



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**VARIABILIDADE GENÉTICA, MORFOLÓGICA E AGRONÔMICA E SELEÇÃO  
DE GENÓTIPOS ELITE DE *Stevia rebaudiana* VISANDO AO DESENVOLVIMENTO  
DE CULTIVARES ADAPTADAS PARA O CERRADO**

**FELLIPE CELESTINO DE CASTRO**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM AGRONOMIA**

**BRASÍLIA/DF**

**FEVEREIRO/2020**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**VARIABILIDADE GENÉTICA, MORFOLÓGICA E AGRONÔMICA E SELEÇÃO  
DE GENÓTIPOS ELITE DE *Stevia rebaudiana* VISANDO AO DESENVOLVIMENTO  
DE CULTIVARES ADAPTADAS PARA O CERRADO**

**FELLIPE CELESTINO DE CASTRO**  
Matrícula: 19/0022825

**ORIENTADOR: FÁBIO GELAPE FALEIRO**

**COORIENTADOR: RENATO FERNANDO AMABILE**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM AGRONOMIA**

**BRASÍLIA/DF**

**FEVEREIRO/2020**

**BRASÍLIA/DF  
FEVEREIRO/2020**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA (11)**

**VARIABILIDADE GENÉTICA, MORFOLÓGICA E AGRONÔMICA E SELEÇÃO  
DE GENÓTIPOS ELITE DE *Stevia rebaudiana* VISANDO AO DESENVOLVIMENTO  
DE CULTIVARES ADAPTADAS PARA O CERRADO**

**FELLIPE CELESTINO DE CASTRO**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-  
GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA, COMO PARTE DOS REQUISITOS  
NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM AGRONOMIA.**

**APROVADA POR:**

---

**Fábio Gelape Faleiro, Dr. (Embrapa Cerrados)  
(Orientador) e-mail: fabio.faleiro@embrapa.br**

---

**Michelle Souza Vilela, Dra. (Universidade de Brasília)  
(Examinadora Interna) e-mail: michellevilela@unb.br**

---

**Sebastião Pedro da Silva Neto, Dr. (Embrapa Cerrados)  
(Examinador Externo) e-mail: sebastiao.pedro@embrapa.br**

**BRASÍLIA/DF, 14 de FEVEREIRO de 2020.**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Castro, Fellipe Celestino

Título: Variabilidade genética, morfológica e agronômica e seleção de genótipos elite de *Stevia rebaudiana* visando ao desenvolvimento de cultivares adaptadas para o Cerrado

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO (M) – UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA/FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA, 2020.

1. Estévia. 2. Caracterização. 3. Diversidade. 4. Caracteres Morfoagronômicos. 5. Melhoramento Genético. 6. Parâmetros Genéticos.

I. Faleiro, F. G. II. Doutor.

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

CASTRO, F.C. **Variabilidade genética, morfológica e agronômica e seleção de genótipos elite de *Stevia rebaudiana* visando ao desenvolvimento de cultivares adaptadas para o Cerrado.** Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2020. Dissertação de Mestrado.

## CESSÃO DE DIREITOS

NOME DO AUTOR: FELLIPE CELESTINO DE CASTRO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Variabilidade genética, morfológica e agronômica e seleção de genótipos elite de *Stevia rebaudiana* visando ao desenvolvimento de cultivares adaptadas para o Cerrado.

GRAU: Mestre ANO: 2020

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta dissertação de mestrado para única e exclusivamente propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

-----  
Nome: Fellipe Celestino de Castro

CPF: 031.397.981-21

Endereço: SHIN CA 10 Lote 1, Cond. Bellágio B1: F Ap: 203, Lago Norte, Brasília, DF

Tel. (63) 98106-2998 Email: fellipecelestino.castro@gmail.com

Ao meu orientador Fábio Faleiro e equipe pela ajuda, incentivo e confiança,

Aos meus pais,

À minha esposa e companheira de todas as horas,

Aos meus filhos Vicente Caponi Castro (*in memoriam*) e Júlia,

Dedico e Agradeço.

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade de Brasília pela oportunidade da realização do mestrado.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Cerrados, pela concessão de toda a infraestrutura para este projeto.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

A todos o meu muito obrigado!

Posso ter defeitos, viver ansioso  
e ficar irritado algumas vezes mas  
não esqueço de que minha vida é a  
maior empresa do mundo, e posso  
evitar que ela vá à falência.

Ser feliz é reconhecer que vale  
a pena viver apesar de todos os  
desafios, incompreensões e períodos  
de crise.

Ser feliz é deixar de ser vítima dos  
problemas e se tornar um autor  
da própria história. É atravessar  
desertos fora de si, mas ser capaz de  
encontrar um oásis no recôndito da  
sua alma.

É agradecer a Deus a cada manhã  
pelo milagre da vida.

Ser feliz é não ter medo dos próprios  
sentimentos.

É saber falar de si mesmo.  
É ter coragem para ouvir um "não".

É ter segurança para receber uma  
crítica, mesmo que injusta.  
Pedras no caminho?  
Guardo todas, um dia vou construir  
um castelo...

Fernando Pessoa

# VARIABILIDADE GENÉTICA, MORFOLÓGICA E AGRONÔMICA E SELEÇÃO DE GENÓTIPOS ELITE DE *Stevia rebaudiana* VISANDO AO DESENVOLVIMENTO DE CULTIVARES ADAPTADAS PARA O CERRADO

## RESUMO GERAL

A espécie *Stevia rebaudiana* Bertoni pertence à família Asteraceae, caracterizando-se como uma planta herbácea, semiperene, encontrada na forma silvestre na região de divisa entre Paraguai e Brasil. A sua primeira descrição botânica foi realizada pelo suíço Moisés Santiago Bertoni em 1887, que especificou o sabor adocicado. A alta demanda de estévia pela indústria está em evidência. Isso ocorre devido suas propriedades edulcorantes naturais como o esteviolo e suas variações. Essas substâncias possuem poder edulcorante entre 300 e 400 vezes maior que a sacarose, conservam baixo índice glicêmico, são estáveis ao calor e não sofrem fermentação, sendo atributos importantes para indústria alimentícia. O estudo da variabilidade genética e a caracterização de acessos e genótipos elite é uma prática primordial em bancos ativos de germoplasma e também em programas de melhoramento genético que integram informações de identificação, descrição e diferenciação de acessos e genótipos. Este trabalho tem como objetivo o estudo da variabilidade genética, morfológica e agronômica de genótipos elite de *S. rebaudiana* visando ao desenvolvimento de variedades geneticamente superiores para cultivo nas condições do Cerrado. Marcadores moleculares RAPD, descritores morfológicos e características agronômicas foram utilizados para a caracterização dos genótipos. A partir desses marcadores genéticos, foram estimadas as distâncias genéticas e realizadas análises de agrupamento e dispersão gráfica dos genótipos elite. A variabilidade genética observada evidencia o alto potencial da utilização destes genótipos em programas de melhoramento genético da estévia, tendo em vista o desenvolvimento de variedades geneticamente superiores para cultivo nas condições do Cerrado *sensu stricto* (savana brasileira).

**Palavras-chave:** Estévia, caracterização, diversidade, caracteres morfoagronômicos, melhoramento genético.

**MORPHOLOGIC, AGRONOMIC AND GENETIC VARIABILITY AND  
SELECTION OF ELITE GENOTYPES OF *Stevia rebaudiana* AIMING TO THE  
DEVELOPMENT OF ADAPTED CULTIVARS FOR CERRADO**

**ABSTRACT**

The species *Stevia rebaudiana* Bertoni belongs to the Asteraceae family, being characterized as a semi-perennial herbaceous plant, found in the wild form in the border region between Paraguay and Brazil. Its first botanical description was made by the Swiss Moisés Santiago Bertoni in 1887, who specified the sweet taste. The high demand for stevia by the industry is in evidence. This is due to its natural sweetening properties such as steviol and its variations. These substances have the sweetening power between 300 and 400 times higher than sucrose, have a low glycemic index, are stable to heat and do not undergo fermentation, being important attributes for the food industry. The study of genetic variability and characterization of elite accessions and genotypes is a primary practice in active germplasm banks and also in breeding programs that integrate identification, description and differentiation information of accessions and genotypes. The objective of this work is to study the genetic, morphological and agronomic variability of *S. rebaudiana* elite genotypes aiming the development of genetically superior varieties for cultivation under Cerrado conditions. RAPD molecular markers, morphological descriptors, and agronomic characteristics were used to characterize the genotypes. From these genetic markers, genetic distances were estimated and cluster analysis and graphics dispersion of elite genotypes were performed. The genetic variability observed shows the high potential of using these genotypes in Stevia breeding programs, in view of the development of genetically superior varieties for cultivation under Cerrado *sensu stricto* (Brazilian savanna) conditions.

**Key words:** Stevia, characterization, diversity, morphoagronomic characters, genetic improvement.

## SUMÁRIO

RESUMO GERAL.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO GERAL .....	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1 Botânica .....	15
2.2 Biologia floral.....	15
2.2.1. Estrutura da flor .....	15
2.2.2. Antera, pólen e estigma .....	15
2.2.3. Reprodução e polinização .....	17
2.3 Fotoperíodo e floração.....	18
2.4 Sementes.....	19
2.5 Folhas .....	20
2.6. Sistema radicular .....	20
2.7 Sistema vegetativo .....	20
2.8. Origem e história .....	21
2.9. Métodos de propagação .....	24
2.10. Propagação vegetativa .....	25
2.11. Propagação via sementes .....	26
2.12. Sistema de produção .....	27
2.13. Irrigação .....	29
2.14. Variedades .....	29
2.15. Colheita, secagem e armazenamento .....	30
2.16. Comercialização .....	31
2.17. Uso na indústria .....	31
2.18. Melhoramento genético .....	32
2.19. Uso de marcadores moleculares no melhoramento genético .....	36
2.20. Perspectivas de demanda comercial .....	37
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40
CAPÍTULO 1. APLICAÇÃO DE DESCRITORES UTILIZADOS EM ENSAIOS DE DHE PARA ANALISAR A VARIABILIDADE GENÉTICA DOS GENÓTIPOS ELITE DE ESTÉVIA.....	49
RESUMO.....	50
ABSTRACT.....	51
1.1 INTRODUÇÃO.....	52
1.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	53
1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	55
1.4 CONCLUSÕES .....	64
1.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	65

CAPÍTULO 2. VARIABILIDADE GENÉTICA E MORFOLÓGICA DE GENÓTIPOS ELITE DE ESTÉVIA COM BASE EM MARCADORES MOLECULARES RAPD E VARIÁVEIS QUANTITATIVAS .....	68
RESUMO.....	69
ABSTRACT.....	70
2.1 INTRODUÇÃO.....	71
2.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	72
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	77
2.4 CONCLUSÕES .....	88
2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	89
CAPÍTULO 3. AVALIAÇÃO E SELEÇÃO DE GENÓTIPOS DE ESTÉVIA COM BASE EM CARACTERÍSTICAS MORFOAGRONÔMICAS VISANDO AO DESENVOLVIMENTO DE CULTIVARES ADAPTADAS AO CERRADO.....	91
RESUMO.....	92
ABSTRACT.....	93
3.1 INTRODUÇÃO.....	94
3.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	95
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	96
3.4 CONCLUSÕES .....	101
3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	102
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	104

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A *Stevia rebaudiana* Bertoni pertence à família Asteraceae, caracterizando-se como uma planta herbácea, semiperene, encontrada na forma silvestre na região de divisa entre Paraguai e Brasil (DE; MONDAL; BANERJEE, 2013; KATAYAMA et al., 1976).

A alta demanda de estévia pela indústria está em evidência. Isso ocorre devido às suas propriedades edulcorantes naturais como o esteviol e suas variações. Dessa forma, o esteviol constitui-se como alternativa para substituição da sacarose em todo o mundo. Esse crescimento industrial associa-se ao aumento mundial e constante das desordens metabólicas, como as prevalentes diabetes tipo II e obesidade (TAVARINI; PASSERA; ANGELINI, 2018; WÖLWER-RIECK, 2018).

Essas substâncias possuem poder edulcorante entre 300 e 400 vezes maior que a sacarose; conservam baixo índice glicêmico; são estáveis ao calor e não sofrem fermentação, sendo atributos importantes para indústria alimentícia (SANTOS, 2015; LANDÁZURI; TIGRERO, 2009).

A caracterização de plantas é uma prática primordial em bancos ativos de germoplasma e também em programas de melhoramento genético, que integra informações de identificação, descrição e diferenciação de acessos e genótipos. As características morfológicas avaliadas de forma qualitativa e/ou quantitativa são muito úteis em estudos de variabilidade genética e também para a realização de ensaios de distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade (DHE) tendo em vista a proteção de cultivares (BURLE; OLIVEIRA, 2010; FALEIRO et al., 2016).

O desenvolvimento de cultivares de estévia adaptadas ao Cerrado envolve a seleção de genótipos com alta produção de fitomassa, e com período juvenil longo. Logo a avaliação de características agrônômicas como: número de dias para o florescimento, produção de fitomassa, altura de planta e perfilhamento de genótipos de *Stevia rebaudiana* são características importantes, a fim de direcionar avanços de ciclos de seleção e recombinação.

O uso de marcadores moleculares nos estudos da variabilidade genética, caracterização e seleção de genótipos é um procedimento que vem sendo utilizado para resolver problemas associados ao efeito ambiental na precisão e acurácia destes estudos. Os marcadores moleculares em nível de DNA não são influenciados pelo ambiente, e os genes podem ser identificados e analisados nos estádios iniciais de desenvolvimento das plantas. Dessa forma, os marcadores podem ser utilizados para identificar a diferença genética dentro e entre populações e/ou progênies (FRANCIA et al., 2005; TAVARINI, PASSERA, ANGELINI, 2018; WÖLWER-RIECK, 2018).

Os marcadores moleculares do tipo RAPD, que significa “DNA polimórfico amplificado ao acaso”, são eficientes em produzir marcadores polimórficos, consumindo pouco tempo e com baixo custo de operação. Esses marcadores são amplamente utilizados para estimar a diversidade genética de plantas provenientes de diferentes regiões geográficas (THIYAGARAJAN; VENKATACHALAM, 2015; TAVARINI, PASSERA, ANGELINI, 2018; WÖLWER-RIECK, 2018). Faleiro et al. (2006), analisando a variabilidade genotípica em populações de estévia, mostraram que a caracterização molecular foi eficiente com a utilização de apenas 9 primers RAPD. Estes primers originaram 69 marcadores, dos quais 71% foram polimórficos.

O objetivo geral deste trabalho foi a caracterizar a variabilidade genética, morfológica e agrônômica, e selecionar genótipos elite de *S. rebaudiana* visando ao desenvolvimento de variedades geneticamente superiores para cultivo nas condições do Cerrado.

Para atingir o objetivo geral, foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

1. Aplicar descritores morfológicos na caracterização e avaliação da variabilidade genética de genótipos elite na região do Cerrado do Planalto Central.
2. Caracterizar e quantificar a variabilidade genética e morfoagronômica de genótipos elite de *Stevia rebaudiana* com base em marcadores moleculares RAPD e variáveis quantitativas morfoagronômicas.
3. Correlacionar características morfoagronômicas, avaliar e selecionar genótipos elite de *S. rebaudiana* com alta produtividade e adaptados às condições do Cerrado.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Botânica

A *Stevia rebaudiana* Bertoni pertence à família Asteraceae (Compositae), que no Brasil soma, aproximadamente, 1900 espécies dos 180 gêneros (ROQUE; BAUTISTA, 2008; BARROSO et al., 1991; NAKAJIMA; SEMIR, 2001). Cabrera (1978) e Caponio et al. (2016) anotam que cerca de 200 espécies do gênero *Stevia* estão na América, difundidas preferencialmente em regiões tropicais e subtropicais da Argentina até a Califórnia nos Estados Unidos da América.

Segundo Soejarto, Kinghorn e Farnsworth (1982), o gênero *Stevia* foi estudado quanto às propriedades organolépticas, e somente duas das 110 espécies analisadas possuem teores de princípios edulcorantes, sendo elas a *S. rebaudiana* (espécie mais conhecida) e a *S. phlebophylla* A. Gray (espécie mais rara, encontrada no México). Alguns autores questionam a existência de quantidades significativas de glicosídeos de esteviol na espécie do México (CAPONIO et al., 2016; CEUNEN et al., 2013; SOEJARTO; KINGHORN; FARNSWORTH, 1982).

A *S. rebaudiana* e outras 13 espécies paraguaias são classificadas na série Multiaristatae. Taxonomicamente, essa série é definida por: rizomas perenes, folhas simples inteiras, normalmente contrárias na base da planta, crenuladas a crenado-serradas na parte média superior, sésseis a pecioladas; inflorescências corimbiformes ou paniculiformes, brácteas involucrais frequentemente lanceoladas; flores actinomorfas, corola com cinco lobos perfeitos; aquênios (sementes) isomórficos, "papilho ou pappus" com 10 a 20 aristas cerdas e simétricas (LIMA FILHO; VALOIS; LUCAS, 2004).

Classificação taxonômica da *Stevia rebaudiana*:

Reino Plantae – Plantas

Sub-reino Tracheobionta – Plantas vasculares

Superdivisão Spermatophyta – Plantas de semente

Divisão Magnoliophyta – Plantas com florescência

Classe Magnoliopsida – Dicotiledôneas

Subclasse Asteridae

Ordem Asterales

Família Asteraceae

Gênero *Stevia* Cav. – Erva doce

Espécie *Stevia rebaudiana* Bertoni – Erva doce

(YADAV et al., 2011, p.3)

Sua primeira descrição botânica foi realizada pelo suíço Moisés Santiago Bertoni em 1887, que especificou o sabor adocicado (SANTOS, 2015; BERTONI, 1905). O autor descreveu a espécie como sendo uma erva pequena, de 40 a 80 cm de altura, raízes pujantes, talos sublenhosos, pubescentes, com poucas ramificações, terminais coroados por panículas constituídas de pequenos corimbos, com 2 a 6 flores pequenas com corola de lóbulos brancos, alongados e abertos (LIMA FILHO; VALOIS; LUCAS, 2004).

## **2.2. Biologia Floral:**

### **2.2.1. Estrutura da Flor:**

As flores (Figura 1) no gênero *Stevia* são reduzidamente exsertas, ou seja, sobressaem do tubo da corola (LIMA FILHO; VALOIS; LUCAS, 2004).

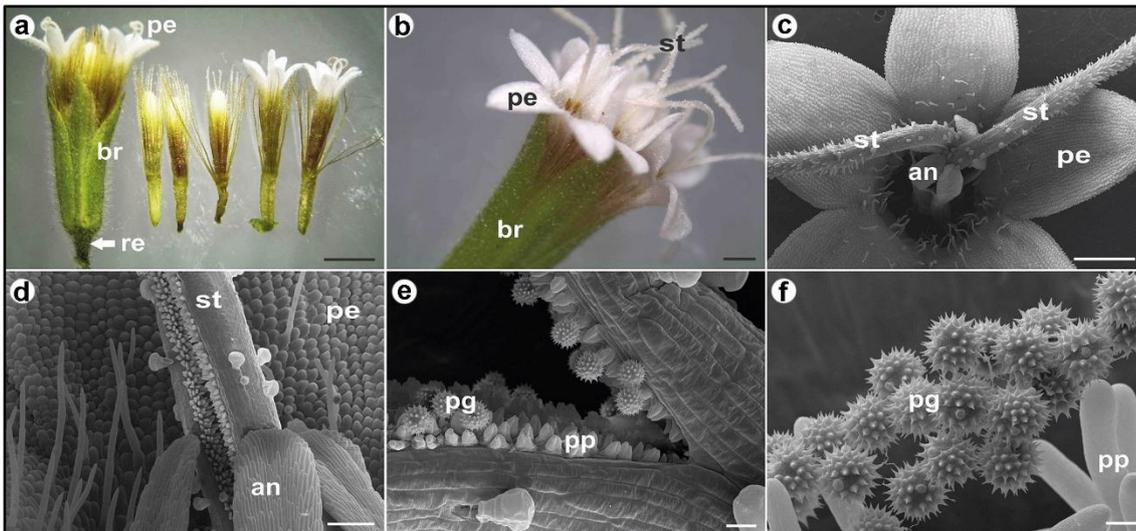


**Figura 1.** Flores de *Stevia rebaudiana* Bertoni. Campos experimentais da Embrapa Cerrados.

**Fonte:** Felipe Celestino de Castro, 2019.

### **2.2.2. Antera, Pólen e Estigma:**

Os grãos de pólen são prolatados esferoidais isopolar, radialmente simétrico, tricolporado com distinto poro circular cercado por espinhos geralmente apresentando uma membrana granulada e alongada (Figura 2). O pólen pode ser carregado por insetos, entretanto, é de difícil dispersão pelo vento devido à sua característica pegajosa e úmida (ROSSI et al., 2018; ANDREATA; TRAVASSOS, 1994); LIMA FILHO; VALOIS; LUCAS, 2004).



**Figura 2.** Morfologia floral da *Stevia rebaudiana*. a-b) Visão geral do cálice (conjunto de sépalas), com 5 sépalas do tipo capítulo, com flores em diferentes fases de desenvolvimento. c) Detalhes da flor mostrando: corola (conjunto de pétalas) com 5 pétalas; a estrutura feminina, o gineceu (conjunto de pistilos), é formada pelo estigma com 2 ramos, juntamente com o estilete e o ovário; a estrutura masculina, androceu (conjunto de estames), é formada por 5 anteras e filetes. d) Particularidades das pétalas, estigma e anteras. e-f) Superfície do estigma com grãos de pólen aderidos às papilas estigmáticas (estruturas que identificam quimicamente os grãos de pólen). Adaptado de Rossi et al. (2018).

As flores são agrupadas em inflorescência axilar e terminal do tipo capítulo. Inflorescência axilar é quando nasce em uma axila, isto é, forma um ângulo no encontro dos dois órgãos ou parte da planta. A inflorescência terminal é quando se encontra no ápice do ramo. Possui receptáculo plano, cercado por brácteas involucrais dispostas em cabeças indeterminadas. O capítulo caracteriza-se pela dilatação do pedúnculo na parte superior formando um receptáculo onde se desenvolvem as flores sésseis. O cálice é altamente modificado para formar o papus, encontrado em flor de ovário ínfero, ou seja, inserto no interior do receptáculo floral e de difícil separação (ROSSI et al., 2018; ANDREATA; TRAVASSOS, 1994).

O androceu caracteriza-se como conjunto dos órgãos masculinos constituídos pelos estames. A *S. rebaudiana* apresenta-se com androceu pentâmero isostêmone, ou seja, que apresenta quantidade de estames e pétalas iguais, gamostêmone que significa estames reunidos em feixes. O estame refere-se ao órgão masculino da flor. Na estévia os estames apresentam filamentos livre, conato ou unidos desde a origem e como homodinamia. A antera refere-se a parte do estame, onde se constituem os sacos polínicos. Na *S. rebaudiana* as anteras formam um tubo com deiscência rimosa na qual os grãos de pólen são liberados e em seguida empurrados, devido ao crescimento do estilete, que emergem região central do meristema floral (ROSSI et al., 2018; ANDREATA; TRAVASSOS, 1994).

O gineceu caracteriza-se como o conjunto dos órgãos femininos formados pelos pistilos ou carpelos. O gineceu é sincárpico, bicarpelar e unilocular, com basal placentação. Na antese o estigma apresenta dois ramos do meio e o estilete é cercado pelas anteras. Os dois ramos do estigma curva para fora, expondo a superfície estigmática com numerosas células papilares para contato com o pólen. A flor de estévia é epiginosa, com côncavo receptáculo que suporta o ovário, de forma que os outros espirais de flores e os nectários se desenvolvem no receptáculo na parte distal do ovário, constituindo o hipanto (ROSSI et al., 2018; ANDREATA; TRAVASSOS, 1994).

### **2.2.3. Reprodução e Polinização:**

A anatomia reprodutiva dos gametófitos masculino e feminino, quer dizer, dos grãos de pólen e do saco embrionário, respectivamente, é própria das angiospermas (SHAFFERT; CHETOBAR, 1992; SHAFFERT; CHETOBAR, 1994; BRANDLE; STARRATT; GIJZEN, 1998).

Segundo Lima Filho, Valois e Lucas (2004), as flores são hermafroditas e com polinização cruzada.

Caponio et al. (2016), pesquisando sobre a biologia reprodutiva da *S. rebaudiana*, cultivada localmente na Argentina, concluíram que a erva se reproduz sexualmente e possui um sistema de autoincompatibilidade que impede a autofertilização. Isso se contrapõe a Grashoff (1974) e Oliveira et al. (2004), que afirmaram que ela se reproduz assexuadamente através da agamospermia, ou seja, formando sementes sem reprodução sexual, assim considerada pelos autores, como apomítica obrigatória. Todavia, Caponio et al. (2016) explicaram que ocorre a protandria (é quando o órgão reprodutor masculino amadurece primeiro que o órgão reprodutor feminino) e a espécie é essencialmente uma planta alógama e não apomítica.

### 2.3. Fotoperíodo e Floração

A estévia é obrigatoriamente de dias curtos, ou seja, são plantas que florescem com fotoperíodos inferiores ao fotoperíodo crítico. As plantas de dias curtos precisam de uma noite longa para florescerem com comprimento de aproximadamente 13 horas (VALIO; ROCHA, 1977). Zaidan, Dietrich e Felipe, (1980) aludiram extensa variabilidade quanto à sensibilidade em diferentes populações. Esta variabilidade é importante quando pensamos no melhoramento genético visando a seleção de plantas com período juvenil mais longo e maior produção de fitomassa (Figura 3). A estevia pode iniciar o florescimento muito cedo, logo depois da formação de 4 folhas verdadeiras (CARNEIRO, 1990; BRANDLE; STARRATT; GIJZEN, 1998).

Transplantes ou podas efetuadas em dias curtos induzem a floração. Logo, a planta alcança a idade fisiológica apropriada, sucedendo um lento desenvolvimento. Desaconselha-se o plantio nos meses de menor comprimento do dia, a fim de prevenir o florescimento das mudas ainda no viveiro (LIMA FILHO; VALOIS; LUCAS, 2004).



**Figura 3.** Plantas com diferentes períodos juvenis, implicando em diferentes produções de fitomassa. Campos experimentais da Embrapa Cerrados. **Fonte:** Fellipe Celestino de Castro, 2019.

#### 2.4. Sementes

As sementes (Figura 4) do gênero *Stevia* são também chamadas de aquênios, sendo os mesmos dispostos em panículas laxas, sendo glanduloso-ciliados (LIMA FILHO; VALOIS; LUCAS, 2004).

A *S. rebaudiana* produz três tipos de frutos que são chamados de aquênios, sendo formados de um embrião pseudogâmico com dois cotilédones e um eixo embrionário coberto por um endosperma mais espesso. O aquênio claro e estéril ocorre devido à ausência de polinização. No aquênio escuro estéril, há a polinização, mas o tubo polínico não consegue atingir a oosfera. No aquênio escuro e fértil, verifica-se a polinização e a fecundação da oosfera com a geração do embrião (LIMA FILHO; VALOIS; LUCAS, 2004).



**Figura 4.** Frutos com sementes férteis e estéreis de *Stevia rebaudiana* Bertoni. **Fonte:** Fellipe Celestino de Castro, 2019.

## 2.5. Folhas

As folhas são oblongas-lanceoladas a romboídeas, com todas as faces esparso-pilosas (LIMA FILHO; VALOIS; LUCAS, 2004). A estévia demonstra variações na sua fisiologia e morfologia, influenciadas pela interação genótipo e ambiente. As plantas provenientes de sementes apresentam a variabilidade genética através dos tipos e tamanhos das folhas (Figura 5) e também da concentração de glicosídeos (LIMA FILHO; VALOIS; LUCAS, 2004).



**Figura 5.** Variabilidade de tipos e tamanhos das folhas de *Stevia rebaudiana* Bertoni. **Fonte:** Felipe Celestino de Castro, 2019.

## 2.6. Sistema radicular

O sistema radicular da estévia é do tipo pivotante, entretanto após o primeiro corte, ocorre na região do coleto uma diferenciação celular, tornando-o raízes fasciculadas (LIMA FILHO; VALOIS; LUCAS, 2004).

## 2.7. Sistema vegetativo

A estévia, segundo Lima Filho, Valois e Lucas (2004), apresenta o crescimento do tipo determinado, onde se verifica, em média no primeiro ciclo, uma haste principal com 25 ramos secundários por planta. Contudo, ainda de acordo com os mesmos autores, o corte afeta na diminuição dos ramos secundários, resultando em um perfilho com uma só haste principal. As podas frequentes estimulam o perfilhamento (Figura 6) da planta e o vigor do novo ciclo deriva da fertilidade do solo, das reservas das plantas e também da genética.



**Figura 6.** Plantas de estévia com diferentes tipos de perfilhamento. **Fonte:** Fellipe Celestino de Castro, 2019.

## 2.8. Origem e História

A *Stevia rebaudiana* é nativa do Paraguai, sendo difundida no seu país de origem (DE; MONDAL; BANERJEE, 2013; KATAYAMA et al., 1976). Segundo Madan et al. (2010), a estévia é original do Vale do Amambai, que se estende do nordeste do Paraguai ao sul do Brasil e sul da Argentina (MARTINS et al., 2017). No Brasil, a estévia cresce naturalmente no estado Mato Grosso do Sul, preferindo solos levemente ácidos, arenosos e úmidos (CABRERA; HOLMES; MCDANIEL, 1996; YADAV et al., 2011; CAPONIO et al., 2016).

Os primeiros registros indicam que a estévia era conhecida pelos espanhóis durante o século 16, mas isso perdura na incerteza (RAMESH; SINGH; MEGEJI, 2006). As primeiras evidências científicas reportadas de estévia ocorreram particularmente, em ordem cronológica de 1887-1945, em registros do Jardim Botânico Real de Kew, na Inglaterra, onde claramente é citado o seu uso como planta medicinal e também como adoçante pelos povos indígenas Guarani do Paraguai, mestiços e outros (LEWIS, 1992).

