

EDSON TSUTOMU ANAMI

**CARACTERIZAÇÃO E DIVERGÊNCIA GENÉTICA EM CLONES DE
Stevia rebaudiana (Bert.) Bertoni**

MARINGÁ
PARANÁ - BRASIL
DEZEMBRO - 2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

EDSON TSUTOMU ANAMI

**CARACTERIZAÇÃO E DIVERGÊNCIA GENÉTICA EM CLONES DE
Stevia rebaudiana (Bert.) Bertoni**

Tese apresentada como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento da Universidade Estadual de Maringá.

MARINGÁ
PARANÁ - BRASIL
DEZEMBRO - 2008

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

A533c Anami, Edson Tsutomi
Caracterização e divergência genética em clones
de *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni / Edson Tsutomu
Anami. - Maringá: [s.n.], 2008.
48f. : il

Orientadora : Prof. Dra. Maria Celeste Gonçalves
Vidigal.

Tese (doutorado)- Universidade Estadual de
Maringá. Programa de Pós-Graduação em Genética e
Melhoramento.

1.Melhoramento genético vegetal. 2. Edulcorantes.
3. Rebaudiosídeo. 3. Esteviosídeo. I. Universidade
Estadual de Maringá. Programa de Pós-graduação em
Genética e Melhoramento.

CDD 21.ed.631.523

Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte.
(O autor)

A Deus,
À minha esposa Paula,
Aos meus Pais e irmãos,
Aos meus amigos.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as coisas boas que tem me proporcionado.

À Universidade Estadual de Maringá e ao Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, pela oportunidade e pela disponibilização de recursos físicos e intelectuais necessários para a realização deste trabalho.

À Empresa Stevia Natus Produtos Naturais Ltda., pertencente ao Grupo Forquímica Agrosciência, representados pelos Sócios Edson Geraldo Rosini e Paulo Assis dos Passos.

À Professora Dra. Maria Celeste Gonçalves-Vidigal, pela orientação, pelo apoio e, acima de tudo, pela confiança e amizade.

Aos professores Dr. Pedro Soares Vidigal Filho, Dr. Ronald José Barth Pinto e Dr. Marcus Vinícius Kvitschal pela co-orientação.

À Dra. Adriana Gonela pelo auxílio prestado durante a realização das pesquisas.

Aos secretários do Curso de Pós-graduação em Genética e Melhoramento (PGM), Francisco José da Cruz e Maria Valkiria Magro.

Aos colegas do Núcleo de Pesquisa Aplicada à Agricultura (Nupagri) da Universidade Estadual de Maringá, pelo apoio técnico-científico prestado nas atividades referentes ao presente estudo.

Ao Engenheiro Químico e amigo Frits Rudof Wiembeck.

Aos Amigos Paulo Vianna, Ariovaldo José Sartori e Jair Figueiredo.

À Bióloga Caroline Leandro, pelo auxílio na realização das coletas dos materiais e análises cromatográficas e aos amigos companheiros de trabalho (Ricardo Comar, Líria, Elisângela, Patricia, “Maringá”, Eduardo, Nanuncio, Ricardo, Benjamin, Domingos, Weber, Zinho e Ana).

BIOGRAFIA

EDSON TSUTOMU ANAMI, filho de Kiyoshi Anami e de Sadako Anami, nascido em 02 de outubro de 1961, na cidade de Londrina, Estado do Paraná, Brasil, casado com Paula Nishiyama.

Iniciou a vida estudantil na Escola Estadual Hugo Simas de Londrina de 1969 até o ano de 1973.

Realizou o curso médio e profissionalizante no Colégio Estadual Vicente Rijo de Londrina, durante o período de 1974 a 1980.

Diplomou-se em Licenciatura e Bacharelado em Ciências Biológicas, em dezembro de 1989, pela Universidade Estadual de Londrina.

No período de 1990 a 1991, foi bolsista (Bolsa de Aperfeiçoamento) do Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR) em Projeto de Cooperação com a Universidade do Estado de Oregon (OSU), USA.

Em março de 1991, ingressou no curso de Mestrado em Biologia Celular, na Universidade Estadual de Maringá (UEM), tendo concluído os créditos exigidos pelo curso.

No período de 1992 a 1993, foi Professor colaborador na Universidade Estadual de Maringá (UEM), ministrando a disciplina Parasitologia Básica, pelo Departamento de Análises Clínicas.

Entre os meses de setembro de 1997 a setembro de 1998 foi laboratorista da Área de Solos e Nutrição Mineral de Plantas do Departamento de Agronomia da Universidade Estadual de Maringá.

De outubro de 1998 até outubro de 2001, integrou o projeto “Aplicações Biotecnológicas de Produto da *Stevia rebaudiana*”, como responsável pelo laboratório de cultura de tecidos de *Stevia rebaudiana*, coordenado pelo Prof. Dr. Sílvio Cláudio da Costa (Convênio NEPRON/FADEC/COZIR e MARTINEZ).

Em julho de 2001, Concluiu o Curso de Mestrado em Agronomia, na Área de concentração em Melhoramento Genético Vegetal, pela Universidade Estadual de Maringá, estudando a multiplicação de clones de estévia com elevada proporção de rebaudiosídeo A/esteviosídeo, através da cultura de tecidos vegetais.

No período entre outubro 2001 a junho de 2003, prestou assessoria à

Empresa Stevmax do Brasil, localizado na cidade de Jandaia do Sul, atuando na área de produção de sementes e mudas de *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni.

Em Julho de 2003 iniciou atividade de consultoria técnica na Empresa Forquímica Agrosciência, localizada na cidade de Cambira – PR.

Atuou como docente da Faculdade Integrado, em Campo Mourão – PR, entre o período de janeiro de 2006 a julho de 2007, ministrando as disciplinas de Ciências do Ambiente, Agroecologia e Plantas Medicinais para o curso de Agronomia.

No ano de 2005, em parceria com a empresa Forquímica Agrosciência, fundou a Empresa Stevia Natus Produtos Naturais Ltda, cuja sede localiza-se na cidade de Cambira, PR, na qual foi sócio até outubro de 2008.

ÍNDICE

RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1. A cultura da estévia (<i>Stevia rebaudiana</i> (Bert.) Bertoni).....	3
2.2.1. Descrição da planta e origem.....	3
2.2.2. Cultivo e produção de mudas.....	4
2.2.3. Condições ambientais para o desenvolvimento das plantas de estévia.....	5
2.2.4. Colheita, secagem e armazenamento.....	6
2.2.5. Principais doenças da cultura da estévia.....	7
2.2.6. Edulcorantes e suas características.....	8
2.3. Análise de correlação.....	10
2.4. Divergência genética	10
2.4.1. Análise de agrupamento.....	11
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1. Identificação da área de coleta e seleção de germoplasma.....	13
3.2. Avaliação experimental.....	14
3.3. Análise estatística.....	16
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	18
4.1. Análise de variância.....	18
4.2. Caracterização dos clones de estévia.....	19
4.2.1. Altura de plantas (ALT).....	19
4.2.2. Produção de massa fresca de plantas (MF).....	21
4.2.3. Produção de massa seca de plantas (MS).....	23
4.2.4. Número de hastes por plantas (NH).....	24
4.2.5. Concentração de edulcorantes totais (ET).....	25
4.2.6. Relação de rebaudiosídeo A/esteviosídeo (R/E).....	27
4.2.7. Clones de estévia de maior interesse.....	29
4.3. Correlação entre características.....	29
4.4. Divergência genética.....	31

4.4.1.	Distância generalizada de Mahalanobis.....	31
4.4.2.	Contribuição relativa dos caracteres para a divergência genética.....	37
4.4.3.	Análise de agrupamentos.....	38
4.5.	Considerações Finais.....	43
5.	CONCLUSÕES.....	45
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46

RESUMO

ANAMI, Edson Tsutomu, D.Sc. Universidade Estadual de Maringá, dezembro de 2008. **Caracterização e divergência genética em clones de *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni.** Orientadora: Maria Celeste Gonçalves-Vidigal. Conselheiros: Pedro Soares Vidigal Filho, Ronald José Barth Pinto e Marcus Vinícius Kvitschal.

A obtenção de clones produtivos com resistência às doenças e às pragas com elevada concentração de edulcorantes nas folhas de estévia são uns dos principais problemas desta cultura. Portanto, o presente estudo teve como objetivo avaliar clones de estévia e caracterizar a divergência genética entre estes clones visando à seleção de parentais para hibridação em programas de melhoramento. No ano de 2004 e 2005 foi realizada a coleta de plantas de estévia fenotipicamente superiores em uma propriedade localizada em Humaitá, município de Jandaia do Sul, Estado do Paraná. Um total de 15 clones superiores foram selecionados com elevada concentração de edulcorantes totais e com considerável relação entre rebaudiosídeo **A** / esteviosídeo. Os clones foram avaliados em experimentos de campo instalados em Cambira, Paraná, em delineamento de blocos completos casualizados, com três repetições. As características avaliadas foram: a altura de plantas, a produção de massa fresca e seca, o número de hastes por planta, a concentração de edulcorantes totais e a relação rebaudiosídeo **A** / esteviosídeo. Os dados foram submetidos à análise de variância conjunta, e as respectivas médias foram comparadas mediante a utilização de teste de Scott e Knott. Na avaliação do efeito da associação entre as características avaliadas, procedeu-se a análise de correlação de Pearson. O agrupamento dos clones foi realizado pelo método de UPGMA, usando como medida de dissimilaridade genética a Distância Generalizada de Mahalanobis. Os clones ST75, ST86, ST141 e ST145 foram caracterizados como os mais promissores para a relação rebaudiosídeo **A**/esteviosídeo, para concentração de edulcorantes totais e para a produção de massa seca. A altura de plantas e a relação rebaudiosídeo **A** / esteviosídeo foram positivamente correlacionadas, de forma que tal associação se deveu à seleção prévia efetuada no germoplasma. Correlação positiva e significativa foi verificada entre as características produção de massa fresca, produção de massa seca e número de hastes por planta. O

número de hastes por planta é indicada na seleção precoce para produção de massa fresca e de massa seca. Ampla variabilidade genética foi observada entre os 15 clones de estévia para todas as características avaliadas, sendo que as características que mais contribuíram para a explicação da divergência genética foram: a relação rebaudiosídeo **A** / esteviosídeo (79%) e a concentração de edulcorantes totais (12%). Os clones ST75, ST86, ST141 e ST 145 foram os que apresentaram maior divergência genética média em relação a todo o conjunto genotípico avaliado. Portanto, em programas de melhoramento hibridações entre estes clones tendem a propiciar a geração de populações segregantes de elevado potencial genético para seleção de indivíduos superiores. Por sua vez, as combinações entre os clones ST75 e ST141 poderão propiciar segregantes superiores em concentração de edulcorantes totais, relação rebaudiosídeo **A**/esteviosídeo e produção de massa seca. Os clones ST140 e ST209 foram os mais similares para todas as características avaliadas.

