., 1998). Incluem fontes de macro e micronutrientes, sacarose, vitaminas, reguladores de crescimento, agente solidificante, entre outros. Vários protocolos de meios de cultura foram criados, WPM (Lloyd GB & McCown BH, 1980), B5 (GAMBORG, et al., 1968), MS (Murashige & Skoog, 1962). Vários meios básicos têm sido utilizados na multiplicação de plantas, sendo o meio MS o mais empregado (Chaves, et al. 2005).

Dentre os componentes básicos para o meio de cultura, a sacarose exerce importante função na cultura de tecidos. Esta é a fonte mais comum de carboidratos utilizados no cultivo *in vitro*. Sua função é fornecer energia metabólica e esqueletos carbônicos para a biossíntese de aminoácidos e proteínas, polissacarídeos estruturais como a celulose, enfim, todos os compostos orgânicos necessários para o crescimento das células (CALDAS et al., 1998). No entanto, Yamada & Sato, (1978), relatam que a sacarose, mesmo sendo essencial ao crescimento das culturas *in vitro*, em excesso pode se tornar prejudicial, pois inibe a síntese de clorofila, reduzindo a capacidade fotossintética das culturas. Concentrações

elevadas de sacarose podem facilitar a proliferação de fungos e bactérias, e com isso aumentar a contaminação *in vitro* afetando drasticamente o crescimento e desenvolvimento dos explantes (KOZAI, 1991).

As etapas do cultivo *in vitro* são constituídas pela fase de estabelecimento da cultura *in vitro*, multiplicação, enraizamento e aclimação. O crescimento e a morfogênese *in vitro* são fatores regulados pela interação e o balanço dos reguladores de crescimento no meio de cultura (GEORGE & SHERRINGTON, 1984). Na fase de multiplicação, o uso de hormônios do grupo das citocininas é comumente utilizado para promover a indução de brotos adventícios a partir de calos ou para induzir multibrotação a partir de gemas axilares ou apicais. As citocininas atuam na inibição da dominância apical, em contrapartida, pode inibir a formação de raízes (SRISKANDARAJAH et al., 1982; CID, 2010). As concentrações deste hormônio podem variar bastante em função da espécie e do tipo de explante. Meios de cultura que contem entre 0,05 a 1,0 mg.l⁻¹ de BAP (6-benzilaminopurina) têm sido utilizados com bons resultados para o cultivo de ápices caulinares de várias espécies herbáceas e lenhosas (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). Chaves et al. (2005), ao estudar o efeito da citocinina BAP na multiplicação *in vitro* de *Physalis peruviana* observou o maior número de brotações na concentração de 0,3 mg.l⁻¹ do hormônio. No entanto Rogalski, et al, (2003) observou que o maior número de brotos foi obtido na concentração de 0,2 mg.l⁻¹.

O microambiente dentro dos frascos é o responsável pela variabilidade, no comportamento das culturas, uma vez que os fatores determinantes para a qualidade do microambiente são o tipo de frasco, tipo de tampa e qualidade do meio presente. A influência do tipo de tampa está relacionada com o nível de trocas gasosas adequadas, pois tampas com vedação hermética podem ocasionar aumento de CO₂ e etileno. Além destes, outros gases metabolicamente ativos são liberados pelas culturas interferindo no seu desenvolvimento e na presença de O₂ no interior do frasco (FILHO et al., 2002). Para reduzir a umidade relativa e a concentração de etileno contida nos frascos, algumas técnicas têm sido testadas para facilitar as trocas gasosas, como o uso de diferentes sistemas de vedação frasco, tais como algodão ou filtros permeáveis a gases (KOZAI & KUBOTA, 2001).

CAPÍTULO 1

Metodologia para análise de sementes de Goji Berry

Introdução

A Goji Berry (*Lycium barbarum* L.) é uma frutífera de hábito arbustivo, pertencente à família Solanaceae e possui como provável centro de origem o continente asiático, mais precisamente a região do Tibete e da China. Os frutos apresentam conteúdo de carboidratos, carotenoides, flavonoides, betaína, aminoácidos e vitaminas (AGAMASE, 2011). As bagas são utilizadas no preparo de sopas de pratos com vegetais e carne, chás, sucos, vinho, consumida *in natura* ou como fruto seco (POTTERAT, 2010).

O consumo de Goji Berry aumentou nos últimos anos em virtude dos benefícios associados ao seu consumo. A coloração vermelho-alaranjado do fruto é derivada dos carotenoides que compõem de 0,03- 0,5% dos frutos secos de Gojiberry. A zeaxatina dipalmitate é o mais abundante e representa 31- 52% dos carotenoides totais (PENG, 2005) também podemos encontrar a luteína (LEUNG, 2011).

De acordo com LE et al. (2007), a fruta possui atividade antioxidante e é rica em flavonoides. Seu trabalho identificou três tipos de flavonoides, myrcetina, quercetin e kaempferol, que somados equivalem a 43% do teor total de flavonoides. ONO et al. (2004) verificou a presença de ácido ascórbico (vitamina C) e isolou o ácido ascórbico 2-O-(β -D-glucopyranosyl). Segundo o autor, o teor de ácido ascórbico encontrado em frutos secos de Goji Berry é comparável ao teor de ácido ascórbico de limões frescos.

Extratos de Goji contém polissacarídeos que apresentam atividade biológica e estão associados ao tratamento de doenças crônicas como controle de diabetes (LUO, 2004), efeitos contra o câncer e ativação do sistema imunológico (GAN, 2004), degeneração macular (CHENG, 2005) além de atividade antioxidante (LIN, 2009). Os polissacarídeos, também chamado de *Lycium barbarum* polissacarídeo ou LBP, representam 5- 8% em frutos secos de goji (AGAMASE, 2011).

A propagação de Goji Berry pode ser assexuada, em que as plantas são originadas através de partes vegetativas da planta matriz, sendo a estaquia a mais utilizada. Outra opção é a multiplicação sexuada, na qual as plantas são obtidas via sementes. Neste caso, a qualidade das sementes é um importante parâmetro a ser definido, pois tem influência sobre a produção, afetando o estabelecimento, desenvolvimento e desempenho das culturas. Para ter sucesso na produção, é preciso ter sementes de alta qualidade e com isso garantir emergência rápida e uniforme de plântulas de cada semente (VERA, 2015).

A qualidade das sementes pode ser definida como o conjunto de todos os atributos genéticos, físicos, fisiológicos e sanitários que afetam a sua capacidade de originar plantas de alta produtividade, podendo ser analisada sob todos estes aspectos e por sua capacidade de desempenhar funções vitais, sendo caracterizada pela longevidade, pelo poder germinativo e pelo vigor (BEWLEY e BLACK, 1983; FOSSATI, 2007).

O teste de germinação tem como objetivo fornecer informações sobre a qualidade fisiológica das sementes. Esses dados podem ser utilizados na seleção de lotes para armazenamento, comercialização e semeadura (VERA, 2015).

A germinação depende de fatores internos e externos que podem atuar de forma independente ou inter-relacionada. De acordo com Carvalho e Nakagawa (2000), os fatores internos são intrínsecos da semente, como longevidade e viabilidade; já os fatores externos dizem respeito às condições ambientais como a temperatura, a água e o oxigênio constituem os principais fatores externos que influenciam na germinação da semente.

A temperatura influi a velocidade e o percentual de germinação, especialmente por alterar a velocidade de absorção de água e modificar a velocidade das reações químicas que irão mobilizar ou degradar as reservas armazenadas e a síntese de várias substâncias para o crescimento das plântulas. A faixa de temperatura dentro das quais as sementes podem germinar é característica de cada espécie. A temperatura ótima propicia a máxima porcentagem de germinação em menor espaço de tempo, enquanto que sob temperaturas máximas e mínimas as sementes pouco germinam (BEWLEY e BLACK, 1994).

Logo, diante do exposto, objetivou-se diante do presente estudo, estabelecer procedimentos metodológicos para a execução do teste de germinação em sementes de Goji Berry (*Lycium barbarum* L.).

Materiais e Métodos

O experimento foi conduzido no Laboratório Didático de Análise de Sementes da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel (FAEM), da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), localizado em Capão do Leão – RS, no período de julho a agosto de 2016.

Foram adquiridos 200g de frutos desidratados de Goji berry em um estabelecimento comercial de Pelotas – RS.

Os frutos foram colocados para embeber em água destilada 24 horas antes da montagem do teste de germinação. As sementes foram retiradas com auxílio de pinças e colocadas em papel mata-borrão para germinar. O substrato, papel mata-borrão foi utilizado neste experimento por ser mais indicado para germinação de sementes pequenas e para outras espécies dentro da mesma família.

A umidade foi determinada de acordo com a metodologia para introdução de novas espécies mencionada nas Regras para Análise de sementes (BRASIL, 2009), adotando temperatura de $103 \pm 2^{\circ}\text{C}$, durante 17 horas. Foram utilizados duas repetições de duas gramas de sementes, pesadas em capsulas de alumínio em balança com precisão de 0,001g. As cápsulas foram colocadas em estufa com a temperatura e o tempo especificados acima. Após o tempo pré-determinado, as cápsulas foram retiradas da estufa e colocadas em um dessecador para reduzir a temperatura sem a absorção de umidade. Os recipientes foram pesados e os resultados estão expressos em porcentagem.

O peso de mil sementes foi determinado através da utilização de oito repetições contendo 100 sementes. As repetições foram pesadas separadamente e a média foi usada para obter o resultado, expresso em gramas.

Temperatura: Avaliou-se três temperaturas constantes (20°, 25° e 30°C) e uma temperatura alternada (20 – 30°C).

Germinação: Para a realização do teste, foram utilizadas 200 sementes em cada repetição. As repetições foram divididas em quatro sub amostras, contendo 50 sementes cada, e semeadas em caixas Gerbox® utilizando papel mata-borrão como substrato. As caixas Gerbox® foram desinfestadas com hipoclorito de sódio a 10% e álcool a 70%. O substrato, papel mata-borrão, foi utilizado neste experimento por ser mais indicado para germinação de sementes pequenas e para outras espécies dentro da mesma família. O papel mata-borrão foi umedecido com água destilada na quantidade equivalente a 2,5 vezes a massa do papel seco. Após esse procedimento as sementes foram colocadas para germinar em câmara de germinação nas temperaturas anteriormente estabelecidas.

As avaliações foram feitas diariamente, até os 14 dias. Foram consideradas plântulas normais as que apresentavam desenvolvimento normal de todas as estruturas essenciais, sendo o resultado expresso em porcentagem. A umidade do substrato foi repostada, conforme a necessidade, a fim de mantê-la constante.

Primeira contagem de germinação: A primeira contagem foi realizada juntamente com o teste de germinação. Para estabelecer o período de avaliação deste teste e também do teste de germinação, foram realizadas contagens diárias e observação dos dias transcorridos até o início da germinação. Para a contagem final, considerou-se o dia em que foi observado o último incremento na germinação.

Velocidade de germinação: Ao analisar a germinação, nas mesmas unidades experimentais foi contabilizado o número de sementes germinadas diariamente até o final de cada período de avaliação do ensaio. Os dados obtidos foram utilizados para determinar o número médio de dias necessários para a germinação das sementes, através da fórmula proposta por Edmond; Drapala, (1958) $VG = (N1G1 + N2G2 + \dots + NnGn) / (G1 + G2 + \dots + Gn)$, onde G1, G2 e Gn é o número de sementes germinadas, e N1, N2 e Nn é o número de dias a partir da semeadura.

Índice de velocidade de germinação: Para obter o IVG, o procedimento foi o mesmo utilizado para obter a velocidade de germinação. O IVG foi calculado utilizando a fórmula proposta por Maguire, (1962): $IVG = G1/N1 + G2/N2 + G3/N3 + \dots + GN/NN$ onde GN indica o número de dias decorridos (N1, N2, N3, ..., NN) entre a semeadura e a germinação.

Coeficiente de velocidade de germinação: Com os dados obtidos através das contagens diárias do número de plântulas normais, foi calculado o coeficiente de velocidade de germinação utilizando a fórmula de Furbeck et al., (1993): $CVG = (G1 + G2 + \dots + Gn) / ((N1G1) + (N2G2) + \dots + (GnNn)) \times 100$, onde G1, G2, Gn é o número de plântulas normais computadas na primeira contagem, na segunda e na última contagem. N1, N2, Nn é o número de dias de semeadura à primeira, à segunda e à última contagem.