Moisés Santiago Bertoni (1857-1929), botânico, suíço, em 1887, em uma de suas viagens às matas do leste Paraguai, tomou conhecimento da planta e de sua característica adocicada (Quadro 1) através dos índios paraguaios e mestiços. Bertoni descreveu a planta, de forma equivocada, como uma nova espécie do gênero *Eupatorium*, chamando-a de “*Eupatorium rebaudianum*”, em homenagem ao químico paraguaio Ovidio Rebaudi, que primeiramente estudou as substâncias químicas doces da estévia e conseguiu isolar dois compostos ativos, no ano de 1900, com amostras cedidas por Bertoni (SANTOS, 2015; KINGHORN, 2001). Todavia, no ano de 1905, o próprio Bertoni retificou a classificação da “erva doce” e a nomeou e registrou definitivamente como *Stevia rebaudiana* Bertoni (AURICCHIO et al., 1989).

Antes disso, em 1901, o cônsul britânico Cecil Gosling, em Assunção no Paraguai, enviou amostras e uma carta com informações de suas propriedades e habitat para o Jardim Botânico Real de Kew. Gosling escreveu que os índios guaranis provavelmente possuíam conhecimento sobre essa planta há mais de um século, e que ela cresce nas terras altas de Amambai próximo ao rio “Segunda-feira”. Relatou também que uma pequena porção de folhas da estévia é o suficiente para adoçar uma xícara de chá ou café (LEWIS, 1992; LIMA FILHO; VALOIS; LUCAS, 2004; AURICCHIO et al., 1989).

Em 1908, foi registrado o primeiro cultivo extensivo de estévia na região de Puerto Bertoni-Alto Paraná no Paraguai. Paralelamente, até 1910, alguns cientistas alemães, como Rasennack e Karl Dietrich, realizaram análises químicas, isolaram e cristalizaram duas substâncias doces da folha, que intitularam de Eupatrina e Rebaudiana (MARÍN, 2004). Porém, no ano de 1921, a substância cristalizada denominada de Eupatorino foi renomeada a Esteviosídeo pela União Internacional de Química, de acordo com o gênero da planta. Em seguida, a Rebaudiana passou a se chamar Rebaudiosídeo. Esses compostos são estáveis ao calor e não sofrem fermentação (SANTOS, 2015; LANDÁZURI; TIGRERO, 2009).

Dez anos após a renomeação da substância, o interesse dos químicos de origem francesa Bridel e Lavielle, avançou ainda mais. Eles cristalizaram o esteviosídeo com 6% de aproveitamento e constataram que a capacidade de adoçar era cerca de 300 vezes maior que o açúcar advindo da cana-de-açúcar. Retificaram a fórmula da estrutura química molecular (passando a  $C_{38}H_{60}O_{18}$ ), e enfim, apresentaram a hipótese de que o esteviosídeo seria eliminado na forma natural pelo organismo, não sendo assimilado pelo corpo (MARÍN, 2004).

Revindo ao ano de 1920, a estévia se tornou uma planta de grande interesse comercial e científico para fins de adoçante e sabor. Durante o vigésimo século, a doce erva foi matéria de mais de 1000 artigos científicos e patentes (KINGHORN, 2001).

Sementes e/ou mudas foram importadas por diversos países como: Estados Unidos da América, Inglaterra, Polônia, antiga União Soviética, Japão, entre vários outros, pois, especialmente os ingleses, nos anos 40 do século XIX, buscavam um substituto para o açúcar de cana-de-açúcar ou beterraba, pois havia uma grande carência de adoçante durante a II Guerra Mundial. Foi reportado que o cultivo de *Stevia rebaudiana* no verão, em três cidades no sudoeste britânico, foi bem-sucedido, produzindo o equivalente a mais de cinco toneladas de açúcar por hectare (LEWIS, 1992; COUSINS, 1942; KINGHORN, 2001).

No Brasil, a primeira descrição da estévia foi em 1926 no Dicionário de Plantas Úteis do Brasil, do botânico Manuel P. Correa (LIMA FILHO; VALOIS; LUCAS, 2004). Von Schmeling (1967) e Kinghorn (2001) descreveram a ocorrência de *S. rebaudiana* no estado do Mato Grosso do Sul, mais especificamente na região de fronteira entre a cidade de Ponta Porã e a capital de Amambay, Pedro Juan Caballero, no Paraguai.

A partir de 1971, conforme (Quadro 1), o Japão introduziu o cultivo experimental da estévia advinda do Brasil (CRAMMER; IKAN, 1986; RAMESH; SINGH; MEGEJI, 2006; SUMIDA, 1973), e conduziu relevantes pesquisas para avaliar o potencial da planta. A *Stevia rebaudiana* é uma exceção no gênero *Stevia*, pois nenhuma das, aproximadamente, 230 espécies do gênero, conseguiram produzir esses níveis de doçura (KINGHORN, 2001; SOEJARTO; KINGHORN; FARNSWORTH, 1982; KINGHORN et al., 1984).

Ainda no ano de 1970, os japoneses iniciaram o primeiro uso comercial do esteviosídeo, marcando a história da estévia, que foi utilizada para adoçar e aromatizar alimentos e bebidas, em substituição a vários adoçantes sintéticos que foram excluídos do mercado (KINGHORN, 2001).

Posteriormente, a começar de 1982, a China iniciou o cultivo em larga escala de *S. rebaudiana*. Nos Estados Unidos da América, as folhas da estévia se tornaram um chá popular. Em 1991, houve a proibição da importação das folhas da estévia, imposta pela Administração Federal de Drogas dos EUA (DE; MONDAL; BANERJEE, 2013; BLUMENTHAL, 1995). Em 1999, a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura - FAO, juntamente com a Organização Mundial da Saúde - OMS, através do seu Comitê Internacional de Especialistas Científicos - JECFA, mais o EU Comitê Científico para Alimentação Humana,

concluíram que era incabível o uso do esteviosídeo como adoçante, com base nos dados disponíveis à época (DE; MONDAL; BANERJEE, 2013).

Mais tarde, em 2004, o JECFA reexaminou o esteviosídeo e conferiu temporariamente, para os glicosídeos de esteviol, um nível de uso de 2 mg/kg de peso corporal. No entanto, no ano de 2008, o próprio comitê concluiu que os mesmos eram seguros para uso em comidas e bebidas, precisando uma dose diária aceitável de 4 mg/kg e estabelecendo especificações de pureza e teor mínimo de 95% da soma dos sete glicosídeos de esteviol que são: stevioside, rebaudioside A, rebaudioside C, dulcoside A, rubusoside, steviolbioside e rebaudioside B (DE; MONDAL; BANERJEE, 2013; FAO, 2008; FAO/WHO, 2009).

**Quadro 1.** – Histórico dos principais eventos técnicos-científicos referentes ao esteviosídeo.

<b>Sequência cronológica dos principais eventos históricos</b>	<b>Referência</b>
Relato da doçura de folhas de <i>S. rebaudiana</i> do Paraguai publicadas em um importante artigo científico.	Gosling (1901)
Primeiro relatório químico sobre os constituintes doces da <i>S. rebaudiana</i> .	Bertoni (1905)
Constatação de que o esteviosídeo é uma forma de glicosídeo.	Dieterich (1908)
Produção do composto steviolbioside glicosídeo a partir do esteviosídeo.	Wood et al. (1955)
<i>S. rebaudiana</i> advinda do Brasil cultivada experimentalmente no Japão.	Sumida (1973)
Isolamento e caracterização do glicosídeo de esteviol rebaudiosídeo A.	Kohda et al. (1976)
Início do uso extensivo de extratos de <i>S. rebaudiana</i> para adoçante e flavorizante de alimentos e bebidas no Japão.	Abe e Sonobe (1977); Akashi (1977)
Primeira aprovação de produtos da <i>S. rebaudiana</i> no Brasil.	Schwontkowski (1995)
Em 1980, as folhas de <i>S. rebaudiana</i> tornaram-se um popular chá de ervas nos EUA.	Blumenthal (1995)
Nos EUA, o rebaudiosídeo A e o esteviosídeo são considerados como produtos seguros “GRAS”.	FDA (2009)
Glicosídeos de esteviol são permitidos como aditivo alimentar pela União Europeia no final de 2011.	Stones (2011)

Adaptado de De, Mondal e Banerjee (2013); Kinghorn (2001).

## 2.9. Métodos de propagação

A estévia pode ser propagada via estacas (Figura 7) e via sementes. Entretanto, as taxas de germinação das sementes são baixas e o crescimento é lento (BRANDLE; STARRATT; GIJZEN, 1998; SIVARAM; MUKUNDAN, 2003; FELIPPE et al., 1971; FELIPPE; LUCAS, 1971; MONTEIRO, 1980; TOFFLER; ORIO, 1981). Segundo Brandle; Starratt e Gijzen (1998), o cultivo anual ou semiperene através do transplântio, finda sendo melhor no Canadá. No mesmo país, o cultivo é exclusivamente anual e a produção é realizada a partir do transplante

de baixo custo, oriundo de sementes. O seu ciclo inicia dentro de casas de vegetação aquecidas, onde as plantas ficam por 6 a 7 semanas após a sementeira. Depois, as mudas são transplantadas no campo no meio ou no fim de maio, com posterior adubação em cobertura e irrigação. A colheita da planta inteira acontece tardiamente em julho até final de setembro (BRANDLE; STARRATT; GIJZEN, 1998).

### **2.10. Propagação vegetativa:**

A propagação clonal, segundo Brandle; Starratt e Gijzen (1998), é economicamente improvável para larga escala, sendo mais indicada para pequenos plantios devido ao custo da mão de obra. Uma importante demanda para a pesquisa é viabilizar a propagação da estévia por sementes visando ao desenvolvimento de sistemas de produção mais extensivos.

De acordo com Sakaguchi e Kan (1982), a propagação vegetativa (Figura 7) é uma ferramenta limitada para a estévia, pois a quantidade de indivíduos retirados de uma única planta é baixa. Assim, Sivaram e Mukundan (2003) afirmaram que a cultura de tecidos é uma alternativa em massa para rápida propagação. Já existem algumas experiências de sucesso da cultura de tecidos de estévia (SIVARAM; MUKUNDAN, 2003; GUPTA; SHARMA; SAXENA, 2010; RAZAK et al., 2014).



**Figura 7.** Plantas obtidas a partir de estacas. Setor de viveiros e casas de vegetação da Embrapa Cerrados. **Fonte:** Fellipe Celestino de Castro, 2019.

Rakibuzzaman, Shimasaki e Uddin (2018) avaliaram, em Bangladesh, a influência da posição do corte e a utilização de hormônios na propagação vegetativa da estévia. Em vista disso, foi verificado no mesmo estudo, que o corte apical e a utilização do hormônio ácido indol butírico - IBA proporcionou alta taxa de sobrevivência de 90,9%, porcentagem de enraizamento de 73,9%, taxa de brotação de 77,6%, sendo indicado como potencializador na propagação vegetativa da estévia.

### **2.11. Propagação via sementes:**

A propagação via sementes resulta em uma grande variabilidade na população e também nos níveis de glicosídeos (SIVARAM; MUKUNDAN, 2003; TAMURA et al., 1984; NAKAMURA; TAMURA, 1985).

A viabilidade e a produtividade das sementes são afetadas quando ocorre excesso de chuva na polinização (BRANDLE; STARRATT; GIJZEN, 1998; CARNEIRO, 1990; SHUPING; SHIZHEN, 1995). As sementes são melhor estocadas com uma temperatura de 0 °C, entretanto, a germinação continua caindo abaixo de 50% durante 3 anos (SHUPING; SHIZHEN, 1995).

O peso aproximado de 1000 sementes de estévia está entre 0,15 a 0,30 gramas, e a produtividade de sementes pode alcançar mais de 8 (oito) quilos por hectare dependendo da população de plantas. A germinação comumente está abaixo de 50% (BRANDLE; STARRATT; GIJZEN, 1998; CARNEIRO, 1990; MIYAZAKI; WATANABE, 1974).

Lima Filho, Valois e Lucas (2004) recomendam não colher as folhas quando o cultivo for destinado para produção de sementes, indicando a colheita das sementes quando as inflorescências alcançarem a cor marrom, para maximizar o aproveitamento dos aquênios, evitando o carregamento pelo vento, pois os mesmos são pequenos, leves e plumosos.

Pereira et al. (2019), investigando variáveis explicativas relacionadas com a germinação de sementes de *S. rebaudiana*, utilizando modelos de regressão com o pacote “gamlss” no software R, reportaram que a posição da bandeja nas prateleiras do germinador e a condição de iluminação afetaram as proporções de plântulas normais, concluindo que a melhor proporção de plântulas normais foi na posição mais alta na prateleira onde tinha mais iluminação.

Para produção de mudas, Lima Filho, Valois e Lucas (2004) indicaram de 2 a 3 kg de sementes por hectare, considerando uma proporção de 10 a 15 gramas de sementes por metro quadrado, deixando as sementes na superfície do solo, cobrindo somente com um “sombrite”

de 50%. A utilização do sombrite é justificada para manter a umidade e para o vento não deslocar as sementes. A germinação ocorrerá de 5 a 10 dias após o plantio.

Goettemoeller e Ching (1999) avaliaram a germinação de sementes de estévia, advindas de 5 tipos de polinização: (1) polinização cruzada realizada por abelhas; (2) polinização cruzada realizada manualmente; (3) polinização cruzada realizada pelo vento através de um ventilador; (4) autopolinização manual; (5) grupo controle isolado. O efeito da luz e do escuro também foi avaliado na porcentagem de germinação. Os autores atestaram que as sementes “pretas” pesam mais que as “claras”, 0,300 e 0,178 mg respectivamente. A viabilidade das sementes escuras é bem maior, 83,7%, e 16% para as claras. Os mesmos autores também afirmam que a germinação com a utilização de luz é maior do que a germinação no escuro. Os 4 diferentes tipos de polinização aumentaram a porcentagem de germinação das sementes pretas em comparação ao controle, sugerindo uma polinização ativa a fim de alcançar a fertilização.

## **2.12. Sistema de Produção**

De acordo com Brandle; Starratt e Gijzen (1998), o grande desafio para as ações de pesquisa e desenvolvimento é converter a estévia numa planta moderna, isto é, compatível com a produção mecanizada eficiente, desenvolvendo todo o sistema de produção com plantio de sementes, com dados sobre insumos agrícolas, manejo e/ou controle de plantas daninhas, pragas, colheita e um programa de melhoramento genético a fim de otimizar o teor de glicosídeos e o potencial agronômicos das plantas.

Nesse sentido, Brandle; Starratt e Gijzen (1998) afirmaram que nenhuma produção mecanizada em grande escala foi estabelecida. Consequentemente, a comercialização em grande escala tem sido baixa devido às dificuldades na produção, qualidade insatisfatória dos extratos da estévia, entre outros.

A China possui a maior área comercial do mundo cultivada com estévia, representando 75% dos 32 mil hectares totais. Brasil, Paraguai, Tailândia, Índia, México, Canadá, Coreia do Sul e vários outros países também cultivam comercialmente a planta (HOSSAIN et al., 2017; SUMIDA, 1980; MEGEJI et al., 2005; MADAN et al., 2010).

No Japão, segundo Katayama et al. (1976), a população de plantas utilizadas nos seus experimentos foi de 40 mil a 400 mil plantas por hectare. A produção de folhas no primeiro ano aumentou com densidades entre 83 a 111 mil plantas por hectare. Já em relação à concentração de esteviosídeo, Metivier e Viana (1979) afirmam que o comprimento do dia aumenta o tempo de acúmulo do edulcorante nas folhas. Destarte, a produção de estévia seria melhor em regiões

com dias longos, onde o período vegetativo seria longo, afim de uma maior produção de esteviosídeo (BRANDLE; STARRATT; GIJZEN, 1998).

Gomes et al. (2018), estudando 3 densidades de plantas de estévia, no sul do Brasil (166 mil, 83 mil e 33 mil plantas por hectare, com espaçamento entre linhas e plantas de 0,60 x 0,50 m, 0,40 x 0,30 m e 0,30 x 0,20 m, respectivamente) concluíram que a população de 166 mil plantas por hectare, associada com a colheita no começo do florescimento, produziu maior quantidade de fitomassa e concentração de esteviosídeo.

Na Índia, a estévia pode ser transplantada de fevereiro a março. O florescimento transcorreria entre o 54° ao 104° dia após o transplante e, no final do verão, a colheita de sementes se iniciaria (MADAN et al., 2010; METIVIER; VIANA 1979).

A fertilidade do solo requerida pela estévia de cultivo anual é moderada (BRANDLE; STARRATT; GIJZEN, 1998). Segundo Katayama et al. (1976), no Japão, a fitomassa seca total acumulada da *S. rebaudiana* foi de 1,4% de nitrogênio (N), 0,3% de fósforo (P) e 2,4% de potássio (K), sendo assim requeridos por essa fitomassa seca, 105 kg de N, 23 kg de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e 180 kg de K<sub>2</sub>O por hectare.

Lima Filho, Valois e Lucas (2004) recomendaram a incorporação com anterioridade de 15 dias da implantação da cultura, 30 a 50 toneladas por hectare de esterco bovino curtido ou 10 a 15 toneladas por hectare de esterco de aviário. No plantio, os mesmos autores indicam 20 kg de N por hectare (ha) e 20 dias após, mais 40 kg de N por ha. A cada corte, utilizar 70 kg de N por ha para cada 1.000 kg de folhas secas colhidas, dividindo 30% após o corte, e 70%, 20 dias após a primeira aplicação. Para o fósforo, sugere-se, 40 kg de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> por ha no plantio e a cada corte, fazer a adubação de manutenção. Assim, para cada 1.000 kg de folhas secas produzidas, aplicar 20 kg de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> na linha em seguida ao corte. Quanto ao potássio, os mesmos autores propõem, no plantio, a quantidade de 30 kg/ha de K<sub>2</sub>O e após cada corte, utilizar 70 kg de K<sub>2</sub>O para cada 1000 kg de folhas secas colhidas, segmentado 30% após o corte e 70% aos 20 dias logo após a primeira aplicação.

Utumi et al. (1999), avaliando a deficiência de macronutrientes em estévia, concluíram que a deficiência de K, Ca e S diminuem a quantidade de esteviosídeo nas folhas, assim como Lima Filho, Malavolta e Yabico (1997), concluíram que a severa deficiência de Ca provoca redução no teor de esteviosídeo nas folhas.

Duas doenças causadas por fungos foram reportadas no cultivo da estévia no Canadá, sendo elas *Septoria steviae* e *Sclerotinia sclerotiorum* (BRANDLE; STARRATT; GIJZEN, 1998; LOVERING; REELEDER, 1996; CHANG et al., 1997).

Lima Filho, Valois e Lucas (2004) apontaram, além dos citados acima, a detecção dos fungos *Alternaria steviae*, *Sclerotium rolfsii*, e também, com solo muito úmido, é capaz de se verificar o aparecimento de *Rhizoctonia*. A ocorrência do ataque de insetos-praga não é significativa, mas são citados: pulgões, cochonilhas, lepdópteros, dípteros, moluscos, formigas, aranhas e nematoides de galhas, dentre outros (LIMA FILHO; VALOIS; LUCAS, 2004).

A estévia, por sua lenta formação, não compete bem com plantas daninhas. Por isso, o controle e/ou manejo deve ser essencial para o sucesso da cultura. Segundo Katayama, (1976), o herbicida trifluralina mostra-se bem tolerado pela *S. rebaudiana* (BRANDLE; STARRATT; GIJZEN, 1998).

A estévia é colhida imediatamente antes do florescimento, quando o esteviol está em seu nível máximo de concentração nas folhas (BRANDLE; STARRATT; GIJZEN, 1998; SUMIDA, 1980; XIANG, 1983). Depois da colheita, a planta inteira é secada e as folhas secas são separadas das hastes (BRANDLE; STARRATT; GIJZEN, 1998; MURAI, 1988).

Segundo Goyal, Samsher e Goyal (2010), o pH do solo deve ser entre 6,5-7,5. Solos salinos devem ser evitados. Os autores reportaram ainda o sucesso do cultivo em larga escala motivado pela alta demanda em vários estados da Índia.

### **2.13. Irrigação:**

A estévia é uma planta que demanda muita água, segundo Fronza e Folegatti, (2003) a evapotranspiração da cultura foi de 5,44 mm.dia<sup>-1</sup> na fase de maior desenvolvimento (51 aos 80 dias), possuindo alta sensibilidade à deficiência hídrica. Seu sistema radicular gira entre 15 a 25 cm de profundidade, de acordo com Lima Filho, Valois e Lucas (2004). A cultura é bem responsiva à irrigação, conferindo maiores rendimentos de massa seca, vigor e velocidade no rebrote após a colheita (LIMA FILHO; VALOIS; LUCAS, 2004).

Lima Filho, Valois e Lucas (2004) e Caballero, Alcaraz e Mayeregger (2013) verificaram em seu estudo executado no Paraguai, que a estévia utilizou em média 1,78, 2,10 e 6,30 milímetros por dia, respectivamente, do corte até 20 dias, de 21 a 46 dias e de 47 a 70 dias depois do corte. No período após 47 dias, a estévia mostrou máxima cobertura vegetal com a ocorrência de florescimento e maturação. Caballero, Alcaraz e Mayeregger (2013) ainda reportaram os coeficientes de cultivo (Kc) de: 0,25, 0,56 e 0,82 para os períodos acima citados, na devida ordem.

### **2.14. Variedades:**

No Japão, de acordo com Lima Filho, Valois e Lucas (2004), foram selecionadas 28 variedades apresentando grande variação no teor de glicosídeos, que juntamente com características morfológicas são considerados fatores de alta herdabilidade. Já no Canadá, o melhoramento da estévia ocorreu por meio da indução genética, que culminou no desenvolvimento de uma variedade insensível ao fotoperíodo, que foi patenteada pela Royal Sweet International Technologies Ltda. Nos EUA, a obtenção de clones de estévia com ótimas características fenotípicas ocorreu por meio do tratamento de sementes com colchicina (LIMA FILHO; VALOIS; LUCAS, 2004).

No Brasil, Lima Filho, Valois e Lucas (2004) afirmaram que os plantios são advindos de sementes de meio-irmãos, sem cultivares identificadas e adaptadas para os diversos ambientes. O desenvolvimento de cultivares adaptadas aos diferentes ambientes no Brasil é uma importante demanda para ações de pesquisa e desenvolvimento.

#### **2.15. Colheita, Secagem e Armazenamento:**

Lima Filho, Valois e Lucas (2004) indicam a colheita das folhas quando 5% dos botões florais ficarem abertos, devido à máxima presença de esteviosídeo nessa fase. Ademais, as flores são classificadas como impurezas para a indústria. A colheita manual é realizada com ferramentas de corte, em que se realiza a poda da planta inteira, dois centímetros acima do solo. A colheita mecanizada pode ser efetivada com segadeira específica, seguindo as mesmas recomendações da colheita manual. A produtividade média de cultivos bem conduzidos é de 4.000 kg por ha de folhas secas, sendo os demais cortes, realizados entre 70 e 90 dias, concluindo 4 cortes por ano. A renovação é indicada a cada 5 ou 6 anos do plantio (LIMA FILHO; VALOIS; LUCAS, 2004).

Mengesha, Geja e Damtew (2014) relataram que na Etiópia, na safra 2010/2011 e 2011/2012, a produção de folhas secas por planta foi de 7,26 a 9,04 gramas, conferindo 6.000 kg por hectare de folhas secas, com concentrações de esteviosídeo entre 9,07 e 10,35%.

A secagem das folhas e ramos ao sol por 6 horas deve ser sobre uma superfície de plástico ou de alvenaria, semelhante aos “terreiros de secar café”, sem sobreposição. O ponto ideal de umidade para o armazenamento das folhas é em torno de 10 a 12% de teor de água e/ou quando as folhas ficam quebradiças. Entretanto, antes do armazenamento, as folhas são separadas dos ramos com o uso de um “rastelo” próprio (LIMA FILHO; VALOIS; LUCAS, 2004).

Lima Filho, Valois e Lucas (2004) anotaram que as folhas com cor “verde escura” sem impurezas (ramos, flores, sementes, etc) devem ser embaladas em sacos de fibra sintética ou “juta” com 10 quilos. De acordo com os mesmos autores, os sacos devem ser protegidos em ambientes secos, escuros e limpos, tendo potencial de ficarem armazenados por um a dois anos e, a coloração “verde clara” nas folhas caracteriza depreciação, sugerindo armazenamento inadequado.

### **2.16. Comercialização:**

A classificação das folhas de estévia no Brasil, segundo Lima Filho, Valois e Lucas (2004), seguem rigorosos critérios, procedimentos e uma tabela de ágios e deságios, sendo realizada pela indústria processadora, que considera 6% de porcentagem mínima de esteviosídeo. As folhas utilizadas na classificação devem apresentar 12% de umidade. A única indústria compradora no Brasil no ano de 2004, conforme relatado por Lima Filho, Valois e Lucas (2004), adquiria folhas de estévia ao preço médio de R\$ 2,40 por quilo, posto na fábrica, sem a aplicação da tabela de ágios e/ou deságios.

De acordo com Ciriminna et al. (2019), o mercado global de estévia em 2017 foi cerca de US\$ 417 milhões em receitas e a previsão é que alcance US\$ 721 milhões em 2024, crescendo a uma taxa de 8,2% ao ano. Na China em 2017 a tonelada de Reb. A com 95% de pureza foi comercializada em média a US\$ 77 mil.

### **2.17. Uso na Indústria**

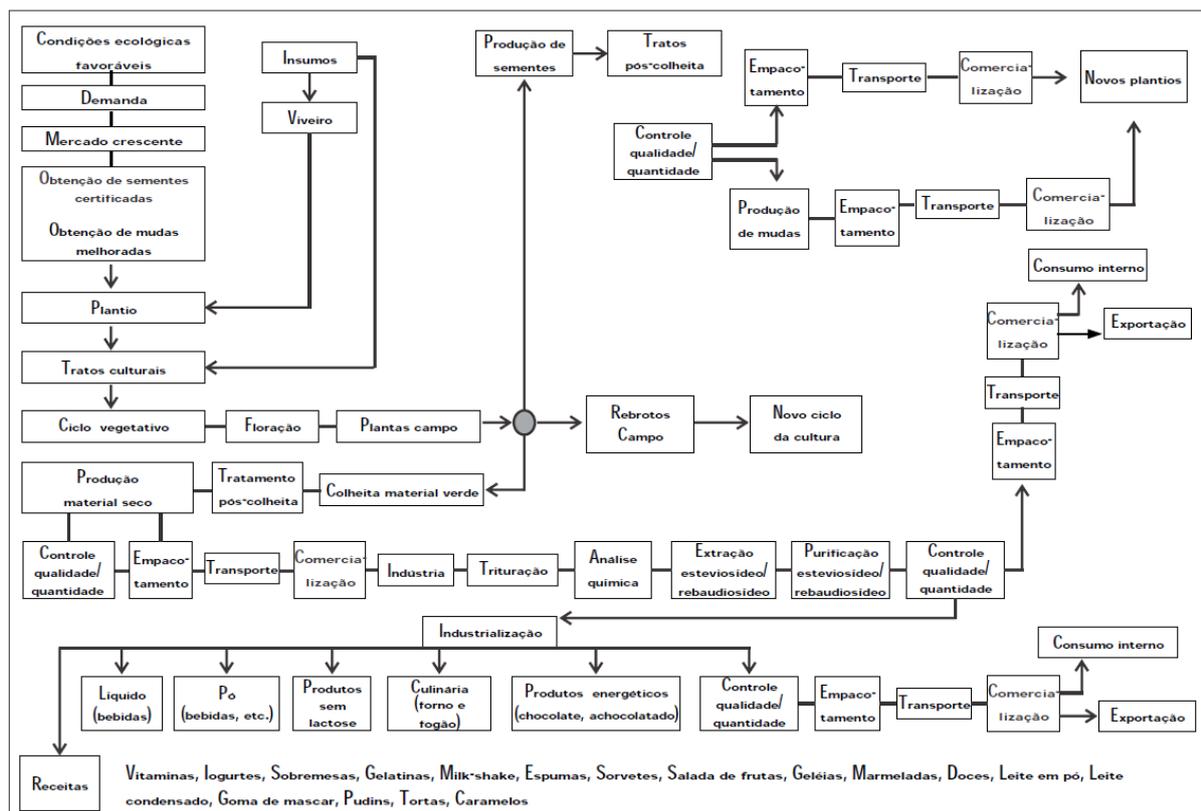
A estévia possui, em suas folhas, glicosídeos diterpênicos que são substâncias edulcorantes, com alto poder de adoçante. Esses glicosídeos, individualmente, têm um poder superior de adoçar em relação à sacarose, da forma que segue: esteviosídeo (250-300 vezes), esteviobiosídeo (100-125 vezes), rebaudiosídeo-A (350-450 vezes), rebaudiosídeo-B (300-350 vezes), rebaudiosídeo-C (dulcosídeo B) (50- 120 vezes), rebaudiosídeo-D (200-300 vezes), rebaudiosídeo-E (250-300 vezes), dulcosídeo-A (50-120) (LIMA FILHO; VALOIS; LUCAS, 2004).

De acordo com Goyal, Samsher e Goyal (2010), as folhas da estévia selvagem contém 0,3% de dulcosídeo; 0,6% de rebaudiosídeo C; 3,8% de rebaudiosídeo A; e 9,1% de esteviosídeo.

No entanto, Lima Filho, Valois e Lucas (2004) afirmam que o esteviosídeo possui de 5 a 15% da matéria seca foliar, o rebaudiosídeo tem 3 a 6% e o esteviosídeo é aplicado como

edulcorante em diversos alimentos, conforme mostra a (Figura 8), que apresenta todo o processo da cadeia agroindustrial da estévia e os diversos usos nos alimentos.

A exploração comercial da estévia segundo Yadav et al. (2011) cresceu devido ao avanço dos estudos japoneses na extração e refinamento do adoçante advindo das folhas da espécie. Progressos na metodologia de obtenção dos edulcorantes, tornaram possível a extração mais simples somente com água, similar à do açúcar.



**Figura 8.** Cadeia agroindustrial da estévia (LIMA FILHO; VALOIS; LUCAS, 2004)

### 2.18. Melhoramento genético

Segundo Tavarini, Passera, Angelini (2018) e Wölwer-Rieck (2018), o melhoramento genético consiste na aplicação de diversas técnicas pelos melhoristas com objetivo de melhorar a composição genética das culturas de acordo com seu interesse. Assim, várias formas de cruzamentos são utilizadas para a reprodução das espécies como: autopolinização, polinização cruzada e propagação vegetativa.