Palavras-chave: Edulcorantes, esteviosídeo, divergência genética, rebaudiosídeo **A**.

ABSTRACT

ANAMI, Edson Tsutomu, D.Sc. Universidade Estadual de Maringá, December 2008. **Characterization and genetic divergence in clones of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni**. Adviser: Maria Celeste Gonçalves-Vidigal. Committee Members: Pedro Soares Vidigal Filho, Ronald José Barth Pinto and Marcus Vinícius Kvitschal.

One of the main problems in stevia crop is to obtain productive clones with resistance to diseases and insects with high concentration of edulcorant in its leaves. Therefore, the present study had as objective to evaluate stevia clones and characterize genetic divergence among these clones in order to provide genitors selection for hybridization in breeding programs. In 2004 and 2005 was carried out a collection of stevia plants phenotypically superior in a property located in Humaitá, Jandaia do Sul town, Estado do Paraná. A total of 15 superior clones were selected with high concentration of total edulcorant and considerable relation between rebaudioside **A** / stevioside. The clones were evaluated in field experiments settled in Cambira, Paraná, with randomized complete experimental designed with three repetitions. The characteristics evaluated were: plant height, production of fresh and dry mass, number of branches per plant, concentration of total edulcorant and relation between rebaudiosídeo **A** / stevioside. The data were submitted to joint variance analysis, and the respective means were compared by using Scott and Knott test. In relation to association effect among the characteristics analyzed, it was carried out the Pearson correlation. The clustering of clones was done by the UPGMA method, using as genetic dissimilarity measure the Mahalanobis' Generalized Distance. The clones ST75, ST86, ST141 and ST145 were characterized as the most promising for rebaudioside **A** / stevioside relation, total edulcorant concentration and dry mass production. The height of plant and rebaudioside **A** / stevioside relation were positively correlated, as this association was attributed to the previous selection done in the germplasma. Positive and significant correlation was verified among the following characteristics: fresh mass production, dry mass production and number of branches per plant. The number of branches per plant is indicated for early selection for dry mass and fresh mass production. Wide genetic variability was

observed among the 15 stevia clones for all evaluated characteristics, considering that the ones that most contributed for the genetic divergence were: rebaudiosídeo **A** / stevioside relation (79%) and concentration of total edulcorant (12%). The clones ST75, ST86, ST141 and ST 145 were the ones that presented higher mean genetic divergence in relation to the whole genotypic pool studied. Therefore, hybridizations in breeding programs among these clones tend to provide generation of segregant populations with high genetic potential for selection of superior individuals. On the other hand, combinations between ST75 and ST141 clones could propitiate superior segregant in total edulcorant concentration, rebaudioside **A**/ stevioside and dry mass. The ST140 and ST209 clones were the most similar for all evaluated characteristics.

Keywords: Edulcorant, genetic divergence, rebaudioside **A**, stevioside.

1. INTRODUÇÃO

A *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni pertencente à família das Asteraceae, e é conhecida por apresentar princípios edulcorantes não-calóricos, sendo considerados os mais importantes o esteviosídeo e o rebaudiosídeo A (Lewis, 1992).

O interesse pela estévia se intensificou principalmente em função das restrições ao consumo de adoçantes sintéticos, além da procura por produtos naturais e pela perspectiva de obtenção destes edulcorantes em escala comercial, não-calóricos. Além disso, havia o interesse da obtenção de adoçantes que apresentassem excelentes propriedades organolépticas e físico-químicas a partir da estévia (Goto e Clemente, 1998).

As folhas da estévia reúnem diferentes compostos glicosídicos diterpénicos, tais como esteviosídeo; rebaudiosídeos A, B, C, D, E, F; dulcosídeo A; e outros derivados do esteviol. O esteviosídeo é o principal componente químico presente nas folhas da estévia. Tanto a planta, como o seu extrato ou ainda o esteviosídeo, têm sido utilizado há alguns anos como adoçante em países como o Japão, a Coreia e o Brasil (Geuns et al., 2007).

No entanto, o esteviosídeo possui o inconveniente *after taste*, ou seja, depois de degustado, ele proporciona um sabor levemente amargo persistente, fato que limita em muito a sua comercialização pela indústria de adoçantes. O rebaudiosídeo, por sua vez, não apresenta sabor amargo e possui um dulçor de até 400 vezes superior ao da sacarose. Portanto, dentre todos os edulcorantes, o rebaudiosídeo é o que possui maior atrativo comercial. Por outro lado, este edulcorante é encontrado em baixas concentrações nas folhas da estévia (Brandle, 1999).

Adicionalmente, a seleção de plantas com elevado conteúdo de edulcorantes totais e elevada concentração de rebaudiosídeo **A**, maior que de esteviosídeo tem sido realizada (Brandle et al., 1998). Por outro lado, a produção de massa seca, a concentração de edulcorantes totais, bem como a qualidade desses edulcorantes, ainda está muito aquém daquela almejada pela indústria de extração de edulcorantes de estévia e produção de adoçantes naturais (Goto e Clemente, 1998).

Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo caracterizar 15 clones de *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni, pré-selecionados na Região Norte Central do Paraná, bem como estimar a sua divergência genética para as características de interesse agrônomo e industrial. E deste modo, auxiliar na seleção de parentais para hibridação em programas de melhoramento de estévia.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A cultura da estévia (*Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni)

2.1.1. Descrição da planta e a sua origem

A *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni é uma espécie semi-arbustiva da família Asteraceae, que apresenta aproximadamente um metro de altura. O caule possui coloração parda, é pubescente e folhoso até o ápice. Já as folhas são

consideras opostas, subsésseis, ovalado-oblongas, obtusas, cuneiformes na base, demonstram três nervadas membranosas, tomentosas na página inferior, até seis centímetros. Por sua vez, as flores são pálidas com escamas pardo-esverdeadas, agudas e pubescentes, reunidas em capítulos corimbiformes e estes dispostos em panículas frouxas. Por fim, o fruto é do tipo aquênio pequeno e com ângulo piloso (Alvarez, 1984; Lewis, 1992). A Figura 1 demonstra ilustrativamente uma planta de estévia.



Figura 1 –Planta de estévia cultivada na Fazenda Itapura/Forquimica, cidade de Paranapoema, Estado do Paraná.

A estévia é uma planta de dias curtos para floração, com fotoperíodo crítico de 13 a 14 horas. As suas flores são hermafroditas, pequenas e levemente perfumadas, sendo que a polinização é cruzada. Uma vez que o pólen é úmido e pegajoso, o mesmo pode ser transportado por insetos, porém a sua dispersão pelo vento torna-se difícil (Lima Filho et al., 2004).

A estévia produz três tipos de frutos, os quais são denominados de aquênios, sendo constituídos de um embrião pseudogâmico com dois cotilédones e um eixo embrionário envolto por um endosperma mais denso. Os três tipos de aquênios são: 1. aquênio claro estéril – por causa da ausência de polinização; 2. aquênio escuro fértil – ocorre a polinização e fecundação da oosfera com formação do embrião; 3. aquênio escuro estéril – ocorre a polinização e o desenvolvimento do tubo polínico, havendo uma interrupção do crescimento deste

antes de atingir a oosfera. A baixa longevidade das sementes provavelmente está relacionada com a composição química, caracterizada pela riqueza de lipídeos (Lima Filho et al., 2004). Segundo estes autores, o sistema radicular da estévia é pivotante no início do desenvolvimento e conseqüentemente no primeiro corte, verifica-se uma diferenciação celular na região do coleto e o sistema radicular torna fasciculado, com maior distribuição na camada superior do solo.

A estévia é uma planta de porte arbustivo e de crescimento determinado, no qual o crescimento vegetativo dá lugar ao crescimento reprodutivo. Durante o primeiro ciclo, observa-se em média uma haste principal com 25 hastes secundárias por planta. O vigor da rebrota depende das reservas acumuladas pelo sistema radicular e da fertilidade do solo.

Esta planta é nativa da região tropical no nordeste do Paraguai e parte da região do Brasil compreendida entre as latitudes 22-24° Sul e longitude 55-56° Oeste, a qual abrange a Serra de Amambá (Alvarez, 1984; Lewis, 1992; Lima Filho et al., 2004).

Alguns estudos revelaram que a estévia possui aproximadamente 200 espécies (Frederico, 1994; Midmore e Rank, 2002; Lima Filho et al., 2004). Este gênero se encontra inteiramente no Novo Mundo, cuja distribuição se estende do Sul dos Estados Unidos ao Norte da Argentina. Normalmente, os exemplares desse gênero são encontrados em altitudes de 500 a 3.000 m de altitude. A *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni foi a única espécie desse gênero, na qual foram identificados princípios adoçantes. Além disso, esta espécie é de grande interesse econômico, uma vez que apresenta substâncias de alto poder edulcorante em suas folhas, caules, inflorescência e aquênios, as quais podem ser utilizadas como adoçantes naturais (Alvarez, 1984; Cabrera et al., 2001).