Tempo médio de germinação: Calculado pela fórmula $TMG = (\sum ni ti) / \sum ni$, em que ni= a número de sementes germinadas por dia, ti= tempo de incubação, i= número de dias.

Emergência de plântulas: O substrato utilizado para a emergência de plântulas foi areia. Optou-se por esse substrato por ser um material inerte e com isso, o teste de emergência pode ser reproduzido em outros laboratórios. A areia foi autoclavada a temperatura de 121° e 1atm, para desinfestar o substrato. As sementes foram distribuídas de forma que todas tivessem a mesma distância entre si, e foram introduzidas no substrato a uma profundidade de 0,5 cm, em caixas tipo Gerbox, umedecidas com água destilada a três vezes o valor do peso seco e mantidos a temperatura de 25 +- 2°C. A avaliação do número de plântulas emergidas foi contabilizada diariamente.

Procedimentos estatísticos:

O delineamento experimental utilizado foi completamente casualizado arranjado em esquema unifatorial, com quatro repetições. O fator de tratamento testou diferentes temperaturas (30, 25 e 20°C constante em germinador, e 20°C / 30°C em BOD). Cada repetição foi composta de 200 sementes, divididas em quatro sub amostras.

Os dados obtidos foram analisados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro Wilk; à homocedasticidade pelo teste de Hartley; e, a independência dos resíduos por análise gráfica. Posteriormente, os dados foram submetidos à análise de variância através do teste F ($p \leq 0,05$). Constatando-se significância estatística, os efeitos das temperaturas foram comparados pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Resultados e discussão:

Os testes realizados permitiram determinar o peso médio de mil sementes que foi de 0,8359 gramas. O peso de mil sementes é uma informação que fornece uma ideia do tamanho das sementes, assim como seu estado de maturidade e de sanidade (BRASIL, 2009). As sementes extraídas dos frutos apresentaram teor de umidade de 10,65%. Valor próximo de outras solanáceas como o cubiu (*Solanum sessiliflorum*) que apresenta 12,9% de umidade (LOPES et al., 2005). Os resultados foram obtidos conforme a metodologia descrita anteriormente.

O período adequado para a realização das avaliações no teste de germinação pode ser visualizado na Figura 2.

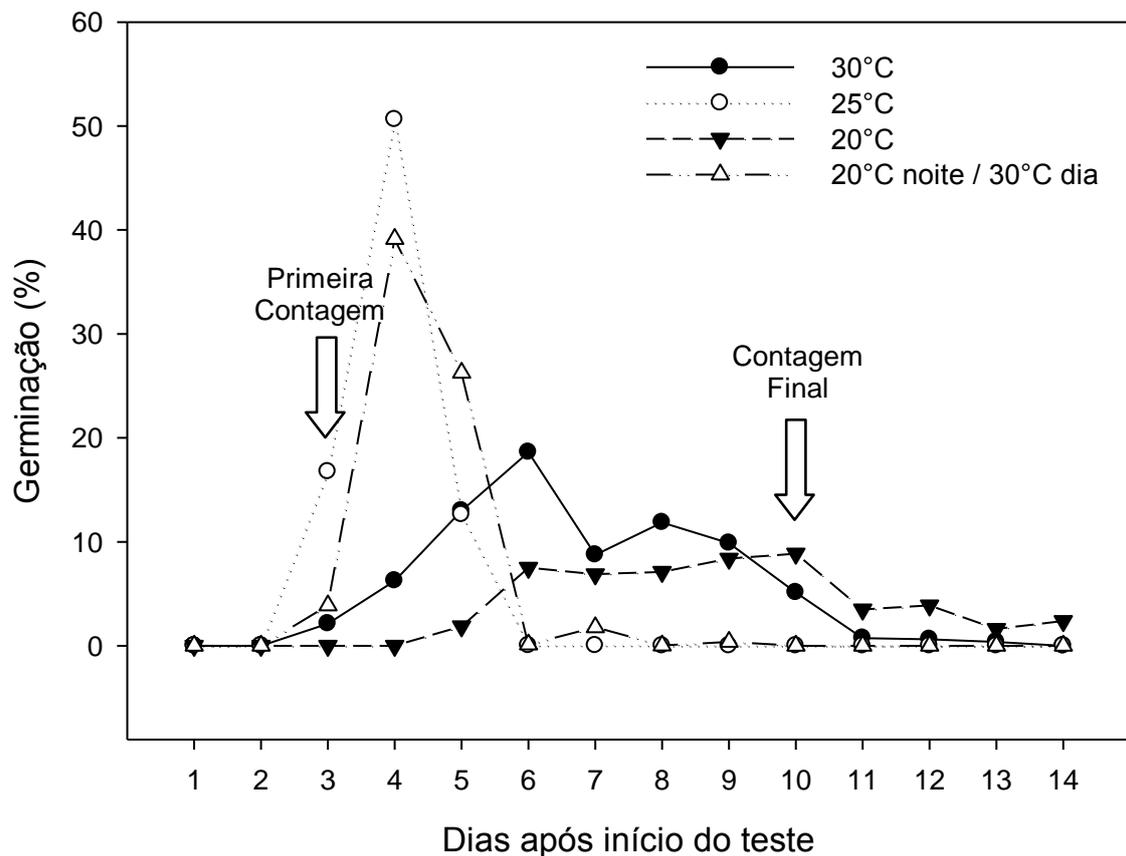


Figura 2 - Germinação acumulada (%) de sementes de Goji Berry, sob diferentes temperaturas. UFPel, Pelotas/RS, 2016.

Baseado no comportamento das sementes durante a realização do teste, considera-se como período adequado para a primeira contagem o terceiro dia e para a segunda contagem, 10 dias após a sementeira, conforme indicam as setas na

Figura 2. Foram considerados estes períodos, pois foi verificado o primeiro pico de germinação no terceiro dia após a instalação do teste e transcorridos 10 dias, não houve incrementos na germinação.

Optou-se por apresentar as temperaturas de 25°C constante e a de 20-30° intercalada (FIGURA 3), por ser as temperaturas recomendadas para as espécies da mesma família *Solanaceae*, a qual pertence a espécie em estudo, de acordo a Regra de Análises de Sementes (BRASIL, 2009).

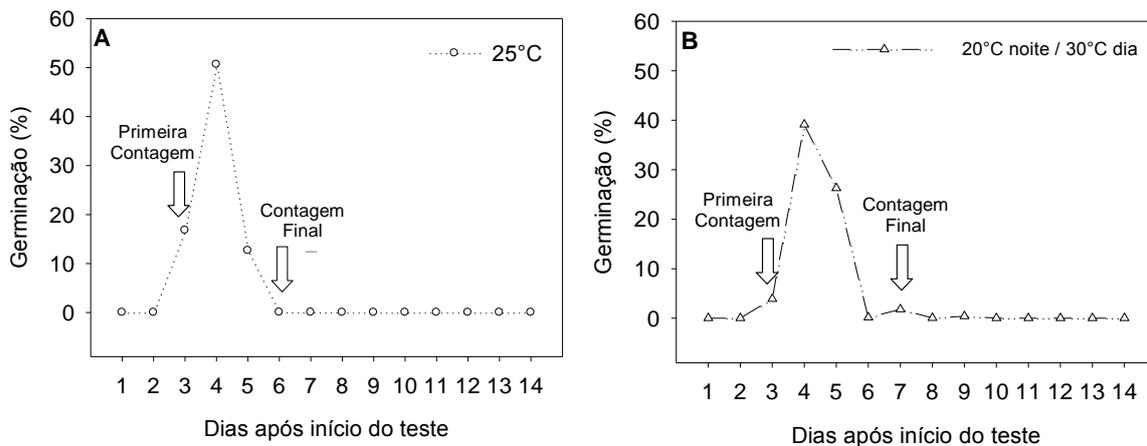


Figura 3 - Germinação acumulada (%) de sementes de Goji Berry, sob 25°C e alternada de 20 – 30°C. UFPel, Pelotas/RS, 2016.

A temperatura de 20°C demonstrou um baixo desempenho, obtendo a menor porcentagem de germinação. As sementes submetidas a este tratamento iniciaram a germinação a partir do 5º dia após a semeadura (Figura 2), enquanto que nas outras temperaturas o processo germinativo iniciou no 3º dia. Na temperatura de 30°C também foi verificado um atraso no início da germinação e menor porcentagem de sementes germinadas.

O conhecimento das condições ideais para a germinação da semente de uma determinada espécie é de fundamental importância, principalmente pelas respostas diferenciadas que ela pode apresentar em função de diversos fatores, como viabilidade, dormência, condições de ambiente, envolvendo água, luz, temperatura, oxigênio e ausência de agentes patogênicos, associamos ao tipo de substrato para sua germinação (LOPES, et al., 2005; CARVALHO & NAKAGAWA, 2000).

Para obter os dados e estabelecer o número de dias para realizar as avaliações de primeira e última contagem, foram realizadas avaliações diárias do número de sementes germinadas, as quais foram contabilizadas e descartadas. As

temperaturas de 25°C e a alternada de 20-30°C tiveram comportamento semelhante, no entanto a temperatura de 25°C obteve o primeiro pico de germinação no terceiro dia após a sementeira (FIGURA 3A), enquanto que a temperatura alternada obteve o primeiro pico de germinação no quarto dia. Para a última contagem, as duas temperaturas não obtiveram mais incremento na germinação a partir do quinto dia após a sementeira.

Ao observar o gráfico da Figura 3, podemos concluir que a temperatura de 25°C obteve a maior porcentagem de germinação comparado com a temperatura alternada e por esse motivo foi realizado o teste de emergência nesta temperatura (FIGURA 4).

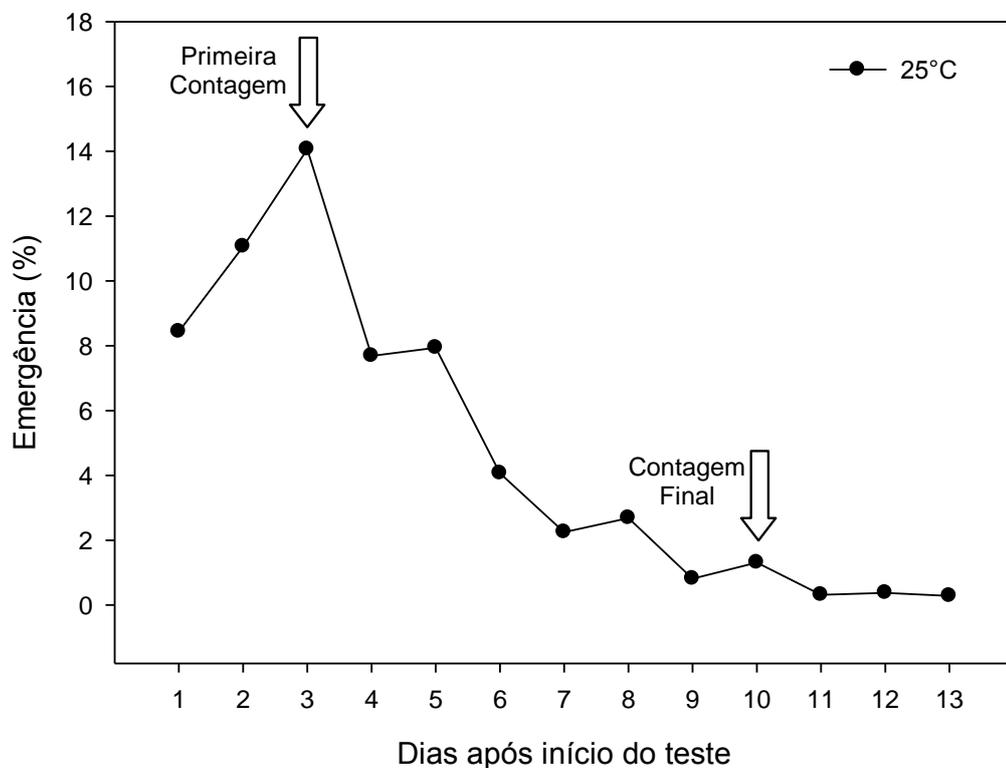


Figura 4 – Emergência acumulada (%) de sementes de Goji Berry, sob 25°C. UFPel, Pelotas/RS, 2016.