A *S. rebaudiana*, por ser uma espécie de polinização cruzada, envolve em sua seleção genótipos mistos, gerando a necessidade da mudança na frequência gênica dos alelos desejáveis, garantindo um alto grau de heteroziguidade (CALIGARI, 2001; TAVARINI, PASSERA, ANGELINI, 2018; WÖLWER-RIECK, 2018).

A maioria dos programas de melhoramento de estévia é baseada no método convencional que consiste na seleção e cruzamento entre vários genótipos desejáveis. Ademais, esse método, aliado à descrição química, visa melhorar as características de qualidade concomitantemente ao programa de seleção (TAVARINI, PASSERA, ANGELINI, 2018; WÖLWER-RIECK, 2018).

Segundo Tavarini, Passera, Angelini (2018) e Wölwer-Rieck (2018), Japão, China, Coreia do Sul e Taiwan são os que mais buscaram, através de pesquisas, o melhoramento de variedades da *S. rebaudiana*, e registraram sucesso no programa de melhoramento através da seleção e cruzamento, conseguindo novas variedades com melhoria na quantidade de glicosídeos e alta produtividade de folhas. Algumas dessas novas variedades são: Sunweon 2, caracterizada pelo seu alto teor de esteviosídeo e alta produção de folhas; Sunweon 11, descrita como elevada quantidade de Rebaudiosídeo A – Reb. A; as variedades K1, K2 e K3, qualificadas pela alta produtividade e boa relação entre o Reb. A e Esteviosídeo; Zongping, definida pela ampliada presença de Reb. A e Esteviosídeo nas folhas; SM4 com alta presença de Reb. A e Esteviosídeo aliada à alta produtividade (YADAV et al., 2011; SHARMA et al., 2016; LEE; KANG; LEE, 1979; SHIZHEN, 1995; LEE; KANG; PARK, 1982; WENG; SUN; ZANG, 1996; TAVARINI, PASSERA, ANGELINI, 2018; WÖLWER-RIECK, 2018).

Lima Filho, Valois e Lucas (2004) classificaram como importante na seleção da estévia: obtenção de populações homogêneas resistentes a pragas e doenças, com alto teor de glicosídeos; alta produção de massa foliar com maior número de hastes e ramificações; produção de sementes viáveis, menos exigentes em nutrientes; tolerância à seca; insensibilidade ao fotoperíodo e à altitude, entre outros.

A *S. rebaudiana* e outras espécies do gênero *Stevia* originadas da América do Sul são diplóides com  $2n=2x=22$  cromossomos (CAPONIO et al., 2016; LI et al., 1982; FREDERICO et al., 1996; OLIVEIRA et al., 2004; GALIANO, 1987; WULFF; HUNZIKER; ESCOBAR, 1996).

Segundo Brandle, Starratt e Gijzen (1998), uma variedade de métodos de melhoramento vem sendo utilizada para aumentar a produtividade de folhas da estévia e também a concentração de rebaudiosídeo. Fundamentando-se em características de cultivares do Japão, China, Coreia do Sul e Canadá, acredita-se que existe variação genética suficiente para conferir ganhos de produtividade e concentração de edulcorantes significativos através da genética (BRANDLE; STARRATT; GIJZEN, 1998; BRANDLE; ROSA, 1992; LEE; KANG; LEE, 1979; MORITA, 1987; SHYU et al., 1994; SHIZHEN, 1995).

O estudo da variabilidade genética através da caracterização de acessos e genótipos é prática primordial em bancos ativos de germoplasma e também em programas de melhoramento genético que integram informações de identificação, descrição e diferenciação de acessos e genótipos. Para tanto, várias características qualitativas e quantitativas são mensuradas, que podem ser descritores morfológicos, ou seja, caracteres geralmente regulados por poucos genes, fortemente herdáveis, que propendem à baixa interação genótipo vs. ambiente (BURLE; OLIVEIRA, 2010; FALEIRO et al., 2016).

De acordo com Daher (1997), a intensificação do número de descritores avaliados pode causar informações repetitivas, devido à possibilidade de correlação positiva entre as características.

Desse modo, a eliminação de descritores supérfluos se mostra favorável, pois reduziria o trabalho de coleta de dados, evitando a imprecisão na caracterização (PEREIRA et al., 1992).

Para Ledo et al. (2011), o nível de entropia pode ser aplicado com o intuito de dimensionar a variabilidade existente em descritores qualitativos através da observação das frequências relativas das classes para cada descritor estudado.

Inicialmente, a entropia clássica foi aplicada à termodinâmica apresentada por Ludwig Boltzmann em 1866, que posteriormente foi retificada por Gibbs. Já em 1948, Shannon estendeu a utilização da entropia para a área da teoria da informação, seguida pela entropia de Rényi que se processa como um parâmetro da diversidade ou aleatoriedade de um sistema e também como medida de emaranhamento na área de informação quântica (ASSIRATI, 2014; COSTA; GOLDBERGER; PENG, 2005; JOST, 2006; GIANCARLO; SCATURRO; UTRO, 2009; HASTINGS et al., 2010; RENYI, 1961).

Segundo Hill (1973), a entropia pode ser empregada em ecologia no campo da biodiversidade a fim de agrupar espécies em distribuições geográficas. A entropia na área da biologia concerne ao nível de aleatoriedade ou desordem em qualquer sistema físico onde se realiza o estudo da diversidade e equitabilidade de uma população. Nesse sentido, quanto maior a desordem, maior a variação do sistema, e assim, maior o grau de entropia.

Padilha, Sosinski e Barbieri (2016), utilizaram a entropia para avaliar 47 descritores em 21 acessos de pimenta *Capsicum baccatum* e *C. chinense*, a fim de uma perspectiva da variabilidade genética de cada descritor.

De acordo com Brandle e Rosa (1992), a hereditariedade da concentração de esteviosídeo é alta, 83% entre meio-irmãos. O rendimento foliar é de 75%, e a relação folha/haste de 83%, sendo considerados eficazes para seleção. Em algumas linhagens de estévia

na China, foi descrito que a concentração total de glicosídeo foi maior que 20,5% e no Japão, foi apresentado na literatura de patentes que a relação rebaudiosídeo/esteviosídeo foi de 9/1 (BRANDLE; STARRATT; GIJZEN, 1998; MORITA, 1987; SHIZHEN, 1995).

Oliveira et al. (2004), estudando diferentes estirpes de *S. rebaudiana* a fim de identificar o número de cromossomos e algumas características morfológicas e compará-las com o nível de ploidia, concluíram que, apesar da esterilidade masculina presente nas linhagens, indivíduos poliploides podem apresentar maiores concentrações de esteviosídeo do que plantas diploides. Ainda de acordo com o mesmo estudo, houve uma relação positiva entre o tamanho do pólen ou estômatos e o nível de ploidia. As estirpes tetraploides tinham folhas e inflorescências maiores; já as triploides, comparadas às diploides, não tiveram diferença significativa para folhas.

Segundo Brandle, Starratt e Gijzen (1998), algumas cultivares com alto teor de Rebaudiosídeo A, desenvolvidas no Japão e na Coreia do Sul, só podem ser reproduzidas vegetativamente. A seleção dessas cultivares foi baseada na seleção de uma única planta, limitando assim o seu uso devido à autoincompatibilidade das mesmas. Divergente da seleção acima, Morita (1987) e Shizhen (1995) adotaram a seleção massal e a seleção recorrente fenotípica.

Nakamura e Tamura (1985) arremataram em sua pesquisa, que contou com 300 plantas aleatórias, que a quantidade de glicosídeo nas fases de plântula e de colheita não se correlaciona, reprovando a seleção antecipada para glicosídeos totais. Apesar disso, os autores, referindo-se somente aos glicosídeos de forma individual, em relação aos glicosídeos totais, comprovam que existe correlação entre as fases de plântula e colheita, sendo possível a seleção antecipada para composição de glicosídeo individual (BRANDLE; STARRATT; GIJZEN, 1998)

Contudo, atestaram também uma grande variação no teor dos 4 principais glicosídeos, sendo que esteviosídeo e dulcosídeo A, e esteviosídeo e rebaudiosídeo A e C têm correlação positiva entre si. Shibata et al. (1991) explicam que os glicosídeos individuais podem servir de substrato para outros, como o esteviosídeo serve de substrato para a biossíntese do rebaudiosídeo A. Portanto, plantas com alto teor de reb. A provavelmente contêm baixos teores de esteviosídeo (BRANDLE; STARRATT; GIJZEN, 1998), conforme mostrado no (Quadro 2) (Adaptado de YADAV et al., 2011), que destaca essa correlação negativa bem como outras importantes correlações.

**Quadro 2.** Principais estudos técnico-científicos referentes a correlações de características da planta com a quantidade de esteviosídeo.

<b>Características</b>	<b>Correlação</b>	<b>Características</b>	<b>Referência</b>
Altura de Planta, Quantidade de folhas	+ ve	Produção de fitomassa	Buana e Goenadi (1985)
Altura de Planta	Sem correlação	Produção, número de folhas, número de perfilhos	Buana (1989)
Teor de Esteviosídeo	+ ve	Carboidrato solúvel total	Nishiyama et al. (1991)
Teor de Esteviosídeo	Sem correlação	Produtividade, relação folha/haste,	Brandle e Rosa (1992)
Produtividade de folhas secas	+ ve	Tamanho e espessura da folha	Shyu et al. (1994)
Rebaudiosídeo A	+ ve	Espessura da folha	Shyu et al. (1994)
Produtividade matéria seca	+ ve	Altura de Planta, número de perfilhos, quantidade de folhas e matéria seca por planta	Chalapathi, Thimmegowda e Sridhara, (1998)
Peso de folha seca por planta	+ ve	Produtividade	Shu e Wang (1988)
Teor de Esteviosídeo	+ ve	Superfície da folha, número de raízes	Truong et al. (1999)
Teor químico do último par de folhas expandidas	+ ve	Status nutricional da planta	Utumi et al. (1999)
Teor de Reb. A	+ ve	Área foliar, taxa fotossintética, teor de clorofila e proteína	Weng, Sun e Zang (1996)
Esteviosídeo	- ve	Reb. A	Nakamura e Tamura (1985)

Adaptado de Yadav et al. (2011).

### **2.19. Uso de marcadores moleculares no melhoramento genético**

O uso de marcadores moleculares na seleção de espécies vegetais é um procedimento que vem sendo utilizado para resolver problemas associados à seleção por fenótipos, pois é aplicado para selecionar indivíduos através da identificação dos genes de interesse. Os marcadores moleculares não são influenciados pelo ambiente, e os genes podem ser identificados nos estádios iniciais de desenvolvimento. Dessa forma, os marcadores podem ser utilizados para identificar a diferença genética dentro ou fora de populações e/ou entre progênies (FRANCIA et al., 2005; TAVARINI, PASSERA, ANGELINI, 2018; WÖLWER-RIECK, 2018).

Os marcadores moleculares do tipo RAPD, que significa “DNA polimórfico amplificado ao acaso”, são eficientes em produzir marcadores com grande polimorfismo, consumindo pouco tempo e com baixo custo de operação. Esses marcadores são amplamente utilizados para estimar a diversidade genética de plantas provenientes de diferentes regiões geográficas (THIYAGARAJAN; VENKATACHALAM, 2015; TAVARINI, PASSERA, ANGELINI, 2018; WÖLWER-RIECK, 2018).

Outra aplicação dos marcadores moleculares é a construção de mapas genéticos de ligação. O primeiro mapa genético da *S. rebaudiana* foi elaborado por Yao, Ban e Brandle (1999), utilizando marcadores RAPD e dados de uma população segregante na primeira geração de um cruzamento.

Chester et al. (2013) avaliaram a genética e a variação metabólica da *S. rebaudiana* em diferentes regiões da Índia, assim como Thiyagarajan e Venkatachalam (2015), e concluíram existir uma forte correlação entre a composição das variações bioquímicas e o polimorfismo do DNA. Assim, os marcadores moleculares têm um grande potencial de identificar e certificar acessos com alta produtividade de esteviol glicosídeos (TAVARINI, PASSERA, ANGELINI, 2018; WÖLWER-RIECK, 2018).

Faleiro et al. (2006), analisando a variabilidade fenotípica e genotípica em populações de estévia com suporte em características morfológicas, agrônômicas e moleculares, com o intuito de amparar programas de seleção e melhoramento genético da espécie para o bioma Cerrado, mostram que as plantas apresentaram alta variação fenotípica para altura de planta, perfilhamento, quantidade de folhas, aspecto fitossanitário e período juvenil.

Quanto à caracterização molecular, os 9 *primers* utilizados, originaram 69 marcadores RAPD, em que 71% desses foram polimórficos. As distâncias genéticas da população estudada foram de 0,134 a 0,307. A avaliação do agrupamento e dispersão gráfica indicam a existência de no mínimo quatro grupos de origem genética distinta, concluindo assim, através das características morfoagronômicas e dos marcadores RAPD, a variabilidade genética das plantas de estévia ora estudadas.

## **2.20. Perspectivas de demanda comercial**

A estévia vem ganhando expressiva popularidade em diversos países devido ao seu potencial de se tornar importante fonte de adoçante no mundo. Além de ser natural e zero calorias, é reconhecida como uma excelente substituta do açúcar e outros adoçantes (HOSSAIN

et al., 2017; KHAN; CHOWDHURY; KARIM, 2012). O Quadro 3 mostra a distribuição de empresas produtoras de esteviosídeo em diversos países.

**Quadro 3** – Principais empresas de fabricação de esteviosídeo por país.

<b>China</b>	<b>Coreia do Sul</b>	<b>Hong-Kong</b>	<b>África do Sul</b>	<b>Brasil</b>
Shandong Shengwang Group Pharmaceutical Ganzhou Julong High-tech Industrial Co. GLG Life Tech Corp. Ministry of Ningbo Dekang Biochem Co. e mais de 400 outras empresas	KOTRA Daepyeong Ginseng Korea Macrocare Tech	Yurui (Shanghai) Chemical Co. Sunrise Health Co.	Globaltrade	Stevia Comercial Exportadora Steviafarma Industrial S/A
<b>Canadá</b>	<b>Japão</b>	<b>Taiwan</b>	<b>Índia</b>	<b>Paraguai</b>
Ferlow Brothers	Morita Kagaku Kogyo Co. Tokiwa Phytochemical Co. Tama Biochemical Co.	Kasmac Industries Co.	Golden Trees Bio Tech Pvt. Ltd. Biosweet Ventures GoGreen Pvt. Ltd.	SteviaLand International Agrolife
<b>Argentina</b>	<b>EUA</b>	<b>Austrália</b>	<b>Alemanha</b>	<b>Polônia</b>
QuFu Natural Green Project Co.	NuSci Institute Daimoku Power PharmBrand USA LLC Stevia	Lancer Biomed Pvt. Ltd. Herbin Biotech Inc.	B&S Naturwelten UG Mangostan- Gold Eco-Nature	PHZ Libra Trade Lukasz Kirzynski Agrol

Adaptado de De, Mondal e Banerjee (2013).

No Canadá, a cultura da estévia, segundo Brandle; Starratt e Gijzen (1998), é uma nova oportunidade para agricultores, dado o mercado existente e também para pesquisadores, pois existe uma grande demanda por informações quanto às suas práticas de produção, plantio, colheita, recomendação de fertilizantes e várias outras informações afim de otimizar a produção.

Lima Filho, Valois e Lucas (2004) reportaram que no Brasil há uma tendência de consumo de adoçantes não calóricos, seguindo o caminho de países da América do Norte e Europa. O consumo de açúcar pelos brasileiros passou por uma diminuição importante, seguindo países das regiões supracitadas. No Brasil, o consumo de açúcar chegou a 62 kg per

capita por ano em 1995, diminuindo para 53 kg em 2002. Segundo o mesmo estudo, o consumo de açúcar no Brasil deve se equilibrar em torno de 40 kg por habitante por ano favorecendo a demanda de adoçantes naturais não calóricos como a estévia, competindo com os adoçantes químicos como ciclamato, sacarina, aspartame, entre outros.

A estévia é segura para pessoas com diabetes pois não altera a quantidade de açúcar no sangue, podendo ser utilizada em alimentos, pastas dentais, medicamentos e outros; não tem efeitos renais e neurológicos, sendo o oposto de adoçantes artificiais; podendo efetivamente ser uma substituta do açúcar (GOYAL; SAMSHER; GOYAL, 2010).

Yadav et al. (2011) apontaram que produtos como o adoçante de estévia irão crescer devido ao interesse dos consumidores em produtos naturais, sendo suportados pelas variedades melhoradas com alta quantidade e qualidade de diterpênico e rebaudiosídeo A, que não têm o sabor amargo no final.

Mengesha, Geja e Damtew (2014) afirmaram que até 2009, a estévia foi utilizada em mais de 6 mil produtos como refrigerantes, alimentos, medicamentos, entre outros, assim, direcionando-se para se tornar uma *commodity* como o açúcar.

Em 2014, segundo Mengesha, Geja e Damtew (2014), foram consumidas em todo o mundo cerca de 160 milhões de toneladas de açúcar. Ainda segundo os mesmos autores, a Organização Mundial da Saúde estima que a estévia vai ocupar 20% do mercado de açúcar no mundo e o preço das folhas secas girou em torno de U\$ 14,44 a U\$81,71 o quilo, em 2014.

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, K.; SONOBE, M. Use of stevioside in the food industry. **New Food Industry**, v. 19, p. 67-72, 1977.

AKASHI, H. Present status and prospect for stevioside for utilization. **Shokuhin Kogyo**, v. 20, n. 24, p. 20-26, 1977.

ANDREATA, R. H. P.; TRAVASSOS, O. P. **Chaves para determinar famílias de: pteridophyta, gymnospermae, angiospermae**. Editora Universitária Santa Ursula, 1994.

ASSIRATI, L. **Entropia aplicada ao reconhecimento de padrões em imagens**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2014.

AURICCHIO, M. T. et al. Pesquisa de adoçantes não calóricos sintéticos em adoçante natural de *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 2, p. 53-61, 1989.

BARROSO, G. M. et al. Sistemática das angiospermas do Brasil. v.3, **UFV, Viçosa, Minas Gerais**, p. 237-315, 1991.

BERTONI, M. S. Le Ka'a he'e Sa nature et ses proprietes. **Anales Científicos Paraguayos**, v. 5, n. 1, 1905.

BLUMENTHAL, M. FDA lifts import alert on stevia. Herb can be imported only as dietary supplement; future use as a sweetener is still unclear. **HerbalGram**, v.35, p. 17-18, 1995.

BRANDLE, J. E.; ROSA, N. Heritability for yield, leaf: stem ratio and stevioside content estimated from a landrace cultivar of *Stevia rebaudiana*. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 72, n. 4, p. 1263-1266, 1992.

BRANDLE, J. E.; STARRATT, A. N.; GIJZEN, M. *Stevia rebaudiana*: Its agricultural, biological, and chemical properties. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 78, n. 4, p. 527-536, 1998.

BUANA, L. Determination of the required growth variables in a stevia agronomic experiment. **Menara Perkebunan**, v. 57, p. 29-31, 1989.

BUANA, L.; GOENADI, D. H. A study on the correlation between growth and yield in *Stevia*. **Menara perkebunan**, v. 53, p. 68-71, 1985.

CABALLERO, R. E. G.; ALCARAZ, J. R. P.; MAYEREGGER, E. Necesidad de agua para el cultivo de estevia (*Stevia rebaudiana* Bert.), calculado sobre la base de lectura de microlisímetro. **Investigación Agraria**, v. 4, n. 2, p. 19 - 24, 2013.

CABRERA, A. L. Flora de la Provincia de Jujuy. Buenos Aires: Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuaria, Cap. 10: Compositae, p. 726, 1978.

CABRERA, A. L.; HOLMES, W. C.; MCDANIEL, S. Stevia, Compositae III. **Flora del Paraguay**, v. 25, p. 302-330, 1996.

CALIGARI, Peter Ds. Plant Breeding and Crop Improvement. **eLS**, [s.l.], p.1-8, 19 abr. 2001.

CAPONIO, I. et al. Aspectos de la biología reproductiva de *Stevia rebaudiana* (Asteraceae). **Bonplandia**, v. 25, n. 1, p. 59-72, 2016.

CARNEIRO, J. W. P. *Stevia rebaudiana* (Bert) Bertoni: produção de sementes. **Maringá: Fundação Universidade Estadual de Maringá**, 1990.

CEUNEN, S. et al. Diterpene glycosides from *Stevia phlebophylla* A. Gray. **Carbohydrate research**, v. 379, p. 1-6, 2013.

CHALAPATHI, M. V.; THIMMEGOWDA, S.; SRIDHARA, S. Correlation studies in stevia. **The Indian Journal of Agricultural**, v. 42, p. 137-138, 1998.

CHANG, K. F. et al. First Report of Stevia as a Host of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease**, [s.l.], v. 81, n. 3, p.311-311, mar. 1997.

CHESTER, K. et al. Genetic and metabolic diversity in *Stevia rebaudiana* using RAPD and HPTLC analysis. **Pharmaceutical biology**, v. 51, n. 6, p. 771-777, 2013.

CIRIMINNA, R. et al. A bioeconomy perspective for natural sweetener Stevia. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 13, n. 3, p. 445-452, 2019.

COSTA, M.; GOLDBERGER, A. L.; PENG, C.-K. Multiscale entropy analysis of biological signals. **Physical review E**, v. 71, n. 2, p. 021906, 2005.

COUSINS, F. G. Chance for the West: Growing the new sugar plant. **Western Morning News, Devon, January**, v. 6, 1942.

CRAMMER, B.; IKAN, R. Sweet glycosides from the Stevia plant. **Chemistry in Britain.**, v. 22, p. 915-917, 1986.

DAHER, R. F. et al. Seleção de caracteres morfológicos discriminantes em capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 26, n. 2, p. 247-258, 1997.

DE, S.; MONDAL, S.; BANERJEE, S. **Stevioside: technology, applications and health**. John Wiley & Sons, 2013.

DIETERICH, K. The constituents of *Eupatorium rebaudianum*, 'Kaa-he-e' and their pharmaceutical value. **Pharmazeutische Zentralhalle**, v. 50, p. 435-458, 1908.

FALEIRO, F. G. et al. Variabilidade em população de *Stevia rebaudiana* como subsídio para a seleção e melhoramento genético. **Embrapa Cerrados-Fôlder/Folheto/Cartilha (INFOTECA-E)**, 2006.

FALEIRO, F.G. et al. Importância da caracterização dos recursos genéticos do maracujazeiro. In: JESUS, O.N.; OLIVEIRA, E.J.; FALEIRO, F.G.; SOARES, T.L.; GIRARDI, E.A. (Eds.) **Descritores morfoagronômicos ilustrados para *Passiflora* spp.** Brasília, DF: Embrapa. p. 8-17, 2016.

FDA. **Agency Response Letter GRAS Notice No. GRN 000287 - Purified Steviol Glycosides with Rebaudioside A and Stevioside As the Principal Components.** 2009.

Disponível em:

<<http://wayback.archiveit.org/7993/20171031050944/https://www.fda.gov/downloads/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/UCM269264.pdf>>. Acesso em: 17 mar. 2019.

FELIPPE, G. M. et al. Observações a respeito de germinação de *Stevia rebaudiana* Bert. **Hoehnea**, v. 1, p. 81–93, 1971.

FELIPPE, G. M.; LUCAS, N. M. C. Estudo da viabilidade dos frutos de *Stevia rebaudiana* Bert. **Hoehnea**, v. 1, p.95–105, 1971.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO), WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **List of Substances Scheduled for Evaluation and Request for Data.** Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Seventy-Third Meeting, Food Additives and Contaminants, Geneva, 2009.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO), WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Steviol Glycosides.** FAO JECFA Monographs 5. Rome: Food and Agriculture Organization, 2008.

FRANCIA, E. et al. Marker assisted selection in crop plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 82, n. 3, p. 317-342, 2005.

FREDERICO, A. P. et al. Chromosome studies in some *Stevia*. Cav.(Compositae) species from Southern Brazil. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 19, n. 4, p. 605-609, 1996.

FRONZA, D.; FOLEGATTI, M. V. Consumo de água da cultura de estévia (*Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni) estimado por microlisímetro. **Scientia Agricola**, v. 60, n. 3, p. 595-599, 2003.

GALIANO, N. G. Estudios cromosomicos en especies argentinas de *Stevia* (Compositae). **Darwiniana**, v. 28, p. 311-315, 1987.

GIANCARLO, R.; SCATURRO, D.; UTRO, F. Textual data compression in computational biology: a synopsis. **Bioinformatics**, v. 25, n. 13, p. 1575-1586, 2009.

GOETTEMOELLER, J.; CHING, A. Seed germination in *Stevia rebaudiana*. **Perspectives on new crops and new uses.** ASHS Press, Alexandria, VA, p. 510-511, 1999.

GOMES, E. N. et al. Plant densities and harvesting times on productive and physiological aspects of *Stevia rebaudiana* Bertoni grown in southern Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 4, p. 3249-3264, 2018.

GOSLING, C. Caá-ehe or azucá-caá. **Kew Bulletin of Miscellaneous Information** 178, v. 180, p. 173-194, 1901.

GOYAL, S. K.; SAMSHER; GOYAL, R. K. Stevia (*Stevia rebaudiana*) a bio-sweetener: a review. **Int J Food Sci Nutr**, v. 61, n. 1, p. 1-10, 2010.

GRASHOFF, J. L. Novelties in Stevia (Compositae: Eupatorieae). **Brittonia**, v. 26, n. 4, p. 347-384, 1974.

GUPTA, P.; SHARMA, S.; SAXENA, S. Callusing in *Stevia rebaudiana* (natural sweetener) for steviol glycoside production. **International Journal of Agricultural and Biological Sciences**, v. 4, n. 12, p. 893-897, 2010.

HASTINGS, M. B. et al. Measuring Renyi entanglement entropy in quantum Monte Carlo simulations. **Physical review letters**, v. 104, n. 15, p. 157201, 2010.

HILL, M. O. Diversity and evenness: a unifying notation and its consequences. **Ecology**, v. 54, n. 2, p. 427-432, 1973.

HOSSAIN, M. F. et al. Cultivation and uses of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni): a review. **African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development**, v. 17, n. 4, p. 12745-12757, 2017.

JOST, L. Entropy and diversity. **Oikos**, v. 113, n. 2, p. 363-375, 2006.

KATAYAMA, O. et al. The practical application of Stevia and research and development data. **I.S.U. Co.**, p. 747, 1976.

KHAN, A. R.; CHOWDHURY, S. H.; KARIM, M. M. Effect of date of planting on the growth and leaf yield of Stevia (*Stevia rebaudiana*). **Journal of the Bangladesh Agricultural University**, v. 10, n. 2, p. 205-210, 2012.

KINGHORN, A. D. et al. A phytochemical screening procedure for sweet ent-kaurene glycosides in the genus Stevia. **Journal of natural products**, v. 47, n. 3, p. 439-444, 1984.

KINGHORN, A. Douglas (Eds.). **Stevia: the genus Stevia**. CRC Press, 2001.

KOHDA, H. et al. New sweet diterpene glucosides from *Stevia rebaudiana*. **Phytochemistry**, v. 15, n. 6, p. 981-983, 1976.

LANDÁZURI, P. A. A.; TIGRERO, J. O. S. (Ed.). **Stevia rebaudiana Bertoni, una planta medicinal.**, Bol. Téc. Edición Especial, ESPE, Sangolquí, 2009.

LEE, J. I.; KANG, K. K.; LEE, E. U. Studies on newsweetening resource plant Stevia (*Stevia rebaudiana* Bert.) in Korea. I. Effects of transplanting date shifting by cutting and seeding dates on agronomic characteristics and dry leaf yields of Stevia. **The Research Reports of the Office of Rural Development**, v. 21, p. 171-179, 1979.

LEE, J. I.; KANG, K. H.; PARK, H. W. New high rebaudioside-A stevia variety" Suweon 11". **The Research Reports of the Office of Rural Development**, v. 24, p. 186-188, 1982.

LEDO, C. A. S. et al. Caracterização morfológica da coleção de espécies silvestres de Manihot (Euphorbiaceae-Magnoliophyta) da Embrapa Mandioca e Fruticultura. **Embrapa Mandioca e Fruticultura-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E)**, 2011.

LEWIS, W. H. Early uses of *Stevia rebaudiana* (Asteraceae) leaves as a sweetener in Paraguay. **Economic Botany**, v. 46, n. 3, p. 336-337, 1992.

LI, L. et al. Observations Chromosomes of *Stevia rebaudiana* from tube seedling. **Journal Botanical**, v. 6 n.7, 1982.

LIMA FILHO, O. F.; VALOIS, A. C. C.; LUCAS, Z. M. (Ed.). **Estévia**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste; Steviafarma Industrial S/A, (Embrapa Agropecuária Oeste. Sistemas de Produção, 5), p. 1-59, 2004.

LIMA FILHO, O.F.; MALAVOLTA, E.; YABICO, H.Y. Influência de estresses nutricionais no teor e produção de esteviosídeo durante o desenvolvimento da estévia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.32, n.5, p.489-494, 1997.

LOVERING, N. M.; REELEDER, R. D. First report of *Septoria steviae* on stevia (*Stevia rebaudiana*) in North America. **Plant Disease**, v. 80, n. 8, p. 959, 1996.

MADAN, S. et al. *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni – a review. **Indian Journal of Natural Products Resources**. v.1, n. 3, p. 267–286, 2010.

MARÍN W. Sondeo de mercado de la Estevia. **Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt**. Bogotá, p. 15-20, 2004.

MARTINS, P. M. et al. Turbo-extraction of glycosides from *Stevia rebaudiana* using a fractional factorial design. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, n. 4, p. 510-518, 2017.

MEGEJI, N. W. et al. Introducing *Stevia rebaudiana*, a natural zero-calorie sweetener. **Current Science**, v. 88, n. 5, p. 801-804, 2005.

MENGESHA B.; GEJA W.; DAMTEW Z. Stevia Production Guideline. **Ethiopian Institute of Agricultural Research Center**, v. 1, p. 1-23, 2014.

METIVIER, J.; VIANA, A. M. Determination of microgram quantities of stevioside from leaves of *Stevia rebaudiana* Bert. By two-dimensional thin layer chromatography. **Journal of Experimental Botany**, v. 30, p. 805–810, 1979.