2.2.2. Cultivo e produção de mudas

A produção de mudas em larga escala é um das principais dificuldades enfrentadas pelos produtores de estévia, devido ao elevado volume de mão-de-obra exigido. Portanto, a aplicação de técnicas que possibilitem a obtenção de mudas em grande quantidade, de forma mais rápida, é muito importante para a expansão desta cultura (Akita et al., 1994; Carvalho e Zaidan, 1995; Chalapathi et al., 1997; Nepovim et al., 1998; Nepovim e Vanek, 1998).

A utilização das sementes para a formação de mudas é método mais comum, quando se tratando de exploração comercial. As sementes de estévia, entretanto, apresentam baixa taxa de germinação (10 a 15%) e baixo período de armazenamento, fato que proporciona a redução do poder germinativo. Por se tratar de uma planta de polinização cruzada, as plantas provenientes de sementes apresentam ampla segregação fato que tem influenciado diretamente no teor de adoçantes (Tamura et al., 1984 a; Tamura et al., 1984 b; Carneiro et al., 1997).

A propagação vegetativa, pela divisão de touceiras ou estaquia herbácea, também pode ser empregada, porém é limitada devido ao baixo número de plantas que pode ser obtido simultaneamente de uma única planta. Essa prática ainda não é utilizada em escala comercial, pois há o risco da disseminação de doenças de solo para outras áreas (Tamura et al., 1984b).

2.2.3. Condições ambientais para o desenvolvimento das plantas de estévia

A melhor época de plantio para obtenção de maior volume de folhas tem sido entre os meses de setembro a novembro. Este período coincide com os dias mais longos do ano, os quais são favoráveis ao desenvolvimento vegetativo (Alvarez, 1984; Carneiro et al., 1997).

Normalmente, a cultura de estévia requer solos de textura média, profundos, com fertilidade natural de média a alta. O clima tropical úmido é ideal, com temperatura média variando entre 18 e 25°C e precipitação pluvial de 190 mm bem distribuídos, principalmente nos estágios de desenvolvimento vegetativo. A prática de adubação verde com leguminosas na cultura da estévia é recomendada, devendo o solo ser preparado pelo sistema convencional (aração e gradagem) para a incorporação da cobertura vegetal. O revolvimento do solo também tem como propósito incorporar as plantas infectadas por patógenos, de forma a prevenir o desenvolvimento de doenças que poderão afetar na cultura. Segundo estes autores, tanto a calagem quanto a adubação devem ser realizadas com base na interpretação dos resultados da análise de amostras de solo. Para calagem, deve-se elevar a saturação de bases para 70%, destacando-se também a importância da adição de matéria orgânica animal (esterco de curral ou galinha poedeira seca moída e triturada). A recomendação de esterco de curral é de 10 a

20 t ha⁻¹, enquanto que para esterco de galinha a dosagem aplicada deve ser de 5 a 10 t ha⁻¹, em pré-plantio incorporado ao solo (Lima Filho et al., 2004).

Em geral, na adubação de base são aplicados 20 kg ha⁻¹ de N, 40 a 120 kg ha⁻¹ de P₂O₅ de 30 a 100 kg ha⁻¹ de K₂O. Na adubação de cobertura, recomenda-se a aplicação de 40 kg ha⁻¹ de N aos trinta dias após o plantio, enquanto que a cada corte é indicada a aplicação de 20 kg ha⁻¹ de N e 20 kg ha⁻¹ de K₂O (Lima Filho et al., 2004). Vários padrões de recomendação, porém são adotados por outros autores (Lima Filho e Malavolta, 1997; Chalapathi e Thimmegowda, 1999; Midmore e Rank, 2002).

A disponibilidade de água, em níveis adequados, é fundamental para o bom desenvolvimento vegetativo da estévia. Assim, a irrigação pode ser conduzida para a reposição periódica da água perdida por evapotranspiração, de forma que a umidade de solo deve ser mantida, preferencialmente de 70 a 100% da capacidade de campo do solo. Por outro lado, durante o transplante das mudas, a irrigação deve ser diária, aplicando-se pequenas quantidades de cada vez (Cabrera et al., 2001). O número de irrigações pode ser aumentado à medida que as plantas se desenvolvem. É importante ressaltar que o sistema radicular da planta de estévia é pouco profundo e, portanto, não se deve deixar a cultura por períodos maiores que cinco dias sem irrigação em solos arenosos, e sete dias em solos argilosos. A lavoura deve ser mantida sempre limpa, e a capina manual cuidadosa deve ser realizada com o propósito de não danificar o sistema radicular das plantas.

Com a finalidade de minimizar os efeitos que as chuvas e a irrigação possam causar no solo (erosão), bem como nas folhas das plantas (depósito de partículas de solo nas folhas), é recomendado que haja cobertura vegetal morta de qualquer natureza na área de cultivo de estévia (Cabrera et al., 2001).

2.2.4. Colheita, secagem e armazenamento

Após o mês de agosto, o corte deve ser preferencialmente efetivado a cada 35 a 45 dias (verão) no período da manhã, e o produto colhido seco no mesmo dia. O corte é realizado quando houver aproximadamente 10% de botões abertos. Tal procedimento é conduzido manualmente com instrumentos esterilizados (faca, facão, tesoura, ancinho, roçadeira costal, dentre outros) sendo realizado a menos de 10,0 cm do nível do solo (Cabrera, et al., 2001).

A secagem pode ser realizada em terreiros (suspensos ou não) ou em secadores, até atingir valores de umidade que variam entre 10 e 15%, momento este em que as folhas se encontram quebradiças mas não se esfarelaram. A secagem em níveis abaixo de 10% de umidade pode causar o esfarelamento das folhas e, com isso, resultar em perdas durante o processo de separação dos galhos. Por outro lado, quando a secagem é a céu aberto, com velocidade média do vento de 4 m/s^{-1} e umidade relativa em torno de 60%, são necessárias aproximadamente 7 horas para reduzir a umidade das folhas de 85% para 12% (Casaccia e Alvarez, 2006).

O armazenamento das folhas deve ser realizado em sacos de fibra sintética, nos quais as folhas são embaladas, na proporção de 10 kg de folhas por saco. A densidade do material é de $0,27 \text{ g/cm}^{-3}$, sem compressão. Estes sacos podem ser empilhados em galpões por um período que pode variar de um a dois anos, desde que sejam respeitados os índices de umidade e temperatura (Casaccia e Alvarez, 2006).

2.2.5. Principais doenças da cultura da estévia

A podridão da haste ou da raiz causada pelo fungo *Sclerotium rolfsii* apresenta pequena incidência durante o ciclo vegetativo da estévia, sem maiores danos. A época de maior incidência está correlacionada às altas temperaturas e à umidade relativa alta. A Septoriose (*Septoria steviae*) inicia-se com pequenas manchas de cor marrom sobre a superfície superior do limbo, as quais gradualmente se desenvolvem para manchas maiores, irregulares, de cor marrom escuro, o que eventualmente pode causar o desfolhamento (Chang e Howard, 1997; Reeleder, 1999). As duas doenças supracitadas têm maior incidência no período do verão, época em que as condições ambientais estão favoráveis ao desenvolvimento das plantas de estévia.

A doença Mancha Negra causada pelo patógeno *Alternaria steviae*, inicialmente apresenta sintomas que resultam no aparecimento de grandes manchas negras circundadas por uma zona clorótica. Estas manchas podem se tornar evidentes nos galhos, nos tecidos e no involúcro floral. Assim sendo, ela é considerada como a principal doença da cultura da estévia (Reeleder, 1999).

2.2.6. Edulcorantes e suas características

O aumento das vendas e da procura por adoçantes é decorrente do interesse das pessoas visando melhorar sua qualidade de vida, sua aparência física e manter a boa forma corporal, uma vez que os adoçantes têm um poder dulcificante muitas vezes maior que o do açúcar, com a vantagem de ter uma quantidade de calorias muito menor. Isso promove a diminuição dos impactos que uma dieta rica em açúcar pode ter sobre a qualidade de vida das pessoas (Geuns et al., 2007). Por este motivo, o mercado de consumo se tornou extremamente lucrativo e se encontra em plena expansão.

As substâncias responsáveis por conferir o sabor doce aos adoçantes, ou seja, os princípios ativos, são os edulcorantes. Os edulcorantes podem ser classificados em naturais: frutose, glicose, lactose, manitol, sorbitol, dextrose flavonóides, estévia, etc.; ou artificiais: sacarina, ciclamato, aspartame, neotame, axessulfame-K, sucralose, lactiol, etc. (Geuns, 2007).

Os limites de ingestão diária recomendados de alguns edulcorantes variam de $5,0 \text{ mg/kg}^{-1}$ de peso para a sacarina, enquanto que para o aspartame é de até $40,0 \text{ mg/kg}^{-1}$ de peso. Tendo em vista essa gama de edulcorantes disponíveis e considerando que alguns desses possuem um sabor residual, as indústrias utilizam a associação de edulcorantes com o intuito de reduzir esse sabor que desagrada ao consumidor do produto (Goto e Clemente, 1998). A vantagem de usar a combinação de edulcorante é o efeito sinérgico do atributo doçura, que pode resultar numa redução significativa do custo do produto final (Ueda et al., 1983).

Os principais edulcorantes presentes nas folhas de estévia são o esteviosídeo e o rebaudiosídeo A, os quais apresentam dulçor entre 300 a 450 vezes maior que a sacarose, dependendo da concentração de teste. Outros edulcorantes também foram isolados das folhas desta planta, tais como: rebaudiosídeos B, C, D, E e F; dulcosídeo e esteviolbiosídeo, os quais apresentam um poder adoçante que varia de 100 a 450 vezes maior que a sacarose a 0,4% (Brandle, 1999; Tateo et al., 1999).