Uma germinação rápida e uniforme de sementes, seguida por imediata emergência das plântulas são características altamente desejáveis na formação de mudas, pois quanto mais tempo as plântulas permanecer nos estágios iniciais de desenvolvimento e demorar para emergir do solo, mais vulnerável estará às condições adversas do meio (MARTINS et al., 1999).

Na Tabela 1, é possível comparar os resultados obtidos para a porcentagem de germinação das sementes, Índice de Velocidade de Germinação (IVG) e o Tempo Médio de Germinação (TMG) em função da temperatura aplicada em cada tratamento.

Tabela 1 - Germinação (%), Índice de velocidade de germinação (IVG) e tempo médio de germinação (TMG) de sementes de goji berry em função de diferentes temperaturas. UFPel, Pelotas/RS, 2016.

Temperatura (°C)	Germinação (%)	IVG	TMG
30	78,50±2,67 b ^{1/}	6,35±0,20 b	6,76±0,11 b
25	87,87±1,59 ab	10,95±0,31 a	4,24±0,04 d
20	52,00±1,43 c	3,12±0,07 c	8,97±0,05 a
20 / 30	91,50±3,03 a	9,70±0,63 a	5,05±0,21 c
C.V. (%)	5,9	9,7	3,9

^{1/} Médias (± erro padrão)acompanhadas por mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (p≤0,05). C.V.: coeficiente de variação.

A maior porcentagem de germinação foi verificada na temperatura alternada de 20-30°C, porém não diferiu estatisticamente da temperatura de 25°C, que obteve a segunda maior porcentagem. De acordo com Alves, et al. (2002), pode ser considerada como temperatura ótima, aquela em que a maior porcentagem de germinação é obtida, dentro do menor espaço de tempo. Segundo as Regras de Análises de Sementes (BRASIL, 2009), espécies da mesma família botânica como *Lycopersicon esculentum*, *Physalis pubescens* e *Solanum tuberosum*, também apresentam a temperatura alternada como recomendação para realização do teste de germinação.

Os resultados deste experimento estão de acordo com Pereira & Andrade (1994), que ao avaliar a ação da temperatura na germinação de sementes de goiabeira (*Psidium guajava* L.) e maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* Sims),obtiveram o maior porcentual de germinação na temperatura alternada de 20-30°C comparado a temperatura de 25°C, porém os dois tratamentos não diferiram estatisticamente. Já para Osipi & Nakagawa (2005) em estudo semelhante feito com maracujazeiro-doce (*Passiflora alata* Dryander), verificaram que a temperatura alternada de 20-30°C atuou significativamente para porcentagem de germinação de sementes desta espécie, em relação à temperatura constante de 25°C.

A germinação de sementes é um processo complexo, que envolve muitas reações e fases, cada uma delas é afetada pela temperatura, a exemplo do florescimento e da maturação das sementes (LOPES, et al., 2005).

Piva (2013) ao estudar o efeito da temperatura em sementes de fisális (*Physalis angulata*), concluiu que a germinação máxima desta espécie ocorre em uma faixa de temperatura mais ampla, de 25°C a 35°. Bagatim (2017) estudando a mesma espécie, notou que o maior IVG foi obtido na temperatura alternada, bem como a maior porcentagem de germinação. De acordo com o mesmo, a temperatura poderia ter favorecido a velocidade de embebição de água pela semente, o que ativou as reações metabólicas no interior da semente, possibilitando a emissão da radícula, uma vez que a embebição das sementes é um dos fatores essenciais para desencadear o processo e o desenvolvimento de plântulas normais. Estes resultados estão de acordo com os obtidos neste trabalho, onde a temperatura alternada obteve os melhores resultados para IVG e germinação, não diferindo estatisticamente da temperatura de 25°C.

Ao trabalhar com sementes de pitaia vermelha (*Hylocere usundatus* Haw.), Alves et al. (2011) verificou que a temperatura mais adequada para o teste de germinação para esta espécie é de 25°C e que a temperatura de 20°C foi a mais prejudicial para as sementes. Em contrapartida, Santos, et al. (2015) em estudo realizado com sementes de arará (*Psidium guineense* Swartz.) verificou que as temperaturas de 20°C e 25°C podem ser usadas para a germinação desta espécie.

No estudo realizado por Justo et al. (2007) com sementes de uvaia (*Eugenia pyriformis* Camb.) concluiu que a espécie germinou, satisfatoriamente na faixa de temperatura entre 20° e 30° e considerou a temperatura de 25°C como ótima para a germinação.

Os valores para porcentagem de germinação podem ter sido influenciados pelo uso de temperaturas elevadas para obtenção dos frutos desidratados, dos quais foram retiradas as sementes para este experimento. De acordo com Tudor et al. (2017), ao realizar experimento comparando germinação de sementes retiradas de frutos frescos e desidratados, concluiu que a temperatura utilizada no processo de desidratação pode influenciar na germinação das sementes assim como os diferentes genótipos.

Para a variável tempo médio de germinação (TMG), o maior valor observado foi na temperatura de 20°C, que também apresentou a menor germinabilidade. Segundo Nassif, et al. (1998), temperaturas abaixo da temperatura ótima, reduz a velocidade de germinação, resultando em alteração da uniformidade de emergência,

por outro lado, temperaturas acima da ótima aumentam a velocidade de germinação, embora somente as sementes mais vigorosas consigam germinar.

A influência da temperatura na germinação também foi avaliada por Alves, et al. (2015), em sementes de goiaba (*Psidium guajava* L.), onde foram testadas as temperaturas de 20°C, 25°C, 30°C e 20- 30°C. O maior valor do IVG foi verificado na temperatura alternada, onde também foi obtida a maior porcentagem de germinação. Já para a variável tempo médio de germinação (TMG), a temperatura de 20°C apresentou o maior valor, e o menor ocorreu na temperatura alternada. Estes resultados também foram observados nas sementes de Goji berry, a qual o maior TMG foi obtido na temperatura de 20°, sendo a menos indicada para o teste pois levaria mais tempo para a obtenção de mudas.

Em estudo realizado com sementes de jabuticabeira (*Myrciaria cauliflora* Berg), Dias et al. (2011) encontrou a maior germinação na temperatura de 30°C. Esta temperatura também proporcionou o maior valor para o índice de velocidade de emergência, discordando dos dados obtidos neste experimento.

Para Carvalho & Nakagawa (1988), existe um grande número de espécies que apresentam uma reação germinativa favorável sob temperaturas alternadas, à semelhança do que acontece ao natural em que as temperaturas diurnas são mais altas e as noturnas menores. Além disso, Filho et al. (2005), que o uso de temperaturas alternadas, geralmente, é recomendada para espécies que possuem dormência, mas também pode beneficiar outras espécies que não possuem esta característica.

Os dados obtidos neste experimento, visam auxiliar o produtor na obtenção de mudas de forma mais rápida e eficiente. A germinação uniforme permite a obtenção de plantas mais homogêneas no viveiro, facilitando o manejo do produtor de mudas.

Conclusões

A primeira contagem do teste de germinação para sementes de Goji berry, deve ser realizada no 3º dia após a instalação do teste e a última contagem deve ser feita no 6º dia e 10º dia para emergência.

A temperatura de 20-30°C é a mais indicada para o teste de germinação.

CAPÍTULO 2

Micropropagação fotoautotrófica na multiplicação *in vitro* de Goji Berry

Introdução

Muitas agências governamentais e internacionais começaram a implementar novos conceitos no esforço de proporcionar uma longa e saudável expectativa de vida para os cidadãos do mundo. Em particular o foco está sendo redirecionado de “curar doença” para “impedir as pessoas de ficarem doentes” e “manter a saúde e o bem-estar” chamando atenção para estilos de vida mais saudáveis, alimentos saudáveis e suplementos benéficos (PROTTI et al., 2017).

A Goji Berry (*Lycium barbarum* L.) é uma frutífera que despertou interesse por apresentar benefícios associados ao seu consumo a exemplo de controle dos níveis de colesterol e pressão arterial, melhorar o sistema imunológico, regular os níveis de glicose no sangue e equilíbrio hormonal, auxílio na redução do peso, redução do processo de envelhecimento (KULCZYNSKI et al., 2016) e efeito anticancerígeno (WAWRUSZAK et al., 2016).

Os frutos de Goji berry atualmente são comercializados em nichos de supermercados e lojas especializadas em produtos orgânicos ou similares. Os frutos desta frutífera são caracterizados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) como sendo um novo alimento ou novo ingrediente e através do Informe Técnico n.66, 01 de junho de 2015 orienta os consumidores sobre a segurança no consumo dos frutos desta espécie. No entanto, apesar de haver um mercado consumidor, não há registro de plantio comercial desta frutífera no Brasil, sendo esta importada de outros países, alcançando alto valor comercial para os consumidores.

Na propagação de espécies frutíferas, podemos obter plantas via sexuada, através da utilização de sementes ou assexuada, através de técnicas de propagação como estaquia, enxertia, alporquia, mergulhia e micropropagação.

A micropropagação é a técnica que permite o crescimento e a multiplicação de células, tecidos, órgãos ou partes de órgãos de uma planta (explante) sobre um meio nutritivo, com condições assépticas e ambiente controlado (luz e temperatura).

Essa técnica se baseia no aproveitamento da totipotência das células vegetais, ou seja, na capacidade de produzir órgãos, como brotos e/ou raízes (organogênese) ou embriões somáticos que regeneram uma planta completa (embriogênese somática) num meio de cultivo favorável (CARVALHO, 1999).

Os meios nutritivos utilizados para a cultura de células, tecidos e órgãos de plantas fornecem as substâncias essenciais para o crescimento dos tecidos e controlam, em grande parte, o padrão de desenvolvimentos *in vitro*. Para tanto, os meios nutritivos se baseiam nas exigências das plantas quanto aos nutrientes minerais. Complementando as substâncias biossintetizadas pelas células, vários compostos orgânicos são adicionados para suprirem as necessidades metabólicas, energéticas e estruturais das células (CALDAS et al., 1998). Incluem fontes de macro e micronutrientes, sacarose, vitaminas, reguladores de crescimento, agente solidificante, entre outros. Vários protocolos de meios de cultura foram criados, WPM (Lloyd GB & McCown BH, 1980), B5 (GAMBORG, et al., 1968), MS (Murashige & Skoog, 1962). Vários meios básicos têm sido utilizados na multiplicação de plantas, sendo o meio MS o mais empregado (Chaves, et al. 2005).

Dentre os componentes básicos para o meio de cultura, a sacarose exerce importante função na cultura de tecidos. Esta é a fonte mais comum de carboidratos utilizados no cultivo *in vitro*. Sua função é fornecer energia metabólica e esqueletos carbônicos para a biossíntese de aminoácidos e proteínas, polissacarídeos estruturais como a celulose, enfim, todos os compostos orgânicos necessários para o crescimento das células (CALDAS et al., 1998). No entanto, Yamada & Sato, (1978), relatam que a sacarose, mesmo sendo essencial ao crescimento das culturas *in vitro*, em excesso pode se tornar prejudicial, pois inibe a síntese de clorofila, reduzindo a capacidade fotossintética das culturas. Concentrações elevadas de sacarose podem facilitar a proliferação de fungos e bactérias, e com isso aumentar a contaminação *in vitro* afetando drasticamente o crescimento e desenvolvimento dos explantes (KOZAI, 1991).

As etapas do cultivo *in vitro* são constituídas pela fase de estabelecimento da cultura *in vitro*, multiplicação, enraizamento e aclimação. O crescimento e a morfogênese *in vitro* são fatores regulados pela interação e o balanço dos reguladores de crescimento no meio de cultura (GEORGE & SHERRINGTON, 1984).

Na fase de multiplicação, o uso de hormônios do grupo das citocininas é comumente utilizado para promover a indução de brotos adventícios a partir de calos ou para induzir multibrotação a partir de gemas axilares ou apicais. As citocininas atuam na inibição da dominância apical, em contrapartida, pode inibir a formação de raízes (SRISKANDARAJAH et al., 1982; CID, 2010). As concentrações deste hormônio podem variar bastante em função da espécie e do tipo de explante. Meios de cultura que contem entre 0,05 a 1,0 mg.l⁻¹ de BAP (6-benzilaminopurina) têm sido utilizados com bons resultados para o cultivo de ápices caulinares de várias espécies herbáceas e lenhosas (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). Chaves et al., (2005), ao estudar o efeito da citocinina BAP na multiplicação *in vitro* de *Physalis peruviana* observou o maior número de brotações na concentração de 0,3 mg.l⁻¹ do hormônio. No entanto Rogalski, et al, (2003) observou que o maior número de brotos foi obtido na concentração de 0,2 mg.l⁻¹.