MIYAZAKI, Y.; WATANABE, H. Studies on the cultivation of *Stevia rebaudiana* Bertoni; On the propagation of the plant. **Japanese Journal of Tropical Agriculture**, v.17, n.3, p. 154–157, 1974.

MONTEIRO, R. Taxonomia e biologia da reprodução de *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Campinas, 1980. Disponível em:  
<<http://www.repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/315053>>. Acesso em: 17 mar. 2019.

- MORITA, T. **Dried leaves**. JAP Patente n° 62-96025, 1987.
- MURAI, N. **Stevia drying system**. JAP Patente n° 63-258553, 1988.
- NAKAJIMA, J. N.; SEMIR, J. Asteraceae do Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil. **Brazilian Journal of Botany**, v. 24, n. 4, p. 471-478, 2001.
- NAKAMURA, S.; TAMURA, Y. Variation in the main glycosides of Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni). **Japanese Journal of Tropical Agriculture**, v. 29, n. 2, p. 109–116, 1985.
- NISHIYAMA, P. et al. Correlation between the contents of total carbohydrates and steviosides in leaves of stevia-rebaudiana. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 34, n. 3-4, p. 425-434, 1991.
- OLIVEIRA, V. M. et al. Chromosomal and morphological studies of diploid and polyploid cytotypes of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni (Eupatorieae, Asteraceae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, n. 2, p. 215-222, 2004.
- PADILHA, H. K. M.; SOSINSKI J., E. E.; BARBIERI, R. L. Morphological diversity and entropy of peppers (*capsicum baccatum* and *capsicum chinense*, solanaceae). **Embrapa Clima Temperado-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2016.
- PEREIRA, A.V.; VENCOVSKY, R.; CRUZ, C.D. Selection of botanical and agronomical descriptors for the characterization of cassava (*Manihot esculenta* Crantz.) germplasm. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v.15, p.115-124, 1992.
- PEREIRA, E. Q. et al. *Stevia rebaudiana* (Bert) Bertoni: regression models with mixed effects for investigating seed germination data. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 41, n. 39609, 2019.
- RAKIBUZZAMAN, M.; SHIMASAKI, K.; UDDIN, A. F. M. J. Influence of Cutting Position and Rooting Hormones on Rooting of Stevia (*Stevia rebaudiana*) Stem Cutting. **International Journal Business Social and Scientific Research**, v. 6, n. 4, p. 122-121, 2018.
- RAMESH, K.; SINGH, V.; MEGEJI, N. W. Cultivation of stevia *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni: A comprehensive review. **Advances in Agronomy**, v. 89, p. 137-177, 2006.
- RAZAK, U. N. A. A. et al. In vitro micropropagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni in Malaysia. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 57, n. 1, p. 23-28, 2014.
- RENYI, A. **On measures of entropy and information**. Fourth Berkeley Symposium, Berkeley, 1960. p. 547-561.1961.
- ROQUE, N.; BAUTISTA, H. P. Asteraceae: caracterização e morfologia floral. **EDUFBA**, 2008.
- ROSSI, M. L. et al. Post-seminal development and morphoanatomy of vegetative and reproductive organs in *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni (Asteraceae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 2, p. 2167-2177, 2018.

SAKAGUCHI, M.; KAN, T. Japanese researches on *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni and stevioside. **Ci Cult**, v. 34, p. 235-248, 1982.

SANTOS, M. G. A. Adaptação da *Stevia rebaudiana* Bertoni em modo de produção biológico em Ponte de Lima. Dissertação (mestrado) - Instituto Politécnico de Viana do Castelo, 2016.

SCHWONTKOWSKI, D. **Herbs of the Amazon: traditional and common uses**. Science Student BrainTrust Pub., 1995.

SHAFFERT, E. E.; CHETOBAR, A. A. Development of the male gametophyte in *Stevia rebaudiana*. **Buletinul Academiei de Stiintse a Republica Moldova**, v. 6, p. 3-9, 1992.

SHAFFERT, E. E.; CHETOBAR, A. A. Development of the female gametophyte in *Stevia rebaudiana*. **Buletinul Academiei de Stiinte a Republicii Moldova Stiinte Biologice Si Chimice**. v. 2, 10-18, 1994.

SHARMA, Saurabh et al. Comprehensive review on agro technologies of low-calorie natural sweetener stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni): a boon to diabetic patients. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, n. 6, p. 1867-1879, 2016.

SHIBATA, Hitoshi et al. Glucosylation of steviol and steviol-glucosides in extracts from *Stevia rebaudiana* Bertoni. **Plant physiology**, v. 95, n. 1, p. 152-156, 1991.

SHIZHEN, S. A study on good variety selection in *Stevia rebaudiana*. **Scientia Agricultura Sinica**, v. 28, n. 2, 1995.

SHU, S. Z.; WANG, W. Z. Variation in quantitative characters in Stevia. **Acta Agronomica Sinica**, v. 14, n. 2, p. 167-173, 1988.

SHUPING, C.; SHIZHEN, S. Study on storage technique of *Stevia rebaudiana* seed. **Acta Agronomica Sinica**, v. 21, p. 102-105, 1995.

SHYU, Y. T. et al. Effects of harvesting dates on the characteristics, yield, and sweet. **Journal of Agricultural Research of China**, v. 43, n. 1, p. 29-39, 1994.

SIVARAM, L.; MUKUNDAN, U. In vitro culture studies on *Stevia rebaudiana*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 39, n. 5, p. 520-523, 2003.

SOEJARTO, D. D.; KINGHORN, A. D.; FARNSWORTH, N. R. Potential sweetening agents of plant origin. III. Organoleptic evaluation of Stevia leaf herbarium samples for sweetness. **Journal of natural products**, v. 45, n. 5, p. 590-599, 1982.

SOUZA, E. M. C. Caracterização morfológica, seleção de descritores e diversidade genética entre acessos de mangueira do banco ativo de germoplasma da Embrapa Semiárido. **Embrapa Semiárido-Tese/dissertação (ALICE)**, 2018.

STONES, M. **Stevia wins final EU approval**. 2011. Disponível em:  
<<https://www.foodmanufacture.co.uk/Article/2011/11/14/Stevia-wins-final-EU-approval>>.  
Acesso em: 19 jun. 2019

SUMIDA, T. Reports on *Stevia rebaudiana* Bertoni. Introduced from Brazil as a new sweetness resource in Japan. **Miscellaneous Publication of the Hokkaido National Agricultural Experiment Station**, v. 2, p. 79–83, 1973.

SUMIDA, T. Studies on *Stevia rebaudiana* (Bertoni): Introduced from Brazil as a new sweetness resource in Japan. **Journal of the Central Agricultural Experiment Station**, v. 31, p. 1-71, 1980.

TAMURA, Yukiyoishi et al. Clonal propagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni by stem-tip culture. **Plant Cell Reports**, v. 3, n. 5, p. 183-185, 1984.

TAVARINI, S., PASSERA, B., ANGELINI, L. G. CHAPTER 1: Crop and Steviol Glycoside Improvement in *Stevia* by Breeding. **Food Chemistry, Function and Analysis**, p. 1-31, 2018.

THIYAGARAJAN, M.; VENKATACHALAM, P. Assessment of genetic and biochemical diversity of *Stevia rebaudiana* Bertoni by DNA fingerprinting and HPLC analysis. **Annals of Phytomedicine**, v. 4, n. 1, p. 79-85, 2015.

TOFFLER, F.; ORIO, O. A. Acceni sulla pin ata tropicale 'Kaa-he-e'ou 'erba dolce'. **Rivista della Societa Italiana di Scienza dell'Alimentazione**, v. 4, p. 225-230, 1981.

TRUONG, T. T. et al. Correlation between stevioside content in leaves, their surface and the number of roots in the plant. **Scientia Agriculturae Bohemica**, v. 30, p. 249-258, 1999.

UTUMI, M. M. et al. Deficiência de macronutrientes em estévia: sintomas visuais e efeitos no crescimento, composição química e produção de esteviosídeo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, n. 6, p. 1039-1043, 1999.

VALIO, I. F. M.; ROCHA, Rosely F. Effect of photoperiod and growth regulator on growth and flowering of *Stevia rebaudiana* Bertoni. **Japanese Journal of Crop Science**, v. 46, n. 2, p. 243-248, 1977.

VON SCHMELING, G. A. Caá-heé: edulcorante natural não calórico (*Stevia rebaudiana* Bert). **Boletim do Sanatório São Lucas**, v. 29, p. 67-78, 1967.

WENG, Xiaoyan; SUN, Jianyi; ZANG, Rongchun. Study on the growth and physiological characteristics of *Stevia rebaudiana* SM4. **Acta Agriculturae Universitatis Chekianensis**, v. 22, n. 5, p. 538-540, 1996.

WÖLWER-RIECK, U. Steviol Glycosides. **Food Chemistry, Function and Analysis**, Royal Society of Chemistry, p.1-32, 2018.

WOOD H. B. et al. Stevioside. I. The structure of the glucose moieties. **Journal of Organic Chemistry**, v. 20, n. 7, p. 875-883, 1955.

WULFF, A. F.; HUNZIKER, J. H.; ESCOBAR, A. Estudios cariológicos en Compositae. VII. **Darwiniana**, v.34, p. 213-231, 1996.

XIANG, Z. P. *Stevia*. General Bureau of State Farms, **Heilongjiang**, China, 1983.

YADAV, A. K. et al. A review on the improvement of stevia [*Stevia rebaudiana* (Bertoni)]. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 91, n. 1, p. 1-27, 2011.

YAO, Y.; BAN, M.; BRANDLE, J. A genetic linkage map for *Stevia rebaudiana*. **Genome**, v. 42, n. 4, p. 657-661, 1999.

ZAIDAN, L. B. P., DIETRICH, S. M. C.; FELIPPE, G. M. Effect of photoperiod on flowering and stevioside content in plants of *Stevia rebaudiana* Bertoni. **Japanese Journal of Crop Science**, v. 49, n. 4, p. 569-574, 1980.

**CAPÍTULO 1. APLICAÇÃO DE DESCRITORES UTILIZADOS EM ENSAIOS DE  
DHE PARA ANALISAR A VARIABILIDADE GENÉTICA DOS GENÓTIPOS ELITE  
DE ESTÉVIA**

## **APLICAÇÃO DE DESCRITORES UTILIZADOS EM ENSAIOS DE DHE PARA ANALISAR A VARIABILIDADE GENÉTICA DE GENÓTIPOS ELITE DE ESTÉVIA**

**Resumo:** A *Stevia rebaudiana* Bertoni pertence à família Asteraceae, caracterizando-se como uma planta herbácea, semiperene, encontrada na forma silvestre na região de divisa entre Paraguai e Brasil. As características morfológicas avaliadas de forma qualitativa e/ou quantitativa são muito úteis em estudos de variabilidade genética e também para a realização de ensaios de distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade (DHE) tendo em vista a proteção de cultivares. Neste trabalho, objetivou-se caracterizar e quantificar a variabilidade genética de genótipos elite de estévia por meio da aplicação de 21 descritores morfológicos publicados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. Foram analisados 19 genótipos elite de estévia do Banco Ativo de Germoplasma – BAG da Embrapa Cerrados. Foram aplicados e analisados 21 descritores morfológicos. Distâncias genéticas entre os genótipos elite foram estimadas pelo método de complemento do índice de coincidência simples das classes fenotípicas dos descritores morfológicos. A partir da matriz de distâncias genéticas, foram realizadas análises de agrupamento utilizando como critério o método do UPGMA. A aplicação de 17 (> 80%) dos 21 descritores morfológicos foi eficiente para a diferenciação e análise da variabilidade dos 19 genótipos elite de estévia. O agrupamento por meio de dendrograma indica a formação de pelo menos quatro grandes grupos de similaridade. A variabilidade genética observada evidencia o alto potencial da utilização destes genótipos em programas de melhoramento genético da estévia, tendo em vista o desenvolvimento de variedades geneticamente superiores para cultivo nas condições do Cerrado.

**Palavras-chave:** Entropia, polimorfismo, morfologia, caracteres, *Stevia rebaudiana*.

## **APPLICATION OF DESCRIPTORS USED IN DHE TESTING TO ANALYZE THE GENETIC VARIABILITY OF STEVIA ELITE GENOTYPES.**

**Abstract:** *Stevia rebaudiana* Bertoni belongs to the Asteraceae family, being characterized as a plant herbaceous, semi-perennial, found in the wild form in the border region between Paraguay and Brazil. Morphological characteristics evaluated qualitatively and /or quantitatively are very useful in genetic variability studies and also for conducting distinguishability, homogeneity and stability (DHE) aiming for cultivar protection. This work aimed to characterize and quantify the genetic variability of stevia elite genotypes by applying 21 morphological descriptors published by the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply - MAPA. They were analyzed 19 genotypes elite of stevia of the Active Germplasm Bank - BAG from Embrapa Cerrados. They were applied and analyzed 21 morphologic descriptors. Genetic distances between elite genotypes were estimated by the simple coincidence index complement method of the phenotypic classes of morphological descriptors. From the genetic distance matrix, cluster analyzes were performed using the UPGMA method as a criterion. The application of 17 (> 80%) of the 21 morphological descriptors was efficient for the differentiation and variability analysis of the 19 genotypes elite of stevia. Clustering by dendrogram indicates the formation of at least four great similarity groups. The observed genetic variability evidence the high potential of the use of these genotypes in stevia breeding programs, aiming of the development of genetically superior varieties for cultivation in the conditions of Cerrado.

**Key words:** Entropy, polymorphism, morphology, characters, *Stevia rebaudiana*.

## 1.1 INTRODUÇÃO:

A *Stevia rebaudiana* Bertoni pertence à família Asteraceae, caracterizando-se como uma planta herbácea, semiperene, encontrada na forma silvestre na região de divisa entre Paraguai e Brasil. (DE; MONDAL; BANERJEE, 2013; KATAYAMA et al., 1976).

A alta demanda de estévia pela indústria está em evidência. Isso ocorre devido suas propriedades edulcorantes naturais (esteviol e suas variações) ausentes de calorias. Dessa forma, o esteviol constitui-se como alternativa para substituição da sacarose em todo o mundo. Esse carecimento industrial associa-se ao aumento mundial e constante das desordens metabólicas, como as prevalentes diabetes tipo II e obesidade (TAVARINI, PASSERA, ANGELINI, 2018; WÖLWER-RIECK, 2018).

Essas substâncias possuem poder edulcorante entre 300 e 400 vezes maior que a sacarose; conservam baixo índice glicêmico; são estáveis ao calor e não sofrem fermentação, sendo atributos importantes para indústria alimentícia (SANTOS, 2015; LANDÁZURI; TIGRERO, 2009).

A caracterização de plantas é uma prática primordial em bancos ativos de germoplasma e também em programas de melhoramento genético, que integra informações de identificação, descrição e diferenciação de acessos e genótipos. As características morfológicas avaliadas de forma qualitativa e/ou quantitativa são muito úteis em estudos de variabilidade genética e também para a realização de ensaios de distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade (DHE) tendo em vista a proteção de cultivares (BURLE; OLIVEIRA, 2010; FALEIRO et al., 2016).

Segundo Burle e Oliveira, (2010), os descritores morfológicos são caracteres geralmente regulados por poucos genes, fortemente herdáveis, que propendem à baixa interação genótipo vs. ambiente. Assim, inicia-se a discriminação do fenótipo, que deve fornecer as primeiras estimativas de variabilidade genética dentro do banco de germoplasma ou da coleção de trabalho do melhorista.

Existem cerca de 90 variedades de estévia desenvolvidas no mundo (RAMESH; SINGH; MEGEJI, 2006). Entretanto, no Brasil, há somente 2 cultivares (AKH L1 e CPQBA T6) inscritas no Registro Nacional de Cultivares – RNC, e 2 cultivares protegidas pelo Sistema Nacional de Proteção de Cultivares – SNPC (CPQBA T6 e Morita III) (MAPA, 2019). Segundo Tavarini, Passera, Angelini (2018) e Wölwer-Rieck (2018), a variedade Morita III, advinda da Morita II, é uma das mais conhecidas e estudadas variedades e caracteriza-se pelo baixo requerimento de água.

Perante a Lei nº 9.456, as cultivares a serem protegidas devem ser submetidas ao teste

de distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade (DHE). Esse teste tem como base a análise de vários descritores morfológicos, denominados pela legislação como descritores mínimos preconizados pelo MAPA, que por sua vez, comprovam a distinção entre outras variedades da mesma espécie (BRASIL, 2009).

O Cerrado tem sido preconizado como um bioma interessante para o cultivo da estévia, apresentando clima tropical, semiúmido, com duas estações bem definidas: uma chuvosa no verão e uma seca no inverno (PELÁ; CASTILHO, 2010). A temperatura média anual fica em torno de 22 °C e a precipitação média anual situa-se entre 1.200 e 1.800 mm (RIBEIRO; WALTER, 1998). Estudos de caracterização de genótipos elite de estévia desenvolvidos nesse bioma podem produzir valiosas informações e culminar no desenvolvimento de variedades altamente adaptadas às condições do Cerrado, bem como ao cultivo em larga escala, constituindo-se como alternativa para os produtores dessa importante região do Brasil.

A Embrapa Cerrados, por meio de parcerias público-privadas, iniciou um programa de melhoramento genético da estévia em 2004 que culminaram no desenvolvimento de genótipos elite promissores para cultivo na região do Cerrado. Neste trabalho, objetivou-se a aplicação de descritores morfológicos, publicados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, de acordo com as normas e indicações do Serviço Nacional de Proteção Cultivares (SNPC) para as cultivares de Estévia *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni, a fim de caracterizar os genótipos e avaliar a variabilidade genética de genótipos elite na região do Cerrado do Planalto Central.

## 1.2 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado na Embrapa Cerrados, em Planaltina-DF (15°36'19" de latitude Sul, 47°42'56" de longitude Oeste e altitude de 1.024 metros). Foram caracterizados 19 genótipos elite de *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni do programa de melhoramento genético da estévia realizado na Embrapa Cerrados (Tabela 1). Todos os genótipos foram conservados em vasos de 60 litros e mantidos em área aberta com o conteúdo de água no solo na capacidade de campo. Os genótipos estão sendo estudados quanto a características agrônômicas de interesse para serem utilizados na base de cruzamentos do programa de melhoramento genético de estévia realizado na Embrapa Cerrados.

**Tabela 1.** Descrição dos 19 genótipos elite de *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni caracterizados. Embrapa Cerrados, Planaltina, DF, 2019.

LOCAL	GENÓTIPOS	CÓDIGO	NÚMERO DE PLANTAS
LA1	1	11	12
LA2	2	13	12
LA3	3	3016	12
LA4	4	1102	12
LA5	5	7	12
LA6	6	3002	12
LA7	7	3015	12
LA8	8	CPAC1	12
LA9	9	CPAC2	12
LA10	10	CPAC3	12
LB1	11	3004	12
LB3	12	3024	12
LB4	13	3 _ 12	12
LB5	14	3 _ 25	12
LB6	15	12	12
LB7	16	1	12
LB8	17	3 = 6	12
LB9	18	CPAC4	12
LB10	19	CPAC5	12

Foram avaliados, em cada genótipo, 21 descritores morfoagronômicos (categóricos) (Quadro 1), preconizados pelo SNP-C-MAPA (MAPA, 2019).

Todas as avaliações na planta, no caule, nas folhas e nas flores foram feitas durante o florescimento pleno, isto é, com pelo menos 50% das plantas com ao menos uma flor. As avaliações foliares foram feitas sempre nas maiores folhas do caule principal, assim como as avaliações nos caules foram realizadas no caule principal. As avaliações nos aquênios foram feitas no estágio de semente madura.

A definição da classe fenotípica de cada descritor foi baseada na avaliação de 10 plantas e 3 partes da planta (caule, folha e aquênio) de cada um dos genótipos.

A partir da distribuição de frequência das diferentes classes fenotípicas dos 19 genótipos elite de *Stevia rebaudiana* (Bert.), calculou-se o nível de entropia dos caracteres (H), proposto por Renyi (1961), de acordo com o seguinte modelo:

$$H' = \left[ N \ln(N) - \sum_{i=1}^s n_i \ln(n_i) \right] / N$$

Em que:

$H'$  = Índice de Shannon-Weaver

$n_i$  = Número de indivíduos amostrados da  $i$ -ésima espécie.

$N$  = número total de indivíduos amostrados.

$S$  = número total de espécies amostradas.

$\ln$  = logaritmo de base neperiana

A estimativa da entropia foi realizada com o auxílio do programa Multiv v.2.3 (PILLAR, 1997). A entropia de qualquer descritor será superior quanto maior for o número de classes fenotípicas e quanto mais proporcional for a fração entre a frequência dos genótipos nas diferentes classes de cada descritor (VIEIRA et al., 2009).

As distâncias genéticas entre os 19 genótipos elite de *S. rebaudiana* foram calculadas com base em todos os 21 descritores morfoagronômicos. As estimativas foram baseadas no complemento do índice de coincidência simples das classes fenotípicas (categorias) com auxílio do programa computacional Genes (CRUZ, 2013). Gráficos bidimensionais da matriz de dados usando uma escala de cores foram estabelecidos utilizando o programa PAST v.3.26 (HAMMER et al., 2001).

Com base na matriz de distâncias genéticas, foram realizadas análises de agrupamento dos genótipos elite via dendrograma, utilizando como critério o método da ligação média entre grupos não ponderados UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic Averages*). No dendrograma, a definição do ponto de corte para estabelecimento foi realizada com base na distância média entre os genótipos. Foi realizada também a dispersão gráfica baseada em escalas multidimensionais usando o método das coordenadas principais, com auxílio dos Programas SAS (SAS INSTITUTE INC., 1989) e Statistica (STATSOFT INC., 1999).

### 1.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com a caracterização dos descritores, verificou-se que somente 4 (19%) dos descritores não apresentaram variação ou polimorfismo, ou seja, a entropia foi nula ( $H=0$ ) para as características: 6. Caule: pubescência (no terço médio); 13. Folha: incisões na margem; 16. Flor: coloração (no centro da corola); 20. Sementes: formação (Quadro 1). Todos os demais descritores permitiram a diferenciação dos 19 genótipos elite de estévia.

Todavia, de acordo com os descritores que não apresentaram polimorfismo, os genótipos elite predominantemente apresentam: formação de sementes, caule com pubescência no terço médio e incisões na margem das folhas. Já referente à flor, a coloração no centro da corola

é exclusivamente branca, consoante ao que geralmente se encontra na espécie segundo Othman, Osman e Zainuddin (2018).

De acordo com Tavarini, Passera, Angelini (2018) e Wölwer-Rieck (2018), a divergência genética entre os genótipos de estévia exerce uma função relevante na seleção de genitores com maior variabilidade para diferentes características de interesse do melhoramento de plantas.

As características que se destacaram quanto ao elevado nível de entropia e alta variabilidade foram: 3. Caule: quantidade de ramos primários (1,44); 18. Aquênio: comprimento do fuso (1,11); 10. Folha: comprimento (1,07); 19. Ciclo de florescimento (1,04); 12. Folha: intensidade da coloração verde (parte adaxial) (1,01); 2. Planta: altura (0,99); 8. Caule: número de nós do caule principal (0,70); (Quadro 1).

As características com elevado nível de entropia (Quadro 1), estão em conformidade com Yadav et al. (2011); Megeji et al. (2005); Monteiro (1980); Magalhães (2000); Nurhaimi e Toruan (1995); Oliveira et al. (2004), em que se observou variabilidade genética e morfológica para as características de altura de planta, período de florescimento, rendimento das folhas e conteúdo de esteviosídeo (TAVARINI, PASSERA, ANGELINI, 2018; WÖLWER-RIECK, 2018).

**Quadro 1.** Características avaliadas, descrição das características, código da descrição dos descritores morfoagronômicos (classes fenotípicas) com suas respectivas frequências e o coeficiente de entropia dos caracteres (H), considerando 19 genótipos elite de *Stevia rebaudiana* (Bert.). Embrapa Cerrados, Planaltina, DF, 2019.

Característica	Descrição da característica	Código da descrição	Frequência (%)	Entropia (H)
1. Planta: tipo (TP) VS (+)	tipo I	1	-	0,20
	tipo II	2	-	
	tipo III	3	94,74%	
	tipo IV	4	5,26%	
	tipo V	5	-	
	tipo VI	6	-	
2. Planta: altura (AP) MS	baixa (< 40 cm)	3	31,58%	0,99
	média (40-50 cm)	5	52,63%	
	alta (> 50 cm)	7	15,79%	
3. Caule: quantidade de ramos primários (QRP) MS (+)	muito baixa (< 3)	3	5,26%	1,44
	baixa ( 3)	4	31,58%	
	média (4 a 7)	5	10,53%	
	alta (8)	6	31,58%	
	muito alta (> 8)	8	21,05%	

continuação...

**Quadro 1.** Características avaliadas, descrição das características, código da descrição dos descritores morfoagronômicos (classes fenotípicas) com suas respectivas frequências e o coeficiente de entropia dos caracteres (H), considerando 19 genótipos elite de *Stevia rebaudiana* (Bert.). Embrapa Cerrados, Planaltina, DF, 2019. continuação...

4. Caule: espessura (diâmetro na altura média do caule principal) (ESPC) MS (+)	fina (< 0,20 cm)	3	15,79%	0,63
	média (0,20 a 0,35cm)	5	78,95%	
	grossa (> 0,35 cm)	7	5,26%	
5. Caule: pigmentação antociânica (PAC) VS/VG	ausente	1	63,16%	0,65
	presente	2	36,84%	
6. Caule: pubescência (no terço médio) (PUBC) VS	ausente	1	-	0,00
	presente	2	100%	
7. Caule: intensidade de pubescência (IPC) (no terço médio) VS	baixa	3	68,42%	0,62
	média	5	31,58%	
	alta	7	-	
8. Caule: número de nós do caule principal (NNCP) MS	poucos (<6)	3	5,26%	0,70
	médios (6 a 9)	5	73,68%	
	muitos (> 9)	7	21,05%	
9. Folha: forma (FFOL) VS (+)	elíptica	1	-	0,33
	romboide	2	-	
	obovada	3	10,53%	
	ovalada	4	-	
	lanceolada	5	89,47%	
10. Folha: comprimento (COMPF) MS	curto (< 4,0 cm)	3	42,11%	1,07
	médio (4,0 a 5,0 cm)	5	31,58%	
	longo (> 5,0 cm)	7	26,32%	
11. Folha: largura (LFOL) MS	estreita (< 1,0 cm)	3	-	0,65
	média (1,0 cm a 1,5 cm)	5	63,16%	
	larga (> 1,5 cm)	7	36,84%	
12. Folha: intensidade da coloração verde (parte adaxial) (ICVF) VG (+)	clara	3	42,11%	1,01
	média	5	42,11%	
	escura	7	15,79%	
13. Folha: incisões na margem (IMF) VS	ausentes	1	-	0,00
	presentes	2	100%	
14. Folha: profundidade das incisões na margem (PIMF) VS	rasa	3	10,53%	0,33
	média	5	89,47%	
	profunda	7	-	
15. Folha: pubescência (PUBFOL) VS	ausente	1	52,63%	0,69
	presente	2	47,37%	
16. Flor: coloração (no centro da corola) (CFLR) VS	branca	1	100%	0,00
	roxa avermelhada			
	clara	3	-	
	roxa avermelhada escura	5		
17. Aquênio: intensidade da coloração marrom (ICMA) VS/VG	clara	1	47,37%	0,69
	média	2	52,63%	
	escura	3	-	
18. Aquênio: comprimento do fuso (CFA) VS (+)	muito curto	2	5,26%	1,11
	curto	3	36,84%	
	médio	5	47,37%	
	longo	7	10,53%	

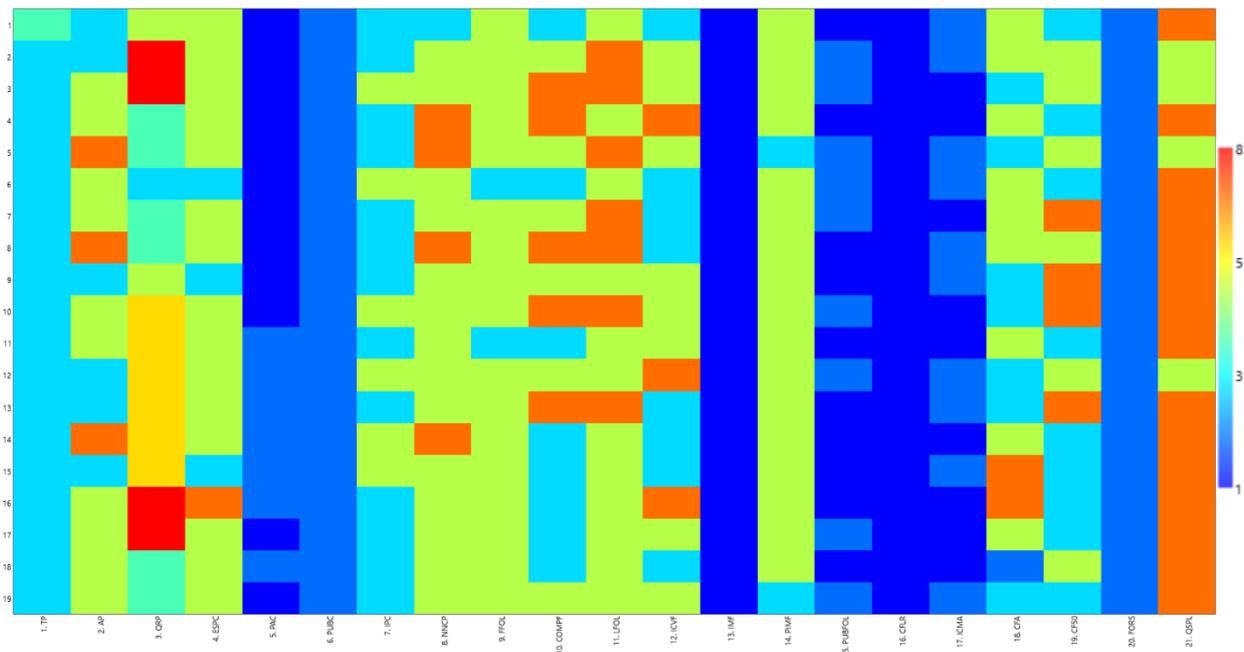
continuação...