O esteviosídeo é o componente edulcorante de maior teor nas folhas de estévia (5 a 15% em peso seco), seguido do rebaudiosídeo A (3 a 6% do peso seco) (Kinghorn e Kim, 1997; Kim e Shibata, 1997; Tateo et al., 1998; Tateo et al., 1999).

associações entre características fenotípicas diferentes são de grande valia para os melhoristas. Elas viabilizam a realização de seleção precoce de caracteres desejados, por meio de caracteres de fácil avaliação e que estejam correlacionados com o caráter alvo de seleção. Portanto, isso pode promover ganho de tempo e economia de trabalho nessas etapas de seleção (Falconer, 1987). Este autor afirmou que a correlação fenotípica apresenta pouco valor prático, podendo sua utilização ocasionar erros. Isso decorre do fato de que o ambiente influencia diretamente na expressão das características fenotípicas, principalmente aquelas de baixa herdabilidade. Dessa maneira, é importante que, no estudo da correlação, sejam distinguidas as causas genéticas e ambientais que, combinadas, resultam na correlação fenotípica.

A correlação genética é explicada por dois fenômenos, a pleiotropia e a ligação gênica. Enquanto a pleiotropia implica em correlação total, seja ela positiva ou negativa, a ligação gênica pode resultar em correlações parciais, que serão tanto mais elevadas quanto mais próximos estiverem os genes envolvidos na expressão das respectivas características correlacionadas (Falconer, 1987).

O melhoramento das espécies não visa apenas às características isoladas, mas todo o conjunto de características de importância agrônômica e econômica, simultaneamente. Dessa maneira, quando uma determinada característica apresenta algum aspecto desfavorável, como dificuldade de mensuração e de seleção, a seleção indireta por meio de caracteres geneticamente correlacionados é de grande importância para os melhoristas de plantas (Cruz e Carneiro, 2003).

2.4. Divergência genética

Visto que a cultura da estévia pode ser propagada vegetativamente (clonagem), deve-se buscar realizar hibridações que permitam amplificar significativamente a variabilidade genética nas populações descendentes. Dessa forma, a análise da divergência genética pode orientar quais as melhores combinações híbridas devem ser realizadas para obtenção de segregantes superiores. Na utilização de técnicas de análise da divergência genética entre clones de espécies vegetais variadas, buscam-se encontrar combinações híbridas que resultem em maior efeito heterótico e maior heterozigose e, assim, maior

possibilidade de recuperação de genótipos superiores. Para tanto, duas técnicas são bem conhecidas; as técnicas biométricas (análise dialélica) e os processos preditivos (análise da divergência genética). A escolha do método mais adequado tem sido determinado pela precisão, pela facilidade, pelos recursos ou pela forma como os dados foram obtidos (Cruz e Carneiro, 2003).

2.4.1. Análise de agrupamentos

O termo “análise de agrupamentos” comporta uma variedade de algoritmos de classificação diferentes, todos voltados para uma questão importante em várias áreas da pesquisa. É sempre importante considerar inclusive, que essas classes devem ocorrer normalmente no conjunto de dados. Dessa maneira, o processamento é dirigido pelos dados observados de forma a agrupá-los segundo as características comuns que ocorram neles. Esse processo deve levar em conta a possibilidade de se realizar, inclusive, uma organização hierárquica de grupos. A cada maior nível de caracterização, também são maiores as diferenças entre elementos contidos em cada grupo (Ramalho et al., 2004).

Como forma de auxiliar a interpretação das matrizes de dissimilaridade, principalmente quando se dispõe de conjuntos genotípicos bastante numerosos, existem os métodos de agrupamento. No melhoramento de plantas, os métodos que têm sido mais utilizados em conjunto, na análise da divergência genética, são os de agrupamento hierárquicos ou os de otimização (Kvitschal, 2008). Os métodos hierárquicos consistem da construção de dendrogramas ou diagramas de árvore nos quais os indivíduos são devidamente ordenados com base nas medidas de dissimilaridade previamente estimadas. Os métodos hierárquicos mais utilizados pelos melhoristas nos estudos de divergência genética são o “Vizinho Mais Próximo” (*Single Linkage Method*) e o UPGMA (*Unweighted pair-group method with arithmetic average*).

Kvitschal (2008), em estudo de divergência genética entre clones de mandioca, reportou que o método de UPGMA foi mais eficiente na delimitação de grupos do que o método do “Vizinho Mais Próximo”, ao passo que também foi sugerido o seu uso associado ao método de Otimização de Tocher.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Identificação da área de coleta e seleção de germoplasma

Nos anos de 2004 e 2005, foram realizadas seleções de plantas de estévia em uma propriedade localizada a 23° 37' 45.75" de latitude Sul e 51° 44' 41.77" longitude Oeste, a uma altitude de 480 metros, na Fazenda Humaitá, município de Jandaia do Sul, região Norte do Paraná. Nesta propriedade cultivava-se estévia há mais de 25 anos. As populações oriundas de diversos clones originais foram provenientes do Paraguai, por intermédio do primeiro projeto realizado pela Universidade Estadual de Maringá na década de 1980.

A propriedade escolhida continha área de cultivo de estévia de 1 ha e com aproximadamente 50.000 plantas. Nessa área foram demarcados 1.000 lotes de 10 m² cada, com aproximadamente 50 plantas em cada lote. De cada um, foram selecionados cinco plantas, utilizando-se como referência as maiores alturas delas e o maior número de ramos por planta. As plantas selecionadas foram então devidamente marcadas, e delas coletadas amostras de aproximadamente 50 g de folhas para serem submetidas à análise de concentração de edulcorantes. Dessa forma, um total de 5.000 plantas foram avaliadas e selecionadas. Desse primeiro *screening*, foram selecionados apenas 15 clones que mais se destacaram para as seguintes características: altura de plantas, concentração de edulcorantes totais e relação rebaudiosídeo A/esteviosídeo (Quadro 1)

A determinação da concentração dos edulcorantes esteviosídeo e rebaudiosídeo A foi realizada mediante utilização de HPLC (cromatografia líquida de alto desempenho) marca Gilson, modelo 307 e UV/VIS-150, respectivamente, conforme metodologia preconizada por FAO (2007). A coluna utilizada foi a Lichrosolv RP-18 com 25,0 x 0,4 cm, fase móvel acetonitrila:água (80:20) com fluxo de 1,0 mL min⁻¹ e detecção em UV a 210 nm. Os padrões de esteviosídeo e rebaudiosídeo A, foram adquiridos junto à empresa Wako-Chen – Japan Co.

Quadro 1 – Composição química média de 15 clones de estévia selecionados em Jandaia do Sul, PR, 2004/05

Clones	Est. ^{/1}	Reb.A ^{/2}	ET ^{/3}	R/E ^{/4}
ST59	2,70	3,13	5,83	1,15
ST65	3,98	5,10	9,08	1,28
ST71	4,13	4,50	8,63	1,08
ST75	3,72	5,93	9,65	1,59
ST86	7,73	12,23	19,96	1,58
ST92	10,69	6,19	16,88	0,57
ST94	5,97	4,51	10,48	0,75
ST100	4,80	4,20	9,00	0,87
ST112	8,18	7,30	15,48	0,89
ST114	2,28	3,03	5,32	0,43
ST140	4,44	5,02	9,46	1,13
ST141	5,22	5,18	10,4	0,99
ST145	5,85	6,51	12,36	1,11
ST209	10,38	6,89	17,27	0,66
ST220	13,31	0,46	13,77	0,03

^{/1} Esteviosídeo; ^{/2} Rebaudiosídeo A; ^{/3} Edulcorantes totais; ^{/4} Relação rebaudiosídeo A/esteviosídeo.

3.2. Avaliação experimental

Os 15 clones selecionados que se encontravam no banco de germoplasma “*in vivo*”, foram multiplicados previamente por estacas, em casa de vegetação, com a finalidade de se obter material vegetal suficiente para proceder a instalação dos experimentos, os quais se iniciaram na primeira semana de setembro de 2005.

Os experimentos foram conduzidos nos anos de 2006, 2007 e 2008 em área da Indústria Forquímica Agrosciência Ltda, a qual disponibilizou mão-de-obra, suplementação de irrigação, área de secagem de material e laboratórios para análise química. A área experimental se encontra situada no município de Cambira, PR, em altitude média de 830 m, a 23° 36' 06.85" de latitude Sul e 51° 34' 19.68" de longitude Oeste.

O delineamento experimental utilizado foi blocos completos casualizados com três repetições para cada clone. As 45 parcelas foram distribuídas ao acaso; cada parcela continha 6 linhas de 2,4 m de comprimento, 3,5 m de largura com 7 plantas em cada linha, a área de cada parcela foi composta de 8,4 m², resultando num total de 42 plantas por parcela. O espaçamento utilizado foi de 0,30 m entre linhas e de 0,50 m entre plantas. As avaliações dos caracteres agrônômicas foram efetuadas nas 10 plantas centrais, durante o período de três anos.

As colheitas e as respectivas análises foram realizadas entre o final de dezembro e início de janeiro de cada ano, sempre após o segundo corte depois do início do ciclo de desenvolvimento vegetativo, o qual se inicia após o mês de setembro de cada ano. O primeiro corte foi realizado na segunda quinzena de setembro; o segundo na primeira quinzena de novembro; e o corte para retirada das amostras destinadas à análise química, foi realizado na segunda quinzena de dezembro do mesmo ano. A coleta do material foi realizada no período da manhã e as folhas foram secas ao ar livre, até atingirem umidade entre 10 a 15%.

Características avaliadas:

- a) Altura média de plantas (ALT): valor médio, expressa em cm, obtida a partir da medição de 10 plantas por parcela, desde a superfície do solo até o ápice da respectiva planta de estévia.
- b) Número médio de hastes por planta (NH): valor médio, obtido a partir da contagem do número total das hastes de 10 plantas por parcela.
- c) Produção de massa fresca (MF): valor médio, expresso em g planta⁻¹, obtida a partir da pesagem, mediante utilização de balança semi-analítica, de 10 plantas por parcela.
- d) Produção de massa seca (MS): valor médio, expresso em g planta⁻¹, obtido a partir da pesagem, mediante utilização de balança semi-analítica, de 10 plantas por parcela, após as mesmas terem sido secas ao sol até a umidade de 10 a 15%.
- e) Concentração de edulcorantes totais (ET): valor médio, expresso em porcentagem, referente à concentração de edulcorantes rebaudiosídeo A e esteviosídeo, quantificado por cromatografia líquida de alta eficiência (FAO, 2007). O material vegetal utilizado para análise dos respectivos edulcorantes consistiu de uma amostra de 5,0 g de folhas secas de 10 plantas por parcela.