O fenômeno de vitrificação ou hiperidricidade não está claramente definida, sendo descrita como uma desordem morfológica e fisiológica das plantas cultivadas *in vitro* resultando em perda de sua capacidade de crescer normalmente, causando problemas na aclimação (Paques and Boxus, 1987). A vitrificação é consequência da resposta da planta ao estresse dos explantes ao serem introduzidos no ambiente *in vitro*. São assim chamados por apresentarem aparência vítrea. Seus caules e folhas são frequentemente grossos, rígidos e facilmente quebráveis. Muitos relatos foram verificados acerca da acumulação excessiva de etileno na fase posterior da cultura *in vitro* pode ser um dos principais indutores da vitrificação (PARK et al., 2004). O uso de sistemas que permitam a troca dos gases do interior do frasco com o meio externo, podem diminuir a concentração deste hormônio no interior do frasco.

Diante do exposto, objetivou-se com o presente trabalho, avaliar a multiplicação *in vitro* de Goji berry (*Lycium barbarum* L.) em meio de cultura contendo distintas concentrações de sacarose e sob diferentes formas de vedações do frasco.

Materiais e Métodos

O trabalho foi desenvolvido no período de outubro de 2015 a julho de 2016, no Laboratório de Propagação de Plantas Frutíferas do departamento de Fitotecnia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel (FAEM), pertencente à Universidade Federal de Pelotas (UFPEl), Capão do Leão - Rio Grande do Sul.

Foram utilizados segmentos nodais de goji berry com 3 meses de idade, de 2 a 3 cm de comprimento, contendo dias gemas. Os explantes são oriundos do estabelecimento *in vitro* de semente. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema bifatorial, com quatro repetições, constituídas cada uma, por cinco explantes. O fator de tratamento A testou diferentes tipos de vedação (algodão, alumínio e Parafilm® e o B concentrações de sacarose (0, 15, 30 e 45 g L⁻¹).

O meio de cultura utilizado foi o meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) acrescido das quatro concentrações de sacarose, 100 mg de mio-inositol e 0,2 mg L⁻¹ do fitoregulador BAP (6-benzilaminopurina). O pH foi ajustado para 5,8 e sequencialmente foi adicionado o ágar na concentração de 6 g L⁻¹. Os meios de cultura foram distribuídos em frascos de vidro com capacidade para 300mL, contendo 40mL de meio de cultura por frasco. Os frascos, contendo o meio de cultura, foram autoclavados por 20min na temperatura de 121°C e 1atm de pressão.

Os explantes foram inoculados nos frascos em câmara de fluxo laminar e os frascos foram vedados com alumínio, algodão ou filme de polivinilcloro transparente. Após, os frascos foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16horas, temperatura de 25 +- 2°C e densidade de fluxo de fótons do período de luz de 27 µmol m⁻² s⁻¹.

Aos 60 dias de cultivo, avaliou-se: a porcentagem de sobrevivência, número de brotações; comprimento da maior brotação (cm), número de folhas; percentual de vitrificação e matéria fresca e seca de explantes (g).

Para obter os dados de porcentagem de sobrevivência foram realizadas contagens do número de explantes sobreviventes e os valores foram transformados em porcentagem. Da mesma forma, foi contabilizado o número de explantes que apresentavam o sintoma de vitrificação. O número de brotações foi obtido por

contagem dos brotos com auxílio de pinças, logo após foi verificado o comprimento da maior brotação com auxílio de uma régua graduada. Para obter os dados de matéria fresca, os explantes de cada frasco foram pesados em balança de precisão, logo após, foram armazenados em sacos de papel e colocados em estufa elétrica com temperatura constante de 60°C por 48 horas para obter os valores de matéria seca.

Os dados foram analisados quanto a normalidade pelo teste de Shapiro Wilk; à homocedasticidade pelo teste de Hartley; e, a independência dos resíduos por análise gráfica. Posteriormente, os dados foram submetidos à análise de variância através do teste F ($p \leq 0,05$). Constatando-se significância estatística, os efeitos das vedações foram comparados pelo teste de Waller-Duncan ($p \leq 0,05$) e concentrações por modelos de regressão ($p \leq 0,05$): $y = y_0 + ax$; $y = y_0 + ax + bx^2$, onde: y = variável resposta; y_0 = variável resposta correspondente ao ponto mínimo da curva; a = valor máximo estimado para a variável resposta; b = declividade da curva; x = concentração de sacarose.

A seleção do modelo foi baseada no baixo resíduo; baixo p -valor; e alto R^2 e R^2 adj. Quando não ocorreu ajuste de equação, os níveis da concentração de sacarose (g L^{-1}) foram comparados com intervalos de confiança a 95%, esses intervalos foram plotados no gráfico e as diferenças foram consideradas significativas quando não houve sobreposição entre as barras verticais. A presença de correlações entre as variáveis dependentes foram analisadas através do coeficiente de correlação de Pearson (r).

Resultados e Discussão

Para todas as variáveis ocorreu interação entre os fatores de tratamento testados (Tabela 1 e Figuras 1 e 2). Para o percentual de sobrevivência foram verificadas diferenças significativas na vedação de algodão em relação a alumínio e Parafilm® na concentração de 45 g L^{-1} de sacarose (Tabela 1). Os dados de sobrevivência ajustaram-se adequadamente ao modelo de regressão polinomial quadrático para algodão ($F = 6,8177, p = 0,0119$) e Parafilm® ($F = 3,9236, p = 0,0517$). Para a vedação a base de alumínio não foi possível ajustar modelo de regressão (Figura 1 A). Observaram-se acréscimos nos valores de sobrevivência de 8 e 6,5% para a vedação de algodão e Parafilm® respectivamente, de 15 para

0 g L⁻¹ de sacarose. Entretanto, foram verificados decréscimos na sobrevivência de 7 e 45% para 30 e 45 g L⁻¹ de sacarose, respectivamente, quando comparados ao controle (0 g L⁻¹) na vedação com algodão. Para essas mesmas comparações na vedação com Parafilm, os decréscimos foram de 45,6 e 36%.

Tabela 2 - Sobrevivência (%), número de brotações, comprimento de brotações (cm), número de folhas, vitrificação (%), massa de matéria fresca e seca (g) de goji berry em função de diferentes vedação e concentrações de sacarose. UFPel/RS, 2016.

Tipo de Vedação	Concentração de sacarose (g L ⁻¹)			
	0	15	30	45
Sobrevivência (%)				
Algodão	100,00±0,00 a ^{1/}	100,00±0,00 a	100,00±0,00 a	53,33±24,04 b
Alumínio	95,00±5,00 a	100,00±0,00 a	100,00±0,00 a	100,00±0,00 a
Parafilm	100,00±0,00 a	95,00±5,00 a	100,00±0,00 a	60,00±23,09 a
Número de brotações				
Algodão	1,40±0,14 a	0,87±0,07 b	2,27±0,55 a	1,73±0,27 ab
Alumínio	1,15±0,10 a	1,33±0,12 ab	0,40±0,11 b	0,93±0,18 b
Parafilm	1,15±0,10 a	1,65±0,21 a	1,27±0,40 ab	2,20±0,42 a
Comprimento da maior brotação (cm)				
Algodão	0,95±0,16 a	0,45±0,08 c	1,31±0,20 a	1,00±0,26 a
Alumínio	0,92±0,13 a	0,88±0,05 b	0,35±0,12 b	0,51±0,12 a
Parafilm	0,84±0,21 a	1,31±0,16 a	0,77±0,22 ab	1,62±0,49 a
Número de folhas				
Algodão	10,90±3,72 a	4,53±1,40 a	16,33±4,60 a	9,00±2,89 b
Alumínio	6,32±1,69 a	9,80±2,04 a	2,85±0,94 b	4,87±1,65 b
Parafilm	4,35±1,26 a	5,58±1,42 a	4,40±2,11 b	18,62±2,56 a
Vitrificação (%)				
Algodão	70,00±5,77 a	30,00±17,32 b	46,67±29,06 a	0,00±0,00 a
Alumínio	75,00±15,00 a	80,00±11,55 a	10,00±5,77 b	0,00±0,00 a
Parafilm	93,33±6,67 a	100,00±0,00 a	70,00±19,15 a	0,00±0,00 a
Matéria fresca (g)				
Algodão	1,20±0,18 a	1,40±0,28 a	1,28±0,35 a	0,45±0,17 a
Alumínio	0,70±0,09 b	2,26±0,59 a	0,74±0,07 a	0,87±0,49 a
Parafilm	0,52±0,14 b	2,16±0,15 a	1,47±0,31 a	1,39±0,43 a
Matéria seca (g)				
Algodão	0,04±0,007 a	0,10±0,02 a	0,16±0,032 a	0,07±0,02 a
Alumínio	0,02±0,001 b	0,21±0,04 a	0,09±0,006 b	0,12±0,07 a
Parafilm	0,008±0,002 b	0,16±0,02 a	0,10±0,009 b	0,19±0,05 a

^{1/} Médias (± erro padrão) acompanhadas por mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Waller-Duncan (p≤0,05) comparando as vedações em cada concentração de sacarose.

As plantas cultivadas em meio asséptico podem ser agrupadas em duas classes: plantas cujas folhas formadas não desenvolvem capacidade fotossintética,

se crescerem em meio contendo sacarose (heterotróficas ou mixotróficas), e plantas adaptadas a condições autotróficas *in vitro*, ou seja, apesar das condições artificiais de cultivo, podem apresentar significativas taxa fotossintética (GROUT, 1988) Neste experimento, observa-se que as plântulas apresentaram maior porcentagem de sobrevivência no meio de cultura sem sacarose, indicando possuir capacidade autotrófica, ou seja, as condições foram eficientes para a realização de fotossíntese.

Para a variável número de brotações (TABELA 2), não houveram diferenças significativas entre os tipos de vedação utilizados, para a concentração de 0g L⁻¹. Para a concentração de 15g L⁻¹, a vedação de Parafilm® proporcionou maior número de brotações. A maior média para a variável, foi verificada na concentração de 30g L⁻¹, utilizando algodão como vedação dos frascos, não diferindo estatisticamente do Parafilm® (Tabela 1) e não foi possível ajustar modelo de regressão para todos os tipos de vedação utilizados (Figura 1 B). Na concentração de 45 g L⁻¹, a vedação do tipo Parafilm® proporcionou o maior resultado para o número de brotações, porém não diferiu estatisticamente do algodão. Com relação as concentrações, para a vedação do tipo algodão, o uso de sacarose no meio de cultura não apresentou aumento no número de brotações, visto que a concentração de 0 g L⁻¹ não diferiu das demais concentrações. Houve diferença apenas para a concentração de 15 g L⁻¹ em relação a 30 g L⁻¹, em que a adição de sacarose proporcionou aumento no número de brotações. Na vedação do tipo alumínio, o número de brotações não diferiu entre as concentrações de sacarose no meio.

De acordo com Rodrigues et al. (2006) a sacarose em altas concentrações pode inibir a síntese de clorofila e ainda prejudicar a atividade da enzima fixadora de carbono (Rubisco Pcpase), nas folhas de certas espécies cultivadas *in vitro*. Entretanto para o Parafilm®, foi verificado aumento no número de brotações na concentração de 45 g L⁻¹, diferindo estatisticamente das concentrações de 0 g.L⁻¹ e 30 g.L⁻¹.

O uso de diferentes sistemas de vedação dos frascos pode ser efetivo na micropropagação fotoautotrófica, pois interferem no microambiente no interior do frasco, modificando a concentração de CO₂, etileno e umidade relativa, possibilitando melhores condições para o desenvolvimento da cultura *in vitro* (KOZAI e KUBOTA, 2001).

A utilização do algodão como vedação proporciona maior aeração no interior do frasco e por consequência maior troca gasosa entre o ambiente interno e o ar

atmosférico, diminuindo a umidade relativa no interior dos frascos, melhorando a transpiração da planta e o seu desenvolvimento. Por outro lado, vedações herméticas aumentam o acúmulo de etileno no interior do frasco, que podem desfavorecer o desenvolvimento da cultura *in vitro* (RIBEIRO et al., 2007).