**Quadro 1.** Características avaliadas, descrição das características, código da descrição dos descritores morfoagronômicos (classes fenotípicas) com suas respectivas frequências e o coeficiente de entropia dos caracteres (H), considerando 19 genótipos elite de *Stevia rebaudiana* (Bert.). Embrapa Cerrados, Planaltina, DF, 2019. continuação...

19. Ciclo de florescimento (quando pelo menos 50% das plantas têm ao menos uma flor) (CF50) MG/MS	precoce	3	47,37%	1,04
	médio	5	31,58%	
	tardio	7	21,05%	
20. Sementes: formação (FORS) VS	ausente	1	-	0,00
	presente	2	100%	
21. Sementes: quantidade de sementes por planta (QSPL) MS	baixa	3	-	0,51
	média	5	21,05%	
	alta	7	78,95%	

As seguintes características apresentaram entropia de 0,69: 15. Folha: pubescência; 17. Aquênio: intensidade da coloração marrom. As características 4. Caule: espessura (diâmetro na altura média do caule principal); 5. Caule: pigmentação antociânica; 7. Caule: intensidade de pubescência (no terço médio); 11. Folha: largura; apresentaram entropia entre 0,65 a 0,62. Já as características 14. Folha: profundidade das incisões na margem; 21. Sementes: quantidade de sementes por planta; 1. Planta: tipo; 9. Folha: forma; apresentaram entropia abaixo de 0,60 e maior que 0,00 (Quadro 1).

A *S. rebaudiana* originalmente apresenta variação fenotípica também na análise quantitativa e qualitativa foliar (YADAV et al., 2011). Handro, Ferreira e Floh (1993), Yadav et al. (2011), Miyagawa et al. (1986) anotaram que essa variabilidade pode ser parcialmente devido à natureza amplamente autoincompatível das flores da espécie. Já Tateo et al. (1998) relacionam a alta variabilidade fenotípica da espécie com a característica de polinização aberta da *S. rebaudiana*.



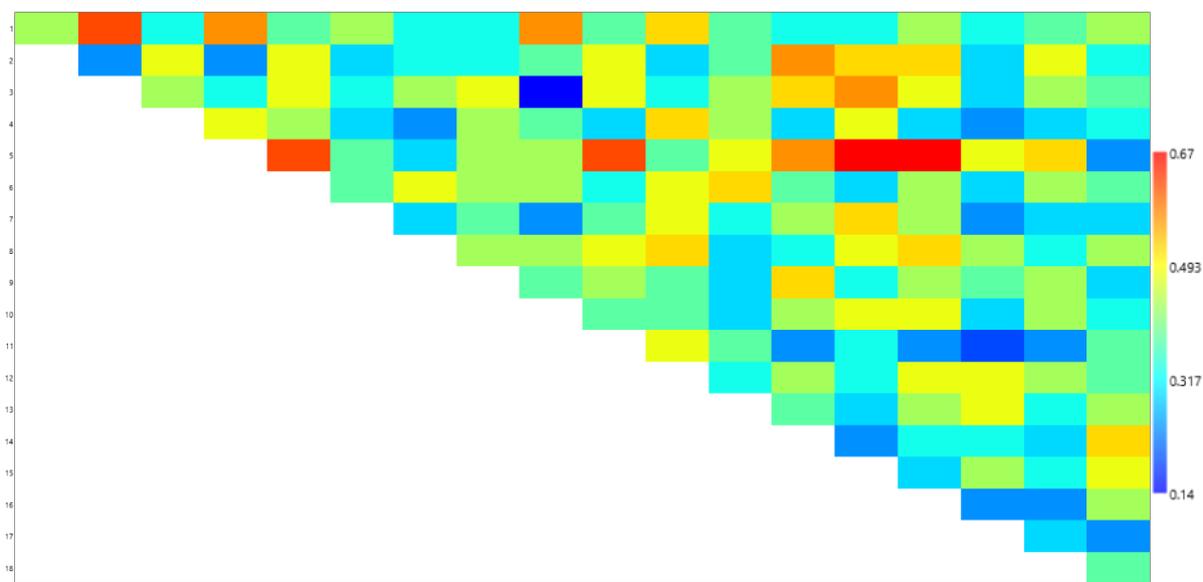
**Figura 1.** Gráfico bidimensional da matriz de dados, usando uma escala de cores com a representação do mapa de calor, projetando uma visão geral da variabilidade dos 19 genótipos, através de suas características avaliadas e classes fenotípicas conforme Quadro 1. O eixo x indica os 21 descritores avaliados, enquanto o eixo y enumera os 19 genótipos elite de estévia (Quadro 1). As cores das “caixas” quadradas especificam as classes fenotípicas de cada característica entre os genótipos com uma escala de 1 a 8. Embrapa Cerrados, Planaltina, DF, 2019.

Segundo Yadav et al. (2011), o gênero *Stevia* possui ampla variação no número de cromossomos. A *S. rebaudiana*, segundo Frederico et al. (1996) e Monteiro (1980), apresenta-se com número de cromossomos  $2n = 22$ . Entretanto, espécies com  $2n = 33$  e  $2n = 44$ , triploide e tetraploide respectivamente, já foram mencionadas (YADAV et al., 2011).

A matriz de distâncias genéticas entre os 19 genótipos elite de *S. rebaudiana* (Bert.) (Tabela 2) evidencia os maiores valores entre os genótipos elite 5 e 15; 5 e 16, ambos com uma distância de 0,67. O genótipo elite 5 detem uma distância de 0,62 em relação aos genótipos 6 e 11, seguido pelo mesmo valor de distância entre os genótipos 1 e 3. O genótipo 1 expõe-se com uma elevada distância de 0,57 em relação aos genótipos cinco 5 e 10. Os genótipos 2 e 14; 3 e 15; 5 e 14, também apresentaram uma distância elevada de 0,57 entre si. No que concerne à distância de 0,52, os genótipos um 1 e 12; 2 e 15; 2 e 16; 3 e 14; 4 e 12; 5 e 18; 6 e 13; 7 e 15; 8 e 12; 8 e 16; 9 e 14; 14 e 19, lograram à respectiva. Por sua vez, os demais genótipos obtiveram distâncias variando de 0,14 a 0,48 de cores azul a verde, conforme mostrado (Figura 2).

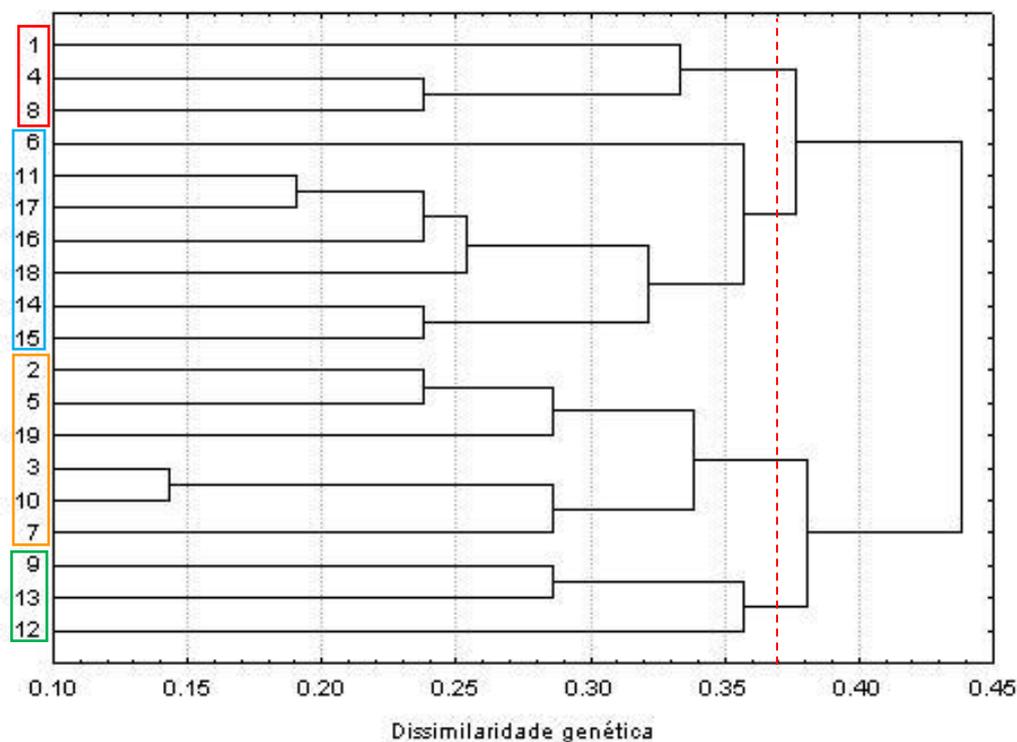
**Tabela 2.** Matriz de distâncias entre 19 genótipos de *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni, calculada utilizando o complemento do índice de coincidência simples baseado em 21 descritores preconizados pelo SNPC – MAPA. Embrapa Cerrados, Planaltina, DF, 2019.

Genótipos	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	
1	0,43	0,62	0,33	0,57	0,38	0,43	0,33	0,33	0,57	0,38	0,52	0,38	0,33	0,33	0,43	0,33	0,38	0,43	
2		0,24	0,48	0,24	0,48	0,29	0,33	0,33	0,38	0,48	0,29	0,38	0,57	0,52	0,52	0,29	0,48	0,33	
3			0,43	0,33	0,48	0,33	0,43	0,48	0,14	0,48	0,33	0,43	0,52	0,57	0,48	0,29	0,43	0,38	
4				0,48	0,43	0,29	0,24	0,43	0,38	0,29	0,52	0,43	0,29	0,48	0,29	0,24	0,29	0,33	
5					0,62	0,38	0,29	0,43	0,43	0,62	0,38	0,48	0,57	0,67	0,67	0,48	0,52	0,24	
6						0,38	0,48	0,43	0,43	0,33	0,48	0,52	0,38	0,29	0,43	0,29	0,43	0,38	
7							0,29	0,38	0,24	0,38	0,48	0,33	0,43	0,52	0,43	0,24	0,29	0,29	
8								0,43	0,43	0,48	0,52	0,29	0,33	0,48	0,52	0,43	0,33	0,43	
9									0,38	0,43	0,38	0,29	0,52	0,33	0,43	0,38	0,43	0,29	
10										0,38	0,38	0,29	0,43	0,48	0,48	0,29	0,43	0,33	
11											0,48	0,38	0,24	0,33	0,24	0,19	0,24	0,38	
12												0,33	0,43	0,33	0,48	0,48	0,43	0,38	
13													0,38	0,29	0,43	0,48	0,33	0,43	
14														0,24	0,33	0,33	0,29	0,52	
15															0,29	0,43	0,33	0,48	
16																0,24	0,24	0,43	
17																	0,29	0,24	
18																			0,38



**Figura 2.** Gráfico bidimensional da matriz de distância, usando uma escala de cores com a representação do mapa de calor, projeta uma visão geral da distância dos 19 genótipos de acordo com a Tabela 2. As cores das “caixas” quadradas especificam a matriz de distância com uma classificação de 0,14 a 0,67. Embrapa Cerrados, Planaltina, DF, 2019.

A análise de agrupamento via dendrograma, utilizando como critério o método do UPGMA e a definição do ponto de corte com base na distância genética média, propiciou a formação de quatro grandes grupos de similaridade. No grupo I, foram incluídos sete (6, 11, 17, 18, 14 e 15) genótipos elite (Figura 3).



**Figura 3.** Análise de agrupamento de 19 genótipos elite de *Stevia rebaudiana* (Bert.), com base na matriz de dissimilaridade genética calculada utilizando 21 descritores qualitativos preconizados pelo SNPC – MAPA. O método do UPGMA foi usado como critério de agrupamento. O valor do coeficiente de correlação cofenética ( $r$ ) foi 0,87. Embrapa Cerrados, Planaltina, DF, 2019.

Este grupo caracteriza-se por apresentar predominantemente: plantas do tipo 3 (MAPA, 2019); altura média; alta quantidade de ramos primários no caule; diâmetro médio de espessura do caule; pigmentação antociânica; baixa intensidade da pubescência no terço médio do caule; médio número de nós no caule principal. As folhas são majoritariamente lanceoladas, exclusivamente de comprimento curto e largura média. A intensidade da coloração verde na parte adaxial das folhas é, na maioria, clara. Possui predomínio de média profundidade das incisões na margem das folhas e ausência de pubescência. Os aquênios desse grupo, em maior número, apresentam-se com uma intensidade de cor marrom claro e comprimento médio a alto do fuso. O ciclo de florescimento tem um predomínio precoce, com alta quantidade de produção de sementes por planta.

No grupo II, foram abrangidos seis (2, 5, 19, 3, 10 e 7) genótipos elite (Figura 3). O

grupo caracteriza-se por apresentar hegemonicamente: plantas do tipo 3 (MAPA, 2019) e altura intermediária. O caule possui: metade da quantidade de ramos primários baixos; espessura média; ausência de pigmentação antociânica; média intensidade da pubescência no terço médio, e prevalece mediano o número de nós no caule principal. As folhas são lanceoladas, na maioria de comprimento médio, largura classificada larga, assim como a intensidade da coloração verde na parte adaxial das folhas é média. O grupo II possui predomínio de média profundidade das incisões na margem das folhas e presença de pubescência. Os aquênios desse grupo mostram bissecção com uma intensidade de cor marrom claro e média; o comprimento do fuso expõe-se geral médio. O ciclo de florescimento apresenta-se na maior parte como médio a tardio. A quantidade de produção de sementes por planta consiste de forma igualitária média e alta.

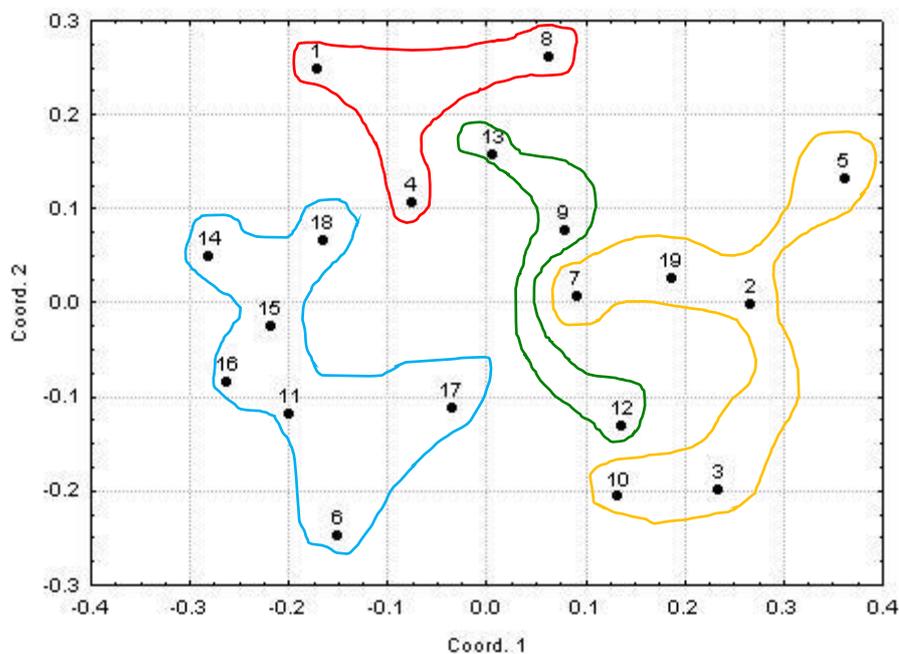
No grupo III, foram abrangidos três (9, 13 e 12) genótipos elite (Figura 3). O grupo caracteriza-se por apresentar hegemonicamente: plantas do tipo 3 (MAPA, 2019) e altura baixa. O caule possui: dominância da quantidade de ramos primários altos; espessura média; presença de pigmentação antociânica; baixa intensidade da pubescência no terço médio e prevalece mediano o número de nós no caule principal. As folhas são lanceoladas, na maioria de comprimento e largura médios. A intensidade da coloração verde na parte adaxial das folhas se diferenciou totalmente entre os três genótipos, sendo clara, média e escura. O grupo III possui predomínio de média profundidade das incisões na margem das folhas e ausência de pubescência. Os aquênios desse grupo possuem uma intensidade de cor marrom média, o comprimento do fuso expõe-se geral médio. O ciclo de florescimento apresenta-se na maior parte como tardio. A quantidade de produção de sementes por planta consiste de forma alta na maioria dos genótipos.

No grupo IV, foram abrangidos três (1, 4 e 8) genótipos elite (Figura 3). O grupo apresenta o único genótipo elite que variou em relação ao tipo IV de planta. Já os demais são do tipo III, semelhantes aos demais grupos. Em relação à altura de planta, o grupo IV também se destacou por exibir uma variação entre todos os genótipos contando com indivíduos baixos, médios e altos. O caule possui: dominância da quantidade de ramos primários baixos; espessura média; ausência de pigmentação antociânica; baixa intensidade da pubescência no terço médio e prevalece muito o número de nós no caule principal. As folhas são lanceoladas, na maioria de comprimento longo e largura média. A intensidade da coloração verde na parte adaxial das folhas é clara. O grupo IV possui predomínio de média profundidade das incisões na margem das folhas e ausência de pubescência. Os aquênios desse grupo se mostram predominantemente com uma intensidade de cor marrom média e o comprimento do fuso expõe-se médio. O ciclo

de florescimento apresenta-se na maior parte como precoce. A quantidade de produção de sementes por planta consiste de forma alta.

Todos os grupos apresentaram pubescência no terço médio do caule, presença de incisões na margem das folhas, flor de coloração branca e formação de sementes.

Para complementar a análise de agrupamento via dendrograma, a análise de dispersão (Figura 4) evidenciou alta variabilidade dos genótipos com uma distribuição ao longo das duas coordenadas do gráfico, havendo uma certa correspondência dos grupos de similaridade definidos no dendrograma com o agrupamento verificado na dispersão gráfica (Figura 4). A variabilidade dos genótipos elite avaliados evidencia a perspectiva de uso destes genótipos em programas de seleção e recombinação visando ao melhoramento genético da espécie.



**Figura 4.** Análise de dispersão de 19 genótipos de *Stevia rebaudiana* (Bert.). Foi utilizado o método das coordenadas principais. Embrapa Cerrados, Planaltina, DF, 2019.

Além das características morfológicas analisadas, os genótipos elite serão avaliados quanto a características agrônômicas como produtividade de fitomassa, período juvenil longo e capacidade de rebrota visando ao desenvolvimento de cultivares adaptadas às condições do Cerrado do Planalto Central.

Consoante ao observado na análise da matriz de distâncias, o genótipo 5 está altamente distante dos genótipos 15 e 16, sendo possíveis candidatos à seleção de genitores para hibridação em programas de melhoramento que buscam maximizar a variabilidade da espécie

e a heterose para obtenção de híbridos de estévia. A obtenção de híbridos é viável, principalmente considerando a possibilidade de cultivo da estévia via propagação vegetativa. Eirete é um exemplo de híbrido desenvolvido no Paraguai para cultivos altamente intensivos (TAVARINI, PASSERA, ANGELINI, 2018; WÖLWER-RIECK., 2018). Dentro desta perspectiva de obtenção de híbridos, os genótipos 1 e 3; 5 e 6; 5 e 11 apresentam potencial, considerando as maiores distâncias genéticas e maiores distanciamentos gráficos entre eles.

#### **1.4. CONCLUSÕES**

A aplicação de 17 (> 80%) dos 21 descritores morfológicos, publicados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, é eficiente para a diferenciação e análise da variabilidade dos 19 genótipos elite.

É observada uma alta variabilidade genética dos genótipos elite com base nas características morfológicas, evidenciando o alto potencial da utilização destes genótipos em programas de melhoramento genético da estévia, tendo em vista o desenvolvimento de variedades geneticamente superiores para cultivo nas condições do Cerrado.

## 1.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Ato n. 1, de 13 de janeiro de 2009. **Diário Oficial da União**. Brasília, 16 de janeiro de 2009. Disponível em: [http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/protecao-de-cultivar/arquivos-medicinais-e-aromaticas/estevia\\_18dez2008p.doc](http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/protecao-de-cultivar/arquivos-medicinais-e-aromaticas/estevia_18dez2008p.doc). Acesso em: 19 Out. 2019.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Proteção de cultivares**, 2019. Disponível em: <http://sistemas.agricultura.gov.br/snpc/cultivarweb/index.php>. Acesso em: 19 Out. 2019.

BURLE, M. L.; OLIVEIRA, M. Manual de Curadores de Germoplasma-Vegetal: Caracterização Morfológica. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia Documentos (INFOTECA-E)**, 2010.

CRUZ, C. D. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 35, n. 3, p. 271-276, 2013.

DE, S.; MONDAL, S.; BANERJEE, S. **Stevioside: technology, applications and health**. John Wiley & Sons, 2013.

FALEIRO, F.G. et al. Importância da caracterização dos recursos genéticos do maracujazeiro. In: JESUS, O.N.; OLIVEIRA, E.J.; FALEIRO, F.G.; SOARES, T.L.; GIRARDI, E.A. (Eds.) **Descritores morfoagronômicos ilustrados para *Passiflora* spp.** Brasília, DF: Embrapa. p. 8-17, 2016.

FREDERICO, A. P. et al. Chromosome studies in some *Stevia*. Cav.(Compositae) species from Southern Brazil. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 19, n. 4, p. 605-609, 1996.

HAMMER, O. et al. PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia electronica**, v. 4, n. 1, p. 1-9, 2001.

HANDRO, W.; FERREIRA, C. M.; FLOH, E I. Chromosomal variability and growth rate in cell suspension cultures of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. **Plant Science**, v. 93, n. 1-2, p. 169-176, 1993.

HILL, M. O. Diversity and evenness: a unifying notation and its consequences. **Ecology**, v. 54, n. 2, p. 427-432, 1973.

KATAYAMA, O. et al. The practical application of *Stevia* and research and development data. **I.S.U. Co.**, p. 747, 1976.

LANDÁZURI, P. A. A.; TIGRERO, J. O. S. (Ed.). ***Stevia rebaudiana* Bertoni, una planta medicinal.**, Bol. Téc. Edición Especial, ESPE, Sangolquí, 2009.

MAGALHÃES, P. M. et al. Agrotecnología para el cultivo de estévia o hierba dulce. **Fundamentos de Agrotecnología de Cultivo de Plantas Medicinales Iberoamericanas**. CYTED-CAB, Bogotá, p. 441-450, 2000.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (2019). **Proteção de cultivares**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>. Consultado em 24 de março de 2019.

MEGEJI, N. W. et al. Introducing *Stevia rebaudiana*, a natural zero-calorie sweetener. **Current Science**, v. 88, n. 5, p. 801-804, 2005.

MIYAGAWA, H. et al. Studies on the Tissue Culture of *Stevia rebaudiana* and Its Components;(II) 1. Induction of Shoot primordia. **Planta medica**, v. 52, n. 04, p. 321-323, 1986.

MONTEIRO, R. Taxonomia e biologia da reprodução de *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Campinas, 1980. Disponível em: <<http://www.repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/315053>>. Acesso em: 17 mar. 2019.

NURHAIMI, H.; TORUAN, M. N. In vitro technology for seed production in plantation crops. **Warta Pusat Penelitian Bioteknologi Perkebunan**, v. 1, n. 1, p. 2-9, 1995

OLIVEIRA, V. M. et al. Chromosomal and morphological studies of diploid and polyploid cytotypes of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni (Eupatorieae, Asteraceae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, n. 2, p. 215-222, 2004.

OTHMAN, H. S.; OSMAN, M.; ZAINUDDIN, Z. Genetic Variabilities of *Stevia rebaudiana* Bertoni Cultivated in Malaysia as Revealed by Morphological, Chemical and Molecular Characterisations. **AGRIVITA, Journal of Agricultural Science**, v. 40, n. 2, p. 267-283, 2018.

PELÁ, M; CASTILHO, D. Cerrados: perspectivas e olhares. **Goiânia: Ed. Vieira**, 2010.

PILLAR, V.P. Multivariate exploratory analysis and randomization testing using Multiv. **Coenoses**, v.12, n.1, p.145-148, 1997.

RAMESH, K.; SINGH, V.; MEGEJI, N. W. Cultivation of stevia [*Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni]: A comprehensive review. **Advances in Agronomy**, v. 89, p. 137-177, 2006.

RENYI, A. **On measures of entropy and information**. Fourth Berkeley Symposium, Berkeley, 1960. p. 547-561.1961.

RIBEIRO, J. F; WALTER, B. M. T. Fitofisionomias do bioma cerrado. In: SANO, S. M; ALMEIDA, S. P. **Cerrado: ambiente e flora**. Planaltina: Embrapa Cerrados, cap. 3, p. 89-166, 1998.

SANTOS, M. G. A. Adaptação da *Stevia rebaudiana* Bertoni em modo de produção biológico em Ponte de Lima. Dissertação (mestrado) - Instituto Politécnico de Viana do Castelo, 2016.

SAS INSTITUTE. **SAS/STAT user's guide**. Version 6, 4th. Ed. Cary. North Caroline, p. 846, 1989.

STATSOFT INC. **Statistica for Windows** [Computer program manual] Tulsa, OK, StatSoft Inc. 2300 Ecast 14th Street, Tulsa, 1999.

TATEO, F. et al. Stevioside content and morphological variability in a population of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni from Paraguay [sweeteners]. **Italian Journal of Food Science**, v. 10, n. 261, p. 3, 1998.

TAVARINI, S., PASSERA, B., ANGELINI, L. G. CHAPTER 1: Crop and Steviol Glycoside Improvement in Stevia by Breeding. **Food Chemistry, Function and Analysis**, p. 1-31, 2018.

VIEIRA, E. A. et al. Variabilidade genética do banco de germoplasma de mandioca da Embrapa Cerrados acessada por meio de descritores morfológicos. **Científica**, v. 36, n. 1, p. 56-67, 2009.

WÖLWER-RIECK, U. Steviol Glycosides. **Food Chemistry, Function and Analysis**, Royal Society of Chemistry, p.1-32, 2018.

YADAV, A. K. et al. A review on the improvement of stevia [*Stevia rebaudiana* (Bertoni)]. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 91, n. 1, p. 1-27, 2011.

**CAPÍTULO 2. VARIABILIDADE GENÉTICA E MORFOLÓGICA DE GENÓTIPOS  
ELITE DE ESTÉVIA COM BASE EM MARCADORES MOLECULARES RAPD E  
VARIÁVEIS QUANTITATIVAS**

## VARIABILIDADE GENÉTICA E MORFOLÓGICA DE GENÓTIPOS ELITE DE ESTÉVIA COM BASE EM MARCADORES MOLECULARES RAPD E VARIÁVEIS QUANTITATIVAS

**Resumo:** A caracterização de genótipos de espécies cultivadas e/ou silvestres são práticas fundamentais para acessar e utilizar a variabilidade genética das espécies vegetais. Na caracterização de cada acesso podem ser utilizadas características ecológicas, morfológicas, agronômicas e moleculares que, por sua vez, proverão auxílio na busca de genes favoráveis aos objetivos do melhoramento genético. Neste trabalho, objetivou-se estudar, caracterizar e quantificar a variabilidade genética e morfoagronômica de acessos de *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni, utilizando marcadores moleculares RAPD e variáveis quantitativas morfoagronômicas. Foram estimadas distâncias genéticas e realizadas análises de agrupamento e dispersão gráfica dos genótipos. Parâmetros genéticos também foram estimados. Verificou-se a existência de alta variabilidade genética entre acessos de estévia com base em 74 marcadores RAPD e seis características quantitativas. Para as condições deste trabalho, as características de sobrevivência (%SBV), altura de planta (ALT) e área foliar (AFOL) são favoráveis à seleção e ganhos genéticos devido à razão  $CVg/CVe$  ( $CVr$ ) maior que uma unidade, alta herdabilidade com acurácia seletiva (AS) alta.

**Palavras-chave:** Diversidade, polimorfismo, marcador molecular, caracterização, *Stevia rebaudiana*.

## **GENETIC AND MORPHOLOGICAL VARIABILITY OF STEVIA ELITE GENOTYPES BASED ON RAPD MOLECULAR MARKERS AND QUANTITATIVE VARIABLES.**

Abstract: The characterization of genotypes of cultivated and/or wild species are fundamental practices to access and use the genetic variability of plant species. In the characterization of each access, ecological, morphological, agronomic and molecular characteristics can be used, which in turn, will assist in the search for genes favorable to the objectives of genetic improvement. This work aimed to study, characterize and quantify the genetic and morpho-agronomic variability of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni access, using RAPD molecular markers and morpho-agronomic quantitative variables. Genetic distances were estimated and cluster analysis and graphics dispersion of the access were performed. Genetic parameters were also estimated. There was a high genetic variability among elite stevia genotypes based on 74 RAPD markers and six quantitative traits. For the conditions of this work, the characteristics of survival (% BLS), plant height (ALT) and leaf area (AFOL) are favorable to the selection and genetic gains due to the  $CV_g / CV_e$  ( $CV_r$ ) ratio greater than one unit, high heritability with selective accuracy (AS) high.

**Key words:** Diversity, polymorphism, molecular marker, characterization, *Stevia rebaudiana*.

## 2.1. INTRODUÇÃO:

A *Stevia rebaudiana* Bertoni é uma planta nativa do Paraguai, dispersa em todo o seu território e também no sul do Brasil e Argentina. A estévia possui folhas com sabor adocicado e caracteriza-se como uma planta herbácea, semiperene. (DE; MONDAL; BANERJEE, 2013; KATAYAMA et al., 1976; MADAN et al., 2010; MARTINS et al., 2017).

No Brasil, a estévia cresce naturalmente no estado do Mato Grosso do Sul, preferindo solos levemente ácidos, arenosos e úmidos (CABRERA; HOLMES; MCDANIEL, 1996; YADAV et al., 2011; CAPONIO et al., 2016).

A indústria alimentícia e farmacêutica tem requerido uma alta quantidade de estévia em todo o mundo. Esse fato deve-se às suas qualidades edulcorantes naturais (esteviol e suas variações) ausentes de calorias. Dessa forma, esses adoçantes constituem alternativas para substituição da sacarose em todo o mundo. Essa demanda industrial associa-se ao aumento mundial e constante das desordens metabólicas como as prevalentes diabetes tipo II e obesidade (TAVARINI; PASSERA; ANGELINI, 2018; WÖLWER-RIECK., 2018).