- f) Relação rebaudiosídeo A/esteviosídeo (R/E): os valores médios obtidos pela razão da concentração de rebaudiosídeo A (%) pela concentração de esteviosídeo (%).

3.3. Análise estatística

Os dados experimentais foram inicialmente submetidos à análise de variância individual a fim de verificar a precisão experimental de cada ensaio e, posteriormente, à análise de variância conjunta para identificar o efeito da interação entre clones e ambiente na expressão de todas as características avaliadas. A comparação entre médias foi realizada mediante utilização do teste Scott e Knott (1974).

A análise de correlação simples de Pearson também foi aplicada com intuito de verificar a existência de características correlacionadas em estévia.

A divergência genética foi estimada utilizando-se a Distância Generalizada de Mahalanobis entre os pares de clones para cada uma das características avaliadas. O método de Singh (1981) foi conduzido para quantificar a contribuição de cada variável estudada na divergência genética total. Também foi aplicado o método hierárquico de UPGMA (método da ligação média entre grupos) para o agrupamento dos clones, com base na distância generalizada de Mahalanobis. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa computacional GENES (Cruz, 2001).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análise de variância

A análise de variância conjunta das características altura de plantas (ALT), produção de massa fresca (MF) e produção de massa seca (MS) foram significativamente diferentes tanto para o efeito genético quanto para o de interação entre clones e anos (C x A) conforme apresentado no Quadro 2. Vale ressaltar ainda que houve elevada precisão experimental para todas as características avaliadas, uma vez que os respectivos coeficientes de variação não ultrapassaram 13,4% (Quadros 2 e 3), valor este que é considerado adequado para os experimentos de campo.

Observou-se diferença significativa na expressão das características altura de plantas, produção de massa fresca e produção de massa seca dos 15 clones de estévia avaliados. Por sua vez, o efeito significativo da interação Clones x Anos, indica que os respectivos clones não apresentam o mesmo padrão de comportamento fenotípico dessas características frente à variação nas condições de ambiente. Dessa forma, é essencial o desdobramento do efeito dos 15 clones de estévia na variação dessas três características fenotípicas avaliadas.

Quadro 2 – Resumo de análise de variância conjunta para as características altura de plantas (ALT), produção de massa fresca (MF) e produção de massa seca (MS) de 15 clones de estévia, avaliados em Cambira, PR, 2006, 2007 e 2008

Fonte de variação	G.L.	Quadrados médios		
		ALT	MF	MS
Blocos/Ano	6	158,904	13.401,259	1.191,679
Clones (C)	14	1.140,860**	27.1315,257**	26.212,522**
Anos (A)	2	64,822 ^{ns}	325.551,089 ^{ns}	52.443,366 ^{ns}
C x A	28	239,690**	41.411,446**	6.815,851**
Resíduo	84	89,372	12.405,370	1.605,377
Média		102,867	1.210,244	298,417
C.V. (%)		9,19	9,20	13,43

G.L. = Graus de liberdade; C.V. = Coeficiente de Variação; ** Significativo ($P \leq 0,01$) pelo teste F; ^{ns} Não-significativo.

No Quadro 3, estão apresentados os resultados da análise de variância conjunta das características número de hastes (NH), concentração de edulcorantes totais (ET) e relação rebaudiosídeo A/esteviosídeo (R/E). Os resultados evidenciaram diferença significativa das características, número de hastes (NH), edulcorantes totais (ET) e relação Rebaudiosídeo A/Esteviosídeo (R/E) entre os 15 clones de estévia avaliados. A interação entre clones e anos (C x A), demonstrou que apenas a característica número de hastes não apresentou efeito significativo, indicando que essa característica pode ser estudada apenas em seu efeito médio, enquanto que o efeito das características ET e R/E deve ser desdobrado.

Quadro 3 – Resumo da análise de variância conjunta para as características número de hastes (NH), edulcorantes totais (ET) e relação rebaldiosídeo A/estaviosídeo (R/E) de 15 clones de estévia, avaliados em Cambira, PR, 2006, 2007 e 2008

Fonte de variação	G.L.	Quadrados médios		
		NH	ET	R/E
Blocos/Ano	6	140,785	0,404	0,006
Clones (C)	14	3.916,230**	57,651**	4,190**
Anos (A)	2	11.579,607 ^{ns}	13,107 ^{ns}	0,240 ^{ns}
C x A	28	238,092 ^{ns}	3,209**	0,062**
Resíduo	84	175,476	0,969	0,011
Média		101,326	9,170	0,929
C.V.(%)		13,07	10,74	11,48

G.L. = Graus de liberdade; C.V. = Coeficiente de Variação; ** Significativo ($P \leq 0,01$) pelo teste F; ^{ns} Não-significativo.

4.2. Caracterização dos clones de estévia

4.2.1. Altura de plantas (ALT)

Nos três anos de avaliação, foi verificada diferença significativa ($P \leq 0,05$) entre as médias de altura de plantas dos 15 clones de estévia avaliados (Quadro 4). Isso sugere que, mesmo após ter passado por seleção prévia, ainda existe variabilidade genética suficiente, portanto, para selecionar a característica altura de plantas na espécie *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni.

Quadro 4 – Médias da altura de plantas (ALT) de 15 clones de estévia, avaliados em Cambira, PR, nos anos agrícolas de 2006, 2007 e 2008

Clones	Altura de plantas (cm)			Média
	2006	2007	2008	
ST59	119,0 a	111,7 a	110,3 a	113,7
ST65	123,7 a	117,0 a	117,7 a	119,4
ST71	105,0 a	105,3 a	92,3 b	100,9
ST75	114,0 a	118,3 a	112,7 a	115,1
ST86	115,0 a	106,0 a	86,7 b	102,6
ST92	102,0 b	93,0 b	107,3 a	100,8
ST94	106,0 a	100,0 a	88,3 b	98,1
ST100	91,0 b	89,3 b	115,7 a	98,7
ST112	92,0 b	91,0 b	104,7 a	96,0
ST114	98,0 b	87,7 b	96,7 b	94,2
ST140	88,7 b	103,3 a	85,0 b	92,3
ST141	114,3 a	113,0 a	113,0 a	113,4
ST145	110,0 a	112,7 a	117,0 a	113,2
ST209	84,7 b	77,3 b	67,0 c	76,3
ST220	98,3 b	101,7 a	124,7 a	108,2
Média	104,2	101,8	102,6	102,9
C.V.(%)	8,1	10,4	8,9	9,19

C.V. = Coeficiente de Variação; Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si ($P \leq 0,05$) pelo teste de Scott e Knott (1974).

Os clones ST59, ST65, ST75, ST141 e ST145 apresentaram elevados valores médios de altura de plantas nos três anos de avaliação, indicando maior estabilidade de comportamento para estatura. Por outro lado, os clones ST114 e ST209 apresentaram estatura média de plantas mais reduzida, visto que em nos anos de avaliação esses clones expressaram médias de altura de planta significativamente inferiores aos demais clones avaliados (Quadro 4).

A altura de plantas é uma característica de importância na seleção de plantas de estévia, visto que os compostos de interesse desta cultura (em especial o rebaudiosídeo A) são extraídos a partir das suas folhas. Dessa forma, plantas de maior altura média apresentam uma tendência em expressar maior produção de parte aérea (Tamura et al., 1984b) e, conseqüentemente, maior

produção de matéria-prima para a extração dos respectivos edulcorantes. Estudos realizados com outras culturas tais, como mandioca e erva-mate indicaram que a altura de plantas é diretamente correlacionada com a produção de parte aérea (Sagrilo et al., 2008; Rosse e Fernandes, 2002).

Vale ressaltar que plantas com estatura muito elevada podem sofrer acamamento ou quebramento, quando sob incidência de ventos fortes, o que pode propiciar a redução da produção de massa fresca. Dessa forma, a altura de plantas, juntamente com a produção de massa fresca, e até mesmo à incidência de acamamento e quebramento de plantas, deve ser considerada na seleção de clones de estévia.

4.2.2. Produção de massa fresca de plantas (MF)

No Quadro 5 estão apresentadas as médias de produção de massa fresca (MF) dos 15 clones de estévia avaliados, durante os três anos de avaliação a campo (2006, 2007 e 2008). Os dados revelaram diferença significativa ($P \leq 0,05$) na massa fresca dos clones de estévia, indicando que, semelhantemente ao observado para a característica altura de planta, existe variabilidade genética suficiente para ser utilizada no melhoramento da estévia.

Os clones ST65 e ST145 apresentaram elevados valores médios de MF nos três anos de avaliação, indicando maior estabilidade de comportamento desta característica em relação aos demais clones avaliados. Por outro lado, o clone ST100 apresentou a menor média de MF em todos os anos avaliados, expressando médias de produção significativamente inferior aos demais clones (Quadro 5).

Em se tratando de produção de massa fresca, é sempre importante associar essa característica com os teores de edulcorantes totais (ET) e com a relação rebaudiosídeo **A** / esteviosídeo (R/E). Valores mais elevados dessas características propiciariam maior rendimento no processo de extração industrial dos edulcorantes de interesse (rebaudiosídeo **A**) e, conseqüentemente, redução dos custos de produção da matéria-prima para a indústria de adoçantes naturais. Entretanto, é preciso levar em consideração as quantidades de água presentes nas folhas, as quais são determinadas por condições ambientais e do cultivo.