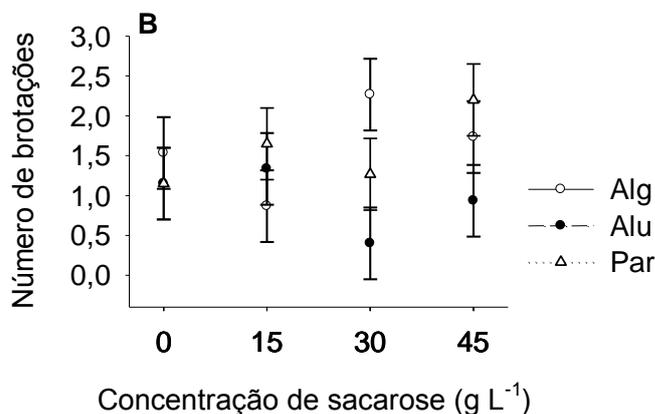
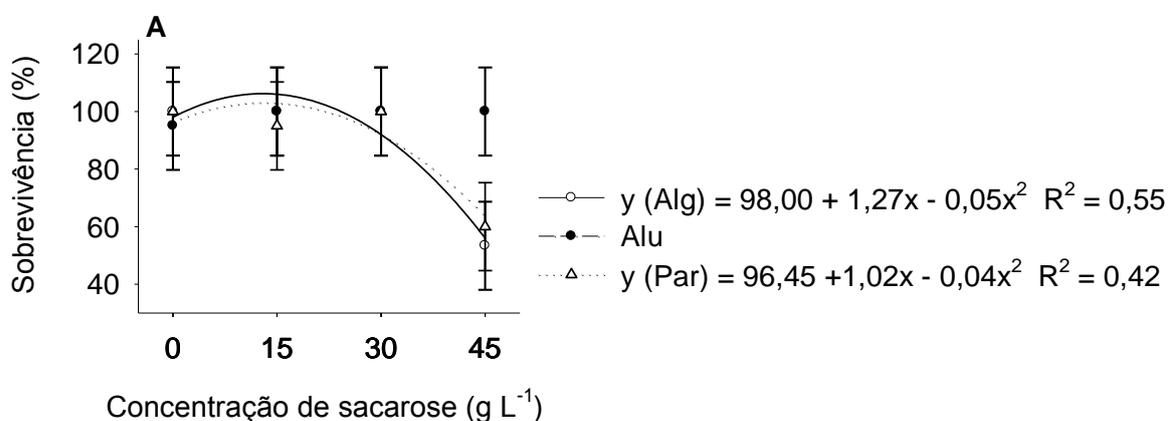
Para a variável comprimento da maior brotação, as maiores médias foram verificadas na concentração de 45 g L⁻¹ de sacarose, utilizando o Parafilm® como material para vedação, todavia não diferiram estatisticamente dos outros materiais (Tabela 2). Na concentração de 0 g L⁻¹ não houve diferença entre os tipos de vedação utilizados. Para a concentração de 15 g L⁻¹, o Parafilm® proporcionou as maiores médias para a variável comprimento da maior brotação. Na concentração de 30 g L⁻¹, o algodão apresentou a maior média, porém não diferiu estatisticamente da vedação de Parafilm®. Somente ocorreu ajuste de modelo de regressão polinomial quadrático para o alumínio (F= 4,7862, p= 0,0320). Para as vedações de algodão e Parafilm® não foi possível ajustar modelo de regressão (Figura 1 C). Ao utilizar o algodão como vedação dos frascos, os maiores valores para o comprimento de brotação foram obtidos na concentração de 30 g L⁻¹ de sacarose, diferindo da concentração de 15 g L⁻¹. Para as vedações de alumínio e Parafilm® não se observaram diferenças entre as concentrações de sacarose. O menor desenvolvimento das plantas utilizando o algodão como vedação, pode ser atribuído a perda de água no meio por evaporação sob condições de baixa umidade restringindo a disponibilidade de água e nutrientes do meio de cultura (DEBERGH et al., 1981).

Ao realizar experimento semelhante com *Thymus vulgaris*, Bandeira et al, (2007) verificou a maior altura média de plantas utilizando 30g L⁻¹ de sacarose em frascos vedados com algodão. Resultado semelhante também foi obtido por Ribeiro et al, (2007) ao estudar diferentes concentrações de sacarose em *Melissa officinalis*.

Para a variável número de folhas, a concentração de 45 g.L⁻¹ de sacarose ao utilizar o Parafilm® para vedação obteve a maior média, sendo superior aos outros aos outros materiais. Para a concentração de 30 g L⁻¹, o maior número de folhas foi verificado ao utilizar o algodão diferindo das demais vedações (Tabela 1). Na concentração de 0 g L⁻¹ e 15 g L⁻¹, não houveram diferenças significativas entre os tipos de vedação. Para a concentração de 30 g L⁻¹, a vedação do tipo algodão proporcionou as maiores médias para a variável número de folhas.

Os dados de número de folhas ajustaram-se adequadamente ao modelo de regressão polinomial quadrático para o Parafilm® ($F = 13,7650$, $p = 0,0013$), entretanto para o algodão e o alumínio não foi possível ajustar modelo de regressão. Observou-se acréscimo no número de folhas de 80,5% ao comparar a concentração de 45 com o controle (0 g L⁻¹) para a vedação de Parafilm®. Para o algodão, a concentração de 30 g L⁻¹, mostrou-se superior a concentração de 15 g L⁻¹ e não diferiu das demais concentrações. Não houve diferenças entre as concentrações de sacarose no meio para o alumínio (Figura 1 D).

Os autores Wainwright e Scrace (1989) sugerem que o nível de sacarose deve ser mantido ou até mesmo aumentado, visando melhorar a qualidade da planta. As altas concentrações de sacarose aumentariam as reservas de carboidratos armazenadas pelas folhas, aumentando assim a energia disponível para as plântulas. Damiani & Schuch (2008) em experimento semelhante com mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade), verificaram as maiores médias em frascos vedados com filme plástico. Estes resultados diferem dos encontrados por Ribeiro et al., (2007) em pesquisa realizada com *Melissa officinalis* L., onde verificou o maior número de folhas na concentração de 30 g L⁻¹.



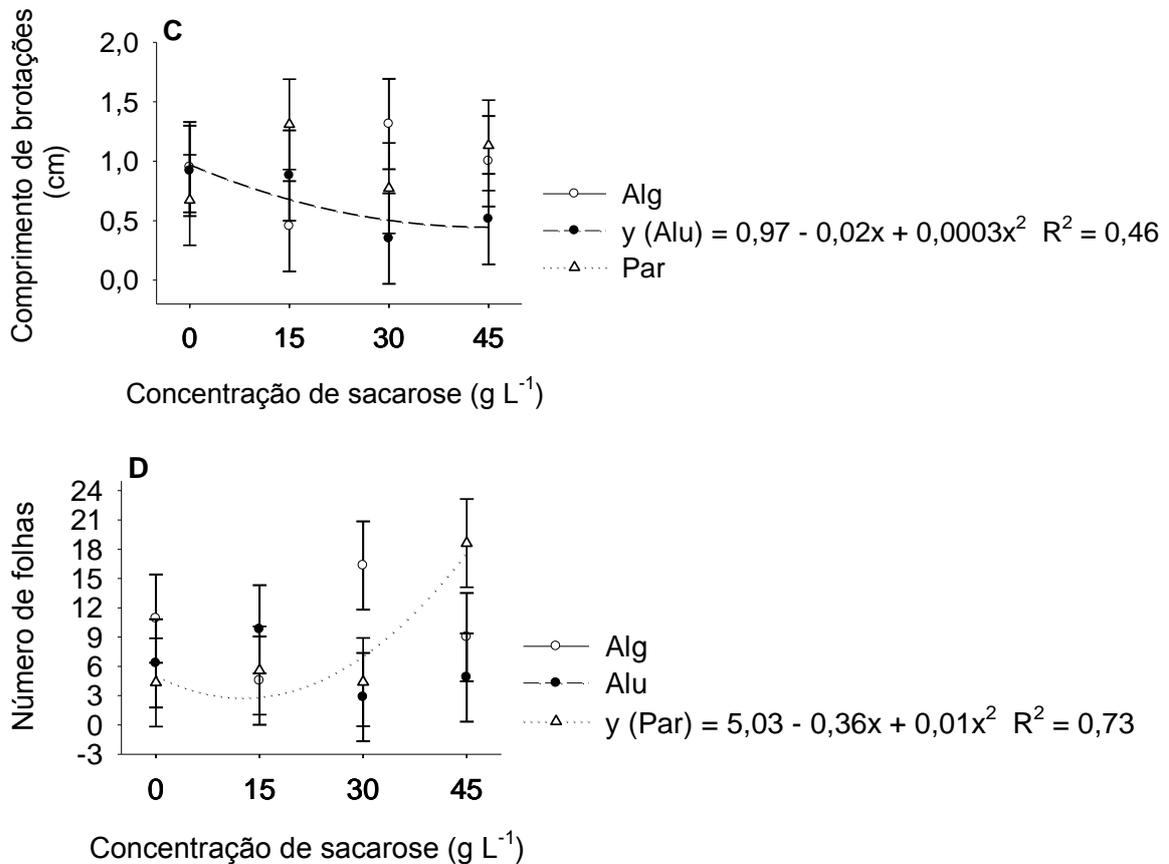


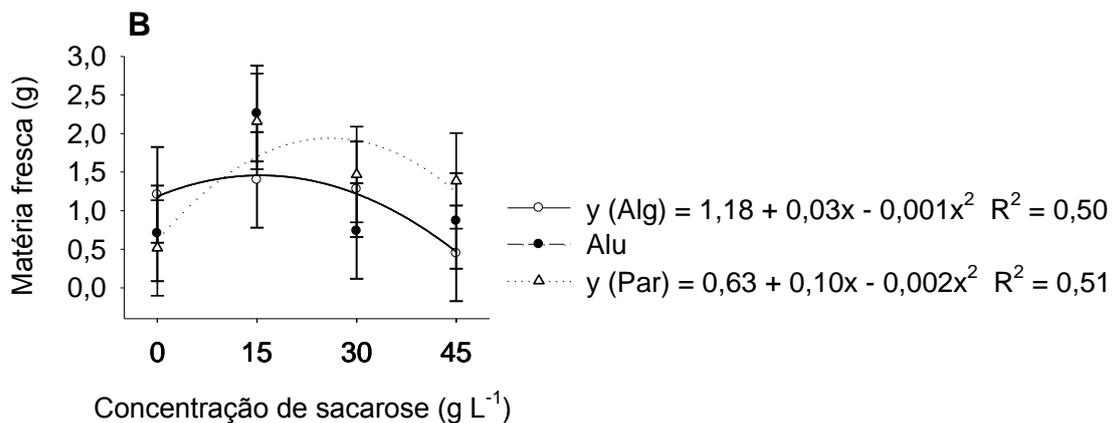
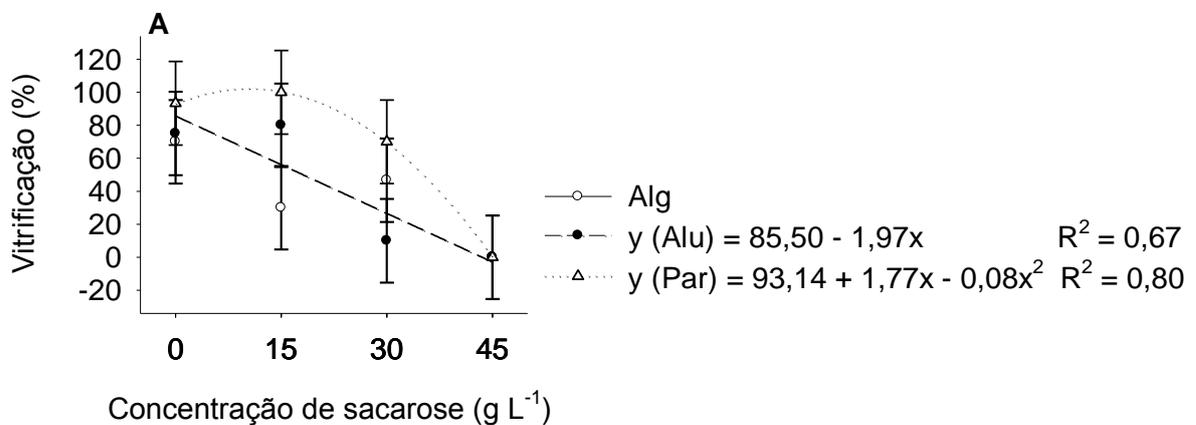
Figura 5 - Sobrevivência (%) (A), número de brotações (B), comprimento da maior brotação (cm) (C), número de folhas (D) de Goji berry em função das vedações com algodão (Alg), alumínio (Alu) e Parafilm (Par) e diferentes concentrações de sacarose. UFPel/RS, 2016. (As barras verticais representam os intervalos de confiança a 95%).