A caracterização de germoplasmas, coleções de trabalho, acessos, genótipos (elite) de espécies cultivadas e/ou silvestres são práticas fundamentais para acessar e utilizar a variabilidade genética das espécies vegetais. Portanto, na caracterização de cada genótipo ou acesso, são utilizadas características ecológicas, morfológicas, agronômicas e moleculares, que, por sua vez, proverão auxílio na busca de genes favoráveis aos objetivos do melhoramento genético (FALEIRO; ANDRADE; JUNIOR, 2011).

Marcadores moleculares são utilizados frequentemente no estudo da variabilidade genética de diversas espécies vegetais. Os marcadores que utilizam a técnica de RAPD apresentam-se como dominantes e com principais aplicações em estudos de diversidade genética, mapeamento genético e *fingerprinting*. (FALEIRO, 2007).

Segundo Faleiro, Andrade e Junior (2011), a avaliação do fenótipo de acessos ou genótipos, onde se consideram os efeitos do ambiente e das interações genótipo versus ambiente, são de suma importância para suportar a aplicação de técnicas de seleção e hibridação que estão inseridas em programas de melhoramento genético. Os autores ainda supõem que haverá uma favorável integração das avaliações molecular e fenotípica.

Diante disso, objetivou-se estudar, caracterizar e quantificar a variabilidade genética e morfoagronômica de genótipos elite de Estévia *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni com base em marcadores moleculares RAPD e variáveis quantitativas morfoagronômicas.

## 2.2. MATERIAL E MÉTODOS

A obtenção de marcadores moleculares RAPD foi realizada no Laboratório de Genética e Biologia Molecular da Embrapa Cerrados. Foram utilizados 12 acessos de *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni do Banco Ativo de Germoplasma de Estévia da Embrapa Cerrados (Tabela 1).

**Tabela 1.** Acessos de *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni do Banco Ativo de Germoplasma de Estévia da Embrapa Cerrados.

Acesso	Descrição do Acesso
1	3-12
2	3-12 (planta diferente)
3	3-25
4	12
5	12 (planta diferente)
6	3-22
7	1
8	3-7
9	9
10	3-19
11	3-19 (planta diferente)
12	3-26

A metodologia de extração de DNA foi a do CTAB, com algumas modificações (FALEIRO et al., 2003). O tecido vegetal fresco foi macerado com auxílio de um bastão de vidro e, em seguida, foram adicionados em cada amostra 450 µL de tampão contendo Tris-HCl 100 µM (pH 8,3), CTAB 7%, EDTA 20 mM, NaCl 1,4 M. As amostras seguiram para banho-maria a 65 °C por 30 minutos.

A desproteinização foi realizada adicionando-se 400 µL de solução clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). Em seguida, as amostras foram agitadas para a formação de uma emulsão e, na sequência, centrifugadas a 5.000 rpm por cinco minutos, retirando-se aproximadamente 200 µL do sobrenadante que foi colocado em microtubos do tipo eppendorf de 2 mL.

Foram adicionados ao sobrenadante 200 µL de isopropanol gelado (5 °C), invertendo-se os microtubos para promover a precipitação do DNA. Em sequência, os tubos foram colocados na geladeira, permanecendo por 30 minutos e, em ininterruptão, foram centrifugados

a 7.000 rpm, por dez minutos, descartando-se o sobrenadante. O pellet formado foi lavado, por duas vezes, com 200 µL de etanol a 70% e secado na temperatura do ar ambiente. Após completamente seco, o pellet foi ressuspensionado em 100 µL de água Milli Q contendo RNase na concentração de 40 µL/mL.

A quantidade de DNA foi estimada por espectrofotometria a 260 nm (A260), e a relação A260/A280 foi utilizada para avaliar a pureza e a qualidade das amostras (SAMBROOCK et al., 1989). As amostras de DNA de cada genótipo foram diluídas para 5 ng/µL. Inicialmente, foram testados 17 primers decâmeros RAPD (Tabela 2).

As reações de amplificação para a obtenção de marcadores RAPD foram efetuadas em um volume total de 13 µL, sendo: 6,29 µL de água Milli Q 1,3 µL de tampão 1x (Invitrogen); 0,78 µL de MgCl<sub>2</sub> 50 mM; 0,13 µL dos desoxiribonucleotídeos (dATP, dTTP, dGTP e dCTP) 10 µM; 1,3 µL de um iniciador (Operon Technologies Inc., Alameda, CA, EUA) 2 µM; 0,2 µL da enzima Taq DNA polimerase (1 unidade) e 3 µL de DNA (15 ng).

**Tabela 2.** Primers testados e utilizados para obtenção dos marcadores RAPD, para 12 acessos de *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni, sequência 5'→3' e o número de bandas polimórficas (BP). Embrapa Cerrados, Planaltina, DF, 2019.

<i>Primer</i> RAPD	Sequência 5'→3'
OPD-07	TTGGCACGGG
*OPD-08	GGCAGGCAAG
OPD-10	GGTCTACACC
OPD-16	AGGGCGTAAG
OPE-16	GGTGACTIONGTG
OPE-18	GGACTGCAGA
*OPE-20	AACGGTGACC
OPF-01	ACGGATCCTG
OPF-17	AACCCGGGAA
OPG-01	CTACGGAGGA
*OPG-05	CTGAGACGGA
OPG-08	TCACGTCCAC
*OPG-17	ACGACCGACA

continuação...

**Tabela 2.** Primers testados e utilizados para obtenção dos marcadores RAPD, para 12 acessos de *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni, sequência 5'→3' e o número de bandas polimórficas (BP). Embrapa Cerrados, Planaltina, DF, 2019.                      continuação...

*OPH-04	GGAAGTCGCC
*OPH-12	TCCAACGGCT
OPH-16	TCTCAGCTGG
OPH-17	CACTCTCCTC

\* Primers selecionados e utilizados para gerar os marcadores RAPD, nos 12 acessos de *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni.

A partir desses testes, foram selecionados e utilizados seis primers para obtenção de marcadores RAPD, que geraram maior quantidade de bandas polimórficas e apresentaram melhor qualidade das amplificações (Tabela 2).

As amplificações para obtenção de marcadores RAPD foram efetuadas em termociclador programado para 40 ciclos, cada um composto pela seguinte sequência: 15 s a 94 °C, 30 s a 35 °C e 90 s a 72 °C. Concluídos os 40 ciclos, foi feita uma etapa de extensão final de seis minutos a 72 °C, e finalmente, a temperatura foi reduzida para 4 °C.

Após a amplificação, foram adicionados a cada amostra 3 µl de uma mistura de azul de bromofenol (0,25%) e glicerol (60%) em água. Essas amostras foram aplicadas em gel de agarose (1,2%), corado com brometo de etídio, submerso em tampão TBE (Tris-Borato 90 mM, EDTA 1 mM). A separação eletroforética foi de aproximadamente quatro horas, a 90 volts. Ao término da corrida, os géis foram fotografados sob luz ultravioleta.

Os marcadores RAPD gerados foram convertidos em uma matriz de dados binários, a partir da qual foram estimadas a dissimilaridade genética entre os diferentes acessos, com base no complemento do coeficiente de similaridade de Nei e Li (NEI e LI, 1979), utilizando o Programa Genes (CRUZ, 2013). Os gráficos bidimensionais da matriz de dados, usando uma escala de cores, foram estabelecidos utilizando o programa PAST v.3.26 (HAMMER et al., 2001).

A similaridade genética (SG) foi dada por:  $S_{gij} = 2N_{ij}/(N_i + N_j)$ , onde:  $N_{ij}$  é o número de bandas presentes em ambos acessos  $i$  e  $j$ ;  $N_i$  e  $N_j$  é o número de bandas presentes no genótipo  $i$  e  $j$ , respectivamente; e, subtraído o valor de SG da unidade (1 - SG), foi obtida a dissimilaridade genética.

A matriz de dissimilaridade genética foi empregada para realizar análises de agrupamento por meio de dendrograma, utilizando o método do UPGMA (Unweighted

pairgroup method arithmetic average) (SNEATH e SOKAL, 1973) como critério de agrupamento, e a dispersão gráfica baseada em escalas multidimensionais, usando o método das coordenadas principais, com auxílio do Programa SAS (SAS Institute Inc., 2008) e Statistica (STATSOFT Inc., 2005).

O estudo morfoagronômico com variáveis quantitativas foi realizado no Setor de Viveiros e Casas de Vegetação da Embrapa Cerrados, em Planaltina-DF (15°36'19" de latitude Sul, 47°42'56" de longitude Oeste e altitude de 1.024 metros). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 9 tratamentos (genótipos elite) (Tabela 3) e quatro repetições (4 clones de cada genótipo elite), totalizando 36 parcelas experimentais. Cada parcela foi representada pela média de 3 clones de cada genótipo elite para as variáveis de número de flores (NFLOR), altura da planta/cm (ALT) e área foliar/mm<sup>2</sup> (AFOL). Já para a variável número de folhas (NFOL), cada parcela foi representada pela média de 2 clones.

Foram avaliados em cada clone, seis descritores morfoagronômicos quantitativos, sendo dois descritores para características de flores. Os descritores avaliados foram % de sobrevivência (%SBV), % de florescimento (%FLOR), número de flores (NFLOR), número de folhas (NFOL), altura da planta/cm (ALT) e área foliar/mm<sup>2</sup> (AFOL). As avaliações foram feitas um mês após o transplante de estacas enraizadas de cada clone.

Foram realizadas análises descritivas, análises de variância e as médias foram comparadas entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância com o auxílio do programa Genes (CRUZ, 2013).

**Tabela 3.** Descrição dos 9 genótipos elite de *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertonii do Banco Ativo de Germoplasma de Estévia da Embrapa Cerrados.

Genótipo Elite	Descrição do Genótipo
1	3-12
2	3-25
3	12
4	3-22
5	1
6	3-7
7	9
8	3-19
9	3-26

As distâncias genéticas entre os nove genótipos elite de *S. rebaudiana* foram calculadas com base em todos os 6 descritores morfoagronômicos. As estimativas foram baseadas na distância de Mahalanobis com auxílio do programa computacional Genes (CRUZ, 2013). Os gráficos bidimensionais da matriz de dados, usando uma escala de cores, foram estabelecidos utilizando o programa PAST v.3.26 (HAMMER et al., 2001).

Com base nas matrizes de distâncias genéticas, foram realizadas análises de agrupamento dos acessos via dendrograma, utilizando como critério o método da ligação média entre grupos, UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic Averages*). Foi realizada também a dispersão gráfica baseada em escalas multidimensionais usando o método das coordenadas principais, com auxílio dos Programas SAS (SAS INSTITUTE INC., 2008) e Statistica (STATSOFT INC., 2005).

As correlações fenotípicas entre as seis características avaliadas foram estimadas, com base no coeficiente de correlação de Pearson, com o auxílio do programa estatístico Genes (CRUZ, 2013), em que:

$$\text{Coeficiente de correlação fenotípica} - r_f = \frac{C\hat{v}_f(X,Y)}{\sqrt{\hat{\sigma}_f^2(X) \cdot \hat{\sigma}_f^2(Y)}}$$

$C\hat{v}_f$  = Estimador da covariância fenotípica entre dois caracteres  $X$  e  $Y$ ;

$\hat{\sigma}_f^2(X)$  = Estimador da variância fenotípica do caráter  $X$ ;

$\hat{\sigma}_f^2(Y)$  = Estimador da variância fenotípica do caráter  $Y$ .

O teste  $t$  foi empregado para testar a significância do  $r$  amostral, em que:

$$t = \frac{r}{\sqrt{1 - r^2}} \cdot \sqrt{n - 2}$$

$n$  = o número de observações. Entretanto, nesse caso, testa-se a hipótese de que a correlação seja “0”.

As correlações foram classificadas segundo Carvalho, Lorencetti e Benin (2004), em que as intensidades são: perfeita ( $|r| = 1$ ); fortíssima ( $0,90 \geq |r| < 1$ ); forte ( $0,60 \leq |r| < 0,90$ ); média ( $0,30 \leq |r| < 0,60$ ); fraca ( $0,00 < |r| < 0,30$ ) e nula ( $r = 0$ ).

A acurácia seletiva (AS) foi calculada segundo Resende e Duarte (2007) como sendo:

$$AS = (1-1/F)^{0.5}; \text{ para } F \geq 1.$$

F = é o valor do teste F

A contribuição relativa de cada caractere para a divergência genética também foi medida utilizando o método de Singh (SINGH, 1981), com o auxílio do programa computacional Genes (CRUZ, 2013).

### 2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação dos 12 genótipos de *S. rebaudiana*, através do uso de 6 *primers* decâmeros, produziu um total de 74 marcadores RAPD, sendo que 85,1% foram polimórficos e 14,9% monomórficos (Tabela 4), obtendo-se uma média de 12,3 marcadores por iniciador.

Os iniciadores OPH-12, OPH-04 e OPG-05 apresentaram o maior número de bandas polimórficas, 18, 15 e 12, respectivamente. O número total de marcas geradas por estes iniciadores foi superior à média de 12,3 marcas por iniciador.

**Tabela 4.** Polimorfismo mostrado pelos *primers* RAPD em *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. Embrapa Cerrados, Planaltina, DF. 2019.

<i>Primer</i> RAPD	Sequência 5'→3'	Número de bandas polimórficas	Número de bandas monomórficas
OPD-08	GGCAGGCAAG	4	1
OPE-20	AACGGTGACC	5	3
OPG-05	CTGAGACGGA	12	1
OPG-17	ACGACCGACA	9	2
OPH-04	GGAAGTCGCC	15	1
OPH-12	TCCAACGGCT	18	3
Total		63	11

A quantidade de polimorfismos gerados com os marcadores RAPD, juntamente com a elevada média de marcadores por iniciador, evidencia à alta variabilidade genética dos 12 genótipos elite de *S. rebaudiana* pertencentes a coleção de trabalho da Embrapa Cerrados. A eficiência na utilização de marcadores RAPD mostra alta variabilidade genética, com base na

ampla quantidade de polimorfismos gerados, assim como foi registrado por Chester et al, (2013), Sharma, Kaur e Era (2016) e Yao, Ban e Brandle (1999).

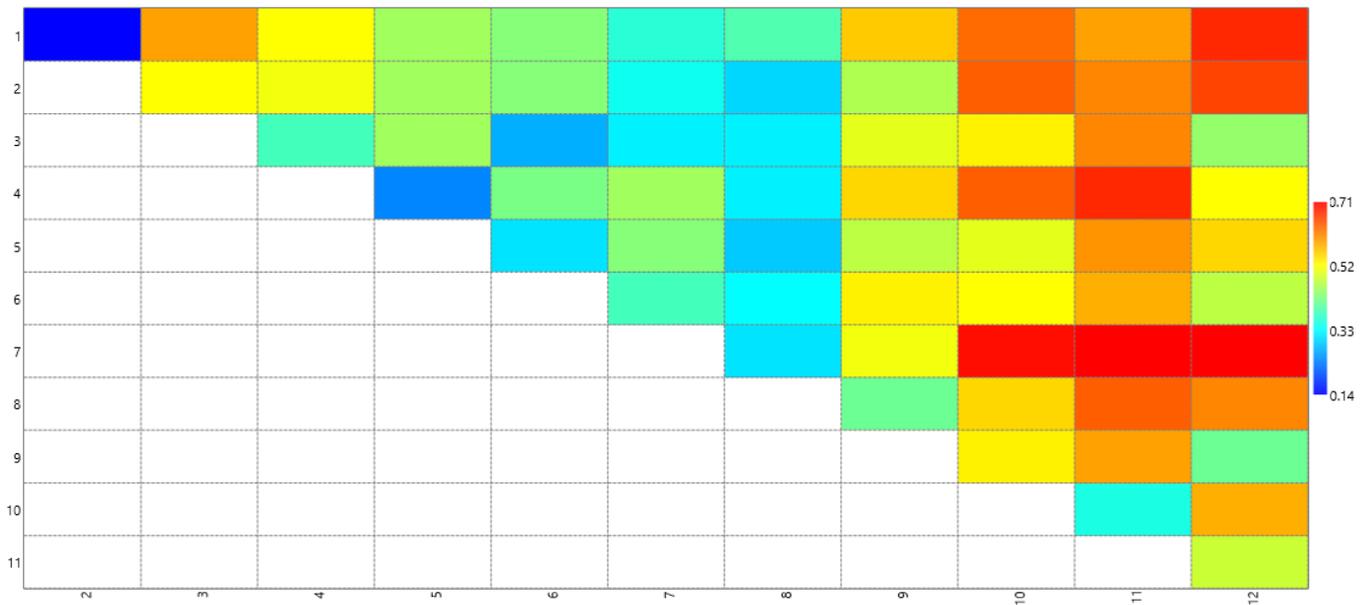
A alta variabilidade genética encontrada nos genótipos elite de *S. rebaudiana* mostra-se fundamental para o programa de melhoramento de estévia da Embrapa Cerrados, pois permite a seleção de genótipos elite divergentes para hibridação e posterior associação de outras características de interesse do melhoramento a fim de culminar em variedades com alta produtividade e adaptadas às condições do Cerrado.

As distâncias genéticas estimadas com base nos marcadores RAPD variaram de 0,14 a 0,71 conforme mostrado na Tabela 5, ilustrado na Figura 1, através do gráfico bidimensional utilizando uma escala de cores.

O genótipo 7 descrito com o código (1) foi o mais distante em relação aos genótipos 10 (3-19), 11 (3-19 planta diferente) e 12 (3-26) com um coeficiente de dissimilaridade de 0,7. Isso evidencia um alto potencial desses genótipos para utilização como genitores na hibridação de estévia nessa coleção de trabalho. O genótipo 8 (3-7) foi o que apresentou a menor distância média (0,41) em relação a todos os demais genótipos. A distância média geral foi de 0,44. O genótipo 11 (3-19 planta diferente) apresentou a maior distância média (0,59) em relação a todos os demais genótipos. O genótipo 1 (3-12), em relação ao genótipo 2 (3-12 planta diferente), apesar de fenotipicamente exibir diferenças, teve a menor distância (0,14), exibida na cor azul escuro na Figura 1.

**Tabela 5.** Matriz de distâncias entre 12 genótipos de *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni, calculada utilizando o complemento do índice de coincidência simples baseado nos 74 marcadores RAPD. Embrapa Cerrados, Planaltina, DF, 2019.

Genótipos	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12 (3-26)
1 (3-12)	0,14	0,59	0,52	0,45	0,43	0,36	0,39	0,56	0,63	0,59	0,68
2 (3-12 p.d.)		0,52	0,51	0,45	0,43	0,34	0,30	0,46	0,64	0,61	0,66
3 (3-25)			0,38	0,45	0,27	0,32	0,32	0,50	0,53	0,61	0,44
4 (12)				0,24	0,42	0,45	0,32	0,55	0,64	0,68	0,52
5 (12 p.d.)					0,31	0,43	0,29	0,47	0,50	0,60	0,55
6 (3-22)						0,38	0,33	0,53	0,52	0,58	0,47
7 (1)							0,31	0,51	0,70	0,71	0,71
8 (3-7)								0,41	0,55	0,64	0,61
9 (9)									0,53	0,59	0,41
10 (3-19)										0,35	0,58
11 (3-19 p.d.)											0,48

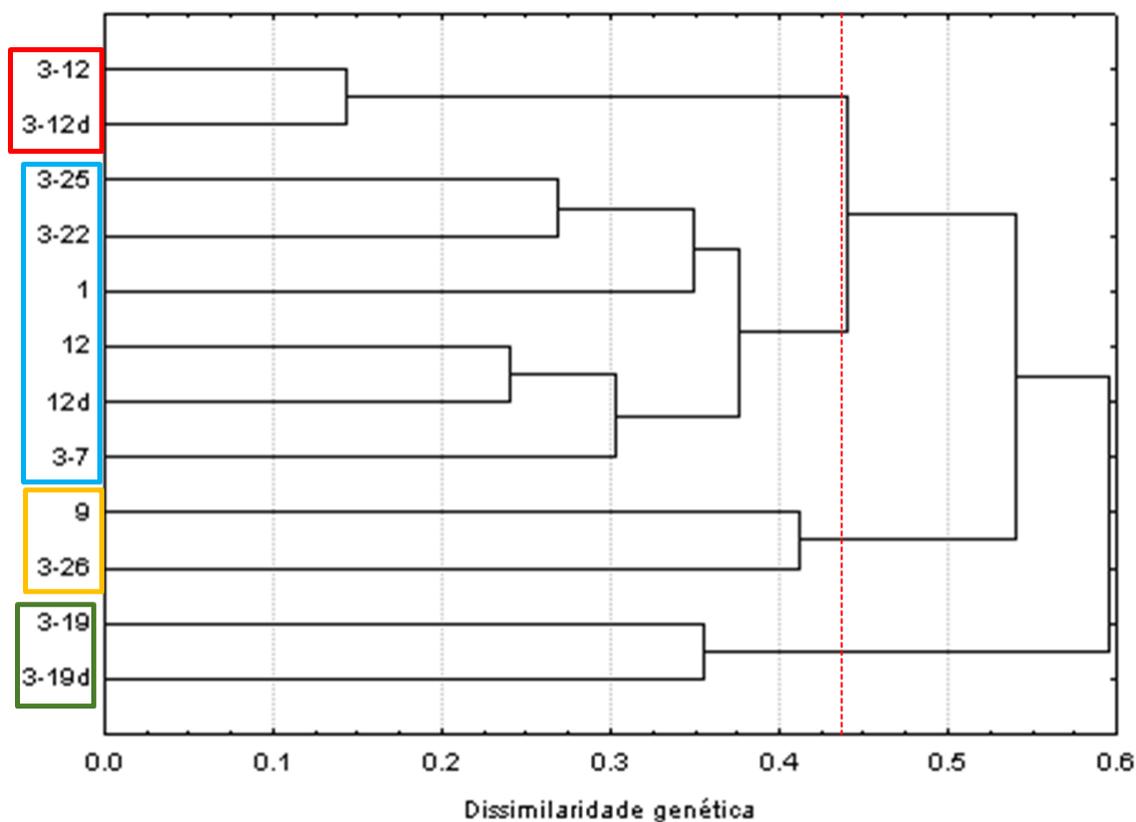


**Figura 1.** Gráfico bidimensional da matriz de distâncias, usando uma escala de cores, com a representação do mapa de calor, projeta uma visão geral da distância dos 12 genótipos de acordo com a (Tabela 5). As cores das “caixas” quadradas especificam a matriz de distância com uma classificação de 0,14 a 0,71. Embrapa Cerrados, Planaltina, DF, 2019

A análise de agrupamento via dendrograma, utilizando como critério de agrupamento o método do UPGMA e a definição do ponto de corte com base na distância genética média de 0,44, propiciou a formação de quatro grupos, conforme apresentado na Figura 2.

Observou-se que o dendrograma (Figura 2) está coerente com a matriz de distâncias (Tabela 5), pois o genótipo 1 (3-12) em relação ao genótipo 2 (3-12 planta diferente), que apresentou a menor matriz de distância (0,14), encontra-se no mesmo grupo na análise de agrupamento do dendrograma (Figura 2). De forma semelhante, os genótipos 10 (3-19) e 11 (3-19 planta diferente) formaram também outro grupo distinto.

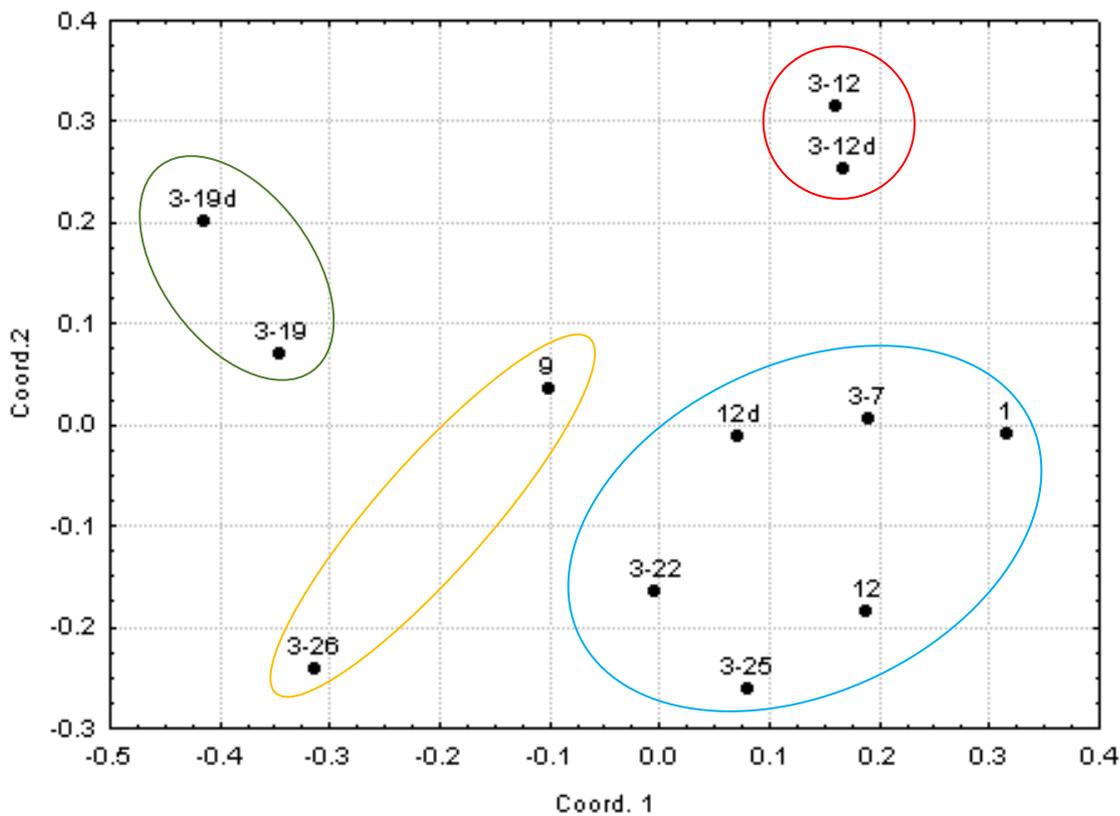
Já os genótipos 9 (9) e 12 (3-26), que apresentaram um coeficiente de dissimilaridade entre si de 0,41, que por sua vez é abaixo da média, apresentaram-se no mesmo grupo com base na análise de agrupamento (Figura 2). Por fim, 6 genótipos ( 3(3-25); 6(3-22); 7(1); 4(12); 5(12 planta diferente); 8(3-70) de *S. rebaudiana* formaram o maior grupo do dendrograma (Figura 2), que por sua vez está em concordância com a matriz de distâncias apresentada na Tabela 5 e Figura 1, pois os coeficientes de dissimilaridades entre esses genótipos situam-se entre 0,24 a 0,45.



**Figura 2.** Análise de agrupamento de 12 genótipos *Stevia rebaudiana* (Bert.), com base na matriz de dissimilaridade genética calculada utilizando 74 marcadores RAPD. O método do UPGMA foi usado como critério de agrupamento. O valor do coeficiente de correlação cofenética ( $r$ ) foi 0,82. Embrapa Cerrados, Planaltina, DF, 2019.

Para complementar a análise de agrupamento via dendrograma, a análise de dispersão (Figura 3) evidenciou e reforçou a formação dos quatro grupos de divergência entre os 12 genótipos de estévia em estudo.

A alta variabilidade dos 12 genótipos, com uma distribuição ao longo das duas coordenadas do gráfico, comprova a correspondência dos grupos de similaridade definidos na matriz de distâncias (Tabela 5), no dendrograma (Figura 2) e na dispersão gráfica (Figura 3).



**Figura 3.** Análise de dispersão de 12 genótipos de *Stevia rebaudiana* com base na matriz de dissimilaridade genética calculada utilizando 74 marcadores RAPD. Foi utilizado o método das coordenadas principais. Embrapa Cerrados, Planaltina, DF, 2019.

Portanto, todas as análises (Figuras 1, 2, 3 e Tabela 5) estão em harmonia quanto à formação de quatro grupos divergentes entre si, bem como à diversidade dos genótipos de estévia. Os genótipos codificados 3-12d, 3-19d e 12d como “planta diferente”, obtiveram baixa dissimilaridade em relação aos seus correspondentes 3-12, 3-19 e 12 respectivamente. Logo, esse diagnóstico foi importante para demonstrar que, apesar do fenótipo exibir diferença visual, o estudo molecular com o uso de marcadores RAPD comprova que são genótipos com a base genética estreita entre si, provavelmente de uma mesma descendência.

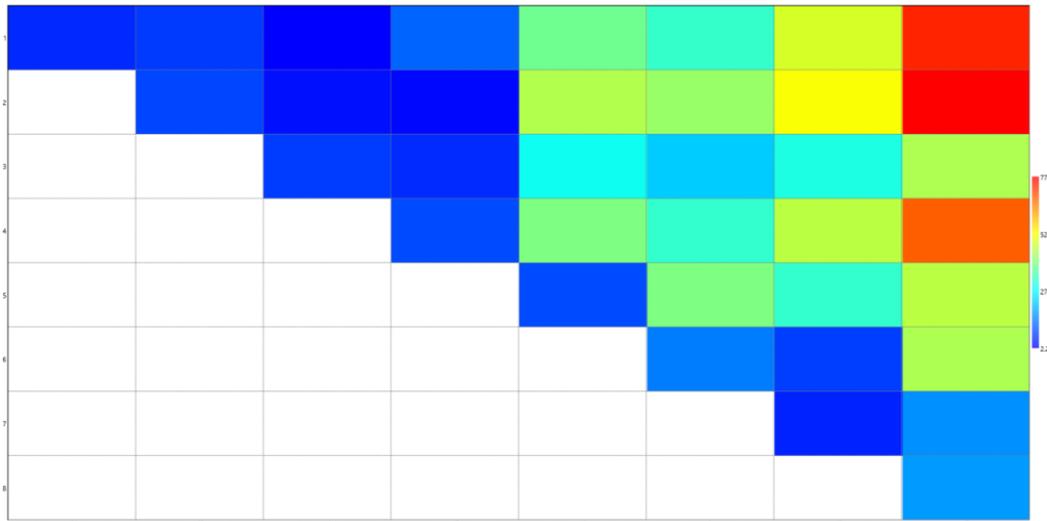
Pela matriz de distâncias genéticas entre os 9 genótipos elite de *S. rebaudiana* (Tabela 6), evidenciam-se os maiores valores entre os genótipos elite 2(3-25) e 9(3-26); 1(3-12) e 9(3-26); 4(3-22) e 9(3-26), com uma distância de 77,27; 73,81 e 68,03 respectivamente. Em contrapartida, os genótipos 1(3-12) e 4(3-22); 2(3-25) e 5(1); 2(3-25) e 4(3-22), representados pela coloração azul escuro na Figura 4, com uma distância de 2,28; 2,99 e 3,94 respectivamente, apresentaram as menores distâncias genéticas entre si.