Quadro 5 – Médias da produção de massa fresca de plantas (MF) de 15 clones de estévia, avaliados em Cambira, PR, nos anos agrícolas de 2006, 2007 e 2008

Clones	Produção de massa fresca de plantas (g/planta ⁻¹)			
	2006	2007	2008	Média
ST59	1.078,3 b	988,7 b	1.165,7 c	1.077,6
ST65	1.383,0 a	1.277,0 a	1.625,3 a	1.428,4
ST71	1.164,3 b	1.022,3 b	1.111,0 c	1.099,2
ST75	1.267,7 a	1.090,0 b	1.381,7 b	1.246,4
ST86	1.161,7 b	1.073,3 b	1.259,3 c	1.164,8
ST92	1.018,0 b	1.006,7 b	1.212,3 c	1.079,0
ST94	1.508,0 a	1.357,0 a	1.263,3 c	1.376,1
ST100	646,0 c	641,0 c	1.102,3 c	796,4
ST112	935,7 b	938,0 b	1.179,3 c	1.017,7
ST114	1.399,3 a	1.292,8 a	1.231,3 c	1.307,8
ST140	1.340,7 a	1.454,0 a	1.292,7 c	1.362,4
ST141	1.323,3 a	1.162,0 a	1.252,0 c	1.245,8
ST145	1.329,3 a	1.262,3 a	1.546,0 a	1.379,2
ST209	1.380,3 a	1.366,0 a	1.363,7 b	1.370,0
ST220	1.117,0 b	1.000,3 b	1.491,0 a	1.202,8
Média	1.203,5	1.128,8	1.298,5	1.210,24
C.V.(%)	7,3	9,6	10,3	9,20

C.V. = Coeficiente de Variação; Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si ($P \leq 0,05$) pelo teste de Scott e Knott (1974).

O ciclo de desenvolvimento vegetativo dos clones de estévia, em fotoperíodo de no mínimo 12 horas de luz, é de aproximadamente 35 dias, quando as plantas apresentam aproximadamente 10% de botões florais abertos. Neste ponto, são realizados os cortes. Quando a cultura de estévia recebe irrigação artificial, preconiza-se que a suplementação hídrica seja coibida por um período de 10 dias que antecedem o corte. Sendo assim, tal prática pode antecipar o florescimento e, conseqüentemente, diminuir o tempo de corte. Adicionalmente, Brandle e Rosa (1992) observaram que o estresse causado pelo déficit hídrico promove um aumento significativo na concentração de edulcorantes totais nas folhas de estévia, o que se deve ao fato da planta apresentar menor quantidade de água em suas folhas.

4.2.3. Produção de massa seca de plantas (MS)

As médias de produção de massa seca de plantas (MS) dos 15 clones de estévia avaliados apresentaram diferenças significativas ($P \leq 0,05$). Os clones ST65, ST94 e ST209 se destacaram, visto que os mesmos apresentaram as maiores médias de MS em pelo menos 2 anos de avaliação (Quadro 6).

Quadro 6 – Médias da produção de massa seca de plantas (MS) de 15 clones de estévia, avaliados em Cambira, PR, nos anos agrícolas de 2006, 2007 e 2008

Clones	Produção de massa seca de plantas (g/planta ⁻¹)			
	2006	2007	2008	Média
ST59	236,2 c	234,8 b	305,3 c	258,7
ST65	313,1 b	318,5 a	429,1 a	353,6
ST71	318,6 b	254,3 b	305,6 c	292,8
ST75	302,0 b	285,3 b	349,8 b	312,4
ST86	313,2 b	275,8 b	340,2 b	309,7
ST92	207,5 c	207,0 b	330,3 b	248,3
ST94	396,1 a	358,2 a	349,6 b	367,9
ST100	96,4 d	85,4 c	272,8 c	151,5
ST112	293,9 b	263,8 b	242,7 c	266,6
ST114	308,2 b	310,8 a	257,7 c	292,2
ST140	329,5 b	336,0 a	347,1 b	337,5
ST141	306,1 b	283,72 b	270,4 c	286,7
ST145	282,2 b	290,2 b	432,4 a	334,9
ST209	351,3 a	328,8 a	367,8 b	349,3
ST220	261,3 b	232,0 b	448,9 a	258,7
Média	287,7	270,9	336,6	298,42
C.V.(%)	9,6	14,5	14,9	13,4

C.V. = Coeficiente de Variação; Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si ($P \leq 0,05$) pelo teste de Scott e Knott (1974).

O clone ST100, por sua vez, apresentou a menor média de teor de matéria seca. Em todos os anos de avaliação, este clone apresentou teor de matéria seca significativamente inferior aos demais clones avaliados (Quadro 6).

A qualidade das folhas secas é um caráter de grande importância à aceitação comercial e industrial das folhas de estévia. A secagem das folhas está

diretamente relacionada com a temperatura e a umidade relativa do ar do ambiente de secagem, já que todo este processo envolve, tradicionalmente, a secagem das folhas ao ar livre. A qualidade das folhas é mantida se, durante a secagem ao ar livre, a umidade do ar estiver abaixo de 60% e a temperatura estiver pouco acima de 25°C (Cabrera et al., 2001). Nessas condições, o tempo de secagem perdura aproximadamente 20 horas, para que a umidade relativa das folhas seja reduzida em até 90%. Ambientes de secagem com umidade relativa do ar superior a 60% elevam significativamente o tempo de secagem das folhas, o que acarreta no seu escurecimento e, por conseqüência, na redução do seu valor comercial.

O clone ST100 apresentou a menor média de MF, fato este confirmado através dos resultados de produção de MS. Em todos os anos avaliados, o presente clone expressou médias de produção significativamente inferiores quando comparado aos demais.

4.2.4. Número de hastes por planta (NH)

O Quadro 7 apresenta as médias do número de hastes por plantas dos 15 clones de estévia avaliados, durante os três anos de avaliação no campo (2006, 2007 e 2008). Visto que o efeito da interação Clones x Anos não foi significativo para esta característica, a comparação entre médias foi realizada com base no efeito médio da característica, o que dispensou o seu desdobramento.

Pode-se observar que as plantas dos clones ST65, ST75, ST92, ST94, ST145 e ST220 apresentaram maior número médio de hastes, enquanto que os ST59, ST71 e ST100 apresentaram as menores médias para esta característica. Considerando apenas os que se destacaram para ALT, MF e MS, verificou-se que destes, apenas o ST65 apresentou as médias mais elevadas de NH.

As plantas que possuem maior número de hastes são as mais desejáveis, uma vez que elas tendem a apresentar maior ramificação lateral e, conseqüentemente, maior área foliar para a absorção de radiação luminosa fotossinteticamente ativa. Portanto, o maior número de hastes por planta pode também estar relacionado à maior produção de massa seca de folhas, a qual serve de matéria-prima para a indústria de adoçantes; e à estrutura da planta de maior valor econômico neste segmento.

Nesse contexto, os clones de maior interesse dentre aqueles integrantes do conjunto genotípico avaliado foram: ST65, ST75, ST92, ST94, ST145 e ST220.

Quadro 7 – Médias do número de hastes (NH) de 15 clones de estévia, avaliados em Cambira, PR, nos anos agrícolas de 2006, 2007 e 2008

Clones	Número de hastes por planta			
	2006	2007	2008	Média
ST59	70,7	79,3	99,3	83,1 c
ST65	127,3	112,0	148,3	129,2 a
ST71	78,3	66,3	95,0	79,8 c
ST75	113,7	106,3	131,0	117,0 a
ST86	95,7	73,3	113,3	94,1 b
ST92	116,0	100,7	117,0	111,2 a
ST94	113,7	92,0	128,0	111,2 a
ST100	25,3	51,7	77,3	51,4 c
ST112	71,0	70,3	121,0	87,4 b
ST114	93,3	103,0	112,3	102,9 b
ST140	85,3	93,3	124,0	100,9 b
ST141	87,0	75,3	117,3	93,2 b
ST145	129,7	116,3	148,7	131,6 a
ST209	98,3	99,0	124,0	107,1 b
ST220	110,7	79,3	138,3	119,6 a
Média	94,4	89,9	119,7	101,33
C.V.(%)	9,9	13,8	14,1	13,1

C.V. = Coeficiente de Variação; Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si ($P \leq 0,05$) pelo teste de Scott e Knott (1974).

4.2.5. Concentração de edulcorantes totais (ET)

Em todos os anos de avaliação, foi verificada ampla variação entre as médias de concentração de edulcorantes totais (rebaudiosídeo A e esteviosídeo) dos 15 clones de estévia (Quadro 8), dado o grande número de grupos definidos pelo teste de Scott e Knott (1974). Dessa forma, o conjunto genotípico avaliado pode ser utilizado como fonte de recurso genético para o melhoramento da característica ET de plantas na espécie *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni.

Quadro 8 – Médias da concentração de edulcorantes totais (ET) de 15 clones de estévia, avaliados em Cambira, PR, nos anos agrícolas de 2006, 2007 e 2008

Clones	Concentração de edulcorantes totais (%)			
	2006	2007	2008	Média
ST59	8,6 c	5,8 d	7,1 e	7,06
ST65	7,0 d	8,2 c	8,5 e	7,88
ST71	7,8 c	7,8 c	8,9 d	8,20
ST75	8,4 c	9,3 b	10,7 c	9,48
ST86	11,3 d	14,6 a	14,0 a	13,30
ST92	14,4 a	14,4 a	14,3 a	14,36
ST94	7,8 c	8,0 c	6,8 e	7,56
ST100	6,9 d	7,3 d	7,7 e	7,32
ST112	8,8 c	8,5 c	10,5 c	9,26
ST114	7,5 d	6,8 d	7,5 e	7,29
ST140	7,0 d	7,7 c	7,1 e	7,26
ST141	12,1 b	13,9 a	14,7 a	13,58
ST145	8,6 c	10,5 b	8,9 d	9,32
ST209	6,5 d	5,9 d	7,9 e	6,77
ST220	8,4 c	6,6 d	11,7 b	8,89
Média	8,7	9,0	9,8	9,17
C.V.(%)	12,5	11,8	7,8	10,7

Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si ($P \leq 0,05$) pelo teste de Scott e Knott (1974).

Somente o clone ST92 apresentou maior média de edulcorantes totais nos três anos de avaliação, o que sugere que ele possui maior habilidade de resistir às variações no ambiente e de concentrar, ao mesmo tempo, maior quantidade de edulcorantes totais nas suas folhas. No entanto, deve-se destacar também os clones ST86 e ST 141, os quais apresentaram elevadas médias de edulcorantes totais nos anos agrícolas 2007 e 2008.