A vitrificação foi um fenômeno observado na maior parte dos métodos de vedação, com exceção da concentração de 45 g L⁻¹. Ao analisar a porcentagem de sobrevivência na Tabela 2, podemos verificar que esta concentração obteve as menores médias para esta variável. Logo um menor número de explantes sobreviventes restaram e assim, o sintoma de vitrificação não foi observado nesta concentração. Provavelmente seja provocado por outro fator. Os dados de percentual de vitrificação ajustaram-se adequadamente ao modelo de regressão linear para vedação com alumínio ($F = 28,4329$, $p = 0,0001$) e polinomial quadrático para Parafilm ($F = 20,1767$, $p = 0,0003$). Para a vedação com algodão não foi possível ajustar modelo de regressão (Figura 2A).

Observaram-se decréscimos do sintoma na ordem de 69 e 103% nas concentrações de 30 e 45 g L⁻¹ respectivamente, quando comparados ao controle (0

g L^{-1}) para o alumínio. O menor valor foi observado na dose de 45 g L^{-1} que diferiu das concentrações de 0 g L^{-1} e 15 g L^{-1} . Em relação ao Parafilm, verificou-se um decréscimo de 88,4% na concentração de 45 g L^{-1} quando comparado ao controle. Para o algodão, a concentração de 45 g L^{-1} obteve o menor percentual de vitrificação, diferindo do controle.

A utilização de vedações mais porosas, que facilitem as trocas gasosas com o ambiente externo do frasco, diminui a concentração de gases como CO_2 , etileno e a umidade relativa. Estes compostos em alta concentração podem induzir anomalias aos explantes.



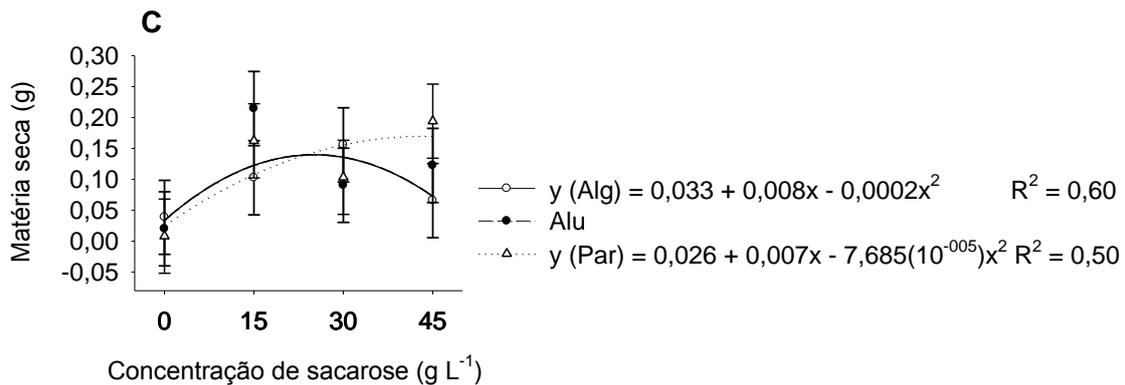


Figura 6 - Vitificação (%) (A), matéria fresca (B) e seca (C) de Goji Berry em função das vedações com algodão (Alg), alumínio (Alu) e Parafilm (Par) e diferentes concentrações de sacarose. UFPel/RS, 2016. (As barras verticais representam os intervalos de confiança a 95%).

Os maiores valores obtidos para a variável massa de matéria fresca foram verificados ao utilizar o alumínio como vedação dos frascos e o meio contendo 15 g L⁻¹ de sacarose, entretanto não diferiu dos demais tipos de vedação para esta dose. O algodão foi superior as demais vedações na concentração de 0 g L⁻¹, diferindo dos outros materiais (Tabela 2). Para as demais concentrações de sacarose não houveram diferenças significativas entre os tipos de vedações.

Os dados de matéria fresca ajustaram-se adequadamente ao modelo de regressão polinomial quadrático para a vedação com algodão ($F = 4,5728, p = 0,0426$) e Parafilm® ($F = 5,1466, p = 0,0291$). Para a vedação com alumínio não foi possível ajustar modelo de regressão (Figura 2B).

Observou-se decréscimo nos valores de massa de matéria fresca na concentração de 45 g L⁻¹ quando comparado ao controle para o algodão. Em relação ao Parafilm®, o maior valor de massa fresca foi verificado na concentração de 15 g L⁻¹, que proporcionou acréscimo de mais de 150% em relação ao controle. Para o alumínio, foi verificado aumento da massa fresca na concentração de 15 g L⁻¹, diferindo das demais concentrações. Para todas as vedações, o acréscimo de sacarose foi prejudicial ao aumento da matéria fresca. De acordo com Souza et al. (1999), o tipo de vedação dos frascos, além de interferir na passagem de luz para o interior dos frascos, altera a interceptação de luz pelos explantes, sua capacidade de transpiração e, devido a retenção de água, a quantidade de matéria fresca.

Para massa de matéria seca, foram verificados maiores valores ao utilizar o alumínio como vedação, todavia não diferiu estatisticamente dos outros materiais na concentração de 15 g L⁻¹. O algodão apresentou o maior valor para matéria seca ao utilizar 0 e 30 g L⁻¹ de sacarose, diferindo estatisticamente das demais vedações, que demonstra menor acúmulo de água nos tecidos e formação de estruturas mais complexas (Tabela 2). Para as concentrações de 15 g L⁻¹ e 45 g L⁻¹, os tipos de vedação não se diferiram estatisticamente.

Os dados de matéria seca ajustaram-se adequadamente ao modelo de regressão polinomial quadrático para vedações com algodão ($F = 7,3216, p = 0,0110$) e Parafilm® ($F = 5,8586, p = 0,0168$). Para a vedação com alumínio não foi possível ajustar modelo de regressão (Figura 2C). Observou-se acréscimo de 182% da matéria seca na concentração de 30 g L⁻¹ em relação ao controle, ao utilizar o algodão como material de vedação. Para o Parafilm®, verificou-se incremento de matéria seca dos explantes na concentração de 45 g L⁻¹ em relação ao controle. Para o alumínio, a concentração de 15 g L⁻¹ foi superior ao controle e a concentração de 30 g L⁻¹, porém não diferiu da dose de 45 g L⁻¹.

Estes resultados estão de acordo com Calvete et al. (2002), onde obteve maiores valores de matéria fresca nas maiores concentrações de sacarose. De acordo com o mesmo, na ausência de sacarose, a planta não acumulou energia e por isso não teve capacidade de realizar atividade metabólica. Para o autor, um maior conteúdo de sacarose no meio de cultivo corresponde a maior concentração de carboidratos (ou de reservas) no tecido foliar. Em consequência, as folhas têm capacidade de permanecer mais tempo na planta.

As correlações verificadas de forma geral para todo o experimento entre as variáveis dependentes foram positivas e negativas (Tabela 3). O maior coeficiente de correlação positivo ocorreu entre número e comprimento de brotações ($r = 0,77, p < 0,0001$), evidenciando que o incremento no número de brotações acarretou em aumento, conseqüentemente, no comprimento de brotações. Esse mesmo comportamento foi verificado de número de brotações com número de folhas ($r = 0,76, p < 0,0001$). Outras correlações positivas ocorreram de comprimento de brotações com número de folhas ($r = 0,68, p < 0,0001$) e entre matéria fresca e seca ($r = 0,77, p < 0,0001$).

Tabela 3 - Coeficientes de correlação de Pearson e valores de ρ entre as variáveis dependentes. UFPel/RS, 2016.

Variáveis	Sobrevivência	Número de brotações	Comprimento de brotações	Número de folhas	Vitrificação	Massa de matéria fresca	Massa de matéria seca
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)
(1)	1,000	-0,493*	-0,517	-0,326	0,365	0,270	0,105
		0,001**	0,0006	0,043	0,017	0,100	0,506
(2)		1,000	0,770	0,759	-0,026	0,137	0,198
			<0,0001	<0,0001	0,874	0,410	0,209
(3)			1,000	0,682	0,094	0,139	0,160
				<0,0001	0,572	0,413	0,316
(4)				1,000	-0,204	0,256	0,347
					0,227	0,132	0,028
(5)					1,000	0,258	-0,007
						0,129	0,963
(6)						1,000	0,772
							<0,0001
(7)							1,000

Ao utilizar materiais alternativos para a vedação dos frascos, que permitam trocas gasosas com o meio externo e maior intercepção de luz pelos explantes, foi verificado um maior desenvolvimento destes, proporcionando correlação positiva entre o número de brotações e comprimento das mesmas e também, do aumento do número de brotações com o aumento no número de folhas. Estes resultados estão relacionados com a menor concentração de etileno e CO_2 no interior do frasco. Em altas concentrações, como ocorre em recipientes fechados hermeticamente, estes gases podem causar distúrbios fisiológicos e inviabilizar a obtenção de mudas de qualidade. O tipo de vedação do frasco, além de interferir na passagem de luz para o interior do frasco, altera a intercepção de luz pelos explantes, sua capacidade de transpiração e, devido à retenção de água e a quantidade de massa fresca (SOUZA et al., 1999).

Conclusão

De maneira geral, observou-se que a vedação dos frascos com algodão e adição de 30 g L⁻¹ de sacarose proporcionou o maior número de brotações, maior número de folhas e de matéria seca.

Na ausência de sacarose no meio de cultura, a vedação de algodão permitiu a obtenção de maior matéria fresca e matéria seca.

Considerações finais

Muitos estudos são realizados acerca das propriedades nutraceuticas dos frutos de Goji Berry, evidenciando os benefícios associados ao seu consumo. No entanto, as pesquisas avançam pouco quanto aos métodos de obtenção de mudas desta espécie. Logo, trabalhos realizados com esse tema irão agregar informações quanto aos aspectos sobre a propagação desta espécie contribuindo com a formação de mudas de qualidade.

Os dados obtidos no estudo do capítulo 1 permitem otimizar a produção de mudas, por meio da propagação sexual, contribuindo com dados de temperatura e número de dias para realizar a primeira e última contagem. Os resultados permitem obter uma germinação mais uniforme e eficiente, facilitando o manejo do produtor de mudas.

Os dados do capítulo 2, contribuem para a obtenção de mudas micropropagadas. Os resultados demonstram que a redução da concentração de sacarose é prejudicial para o desenvolvimento dos explantes, sendo a concentração de 30 g L⁻¹ a mais indicada. A vedação do tipo algodão permitiu maior troca de gases com o ambiente externo e proporcionou um bom desenvolvimento dos explantes.

Algumas dificuldades foram encontradas ao longo da execução deste trabalho. Por ser uma frutífera pouco conhecida no Ocidente, há pouca informação na literatura e trabalhos científicos de cunho agrônomo. Muitos trabalhos são de origem chinesa e relacionados as propriedades nutraceuticas. Para iniciar o trabalho, foi realizada uma revisão bibliográfica dentro da família Solanaceae buscando a faixa de temperatura mais adequada para a execução do teste de germinação no primeiro capítulo e a concentração de fitorregulador para multiplicação no segundo capítulo.

Outra grande dificuldade foi adquirir material para iniciar o trabalho. Em outro experimento as sementes foram adquiridas de um estabelecimento comercial e eram de qualidade inferior. Ao iniciar o teste, muitas sementes não germinaram e foi necessário refazer o experimento. Para o cultivo *in vitro*, apesar de realizar o

protocolo de desinfestação, houve contaminação por fungos. Muitas vezes a contaminação se manifestava de 30-60 dias após a instalação do experimento. Muitos explantes foram perdidos em virtude da alta contaminação. Outra grande dificuldade foi montar o segundo experimento, pois no momento de retirar os explantes do tubo de ensaio os mesmos sofriam desidratação. A pinça causava lesões nos mesmos, por serem muito tenros e frágeis.