Podemos verificar que os três genótipos mais distantes entre si, (3-25) e 9(3-26); 1(3-12) e 9(3-26); 4(3-22) e 9(3-26), pertenciam a grupos divergentes de acordo com as Figura 2 e 3, da diversidade dos genótipos utilizando marcadores RAPD. Já os genótipos com menores distâncias, com exceção do 1(3-12) e 4(3-22), pertenciam ao mesmo grupo de acordo com as Figuras 2 e 3.

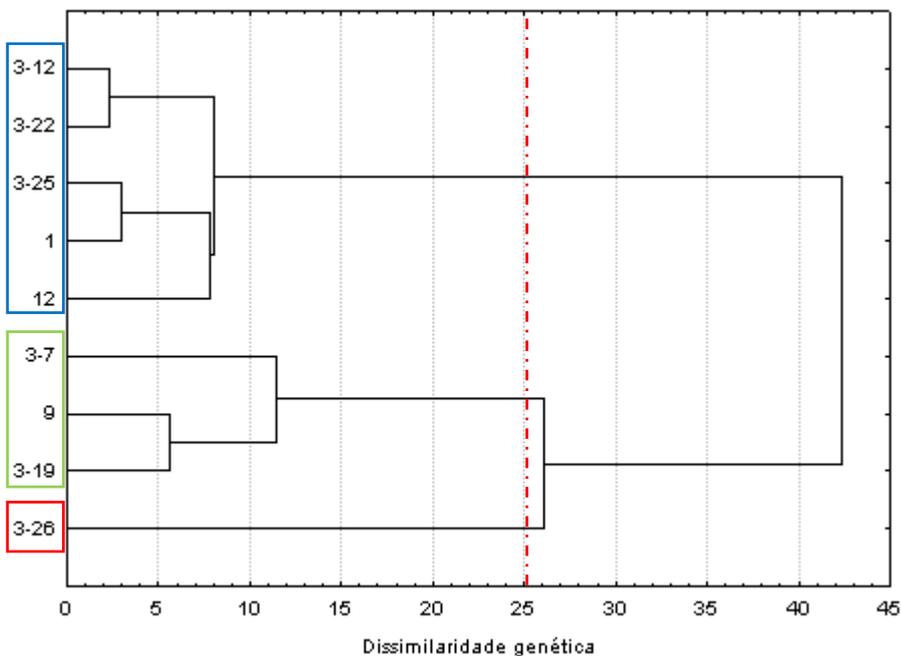
A análise de agrupamento via dendrograma, utilizando como critério o método do UPGMA e a definição do ponto de corte com base na distância genética média de 25,23, propiciou a formação de três grupos, conforme apresentado na Figura 5. Podemos verificar que o genótipo 9(3-26) ficou distante dos genótipos 2(3-25), 1(3-12) e 4(3-22), confirmando assim a matriz das distâncias (Tabela 6) e os grupos supracitados referentes ao estudo de marcadores RAPD (Figuras 2 e 3). Esses três genótipos (1, 2 e 4) formaram o primeiro agrupamento conjuntamente com os genótipos 5(1) e 3(12). Logo, os genótipos 6(3-7), 7(9), 8(3-19) formaram o segundo grupo de acordo com o dendrograma (Figura 5). Por fim, o genótipo 9(3-26), *per se*, constituiu um novo grupo que está mais distante em relação ao primeiro grupo formado.

**Tabela 6.** Matriz de distâncias entre nove genótipos de *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni, calculada utilizando a distância generalizada de Mahalanobis de seis caracteres morfoagronômicos. Embrapa Cerrados, Planaltina, DF, 2019.

<b>Genótipos</b>	2	3	4	5	6	7	8	9 (3-26)
1 (3-12)	6,27	7,97	2,28	12,20	38,15	32,37	48,27	73,81
2 (3-25)		9,11	3,94	2,99	44,73	42,28	51,88	77,27
3 (12)			8,16	6,43	28,66	22,24	30,02	44,30
4 (3-22)				9,51	39,66	32,23	45,64	68,03
5 (1)					9,51	39,66	32,23	45,64
6 (3-7)						14,46	8,39	44,26
7 (9)							5,66	16,42
8 (3-19)								17,44

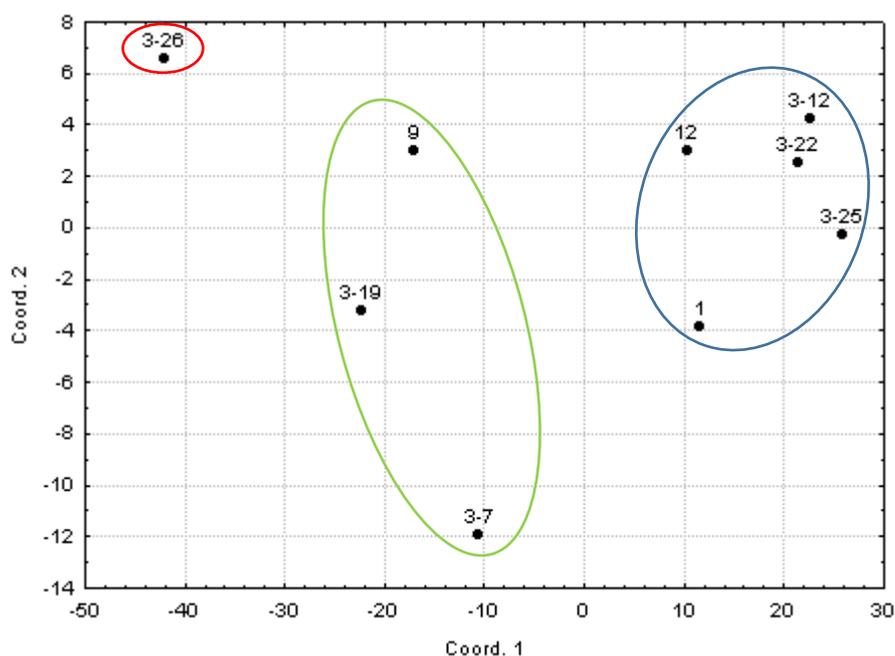


**Figura 4.** Gráfico bidimensional da matriz de distância, usando uma escala de cores com a representação do mapa de calor, projeta uma visão geral da distância dos nove genótipos de acordo com a (Tabela 6). As cores das “caixas” quadradas especificam a matriz de distância com uma classificação de 2,28 (azul) a 77,3 (vermelho). Embrapa Cerrados, Planaltina, DF, 2019.



**Figura 5.** Análise de agrupamento de nove genótipos *Stevia rebaudiana* (Bert.), com base na matriz de dissimilaridade genética calculada utilizando a distância generalizada de Mahalanobis estimada com base em seis caracteres morfoagronômicos. O método do UPGMA foi usado como critério de agrupamento. O valor do coeficiente de correlação cofenética ( $r$ ) foi 0,87. Embrapa Cerrados, Planaltina, DF, 2019.

A análise de dispersão (Figura 6) confirma a formação dos três grupos divergentes de acordo com todas análises (Figura 3, 4 e 5). Assim, demonstra-se a alta variabilidade dos genótipos dispersos ao longo das duas coordenadas. Pode-se verificar a correspondência dos grupos de similaridade definidos no dendrograma (Figura 5) com os grupos formados na dispersão (Figura 6). Todavia, o grupo dois, formado pelos genótipos 6(3-7), 7(9) e 8(3-19), ficou com uma distribuição mais distante ao longo das coordenadas devido à sua distância apresentada na Tabela 6, que mostrou um distanciamento de 14,46 entre os genótipos 6(3-7) e 7(9).



**Figura 6.** Análise de dispersão de nove genótipos de *Stevia rebaudiana*, com base na matriz de dissimilaridade genética calculada utilizando a distância generalizada de Mahalanobis estimada com base em seis caracteres morfoagronômicos. Foi utilizado o método das coordenadas principais. Embrapa Cerrados, Planaltina, DF, 2019.

Com base no método proposto por Singh (1981), foi possível classificar a importância relativa de todas as seis variáveis quantitativas avaliadas para a caracterização dos nove genótipos elite de *S. rebaudiana*. Observou-se, conforme apresentado na Tabela 7, que a variável sobrevivência (%SBV), medida em porcentagem, foi a que mais contribuiu para a variabilidade dos 9 genótipos, com 68,8%, seguida pela variável altura (ALT cm), que contribuiu com 19,24%. Por outro lado, a variável porcentagem de florescimento (%FLOR) foi a que menos participou relativamente para a divergência, com 1,47%. Este fato pode ser

justificado pela interação ambiental, pois de acordo com Valio e Rocha (1977), a estévia é obrigatoriamente de dias curtos, ou seja, são plantas que florescem com fotoperíodos inferiores ao fotoperíodo crítico.

A estévia pode iniciar o florescimento muito cedo, logo depois da formação de 4 folhas verdadeiras, transplantes ou podas efetuadas em dias curtos, e o plantio nos meses de menor comprimento do dia pode induzir o florescimento das mudas ainda no viveiro (CARNEIRO, 1990; BRANDLE; STARRATT; GIJZEN, 1998; LIMA FILHO; VALOIS; LUCAS, 2004).

Segundo Cruz, Regazzi e Carneiro (2012), a importância relativa das características propicia a eliminação de variáveis, que pode melhorar na escolha dos caracteres que serão estudados quanto a divergência.

**Tabela 7.** Contribuição relativa dos caracteres para divergência – SINGH (1981), % de sobrevivência (%SBV), % de florescimento (%FLOR), número de flores (NFLOR), número de folhas (NFOL), altura da planta/cm (ALT) e área foliar/mm<sup>2</sup> (AFOL) de 9 genótipos elite de *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. Embrapa Cerrados, Planaltina, DF. 2019.

Variável	S.j.	SINGH %
% SBV	737,35	68,80
% FLOR	15,75	1,47
NFLOR	44,42	4,14
NFOL	51,76	4,83
ALT (cm)	206,22	19,24
AFOL (mm <sup>2</sup> )	16,07	1,50

S.j.: valor estimado da estatística de Singh (1981).

As análises de variância mostraram diferenças significativas entre os genótipos elite de *S. rebaudiana*, comprovando a presença de variabilidade, com base nas seis variáveis analisadas (Tabela 8). A variabilidade desses genótipos elite já era esperada, considerando as distâncias genéticas de Mahalanobis e as análises de agrupamento e dispersão gráfica realizadas com base nestas distâncias (Tabela 6; Figura 5; Figura 6).

A partir do valor de F, a precisão e a acurácia experimental foram consideradas adequadas segundo Resende e Duarte (2007), pois os valores de F (Valor F) foram todos acima de 1,96 (Tabela 8), variando de 2,56 a 30,33 e os valores da acurácia seletiva (AS) foram todos

acima de 0,70 variando de 0,78 a 0,98. Com base nos valores de máximo e mínimo, verifica-se uma grande amplitude entre a média dos genótipos em cada uma das seis variáveis estudadas. Destaca-se que, somente para as variáveis (NFOL) e (ALT), a amplitude ficou mais próxima da média. Desse modo, de maneira geral, a amplitude indica a influência de diversos fatores nas medidas de cada caractere.

Os coeficientes de variação ambiental mostraram-se ( $CV_e$ ) altos para os valores de porcentagem de flor (% FLOR) e número de flor (NFLOR) com 56,01% e 86,51% respectivamente. Evidenciou-se uma forte interação do ambiente para esses caracteres. Desse modo, as estimativas de herdabilidade para essas características foram de 67,02% e 60,95% respectivamente, ou seja, 67% e 60% de toda a variabilidade fenotípica para (% FLOR) e (NFLOR) nesses genótipos elite de *S. rebaudiana* vieram de diferenças genéticas que controlam essas características.

A herdabilidade  $h_a^2$  (%) para os caracteres de % de sobrevivência (%SBV), número de folhas (NFOL), altura da planta (ALT) em cm e área foliar (AFOL) em mm<sup>2</sup> foram altos, com valores próximo de 80% e > 80%. Altos valores dos coeficientes de variação genética ( $CV_g$ ) associados a alta herdabilidade são imprescindíveis para uma eficaz inferência acerca do valor genotípico dos genótipos a partir das avaliações fenotípicas (RESENDE, 2002).

Segundo Santos (1985), a razão  $CV_g/CV_e$  ( $CV_r$ ) é a que mede a variabilidade genotípica à disposição do melhorista, e de acordo com Vencovsky (1987), essa relação pressupõe o sucesso no melhoramento genético. Logo, exceto para as características % FLOR, NFLOR) e NFOL, todas foram acima de uma unidade (Tabela 8).

Para as condições desse trabalho, pode-se inferir que, as características % SBV, ALT e AFOL são favoráveis à seleção e ganhos genéticos, uma vez que o valor de  $CV_g$  é maior ao  $CV_e$ .

Foram apuradas diferenças estatisticamente significativas entre as médias dos genótipos elite de *S. rebaudiana* pelo teste de Tukey a 5% de significância para todas as características avaliadas (Tabela 8). Formou-se, através do agrupamento com base no teste de Tukey, 2 a 4 grupos de similaridade. A % de sobrevivência (%SBV) foi a característica que formou somente 2 grupos de coincidência. As características % FLOR e NFLOR formaram três grupos; em contrapartida, as variáveis NFOL, ALT e AFOL formaram quatro grupos de similaridade cada. Consequentemente, resultou-se em uma média geral de 3,3 grupos por característica, concordando com os 3 grupos formados na Figuras 2, 3, 4 e 6.

**Tabela 8.** Análise de variância, parâmetros genéticos e comparação das médias das variáveis % de sobrevivência (%SBV), % de florescimento (%FLOR), número de flores (NFLOR), número de folhas (NFOL), altura da planta (ALT) em cm e área foliar (AFOL) em mm<sup>2</sup> de 9 genótipos elite de *S. rebaudiana* submetidos ao teste de Tukey a 5%, e dos valores mínimos (Mínimo), médios (Média), amplitude (A), máximos (Máximo), quadrado médio (QM), variâncias fenotípica ( $\sigma^2_f$ ), ambiental ( $\sigma^2_e$ ), genotípicas ( $\sigma^2_g$ ), das estimativas da herdabilidade ao nível da média ( $h^2_a$ ), acurácia seletiva (AS), dos coeficientes de variação genética (CV<sub>g</sub>) coeficientes de variação ambiental, da razão CV<sub>g</sub>/CV<sub>e</sub> (CV<sub>r</sub>). Embrapa Cerrados, Planaltina, DF. 2019.

<b>Genótipo / Descrição</b>	<b>% (SBV)</b>	<b>% (FLOR)</b>	<b>(NFLOR)</b>	<b>(NFOL)</b>	<b>(ALT) (cm)</b>	<b>(AFOL) (mm<sup>2</sup>)</b>
1 (3-12)	95 a	52,5 a	21,91 ab	37,25 bc	20,75 bc	35,65 bc
2 (3-25)	95 a	22,5 ab	18,16 ab	35,37 bc	21,25 bc	32,88 c
3 (12)	85 a	45 ab	9,16 ab	41,37 bc	24,66 b	35,44 bc
4 (3-22)	92,5 a	45 ab	32,41 a	41,5 bc	21,66 bc	34,62 c
5 (1)	85 a	12,5 b	5,33 ab	42,5 abc	22,5 bc	33,42 c
6 (3-7)	25 b	25 ab	4,83 b	29,12 c	18,25 c	33,69 c
7 (9)	30 b	30 ab	12,41 ab	58,75 ab	23,58 bc	46,41 ab
8 (3-19)	15 b	15 ab	5,75 ab	54,25 abc	22,5 bc	40,33 bc
9 (3-26)	20 b	20 ab	10,75 ab	69 a	31,92 a	52,83 a
Mínimo	15	12,5	4,83	29,12	18,25	32,88
Média	60,27	29,72	13,41	45,45	23,01	38,36
A	80	40	27,58	39,88	13,67	19,95
Máximo	95	52,5	32,41	69	31,92	52,83
QM	5.252,77	834,02	339,90	642,54	57,82	192,10
Valor F	30,33*	3,03*	2,56*	4,82*	10,35*	8,84*
$\sigma^2_f$	1.313,19	208,50	84,97	160,63	14,45	48,02
$\sigma^2_e$	43,28	68,75	33,18	33,27	1,39	5,42
$\sigma^2_g$	1.269,90	139,75	51,79	127,36	13,05	42,59
$h^2_a$ (%)	96,7	67,02	60,95	79,28	90,34	88,69
AS	0,98	0,81	0,78	0,89	0,95	0,94
CV <sub>g</sub>	59,11	39,77	53,64	24,82	15,70	17,01
CV <sub>e</sub>	21,89	56,01	86,51	25,58	10,32	12,15
CV <sub>r</sub>	2,70	0,71	0,62	0,97	1,52	1,40

\* Significativo a 5% pelo teste F; <sup>(1)</sup>Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey 5% de probabilidade.

As estimativas dos coeficientes de correlação fenotípica entre as médias das seis características (Tabela 9) estudadas nesse trabalho inferem a existência de correlação forte, significativa e positiva entre as variáveis % de sobrevivência (%SBV) com área foliar (AFOL), número de folhas (NFOL) com altura da planta (ALT), bem como altura da planta (ALT) com área foliar (AFOL). Já os caracteres número de folhas (NFOL) e área foliar (AFOL),

apresentaram, segundo a classificação de Carvalho, Lorencetti e Benin (2004), uma correlação fortíssima, ou seja, acima de 0,90, positiva e com significância de 1% de probabilidade pelo teste t.

**Tabela 9.** Estimativas dos coeficientes de correlação de Pearson entre as médias das variáveis % de sobrevivência (%SBV), % de florescimento (%FLOR), número de flores (NFLOR), número de folhas (NFOL), altura da planta (ALT) em cm e área foliar (AFOL) em mm<sup>2</sup> de 9 genótipos elite de *S. rebaudiana*. Embrapa Cerrados, Planaltina, DF. 2019.

Variáveis	% (SBV)	% (FLOR)	(NFLOR)	(NFOL)	(ALT)	(AFOL)
% (SBV)	-	0,53	0,58	-0,57	-0,31	-0,67*
% (FLOR)		-	0,66	-0,32	-0,19	-0,23
(NFLOR)			-	-0,17	-0,13	-0,17
(NFOL)				-	0,85**	0,94**
(ALT)					-	0,82**
(AFOL)						-

\*\* , \* : Significativo a 1 e 5% de probabilidade, respectivamente pelo teste t.

## 2.4. CONCLUSÕES

Verifica-se alta variabilidade genética dos 12 acessos de *S. rebaudiana* avaliados com base em marcadores RAPD que podem ser utilizados como genitores em hibridações que buscam otimizar a heterose, contribuindo também para aumentar a base genética em programas de melhoramento de estévia.

Existe alta variabilidade genética com base nas distâncias genéticas calculadas com base em seis características morfoagronômicas.

Observaram-se diferenças estatisticamente significativas entre as médias das características quantitativas dos genótipos elite de estévia. As características SBV, ALT e AFOL são favoráveis à seleção e ganhos genéticos devido à razão  $CV_g/CV_e$  ( $CV_r$ ) acima de uma unidade, alta herdabilidade com acurácia seletiva (AS) alta. O genótipo 9 (3-26) mostrou-se com maiores médias para as variáveis NFOL, ALT e AFOL, que são importantes para o melhoramento de *S. rebaudiana*, visando à maior produtividade de fitomassa.

## 2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRANDLE, J. E.; STARRATT, A. N.; GIJZEN, M. *Stevia rebaudiana*: Its agricultural, biological, and chemical properties. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 78, n. 4, p. 527-536, 1998.

CABRERA, A. L.; HOLMES, W. C.; MCDANIEL, S. *Stevia*, Compositae III. **Flora del Paraguay**, v. 25, p. 302-330, 1996.

CAPONIO, I. et al. Aspectos de la biología reproductiva de *Stevia rebaudiana* (Asteraceae). **Bonplandia**, v. 25, n. 1, p. 59-72, 2016.

CARNEIRO, J. W. P. *Stevia rebaudiana* (Bert) Bertoni: produção de sementes. **Maringá: Fundação Universidade Estadual de Maringá**, 1990.

CARVALHO, F. I. F.; LORENCETTI, C.; BENIN, G. **Estimativas e implicações da correlação no melhoramento vegetal**. Pelotas: UFPel, 2004.

CHESTER, K. et al. Genetic and metabolic diversity in *Stevia rebaudiana* using RAPD and HPTLC analysis. **Pharmaceutical biology**, v. 51, n. 6, p. 771-777, 2013.

CRUZ, C. D. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 35, n. 3, p. 271-276, 2013.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J.; CARNEIRO, P. C. S. Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. 3. ed., v. 2, **Viçosa: UFV**, 668 p., 2012.

DE, S.; MONDAL, S.; BANERJEE, S. **Stevioside: technology, applications and health**. John Wiley & Sons, 2013.

FALEIRO, F. G. **Marcadores genético-moleculares aplicados aos programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p. 35-49, 2007.

FALEIRO, F. G.; ANDRADE, S. R. M.; JUNIOR, F. B. D. R. Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária. **Embrapa Cerrados-Livro técnico (INFOTECA-E)**, 2011.

HAMMER, O. et al. PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia electronica**, v. 4, n. 1, p. 1-9, 2001.

KATAYAMA, O. et al. The practical application of *Stevia* and research and development data. **I.S.U. Co.**, p. 747, 1976.

LIMA FILHO, O. F.; VALOIS, A. C. C.; LUCAS, Z. M. (Ed.). **Estévia**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste; Steviafarma Industrial S/A, (Embrapa Agropecuária Oeste. Sistemas de Produção, 5), p. 1-59, 2004.

MADAN, S. et al. *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni – a review. **Indian J. Nat. Prod. Res.** v.1, n. 3, p. 267–286, 2010.

MARTINS, P. M. et al. Turbo-extraction of glycosides from *Stevia rebaudiana* using a fractional factorial design. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, n. 4, p. 510-518, 2017.

NEI, M.; LI, W. H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 76, n. 10, p. 5269-5273, 1979.

RESENDE, M. D. V. **Genética biométrica e estatística no melhoramento de plantas perenes**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2002.

RESENDE, M.D.V.; DUARTE, J.B. Precisão e controle de qualidade em experimentos de avaliação de cultivares. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v.37, n.3, p.182-194, 2007.

SAS INSTITUTE. **SAS user's guide: statistic: version 9.1.3**. Cary: SAS Institute, 2008.

SHARMA, N.; KAUR, R.; ERA, V. Potential of RAPD and ISSR markers for assessing genetic diversity among *Stevia rebaudiana* Bertoni accessions. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 15, p. 95-100, 2016.

SINGH, D. The relative importance of characters affecting genetic diversity. **Indian Journal of Genetics and Plant Breeding**, New Delhi, v. 41, n. 2, p. 237-245, 1981.

SNEATH, P. H. A.; SOKAL, R. R. **Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification**. San Francisco: W. H. Freeman, p. 573, 1973.

STATSOFT, Inc. **Statistica for Windows** (data analysis software system), version 7.1. Statsoft, Tulsa, Oklahoma (USA), 2005.

TAVARINI, S., PASSERA, B., ANGELINI, L. G. CHAPTER 1: Crop and Steviol Glycoside Improvement in *Stevia* by Breeding. **Food Chemistry, Function and Analysis**, p. 1-31, 2018.

VALIO, I. F. M.; ROCHA, Rosely F. Effect of photoperiod and growth regulator on growth and flowering of *Stevia rebaudiana* Bertoni. **Japanese Journal of Crop Science**, v. 46, n. 2, p. 243-248, 1977.

VENCOVSKY, R. Herança quantitativa. In: PATERNIANI, E.; VIEGAS, G. P. (Ed.). **Melhoramento e produção de milho**. 2. ed. Campinas, SP: Fundação Cargill, v. 1, 1987.

WÖLWER-RIECK, U. Steviol Glycosides. **Food Chemistry, Function and Analysis**, Royal Society of Chemistry, p.1-32, 2018.

YADAV, A. K. et al. A review on the improvement of stevia [*Stevia rebaudiana* (Bertoni)]. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 91, n. 1, p. 1-27, 2011.

YAO, Y.; BAN, M.; BRANDLE, J. A genetic linkage map for *Stevia rebaudiana*. **Genome**, v. 42, n. 4, p. 657-661, 1999.

**CAPÍTULO 3. AVALIAÇÃO E SELEÇÃO DE GENÓTIPOS DE ESTÉVIA COM  
BASE EM CARACTERÍSTICAS MORFOAGRONÔMICAS VISANDO AO  
DESENVOLVIMENTO DE CULTIVARES ADAPTADAS AO CERRADO**

## **AVALIAÇÃO E SELEÇÃO DE GENÓTIPOS DE ESTÉVIA COM BASE EM CARACTERÍSTICAS MORFOAGRONÔMICAS VISANDO AO DESENVOLVIMENTO DE CULTIVARES ADAPTADAS AO CERRADO.**

**Resumo:** O desenvolvimento de cultivares de estévia adaptadas ao Cerrado envolve a seleção de genótipos com alta produção de fitomassa e com período juvenil longo. Estudos em estévia desenvolvidos nessa região podem produzir valiosas informações e culminar no desenvolvimento de variedades altamente adaptadas às condições desse bioma. Neste trabalho, objetivou-se correlacionar características morfoagronômicas, avaliar e selecionar genótipos elite de *S. rebaudiana* com alta produtividade e adaptados às condições do Cerrado. Foram avaliadas 230 plantas no período de 2018 a 2019. Durante o experimento, foram realizados seis cortes para avaliação da produção de fitomassa verde (FMV) da parte aérea, altura (ALT) e perfilhamento (PERF) de cada planta. O período juvenil foi avaliado com base no número de dias para o início do florescimento (NDF). Foram realizadas análises descritivas e de correlação entre as médias das características de cada genótipo. O índice de Mulamba e Mock foi utilizado para seleção dos genótipos superiores. A população selecionada com base na soma de ranks resultou em altos ganhos de seleção para as características morfoagronômicas analisadas.

**Palavras-chave:** Fitomassa, correlação, produção, caracterização, *Stevia rebaudiana*.

## **EVALUATION AND SELECTION OF STEVIA GENOTYPES BASED ON MORPHOAGRONOMIC CHARACTERISTICS FOR THE DEVELOPMENT OF CERRADO ADAPTED CULTIVARS.**

Abstract: The development of stevia cultivars adapted to the Cerrado involves the selection of genotypes with high phytomass production and with a long juvenile period. Studies in stevia developed in this region can produce valuable information and culminate in the development of varieties highly adapted to the conditions of this biome. In this work, the objective was to correlate morpho-agronomic characteristics, evaluate and select elite genotypes of *S. rebaudiana* with high productivity and adapted to the conditions of the Cerrado. 230 plants were evaluated in the period from 2018 to 2019. During the experiment, six cuts were made to evaluate the green phytomass production (FMV) of the aerial part, height (ALT) and tillering (PERF) of each plant. The juvenile period was evaluated based on the number of days to start flowering (NDF). Descriptive and correlation analyses were performed between the means of the characteristics of each genotype. The Mulamba and Mock index was used to select the superior genotypes. The population selected based on the sum of ranks resulted in high selection gains for the analyzed morpho-agronomic characteristics.

**Key words:** Phytomass, correlation, production, characterization, *Stevia rebaudiana*.

### 3.1. INTRODUÇÃO:

Estévia é uma planta na qual, através de suas folhas, realiza-se a extração de edulcorantes naturais com zero calorias. A *Stevia rebaudiana* Bertoni pertence à família Asteraceae, caracterizando-se como uma planta herbácea, semiperene, encontrada na forma silvestre na região de divisa entre Paraguai e Brasil (DE, MONDAL, BANERJEE, 2013; KATAYAMA et al., 1976).

O cultivo de estévia vem se difundindo em vários países como China e Japão que são os maiores produtores, Índia, EUA, Canadá, Coreia do Sul, México, Rússia, Indonésia, Tanzânia, Argentina, Austrália, Alemanha, Polônia e nos países de origem, Brasil e Paraguai (RAMESH, SINGH, MEGEJI, 2006; TAVARINI, PASSERA, ANGELINI, 2018; WÖLWER-RIECK., 2018; DE, MONDAL, BANERJEE, 2013; KATAYAMA et al., 1976; YADAV et al., 2011).

Yadav et al. (2011) apontaram que produtos como o adoçante de estévia irão crescer devido ao interesse dos consumidores em produtos naturais, sendo suportados pelas variedades melhoradas com altas quantidade e qualidade de diterpênico e rebaudiosídeo A, que não têm o sabor amargo no final.

Mengesha, Geja e Damtew (2014) afirmaram que até 2009, a estévia foi utilizada em mais de 6 mil produtos como refrigerantes, alimentos, medicamentos, entre outros, assim, direcionando-se para se tornar uma *commodity* como o açúcar, e substituí-lo em 20% de seu mercado mundial.

O desenvolvimento de cultivares de estévia adaptadas ao Cerrado envolve a seleção de genótipos com alta produção de fitomassa e com período juvenil longo. Logo, a avaliação de características agrônômicas como: número de dias para o florescimento, produção de fitomassa, altura de planta e perfilhamento de genótipos de *S. rebaudiana* são características importantes a fim de direcionar avanços de ciclos de seleção e recombinação.

O Cerrado tem sido preconizado como um bioma interessante para o cultivo da estévia, apresentando clima tropical, semiúmido, com duas estações bem definidas: uma chuvosa no verão e uma seca no inverno (PELÁ; CASTILHO, 2010). A temperatura média anual fica em torno de 22 °C e a precipitação média anual situa-se entre 1.200 e 1.800mm (RIBEIRO; WALTER, 1998).

Estudos em estévia desenvolvidos nesse bioma podem produzir valiosas informações e culminar no desenvolvimento de variedades altamente adaptadas às condições do Cerrado, bem como ao cultivo em larga escala, constituindo-se como alternativa para os produtores dessa

importante região do Brasil.