O teor de edulcorantes totais é uma característica muito importante para as indústrias de extração de edulcorantes de estévia, visto que, atualmente, folhas de estévia não ultrapassam o teor de 9% de edulcorantes totais (Midmore e Rank, 2002). No presente estudo, foram verificados clones com concentração de

edulcorantes totais superior a 13% (ST86, ST92 e ST141), o que evidencia um elevado potencial genético do conjunto genotípico para concentração de edulcorantes totais.

Além de elevada concentração de edulcorantes totais, os clones ST86 e ST141 também apresentaram elevadas médias de massa fresca e de massa seca, o que propicia maior produção de edulcorantes por unidade de área. Dessa forma, esses clones são boas opções para cultivo ou para utilização como recurso genético em programas de melhoramento de estévia.

4.2.6. Relação de rebaudiosídeo A/esteviosídeo (R/E)

A relação entre a concentração de rebaudiosídeo A e a concentração de esteviosídeo expressa diretamente a qualidade industrial da matéria-prima do segmento de adoçantes naturais, de forma que são almejadas plantas com maior concentração de rebaudiosídeo A do que de esteviosídeo. Isso decorre do fato de que o esteviosídeo é um edulcorante que confere sabor amargo, capaz de sobrepujar o dulçor do rebaudiosídeo **A**, se estiver presente em maior concentração. O efeito recíproco, entretanto, também é verdadeiro, de forma que se torna essencial à seleção de clones que apresentem valores iguais ou superiores a 1,0 dessa relação rebaudiosídeo A/esteviosídeo (Goto e Clemente, 1998).

Assim sendo, os adoçantes que utilizam edulcorantes com maior proporção de rebaudiosídeo A não apresentam sabor amargo (decorrente do esteviosídeo); logo, possuem boa aceitação pelo mercado consumidor de adoçantes e, conseqüentemente, maior valor comercial.

Com base nas inferências supracitadas, pode-se destacar os clones ST59, ST75, ST86, ST141, ST145 e ST94, visto que os mesmos apresentaram valores de R/E superiores a 1,0 (Quadro 9). O clone ST94 também apresentou R/E superior a 1,0 em dois anos agrícolas 2006 e 2007, podendo o mesmo ser utilizado em seleção para maior concentração de rebaudiosídeo A. Dentre os clones avaliados, o maior destaque deve ser dado ao ST75, visto que este apresentou valores de R/E significativamente superiores a todos os demais clones avaliados, com as médias variando entre 2,45 e 2,94 (Quadro 9). Dessa forma, considerando o conjunto genotípico de estévia avaliado, o clone ST75 tende a proporcionar maior rendimento e melhor qualidade na fabricação de adoçantes.

Quadro 9 – Médias da relação rebaudiosídeo **A** / esteviosídeo (R/E) de 15 clones de estévia, avaliados em Cambira, PR, nos anos agrícolas de 2006, 2007 e 2008

Clones	Relação rebaudiosídeo A / esteviosídeo			
	2006	2007	2008	Média
ST59	1,28 d	1,24 c	1,43 c	1,32
ST65	0,77 d	0,77 d	0,71 e	0,75
ST71	0,78 d	0,72 d	0,74 e	0,75
ST75	2,45 a	2,80 a	2,94 a	2,73
ST86	1,14c	1,07 c	1,44 c	1,20
ST92	0,65 e	0,41 e	0,63 e	0,56
ST94	0,99 c	1,18 c	1,18 d	1,12
ST100	0,63 e	0,60 d	0,57 f	0,60
ST112	0,63 e	0,63 d	0,68 e	0,70
ST114	0,54 e	0,45 e	0,56 f	0,52
ST140	0,31 f	0,24 f	0,42 f	0,30
ST141	1,30 b	2,04 b	2,06 b	1,80
ST145	1,24 b	1,32 c	1,25 d	1,27
ST209	0,22 f	0,25 f	0,50 f	0,32
ST220	0,02 g	0,01 g	0,01 g	0,01
Média	0,86	0,92	1,01	0,92
C.V.(%)	15,90	6,77	10,61	11,5

Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si ($P \leq 0,05$) pelo teste de Scott e Knott (1974).

Por outro lado, os demais clones não se mostraram aptos à exploração comercial de estévia destinada à indústria de adoçantes, uma vez que eles apresentaram maior proporção de esteviosídeo em relação ao rebaudiosídeo A e, conseqüentemente, o produto final (adoçante) apresentaria sabor amargo. Esta característica inibe a inclusão ou até mesmo a manutenção de um novo produto no mercado consumidor de adoçantes.

Os clones que apresentaram os menores valores de R/E foram ST220, ST140 e ST209, respectivamente. Tais clones foram classificados como os menos desejáveis para a exploração destinada ao abastecimento da indústria de adoçantes. O clone ST220, embora tenha apresentado concentração mediana de edulcorantes totais, cujo valor foi superior a (6,0%), a relação entre as

concentrações de rebaudiosídeo A e de esteviosídeo foi muito próxima de zero, o que indica que este clone praticamente não apresenta rebaudiosídeo A na composição de suas folhas. Portanto, seria o clone menos apreciado pela indústria de adoçantes.

Cabrera et al. (2001), no Paraguai, reportaram pela primeira vez a ocorrência da concentração de edulcorantes totais acima de 12%, e relação rebaudiosídeo A/esteviosídeo igual a 1,08, em um clone selecionado de estévia (IAN-VC142). Anami (2001), em estudo desenvolvido na região de Kaloré, PR, reportou a ocorrência de um clone de estévia denominado de UEM-320, que apresentou características de edulcorantes totais acima de 12% e relação rebaudiosídeo A/esteviosídeo equivalente a 1,58. Assim sendo, esse estudo estimulou os investimentos na área de seleção de clones de estévia com características agrônomicas e comerciais favoráveis, bem adaptados à Região Norte/Noroeste do Estado do Paraná.

4.2.7. Clones de estévia de maior interesse

De forma geral, os clones ST75, ST86, ST141, ST145 e ST94 podem ser caracterizados como os mais promissores dentre todo o conjunto de clones de estévia avaliados. Isto se deve às características favoráveis apresentadas por eles, tais como: a elevada concentração de edulcorantes totais com maior proporção de rebaudiosídeo A nas suas folhas; e a produção de massa seca de média à alta, o que propicia alto rendimento de matéria-prima para a fabricação de adoçantes naturais.

4.3. Correlação entre características

No Quadro 10, estão apresentadas as estimativas de correlação de Pearson entre as características altura de plantas (ALT), número de hastes (NH), produção de massa fresca (MF), produção de massa seca (MS), concentração de edulcorantes totais (ET) e relação rebaudiosídeo A / esteviosídeo de 15 clones de estévia, cultivados em Cambira, PR, nos anos agrícolas de 2006, 2007 e 2008.

A altura de plantas exibiu correlação positiva e significativa com a característica rebaudiosídeo A/esteviosídeo (Quadro 10). Os resultados obtidos indicam que a altura de plantas é uma característica que pode ser utilizada na

seleção precoce de plantas para elevada relação rebaudiosídeo **A** / esteviosídeo dentro deste conjunto genotípico de estévia.

Quadro 10 – Estimativas de correlação de Pearson entre as características altura de plantas (ALT), número de hastes (NH), produção de massa fresca (MF), produção de massa seca (MS), concentração de edulcorantes totais (ET) e relação rebaudiosídeo **A** / esteviosídeo, de 15 clones de estévia cultivados em Cambira, PR, nos anos agrícolas 2006, 2007 e 2008

	NH	MF	MS	ET	R/E
ALT	0,27 ^{ns}	0,03 ^{ns}	-0,01 ^{ns}	0,28 ^{ns}	0,56*
NH		0,81**	0,78**	0,10 ^{ns}	0,10 ^{ns}
MF			0,93**	-0,15 ^{ns}	0,07 ^{ns}
MS				-0,14 ^{ns}	0,06 ^{ns}
ET					0,30 ^{ns}

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

Observou-se também a existência de correlações positivas e significativas ($P \leq 0,01$) da característica número de hastes com as características massa fresca e massa seca, bem como entre massa fresca e massa seca. Isso indica que plantas que apresentam maior número médio de hastes também possuem a tendência de expressar elevada produção de massa fresca e de massa seca. Dessa forma, a seleção para as produções de massa fresca ou de massa seca pode ser antecipada pela seleção com base no número de hastes por planta, visto que tais produções somente são avaliadas após o corte da parte aérea das plantas. O número de hastes por plantas, por sua vez, pode ser avaliado visualmente, mediante a contagem direta do número de hastes das plantas. Com isso, pode-se ter redução do volume de trabalho na operação de colheita durante o processo de seleção.

A concentração de edulcorantes totais também não apresentou correlação significativa com nenhuma das demais características avaliadas, de forma que não foi identificada nenhuma característica apta para se fazer seleção precoce para concentração de edulcorantes totais.

4.4. Divergência Genética

4.4.1. Distância Generalizada de Mahalanobis

As estimativas de dissimilaridade das combinações de clones de estévia avaliados, referente à altura de plantas (ALT), dispostas no quadrante acima da diagonal da matriz, bem como às características produção de massa fresca (MF), produção de massa seca (MS) e número de hastes por planta (NH), dispostas no quadrante abaixo da diagonal da matriz estão apresentadas no Quadro 11.

No que concerne à característica ALT, foi verificada a existência de ampla variabilidade genética, visto que foram observadas estimativas de dissimilaridade variando de 0,000 a 20,796 (Quadro 11). Os clones ST71, ST86, ST92, ST94, ST112 e ST220 apresentaram maior similaridade média dentro do conjunto genotípico de estévia avaliado. As combinações entre os clones ST71 e ST92, ST59 e ST141, ST59 e ST145, ST141 e ST145, bem como entre os clones ST94 e ST100 não evidenciaram diferença alguma quanto à altura de planta, uma vez que as estimativas de dissimilaridade entre eles foram muito próximas de zero (Quadro 11).