Mais estudos poderiam ser realizados para auxiliar os produtores na implantação comercial desta cultura no Brasil. O próximo passo seria testar os diferentes substratos para a germinação mais eficiente de sementes, o espaçamento mais adequado para as mudas, métodos de condução.

Os estudos relacionados à espécie *Lycium barbarum* L. foram os primeiros realizados no Brasil e servirão de embasamento para as futuras investigações que contribuirão para a comunidade científica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, A. F. B. **Cultivo do feijão da primeira e segunda safras na Região Sul de Minas Gerais**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2005. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/FeijaoPrimSegSafrSulMG/index.htm>>.
- AGAMASE, H.; FARNSWORTH, N.R. A review of botanical characteristics, phytochemistry, clinical relevance in efficacy and safety of *Lycium barbarum* fruit (Goji). **Food Research International**. V.44, p.1702–1717, 2011.
- AGAMASE, H.; SUN B.; BOREK, C. *Lycium barbarum* (goji) juice improves in vivo antioxidant biomarkers in sérum of healthyasults. **Nutr. Res.** 2009; 29: 19-25.
- ALVES, C. Z.; GODOY, A. R.; CORRÊA, L. S. Adequação da metodologia para o teste de germinação de sementes de pitaiá vermelha. **Ciência Rural**. Santa Maria, online, 2011.
- ALVES, C. Z.; SILVA, J. B.; CÂNDIDO, A. C. S. Metodologia para condução do teste de germinação em sementes de goiaba. **Revista Ciência Agronômica**, v.46, n.3, p. 615- 621, 2015.
- ALVES, E. U.; PAULA, R. C.; OLIVEIRA, A. P.; BRUNO, R. C. A.; DINIZ, A. A. Germinação de sementes de *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth. em diferentes substratos e temperaturas. **Revista Brasileira de Sementes**, vol.24, nº1, Londrina, 2002.
- ANUÁRIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA 2015. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta, 2015. 104p.
- ANUÁRIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA 2016. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta, 2016. 88p.
- Informe Técnico n.66, 01 de junho de 2015. **ANVISA**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/388729/Informe+T%C3%A9cnico+n%C2%BA+66%2C+01+de+junho+de+2015/43dbb7ac-d9ea-45ac-ac4f-af615b103d9d>.
- BAGATIM, A. G. **Temperatura e substrato na germinação de *Physalis angulata***. 2017, 19p. Dissertação Universidade Estadual Paulista- UNESP.
- BANDEIRA, J. M.; LIMA, C. S. M.; RUBIN, S.; RIBEIRO, M. V.; FALQUETO, A. R.; PETERS, J. A; BRAGA, E. J. B. Diferentes tipos de vedações e concentrações de sacarose na micropropagação de *Thymus vulgaris* L. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.5, p. 472- 474, 2007.
- BEWLEY, J. D.& BLACK, M. **Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination**. V.1. Berlim, Heidelberg; New York, Springer- Verlage, 1983. 306p.
- BEWLEY, J. D.& BLACK, M. **Seeds: Physiology of Developmentand Germination**. 2nd ed., New York, Plenum Press, 1994. 445p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para Análises de Sementes**. SNDA/DNDV/CLAV, 2009. 148p.

BRANCALION, P. H. S.; NOVENBRE, A. D. L. C.; RODRIGUES, R. R. Temperatura ótima de germinação de espécies arbóreas brasileiras. **Revista Brasileira de Sementes**. V.32, nº4, p. 015- 021, 2010.

BUSTAMANTE, P. M. A. C. A fruticultura no Brasil e no Vale do São Francisco: Vantagens e Desafios. **Revista Econômica do Nordeste**. V. 40, nº1, p. 153- 171, 2009.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, O.; FERREIRA, M. E. Meios Nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília, DF. Embrapa- CNPH. 1998.

CALVETE, E. O.; KÄMPF, A. N.; SUZIN, M. Concentração de sacarose no enraizamento *in vitro* de morangueiro. **Horticultura Brasileira**, v.20, n.2, 2002.

CARVALHO, J. M. F. C. Técnicas de Micropropagação. **Embrapa**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 1999. 39p. (Embrapa-CNPA. Documentos, 64).

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4ª ed. Jaboticabal: FUNEP, 2000. 588p.

CHAVES, A. C.; SCHUCH, M. W.; ERIG, A. C. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Physalis peruviana* L. **Ciência e Agrotecnologia**. V.29, n.6, p. 1281- 1287, 2005.

CHENG, C. Y.; CHUNG, W. Y.; SZETO, Y. T.; BENZIE, I. F. F. Fasting plasma zeaxanthin response to *Fructus barbarum* L. (wolfberry; keiTze) in a food-based human supplementation trial. **British Journal of Nutrition**. V.93 p. 123- 130, 2005.

CID, L. P.B. Cultivo *in vitro* de plantas. **EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia**. Brasília, DF. 303p.

DAMIANI, C. R.; SCHUCH, M. W.; Multiplicação fotoautotrófica de mirtilo através do uso de luz natural. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal, SP.mV.30, n.2, p. 482-487, 2008.

DAMIANI, C. R.; SCHUCH, M. W.; SILVA, L. C.; ERIG, A. C. Micropropagação como técnica de rejuvenescimento em mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade) cultivar Climax. **Ciência e Agrotecnologia**, 2008, vol.32 nº3, Lavras.

DAUDT, C. E.; MUTTI, L. S. M.; KERSTEIN, E. Possibilidades de produção de *Vitis vinifera* em Uruguaiana e vizinhanças. **Ciência Rural**. V.3, p. 163- 163, 1973.

DHARMANDA, S. (2007, August). LYCIUM FRUIT. Portyland, Oregon: **Foodand Medicine**, Intitute for Tradicional Medicine. Disponível em: <http://www.itmonline.org/arts/lycium.htm>.

DIAS, M. A.; LOPES, J. C.; NETO, J. D. S.; HEBERLE, E. Influência da temperatura e substrato na germinação de sementes de jaboticabeira (*Myrciaria cauliflora* Berg.). **Idesia (Chile)**. V. 29, nº1, p. 23-27, 2011.

EDMON, J. B.; DRAPALA, W. J. The effects of temperature, sand and oil, and acetone on germination of okra seeds. **American Society for Horticultural Science Research**. Itahaca, v.71, p. 428- 434, 1958.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Micropropagação fotoautotrófica e uso da luz natural. *Ciência Rura*. V.35, p.961- 965, 2005.

FACHINELLO, J. C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J.C.; KERSTEN, E.; FORTES, G. R. DE L. Propagação de plantas frutíferas de clima temperado. 2ªed. Pelotas. **Universitária**, 1995. 178p.

FACHINELLO, J. C.; NACHTIGAL, J.; KERSTEN, E. **Fruticultura: fundamentos e práticas**. EMBRAPA Clima Temperado. Pelotas, 2008. 176p.

FACHINELLO, J. C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J. **Propagação de plantas frutíferas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica. Ed. 2005. P.141- 147.

FACHINELLO, J. C.; PASA, M. S., SCHMIZ, J. D.; BETEMPS, D. L. Situação e perspectiva da fruticultura de clima Temperado no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal, SP.2011p. 109- 120.

FILHO, W. B.; PEREIRA, A. M. S.; FRANÇA, S. C.; FURLAN, M. Indução de metabólitos bioativos em culturas de células de *Maytenusilicifolia*. **Eclética Química**, v. 27, São Paulo, 2002.

FILHO, M. J. **Fisiologia de Sementes e Plantas Cultivadas**. Piracicaba, FEALQ, 2005. 495p.

FRANZON, R. C.; CARPENETO, S.; SILVA, J. C. S. Documentos 283. Produção de mudas: principais técnicas utilizadas na propagação de fruteiras. **Embrapa Cerrados**. 1ª edição. Planaltina, DF, 2010.

FOSSATI, Luiz Cláudio. **Ecofisiologia da germinação das sementes em populações de *Ocoteapuberula* (Rich.) Ness, *Prunus sellowii* Koehne E *Piptocarpha angustifolia* Dusén Ex Malme**. 2007, p.10. Tese de Doutorado na Universidade Federal do Paraná.

GAN, LU.; ZHANG, S.H.; LIU, Q.; XU, H. B. A polysaccharide-protein complex from *Lycium barbarum* upregulates cytokine expression. In human peripheral blood mononuclear cells. **European Journal of Pharmacology**. P. 217- 222, 2003.

GAN, LU.;ZHANG, S. H.; YANG, X. L.; XU, H. B. Immunomodulation and antitumor activity by an polysaccharide-protein complex from *Lycium barbarum*. **International Immuno pharmacology**. Vol. 4, p. 563- 569, 2004.

GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P. D. **Plant propagation by tissue culture**. Eversley: Exegetics, 1984. 709p.

GEORGE, E. F. "Plant tissue culture procedure- background". In: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK. **Plant Propagation by Tissue Culture**. Vol. 1. Dordrecht, Netherlands: Springer. 3ª Ed . p. 1- 28, 2008.

GEORGE, E. F.; DEBERGH, P. C. "Micropropagation: uses and methods". In: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK. **Plant Propagation by Tissue Culture**. Vol. 1. Dordrecht, Netherlands: Springer. 3.Ed . p. 29-64, 2008.

GUIMARÃES, D. H P.; BOSCOLO, T. Determinação das propriedades reológicas da polpa de Framboesa Amarela (*Rubus Imperialis*) e Processamento da geleia a partir da mesma. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, Vol.15, nº 2, 2013.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Embrapa- CNPH. Brasília- DF, 1998, p. 183-260.

GROUT, B. W. W. Photosynthesis of regenerated plantlets“ in vitro” and the stresses of transplanting. **Acta Horticulturae**. V.230, p. 129- 134, 1988.

HARTMANN, H.T. **Plant propagation: principles and practices**. 7ªed. New Jersey. Prentice-Hall, 2002. 880p.

HUNZIKER, A. T. **Genera Solanacearum**. Ruggel: A.R.G. Gantner Verlag. 500p. Germany, 2001.

HUMMER, K. E. Gojiberry or Wolfberry.In: BADENES, M. L.; BYRNE, D. H. **Fruit Breeding**. Springer, Cap. 9, p. 130, 2012.

IBGE. Censo agropecuário 2014: lavoura permanente e temporária. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/estadosat/perfil.php?sigla=rs>. Acesso em 28 de agosto de 2016.

JACKSON, M. B.; ABBOTT, A. J.; BELCHER, A. R.; HALL, K. C.; BUTLER, R.; CAMERON, J. Ventilation in Plant Tissue Cultures and Effects os Poor Aeration on Ethylene and Carbon Dioxide accumulation, Oxygen depletion and explant development. **Annals of Botany**. V.67, p. 229 – 237, 1991.

JUSTO, C. F.; ALVARENGA, A. A.; NERY, F. C.; FILHO, N. D. Composição química, curva de embebição e efeito da temperatura sobre a germinação de sementes de *Eugenia pyriformis* Camb. (Mystaceae). **Revista Brasileira de Biociências**. Porto Alegre, v.5, p. 510-512, 2007.

KNAPP, S.; BOHS, L.; NEE, M.; SPOONER, D. M. Solanceae- a model for linking genomics with biodiversity. **Comparative and Functional Genomics**. V. 5, p. 285- 291.

KOZAI, T. Photoautotrophic Micropropagation. **In vitro Cellular and Developmental Biology**. V.27, p. 47- 51, 1991.

KOZAI, T.; KUBOTA, C. Developing a photoautotrophic micropropagation system for woody plants. **Journal of Plant Research**. V.114, p. 525- 537, 2001.

KULCZYNSKI, B.; MICHATOWSKA, A. G. Goji Berry (*Lycium barbarum*): Composition and Health Effects – a Review. **Polish Journal os Food and Nutritional Research Sciences**. V.66, p. 67- 75, 2016.

LAZZAROTTO, J. J.; FIORAVANÇO, J. C. Estudo de caso da eficiência econômica e viabilidade financeira da produção de morango em sistema semi-hidropônico. **Circular Técnica 88 Embrapa**, Bento Gonçalves, 2011.