A seleção de genótipos de estévia mais adaptados ao Cerrado envolve a combinação de diferentes características de interesse como a produtividade de fitomassa, capacidade de perfilhamento, período juvenil longo, entre outras. Para combinar diferentes características de interesse em um mesmo genótipo, índices de seleção têm sido utilizados. Um dos índices utilizados é o de Mulamba e Mock (1978) baseado na soma de um ranquiamento de genótipos com base nas características de interesse. Essa soma dos “ranks” determina a classificação dos genótipos com base nas variáveis analisadas (CRUZ; CARNEIRO, 2006).

Objetivou-se correlacionar características morfoagronômicas, avaliar e selecionar genótipos elite de *S. rebaudiana* com alta produtividade, período juvenil longo e adaptados às condições do Cerrado.

### **3.2. MATERIAL E MÉTODOS**

O estudo foi realizado na Embrapa Cerrados, em Planaltina-DF (15°36'19" de latitude Sul, 47°42'56" de longitude Oeste e altitude de 1.024 metros). Foram avaliadas 230 plantas no período de 2018 a 2019. As plantas foram originadas de sementes obtidas a partir do cruzamento natural entre genótipos elite. Foi realizado o semeio em abril de 2018 e o plantio no campo no final de maio de 2018, quando as mudas tinham aproximadamente 25 cm de altura. Durante o experimento, foram realizados seis cortes (19/10/2018, 13/12/2018, 28/03/2019, 25/06/2019, 30/09/2019 e 19/12/2019) para avaliação da produção de fitomassa verde (FMV) da parte aérea, altura (ALT) e perfilhamento (PERF) de cada planta.

O período juvenil foi avaliado com base no número de dias para o início do florescimento (NDF) e quando as plantas apresentavam um capítulo com a presença de flores abertas, baseando-se na contagem dos dias a partir do plantio das mudas no campo para (NDF1) e a partir do dia de realização de cada corte para os demais períodos de NDF (2, 3, 4, 5 e 6).

As plantas foram colhidas cortando até 5 cm do solo, e toda a fitomassa verde (FMV) ou fresca (parte área acima do solo) foi pesada individualmente. A variável altura (ALT) foi mensurada do solo até o ápice da planta. O número de perfilhamento (PERF) por planta foi contado. Foram realizadas análises descritivas e de correlação entre as médias das características de cada genótipo. Durante todo o período de condução do experimento foram realizadas 24 avaliações, considerano as 4 características agronômicas avaliadas durante seis períodos.

Na condução do experimento, foram realizadas capinas quinzenalmente para controle das plantas daninhas. Não foram aplicados produtos fitossanitários para controle de pragas e doenças. A cultura seguiu as recomendações técnicas quanto à adubação e irrigação, de acordo com Lima Filho, Valois e Lucas (2004).

O índice de Mulamba e Mock (1978), denominado soma de ranks, foi utilizado para seleção dos genótipos superiores. Aplicou-se uma intensidade de seleção de 10%, que resultou na seleção de 23 genótipos elite. Na soma dos ranks, e foi atribuído o peso econômico 1 para todas as 24 avaliações das 4 características agronômicas.

### 3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Verificou-se que a população de genótipos elite de estévia, inicialmente com 230 indivíduos, apresentou uma elevada variação entre os genótipos para todas as variáveis estudadas em todos os seis períodos, com exceção das avaliações realizadas no período três (NDF3, PERF3 e FMV3) (Tabela 1).

A seleção com base no índice Mulamba e Mock (1978), com intensidade de seleção de 10%, culminou na seleção de 23 genótipos elite altamente superiores. Houve elevado ganho de seleção para todas as características agronômicas analisadas (Tabela 1).

Destacam-se os ganhos de seleção acima de 100% para as variáveis (ALT4), (PERF4), (FMV4), (FMV5) e (FMV6), com valores em porcentagem de 109, 214, 204, 172, 155, respectivamente, exibidos na forma de gráfico radar bidimensional (Figura 1).

**Tabela 1.** Estimativas de ganho de seleção (GS e GS%) e médias da população inicial ( $X_0$ ) e da população selecionada ( $X_s$ ), obtidas através do índice de seleção baseado na soma de ranks (Mulamba e Mock, 1978) de uma população de genótipos elite de *S. rebaudiana* para as variáveis número de dias para o florescimento (NDF), altura (ALT), perfilhamento (PERF), fitomassa verde (FMV), sendo as numerações 1,2,3,4,5 e 6 relativas a cada período. Embrapa Cerrados, Planaltina, DF. 2019.

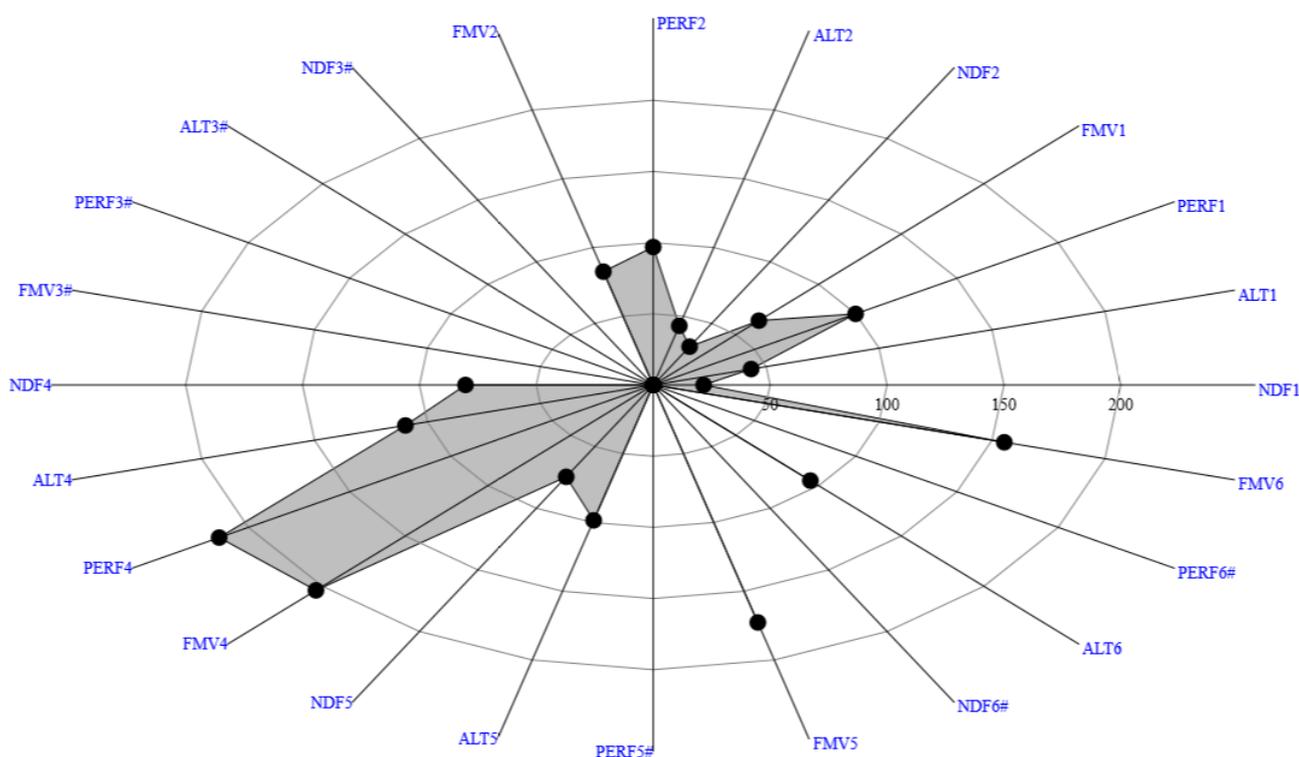
Variável	$X_0$	$X_s$	GS	GS %
NDF1	125,41	152,43	27,03	21,55
ALT1	41,80	59,91	18,11	43,33
PERF1	14,05	28,09	14,04	99,94
FMV1	331,42	543,23	211,80	63,91
NDF2	31,08	40,74	9,66	31,09
ALT2	49,27	70,48	21,20	43,03
PERF2	39,73	78,26	38,53	96,96
FMV2	340,53	621,31	280,79	82,46
NDF3#	-	-	-	-

continuação...

**Tabela 1.** continuação...

ALT3#	54,35	90,52	-	-
PERF3#	-	-	-	-
FMV3#	-	-	-	-
NDF4	28,02	50,52	22,50	80,29
ALT4	27,49	57,65	30,17	109,75
PERF4	9,57	30,09	20,52	214,40
FMV4	44,36	134,87	90,51	204,03
NDF5	26,03	45,43	19,40	74,52
ALT5	30,33	60,20	29,86	98,44
PERF5#	28,72	76,39	-	-
FMV5	257,39	702,00	444,61	172,74
NDF6#	28,44	48,48	-	-
ALT6	46,35	90,40	44,05	95,03
PERF6#	35,81	91,00	-	-
FMV6	434,55	1.109,96	675,40	155,43
<b>Ganho Total:</b>			1.998,18	1.686,90

# Variável assinalada com o símbolo # apresenta variância genética negativa.



**Figura 1.** Gráfico radar bidimensional do ganho de seleção em porcentagem (GS%), com base em 24 avaliações de variáveis quantitativas representadas em eixos que partem do mesmo ponto. Embrapa Cerrados, Planaltina, DF, 2019.

A Tabela 2 contém as médias das populações inicial ( $X_0$ ) e selecionada ( $X_s$ ) para cada característica ao longo do tempo, ou seja, em todos os períodos disponíveis. Observa-se que, com o aumento do período juvenil retratado pela variável número de dias para o florescimento

(NDF), obtivemos um aumento muito significativo, mais que o dobro para a variável de produção de fitomassa verde (FMV).

Taleie et al. (2012), estudando os efeitos da densidade na produção da *S. rebaudiana*, observaram que, para as condições do Iran, o espaçamento de 50 cm x 20 cm, equivalente a 10 plantas por m<sup>2</sup> (100 mil plantas/ha), foi o mais adequado para as condições *in loco* do estudo. Essa população obteve a planta mais alta com 80 cm. Em comparação ao presente estudo, a altura máxima atingida foi de 47,5% maior (118 cm), e a média da população selecionada foi 71,53 cm.

Todavia, Serfaty et al. (2013), em Israel, alcançaram aproximadamente 130 cm de altura na primavera; e na Índia, Kimar et al. (2014) atingiram altura máxima de 126,7 cm. No sul do Brasil, Francisco et al. (2018) obtiveram altura máxima de 116 cm em um acesso.

Segundo Francisco et al. (2018), os autores Andolfi, Macchia e Ceccarini (2006); Fronza e Folegatti (2003); González et al. (2007); Lima Filho et al. (2004); Megeji et al. (2005) e Serfaty et al. (2013) lograram rendimentos inferiores de 4,3 toneladas por hectare de folhas secas.

Por outro lado, na Etiópia, Btru et al. (2017) obtiveram altura máxima de 119,5 cm e rendimento de 7,8 toneladas/ha de folhas secas, com uma densidade de 125 mil plantas por hectare.

**Tabela 2.** Média da soma das variáveis número de dias para o florescimento (NDF), altura (ALT) em centímetros, perfilhamento (PERF), fitomassa verde em gramas (FMV) das populações inicial e selecionada ( $X_0$  e  $X_s$ ). Valores mínimo e máximo em relação aos 230 genótipos. Embrapa Cerrados, Planaltina, DF. 2019.

Variável	Média $X_0$	Média $X_s$	Mínimo	Máximo
<b>NDF (2;4;5;6)</b>	28 (dias)	46 (dias)	21 (dias)	80 (dias)
<b>ALT (1;2;3;4;5;6)</b>	41,60 (cm)	71,53 (cm)	15 (cm)	118 (cm)
<b>PERF (1;2;4;5;6)</b>	25,58	60,77	1	170
<b>FMV (1;2;4;5;6)</b>	281,65 (gr)	622,27 (gr)	1 (gr)	1882 (gr)

As estimativas dos coeficientes de correlação de Pearson entre as médias das 24 variáveis dos 230 genótipos elite de estévia, apresentadas nas Tabelas 3, 4 e 5, exibem sete correlações fortíssimas (>0,9) entre as variáveis ALT 4 e ALT 5, 6; NDF 5 e ALT 5, NDF6; ALT5 e NDF6, ALT6; e por fim, NDF6 e ALT 6, conforme classificação de Carvalho, Lorencetti e Benin (2004). Portanto, quanto maior a altura (ALT), maior será o período juvenil, ou seja, maior o número de dias para o florescimento (NDF). Esse fato pode ser verificado pois

todas as variáveis de NDF e ALT em seus correspondentes períodos são acima de 0,8, portanto, correlacionando-se positivamente e com alta intensidade, exceto para o período três.

Verifica-se que 105 correlações, que correspondem a 38% do total, são de intensidades consideradas altas ( $> 0,6$  e  $< 0,9$ ), segundo Carvalho, Lorencetti e Benin (2004). Destaca-se a existência de um padrão de comportamento de intensidades alta e altíssima entre as variáveis NDF e ALT para os períodos 3, 4, 5 e 6 dessas variáveis, conforme Figura 2. Observa-se que, entre as variáveis FMV e PERF, nos períodos 1, 5 e 6, houve correlação positiva, significativa e acima de 0,8.

**Tabela 3.** Estimativas dos coeficientes de correlação de Pearson entre 24 variáveis: número de dias para o florescimento (NDF: 1;2), altura (ALT:1;2) em centímetros, perfilhamento (PERF:1;2), fitomassa verde em gramas (FMV: 1;2) de 230 genótipos elite de *S. rebaudiana*. Embrapa Cerrados, Planaltina, DF. 2019.

	ALT 1	PERF 1	FMV 1	NDF 2	ALT 2	PERF 2	FMV 2
NDF 1	<b>0,88</b>	0,76	0,66	0,79	0,79	0,60	0,59
ALT 1		<b>0,83</b>	0,78	<b>0,80</b>	<b>0,85</b>	0,71	0,68
PERF 1			<b>0,85</b>	0,67	0,73	0,76	0,67
FMV 1				0,60	0,63	0,62	0,61
NDF 2					<b>0,87</b>	0,65	0,61
ALT 2						0,78	0,79
PERF 2							<b>0,80</b>

<sup>(-1)</sup>: Significativo a 1% de probabilidade pelo teste t.

**Tabela 4.** Estimativas dos coeficientes de correlação de Pearson entre 24 variáveis: número de dias para o florescimento (NDF: 1,2,3,4), altura (ALT:1,2,3,4) em centímetros, perfilhamento (PERF:1,2,3,4), fitomassa verde em gramas (FMV: 1,2,3,4) de 230 genótipos elite de *S. rebaudiana*. Embrapa Cerrados, Planaltina, DF. 2019.

	NDF 3	ALT 3	PERF 3	FMV 3	NDF 4	ALT 4	PERF 4	FMV 4
NDF 1	0,00	0,54	0,00	0,00	0,51	0,53	0,44	0,36
ALT 1	0,00	0,61	0,00	0,00	0,62	0,62	0,50	0,36
PERF 1	0,00	0,51	0,00	0,00	0,52	0,55	0,47	0,40
FMV 1	0,00	0,43	0,00	0,00	0,46	0,49	0,42	0,33
NDF 2	0,00	0,59	0,00	0,00	0,56	0,57	0,49	0,38
ALT 2	0,00	0,69	0,00	0,00	0,65	0,69	0,54	0,44
PERF 2	0,00	0,57	0,00	0,00	0,59	0,59	0,50	0,39
FMV 2	0,00	0,56	0,00	0,00	0,52	0,59	0,46	0,41
NDF 3		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
ALT 3			0,00	0,00	<b>0,84</b>	<b>0,87</b>	0,75	0,57
PERF 3				0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
FMV 3					0,00	0,00	0,00	0,00
NDF 4						<b>0,84</b>	0,66	0,48
ALT 4							<b>0,82</b>	0,72
PERF 4								<b>0,80</b>

<sup>(-1)</sup>: Significativo a 1% de probabilidade pelo teste t.

**Tabela 5.** Estimativas dos coeficientes de correlação de Pearson entre 24 variáveis: número de dias para o florescimento (NDF: 1,2,3,4,5,6), altura (ALT: 1,2,3,4,5,6) em centímetros, perfilhamento (PERF: 1,2,3,4,5,6), fitomassa verde em gramas (FMV: 1,2,3,4,5,6) de 230 genótipos elite de *S. rebaudiana*. Embrapa Cerrados, Planaltina, DF. 2019.

	<b>NDF 5</b>	<b>ALT 5</b>	<b>PERF 5</b>	<b>FMV 5</b>	<b>NDF 6</b>	<b>ALT 6</b>	<b>PERF 6</b>	<b>FMV 6</b>
<b>NDF 1</b>	0,51	0,52	0,41	0,40	0,52	0,51	0,40	0,38
<b>ALT 1</b>	0,59	0,63	0,49	0,48	0,61	0,60	0,49	0,44
<b>PERF 1</b>	0,54	0,58	0,51	0,48	0,54	0,56	0,47	0,46
<b>FMV 1</b>	0,46	0,52	0,47	0,45	0,45	0,47	0,39	0,39
<b>NDF 2</b>	0,55	0,58	0,46	0,45	0,58	0,56	0,44	0,43
<b>ALT 2</b>	0,63	0,68	0,52	0,52	0,65	0,67	0,55	0,50
<b>PERF 2</b>	0,59	0,61	0,52	0,48	0,57	0,58	0,50	0,44
<b>FMV 2</b>	0,53	0,60	0,50	0,52	0,53	0,61	0,52	0,54
<b>NDF 3</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>ALT 3</b>	<b>0,82</b>	<b>0,87</b>	0,67	0,67	<b>0,86</b>	<b>0,85</b>	0,67	0,62
<b>PERF 3</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>FMV 3</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>NDF 4</b>	<b>0,84</b>	<b>0,84</b>	0,66	0,60	<b>0,86</b>	<b>0,81</b>	0,65	0,59
<b>ALT 4</b>	<b>0,85</b>	<b>0,94</b>	<b>0,80</b>	0,79	<b>0,89</b>	<b>0,92</b>	0,79	0,74
<b>PERF 4</b>	0,70	0,79	0,72	0,76	0,73	0,79	0,75	0,65
<b>FMV 4</b>	0,54	0,66	0,65	0,71	0,57	0,67	0,68	0,68
<b>NDF 5</b>		<b>0,90</b>	0,66	0,64	<b>0,91</b>	<b>0,86</b>	0,65	0,60
<b>ALT 5</b>			0,79	<b>0,80</b>	<b>0,93</b>	<b>0,95</b>	0,79	0,74
<b>PERF 5</b>				<b>0,83</b>	0,68	0,75	<b>0,81</b>	0,77
<b>FMV 5</b>					0,67	0,79	<b>0,83</b>	<b>0,86</b>
<b>NDF 6</b>						<b>0,92</b>	0,70	0,63
<b>ALT 6</b>							<b>0,81</b>	<b>0,80</b>
<b>PERF 6</b>								<b>0,86</b>

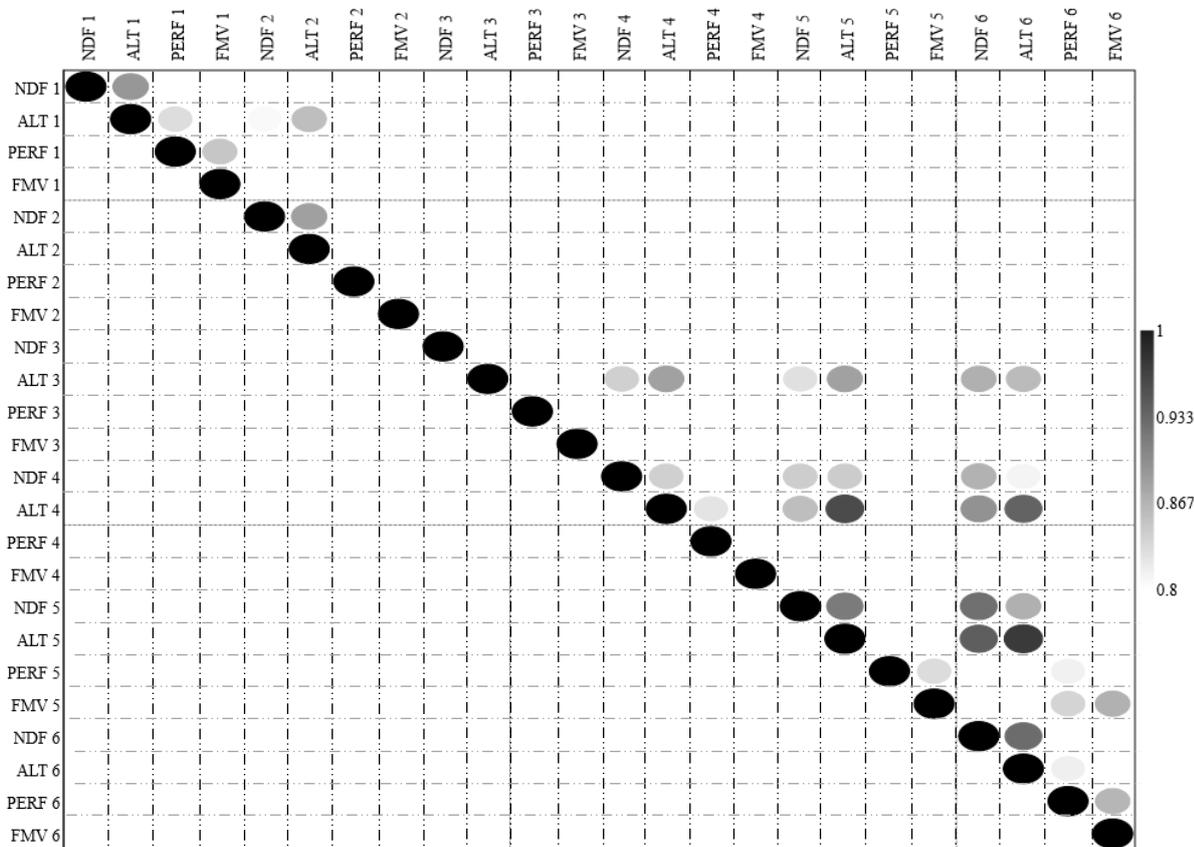
<sup>(-1)</sup>: Significativo a 1% de probabilidade pelo teste t.

Pode ser observado que, nas Tabelas 3, 4 e 5, existe uma correlação alta e positiva entre as variáveis NDF e FMV (1,2,5,6), sendo que todas essas correlações se apresentam acima de 0,6. Assim, podemos inferir que, com o aumento do período juvenil dos genótipos elite, houve concomitantemente um aumento da produção de fitomassa verde.

A fitomassa verde está ligada ao rendimento de folhas, que é a parte de maior importância comercial da estévia. Buana e Goenadi (1985) encontraram correlação positiva entre altura de planta, quantidade de folhas em relação a produção de fitomassa. Segundo Chalapathi, Thimmegowda e Sridhara, (1998) a característica altura de planta e o número de perfilhos tem relação positiva com produtividade de matéria seca.

Por fim, a seleção de genótipos elite de estévia com alta produção de fitomassa verde ou fresca, maior insensibilidade a comprimento curto do dia, que por sua vez, permite um aumento no período juvenil; bem como altura elevada sem acamamento, são fundamentais para

o melhoramento de *S. rebaudiana*, proporcionando uma alternativa de produção para produtores das regiões que apresentam essas condições com ênfase ao Cerrado.



**Figura 8.** Gráfico das tabelas de correlação parcial (Tabelas 15,16 e 17), com uma classificação de 0,8 a 1. Embrapa Cerrados, Planaltina, DF, 2019.

### 3.4. CONCLUSÕES

A aplicação do índice de seleção Mulamba e Mock (1978), culmina em ganhos de seleção significativos para todas as características de estévia.

Os 23 genótipos elite superiores detem média de 46 dias para iniciar o florescimento; 71,53 cm de altura; 60,77 perfilhos por planta e uma produção média de fitomassa verde total de 622,27 gramas por planta.

Há altas correlações positivas entre o número de dias para o florescimento, altura e produção de fitomassa.

### 3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDOLFI, L.; MACCHIA, M.; CECCARINI, L. Agronomic-productive characteristics of two genotype of *Stevia rebaudiana* in central Italy. **Italian Journal of Agronomy**, p. 257-262, 2006.

BTRU, T. et al. Influence of Plant Population Density on Growth and Yield of Stevia (*Stevia Rebaudiana* Bertoni L.). **International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research**, v. 5, n. 1, p. 19-26, 2017.

BUANA, L.; GOENADI, D. H. A study on the correlation between growth and yield in Stevia. **Menara perkebunan**, v. 53, p. 68-71, 1985.

CARVALHO, F. I. F.; LORENCETTI, C.; BENIN, G. **Estimativas e implicações da correlação no melhoramento vegetal**. Pelotas: UFPel, 2004.

CHALAPATHI, M. V.; THIMMEGOWDA, S.; SRIDHARA, S. Correlation studies in stevia. **The Indian Journal of Agricultural**, v. 42, p. 137-138, 1998.

CRUZ, C. D.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 2.ed. Viçosa: UFV, 2006.

DE, S.; MONDAL, S.; BANERJEE, S. **Stevioside: technology, applications and health**. John Wiley & Sons, 2013.

FRANCISCO, Felipe et al. Characterization of *Stevia rebaudiana* Bertoni accessions cultivated in southern Brazil. **Journal Agricultural Science**, v. 10, p. 353-363, 2018.

FRONZA, D.; FOLEGATTI, M. V. Water consumption of the estevia (*Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni) crop estimated through microlysimeter. **Scientia Agricola**, v. 60, n. 3, p. 595-599, 2003.

GONZÁLEZ, H. R. et al. Comportamiento del cultivo de *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni en Cuba. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 12, n. 4, p. 0-0, 2007.

KATAYAMA, O. et al. The practical application of Stevia and research and development data. **I.S.U. Co.**, p. 747, 1976.

LIMA FILHO, O. F.; VALOIS, A. C. C.; LUCAS, Z. M. (Ed.). **Estévia**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste; Steviafarma Industrial S/A, (Embrapa Agropecuária Oeste. Sistemas de Produção, 5), p. 1-59, 2004.

MEGEJI, N. W. et al. Introducing *Stevia rebaudiana*, a natural zero-calorie sweetener. **Current Science**, v. 88, n. 5, p. 801-804, 2005.

MENGESHA B.; GEJA W.; DAMTEW Z. Stevia Production Guideline. **Ethiopian Institute of Agricultural Research Center**, v. 1, p. 1-23, 2014.

MULAMBA, N. N.; MOCK, J. J. Improvement of yield potential of the ETO blanco maize (*Zea mays* L.) population by breeding for plant traits Mexico. **Egyptian journal of genetics and cytology**, 1978.

PELÁ, M; CASTILHO, D. Cerrados: perspectivas e olhares. **Goiânia: Ed. Vieira**, 2010.

RAMESH, K.; SINGH, V.; MEGEJI, N. W. Cultivation of stevia [*Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni]: A comprehensive review. **Advances in Agronomy**, v. 89, p. 137-177, 2006.

RIBEIRO, J. F; WALTER, B. M. T. Fitofisionomias do bioma cerrado. *In*: SANO, S. M; ALMEIDA, S. P. **Cerrado: ambiente e flora**. Planaltina: Embrapa Cerrados, cap. 3, p. 89-166, 1998.

SERFATY, M. et al. Dynamics of yield components and stevioside production in *Stevia rebaudiana* grown under different planting times, plant stands and harvest regime. **Industrial crops and products**, v. 50, p. 731-736, 2013.

TALEIE, N. et al. Effects of plant density and transplanting date on herbage, stevioside, phenol and flavonoid yield of *Stevia rebaudiana* Bertoni. **International Journal Agriculture and Crop Sciences**, v. 4, n. 6, p. 298-302, 2012.

TAVARINI, S., PASSERA, B., ANGELINI, L. G. CHAPTER 1: Crop and Steviol Glycoside Improvement in Stevia by Breeding. **Food Chemistry, Function and Analysis**, p. 1-31, 2018.

WÖLWER-RIECK, U. Steviol Glycosides. **Food Chemistry, Function and Analysis**, Royal Society of Chemistry, p.1-32, 2018.

YADAV, A. K. et al. A review on the improvement of stevia *Stevia rebaudiana* (Bertoni). **Canadian Journal of Plant Science**, v. 91, n. 1, p. 1-27, 2011.

#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

De maneira geral, a aplicação de 17 (> 80%) dos 21 descritores morfológicos publicados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, foi eficiente para a diferenciação e análise da variabilidade dos 19 genótipos elite de estévia.

A coleção de trabalho da Embrapa Cerrados possui alta variabilidade genética com base nas características morfológicas, servindo para acessar a variabilidade e desse modo, explorar o alto potencial desses genótipos em programas de melhoramento genético de estévia, tendo em vista o desenvolvimento de variedades geneticamente superiores para cultivo nas condições do Cerrado.

Os marcadores moleculares RAPD foram eficientes em caracterizar e quantificar a variabilidade genética entre os genótipos elite de estévia estudados, formando quatro grupos de dissimilaridade.

A caracterização morfoagronômica também foi eficiente para estimar a variabilidade genética por meio da distância generalizada de Mahalanobis. Os resultados foram correspondentes aos obtidos com base em marcadores moleculares RAPD.

O genótipo elite 9 (3-26) mostrou-se divergente geneticamente, e superior estatisticamente aos demais para as médias de NFOL, ALT e AFOL, que são importantes caracteres para o melhoramento de *S. rebaudiana*.

A população selecionada com base na soma de ranks resultou em alto ganho de seleção para as características morfoagronômicas de interesse. Os 23 genótipos elite superiores apresentaram em média 46 dias para iniciar o florescimento; 71,53 cm de altura; 60,77 perfilhos por planta e uma produção média de fitomassa verde total de 622,27 gramas por planta. Foram observadas altas correlações positivas entre o número de dias para o florescimento, altura e produção de fitomassa.

Novos ciclos de seleção e recombinação devem ser realizados para aumentar os ganhos de seleção. Para aumentar a precisão e acurácia experimental, é importante que os genótipos elite sejam clonados e avaliados em parcelas maiores e com maior número de repetições. Progênie de meio-irmãos e irmãos completos dos genótipos elite também podem ser obtidas e avaliadas para estimar a capacidade geral e específica de combinação.