LE, K.; CHIU, F.; NG, K. Identification and quantification of antioxidants in *Fuctus lycii*. **FoodChemistry**. V.105, p. 353- 363, 2007.

LEUNG, I. Y. F.; TSO, M. O. M.; LI, W. W. Y.; LAM, T. T. Absorption and tissue distribution of zeaxanthin and lutein in rhesus monkey soft retaking *Fructus lycii* extract. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**. Vol. 42, p. 466- 471, 2001.

LEVIN, R. A.; BERNADELLO, G.; WHITINING, C.; MILLER, J. S. A new generic circumscription in tribe Lycieae (Solanaceae). **Taxon**. V. 60 (3), p.681, 2011.

LIN, C. L.; WANG, C. C.; CHANG, S. C.; INBARAJ, B. S.; CHEN, B. H. Antioxidative activity of polysaccharide fractions isolated from *Lycium barbarum* Linnaeus. **International Journal of Biological Macromolecules**. V.45, p. 146- 151, 2009.

LIU, Y.; GUILI, G.; ZHANG, J.; JIA, S.; LIA, F.; WANG, Y.; WU, S. Response surface optimization of ultrasound – assisted enzimática extraction polysaccharides from *Lycium barbarum*. **Carbohydrate Polymers** 110. 2014, 278- 284p.

LOPES, J. C.; PEREIRA, M. D. Germinação de sementes de cubiu em diferentes substratos e temperaturas. **Revista brasileira de sementes**, vol.27, nº2, Pelotas, 2005.

LLOYD G.; MCCOWN B. Commercial lyfe asible micropropagation of mountain laurel (*Kalmialauifolia*) by use of shoot tip culture. **International Plant Propagation Society Proceedings**, Washington. V.30, p. 421- 427, 1980.

LUO, Q.; CAI, Y.; YAN, J.; SUN, M.; CORKE, K. Hypoglycemic and Hypoglycemic effects and antioxidant activity of extracts from *Lycium barbarum*. **Life Sciences**. Vol. 76, p. 137- 139, 2004.

MAGUIRE, J. D. Speeds of germination-aids election and evaluation for seedling gemergence and vigor. **Crop Science**. Madison, v. 2, p. 176, 1962.

MARTINS, C. C.; NAKAGAWA, J.; BOVI, M. L. A. Efeito da posição da semente no substrato e no crescimento inicial das plântulas de Palmito- Vermelho (*Euterpe espirosantensis* Fernandes – Palmae). **Rev. Brasileira de Sementes**, Brasília, V. 21, n.1, p. 164- 173. 1999.

MILLER, J. S.; KAMATH, A.; DAMASHEK, J.; LEVIN, R. A. Out of America to Africa or Asia: Inference of Dispersal Histories Using Nuclear and Plastid DNA and the *S-RNase* Self-incompatibility Locus. **Mol BiolEvol**. V. 28 (1), p. 793-801, 2011.

MOCAN, A.; VLASE, L.; VODNAR, V. C.; BISCHIN, C.; HANGANU, D.; GHELDIU, A. M.; DUMITRESCU, R. S.; CRISAN, G. Polyphenolic contente, antioxidante antantimicrobial activities of *Lycium barbarum* L. and *Lycium chinense* Mill. Leaves. **Molecules**. V. 19(7), 2014.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised médium for Rapids growth and bioassays with tobacco tissue culturas. **Physiologia Plantarum**, v.15, n.3, p. 473- 497,

NASSIF, F. M. L. ; VIEIRA, I, G.; FERNANDES, S. G. D. Fatores externos (ambientais) que influenciam na germinação de sementes. Disponível em: <http://www.ipef.br/tecsementes/germinacao.html>. Acesso em: 24 mai 2017.

ONO, K. T.; MAEDA, M.; NAKAO, M.; YOSHIMURA, M.; TOMIMORI, N. S.; FUKAMI, H. 2-O-(β -D-Glucopyranosyl) ascorbic Acid, a Novel Ascorbic Acid Analogue Isolated from *Lycium* Fruit. **Journal Agriculture Food Chemistry**. V. 52, p. 2092- 2096, 2004.

OSIPI, E. A. F.; NAKAGAWA, J. Efeito da temperatura na avaliação da qualidade fisiológica de sementes do Maracujá-doce (*Passiflora alata* Dryander). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 27, n.1, p. 179-181, 2005.

PARK, S. W.; JEON, J. H.; KIM, H. S.; PARK, Y. M.; ASWATH, C.; JOUNG, H. Effect of sealed and vented gaseous microenvironments on the hyperhydricity of potato shoots in vitro. **Scientia Horticulturae**. V. 99, p. 199 – 2015, 2004.

PAQUES, M.; BOXUS, P. Vitrification: review of literature. **Acta Hort**. V. 212, p. 155 – 166, 1987.

PENG, Y.; MA, C.; LI, Y.; LEUNG, K. S. Y.; JIANG, Z. H.; ZHAO, Z. Quantification of Zeaxanthin Dipalmitate and total carotenoids. **Plant Foods for Human Nutrition**. V. 60, p. 161- 164, 2005.

PEREIRA, T. S.; ANDRADE, A. C. S. Germinação de *Psidium guajava* L. e *Passiflora edulis* Sims- Efeito da temperatura, substrato e morfologia do desenvolvimento pós-seminal. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 16, n.1, p. 58-62, 1994.

PESKE, S. T.; VILELLA, F. A.; MENEGHELLO, G. E. Sementes: Fundamentos científicos e tecnológicos. 3ªed. Cap. 1. **Universitária**. PREC – UFPEL. 2012. 573p.

POTTERAT, O. Goji (*Lycium barbarum* and *L. chinense*): Phytochemistry, Pharmacology and Safety in the Perspective of Traditional Uses and Recent Popularity. **Planta Med**. V. 76, p 7-19, 2010.

POTTERAT, O.; HAMBURGUER, M. Goji Juice: A novel miraculous cure for longevity and well-being? A review of composition, pharmacology, health- related claims and benefits. **Ganzheits Medizin**. V. 20, p353-357, 2007.

PROTTI, M.; GUALANDI, I.; MANDRIOLI, L.; ZAPPOLI, S.; TONELLI, D.; MERCOLINI, L. Analytical profiling of selected antioxidants and total antioxidant capacity of Goji (*Lycium* spp.) berries. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. V. 143, p. 252-260, 2017.

RASEIRA, M. C. B.; GONÇALVES, E. D.; TREVISAN, R.; ANTUNES, L. E. C. **Aspectos técnicos da cultura da framboeseira**. Embrapa Clima Temperado. Documento 120. P. 22.

RIBEIRO, G. D.; COSTA, J. N. M.; VIEIRA, A. H.; SANTOS, M. R. A. **Enxertia em Fruteiras**. Embrapa. Recomendações Técnicas 92, Porto Velho, RO. 2005.

- RIBEIRO, M. V.; LIMA, C. S. M.; BANDEIRA, J. M.; RUBIN, S.; BENITEZ, L. C., PETERS, J. A.; BRAGA, E. J. B. Concentrações de sacarose e tipos de vedação no cultivo *in vitro* de *Melissa officinalis* L. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.5, p. 843- 845, 2007.
- RODRIGUES, M. M.; MELO, M. D.; ALOUFA, M. A. I. Propagação vegetativa *in vitro* e análise estrutural de macieira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, p. 171- 173, 2006.
- ROGALSKY, M.; GUERRA, M. P.; SILVA, A. L. Multiplicação *in vitro* da ameixeira 'Santa Rosa': efeito da citocinina BAP. **Revista Brasileira de Fruticultura**. V. 25, n. 2, p. 365-367, 2003.
- ROSA, S. G. T.; FERREIRA, A. G. Germinação de sementes de plantas medicinais lenhosas. **Act Bot. Bras.** V. 15, p. 147- 154, 2001.
- SANTOS, M. A. C.; QUEIRÓZ, M. A.; BISPO, J. S.; DANTAS, B. F. Germinação de sementes de araçá (*Psidium guineense* Swartz.). **Journal of seeds science**, v. 37, n.4, p. 214- 221, 2015.
- SANTOS, E. K. Totipotência celular e cultura de tecidos vegetais. In: FREITAS, L. B.; BERED, F. **Genética e Evolução Vegetal**. 1ª ed. Porto Alegre: UFRGS, 2003. p. 415- 426.
- SANTOS, F. F.; BANDEIRA, J. M.; MARINI, P.; MARTINS, AC. B. N.; VARGAS, D. P.; DUTRA, L. F.; COUTINHO, E. F.; MORAES, D. M. Relações entre viabilidade, vigor e cultivo *in vitro* de embriões e sementes de oliveira (*Olea europaea* L.). **Revista brasileira de Biociência**, Porto Alegre, v. 13, n.3, p. 130- 133, 2015.
- SCHUCH, M. W.; ERIG, A. C. Micropropagação de Plantas Frutíferas. In: FACHINELLO, J. C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J. C. **Propagação de Plantas Frutíferas**. Brasília: Embrapa, 2005. Cap. 8, p. 155- 173.
- SILVA, S. R.; RODRIGUES, K. F. D.; FILHO, J. A. S. **Propagação de Árvores Frutíferas**. Piracicaba: ESALQ, Casa do Produtor Rural, 2011. 63p.
- SILVA, M. J. R.; JESUS, P. R. R.; ANKOS, J. M. C.; MACHADO, M.; RIBEIRO, V. G. Caracterização agrônômica e pós-colheita das bananeiras 'Maravilha' e 'Preciosa' no Submédio do Vale São Francisco. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 63, n.1, p. 046-053, 2016.
- SOUZA, C. M. D.; PINTO, J. E. B. P.; RODRIGUES, M. B.; MORAIS, A. R. de ARRIGONI-BLANK, M. de F. Influência dos fatores físicos na regeneração de brotos de repolho. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.23, n.4, p.830- 835, 1999.
- SRISKANDARAJAH, S.; MULLINS, M. G.; NAIR, Y. Induction adventitious rooting *in vitro* in difficult to propagate cultivars of apple. **Plant Science Letters**. V 24, p. 1-9, 1982.
- THOMPSON, P. A. Effects of Fluctuating Temperatures on Germination. **Journal of Experimental Botany**. V. 25, p. 164, 1974.
- TOLEDO, F. F.; MARCOS FILHO, J. **Manual das sementes: tecnologia da produção**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1977. 225 p.

TUDOR, V.; ASANICA, A.; TEODORESCU, R. I.; GÎDEA, M.; TANASESCU, C.; TUDOR, A. D.; TIU, J. V. Germination of some *Lycium barbarum* L. and *Lycium chinense* Mill. biotypes seeds. **Romanian Biotechnological Letters**, Romania, Vol. 22, No. 1, p. 12192, 2017.

VERA, Maria Johana Gonzáles. **Metodologia para condução do Teste de Germinação em sementes de chia (*Salviahispanica* L.)**. 2015. 13p. Dissertação – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

VIGNOLO, G. K.; PICOLOTTO, L.; GONÇALVES, M. A.; PEREIRA, I. S.; ANTUNES, L. E. C. Presença de folhas no enraizamento de estacas de amoreira-preta. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.44, n.3, p.467-472, 2014.

WAINWRIGHT, H.; SCRACE, J. Influence of “in vitro” preconditioning with carbohydrates during the rooting of micro cuttings son “in vitro” establishment. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.38, p.261- 267, 1989.

WAWRUSZAK, A.; CZERWONKA, A.; OKLA, K.; RZESKI, W. Anticancer effect of ethanol *Lycium barbarum* (Goji berry) extract on human breast cancer T47D cell line. **Journal Natural Product Research**. V. 30, 2016.

YAMADA, Y.; SATO, F. The photoautotrophic culture of chlorophyllous cells. **Plant & Cell Physiology**. V.19, n.4, p. 691- 699, 1978.

YAO, X.; PENG, Y.; XU, L. J.; LI, L.; WU, Q. L.; XIAO, P.G. Phytochemical and biological studies of *Lycium* medicinal plants. **Chemistry Biodiversity**. V.8, p.977, 2011.

ZHENG, G. Q.; ZHENG, Z. Y.; HU, Z. H. Variation in fruit sugar composition of *Lycium barbarum* L. and *Lycium chinense* Mill. of different regions and varieties. **Biochemical Systematics and Ecology** v.38, p. 275–284, 2010.