Por sua vez, o clone ST209 foi o que apresentou a maior divergência genética média dentro do conjunto genotípico avaliado. As maiores estimativas de dissimilaridade ocorreram entre o clone ST209 e os clones ST59 ($D^2_{iii} = 15,595$), ST65 ($D^2_{iii} = 20,796$), ST75 ($D^2_{iii} = 16,825$), ST141 ($D^2_{iii} = 15,410$) e ST145 ($D^2_{iii} = 15,226$). Essa elevada divergência pode ser confirmada pela elevada diferença apresentada entre as médias de altura de plantas desses clones, de forma que o clone ST209 se caracterizou pela baixa estatura, enquanto que os clones ST59, ST65, ST75, ST141 e ST145 foram os de estatura mais elevada (Quadro 4).

A hibridação entre clones mais divergentes entre si tende a amplificar consideravelmente a variabilidade genética e o efeito heterótico nas populações descendentes (Cruz e Carneiro, 2003). Logo, a hibridação do clone ST209 com os clones ST59, ST65, ST75, ST141 e ST145 tende a propiciar a formação de ampla variabilidade dos genes envolvidos no controle do caráter ALT, além de implicar em maior efeito heterótico resultante, passível de seleção pelos melhoristas de estévia.

A divergência genética entre os 15 clones de estévia, com base na produção de massa fresca (MF), produção de massa seca (MS) e número de hastes por planta (NH), foi analisada de forma conjunta, visto que apresentaram

elevado grau de associação, este fato propicia resposta fenotípica semelhante dessas características.

Este princípio foi adotado, a fim de facilitar a análise dos dados e a interpretação dos resultados, sem que informações importantes a respeito da divergência genética fossem desconsideradas.

Para estas características (MF, MS e NH), pode-se observar no Quadro 11 que as combinações entre os clones ST140 e ST209, ST94 e ST209, ST75 e ST220, ST65 e ST145, bem como entre ST114 e ST141, apresentaram as estimativas mais reduzidas de dissimilaridade genética, caracterizando-se, portanto, como os clones mais similares. A hibridação destes clones possivelmente implicaria na geração de níveis reduzidos de heterozigose, visto que a variabilidade alélica entre eles é bastante pequena. Como resultado, as populações descendentes desses cruzamentos dificilmente disporiam de indivíduos com médias de produção de massa fresca, de massa seca, e de número de hastes por planta superiores à média dos seus parentais, o que implicaria numa seleção não-efetiva.

Por outro lado, o clone ST100 foi o que apresentou maior divergência genética média dentre todos os clones integrantes do conjunto genotípico de estévia avaliado, dado o grande número de participações nas combinações mais dissimilares (Quadro 11). As estimativas mais elevadas de dissimilaridade genética foram verificadas nas combinações envolvendo o clone ST100 e os clones ST65 ($D^2_{ii'} = 44,604$), ST75 ($D^2_{ii'} = 28,520$), ST94 ($D^2_{ii'} = 35,874$), ST140 ($D^2_{ii'} = 29,058$), ST145 ($D^2_{ii'} = 42,840$), ST209 ($D^2_{ii'} = 32,032$) e ST220 ($D^2_{ii'} = 29,731$). Dessa forma, estas são as combinações híbridas mais promissoras para o melhoramento da produção de massa fresca e de massa seca, bem como do número de hastes por planta na cultura da estévia, uma vez que elas apresentam tendência de gerar populações segregantes com maior heterozigose e com maior valor heterótico para seleção.

No quadrante disposto acima da diagonal da matriz de dissimilaridade genética (Quadro 12), estão apresentadas as estimativas de dissimilaridade entre as combinações de clones de estévia avaliados, referente à concentração de edulcorantes totais (ET). Os clones mais similares foram ST100, ST114 e ST140, não foi também observada dissimilaridade entre os clones ST112 e ST145 (Quadro 12).

Quadro 11 – Estimativas da Distância Generalizada de Mahalanobis ($D_{ii'}^2$) entre 15 clones de estévia para altura de plantas (ALT), bem como para produção de massa fresca (MF) e de massa seca (MS) e número de hastes por planta (NH).

Clones	$D_{ii'}^2$ para MF, MS e NH (abaixo da diagonal)							$D_{ii'}^2$ para ALT (acima da diagonal)							
	ST59	ST65	ST71	ST75	ST86	ST92	ST94	ST100	ST112	ST114	ST140	ST141	ST145	ST209	ST220
ST59	0	0,374	1,827	0,023	1,381	1,859	2,708	2,518	3,492	4,230	5,092	0,001	0,002	15,595	0,332
ST65	14,630	0	3,853	0,210	3,192	3,899	5,092	4,831	6,150	7,118	8,224	0,403	0,433	20,796	1,409
ST71	1,417	17,026	0	2,263	0,031	0,000	0,086	0,055	0,267	0,497	0,819	1,764	1,702	6,747	0,602
ST75	6,593	2,718	9,109	0	1,764	2,299	3,234	3,026	4,087	4,882	5,805	0,031	0,040	16,825	0,531
ST86	1,746	9,698	1,180	3,926	0	0,035	0,221	0,169	0,481	0,777	1,169	1,327	1,273	7,694	0,359
ST92	6,859	10,360	12,154	3,140	7,742	0	0,080	0,050	0,255	0,481	0,798	1,795	1,733	6,686	0,620
ST94	8,979	3,465	7,766	3,920	3,737	13,304	0	0,003	0,050	0,169	0,374	2,631	2,555	5,307	1,144
ST100	9,054	44,604	12,735	28,520	17,969	20,450	35,874	0	0,080	0,221	0,449	2,444	2,371	5,581	1,022
ST112	1,279	16,528	1,938	6,575	1,850	5,834	10,490	10,866	0	0,035	0,150	3,405	3,319	4,328	1,671
ST114	5,508	4,575	8,718	3,780	5,409	8,176	4,625	24,158	9,705	0	0,040	4,134	4,039	3,581	2,193
ST140	6,591	5,128	6,540	5,364	3,899	13,682	1,375	29,058	10,290	1,950	0	4,987	4,882	2,864	2,825
ST141	2,563	7,560	4,543	4,668	2,966	8,597	4,581	18,073	6,241	0,794	1,663	0	0,001	15,410	0,305
ST145	14,541	0,516	18,173	1,997	10,412	7,404	5,572	42,840	15,721	5,230	7,421	8,501	0	15,226	0,280
ST209	7,399	3,422	7,160	3,864	3,610	12,413	0,417	32,032	10,089	2,494	0,330	2,565	5,452	0	11,378
ST220	7,830	4,580	10,046	0,509	4,611	2,731	5,693	29,731	6,209	6,929	8,426	7,509	3,303	6,313	0

Quadro 12 – Estimativas da Distância Generalizada de Mahalanobis (D_{ii}^2) entre 15 clones de estévia para concentração de edulcorantes totais de plantas (ET) e para relação rebaudiosídeo **A** / esteviosídeo (R/E)

Clones	D_{ii}^2 para R/E (abaixo da diagonal) \ D_{ii}^2 para ET (acima da diagonal)														
	ST59	ST65	ST71	ST75	ST86	ST92	ST94	ST100	ST112	ST114	ST140	ST141	ST145	ST209	ST220
ST59	0	0,690	1,333	6,038	40,198	54,995	0,252	0,069	4,990	0,052	0,042	43,766	5,276	0,090	3,443
ST65	28,075	0	0,105	2,646	30,354	43,364	0,108	0,322	1,968	0,363	0,392	33,464	2,150	1,279	1,050
ST71	28,518	0,002	0	1,697	26,889	39,202	0,426	0,795	1,164	0,859	0,903	29,821	1,305	2,117	0,491
ST75	175,330	343,724	345,270	0	15,077	24,587	3,822	4,815	0,050	4,970	5,076	17,291	0,026	7,604	0,362
ST86	0,878	19,024	19,389	201,019	0	1,157	34,081	36,932	16,862	37,358	37,649	0,076	16,347	44,095	20,111
ST92	49,960	3,132	2,986	412,474	37,594	0	47,797	51,163	26,854	51,665	52,006	0,640	26,203	59,538	30,916
ST94	3,589	11,587	11,872	229,093	0,917	26,767	0	0,057	2,998	0,075	0,089	37,372	3,221	0,644	1,832
ST100	45,222	2,034	1,917	398,639	33,499	0,118	23,330	0	3,884	0,001	0,003	40,355	4,137	0,317	2,537
ST112	39,402	0,957	0,878	380,965	28,518	0,626	19,206	0,200	0	4,023	4,119	19,200	0,004	6,421	0,143
ST114	56,020	4,779	4,599	429,561	42,873	0,173	31,249	0,577	1,458	0	0,001	40,801	4,281	0,279	2,649
ST140	86,608	16,062	15,730	508,392	70,048	5,009	54,934	6,665	9,176	3,319	0	41,104	4,379	0,255	2,727
ST141	20,411	96,362	97,181	76,097	29,754	134,237	41,119	126,395	116,531	144,059	191,108	0	18,650	47,829	22,657
ST145	0,210	23,431	23,836	187,670	0,229	43,695	2,064	39,271	33,861	49,373	78,292	24,759	0	6,746	0,195
ST209	86,802	16,146	15,813	508,862	70,222	5,056	55,089	6,719	9,239	3,357	0,000	191,396	78,477	0	4,648
ST220	149,609	48,065	47,490	648,859	127,568	26,659	106,852	30,324	35,455	22,533	8,556	280,540	138,614	8,496	0

Essa elevada similaridade entre os clones ST100, ST114 e ST140 pode ser confirmada ao observarmos os valores médios da concentração de edulcorantes totais destes clones. As respectivas médias de cada um desses clones mostraram-se similares nos três anos de avaliação, cujos valores foram sempre próximos de 7,0% (Quadro 8).

O clone ST92 apresentou elevada divergência genética média em relação ao teor de edulcorantes totais quando comparada aos resultados obtidos nos demais clones avaliados. Nesse contexto, o clone ST92 pode ser considerado um parental em potencial para o melhoramento da concentração de edulcorantes totais. No entanto, outras combinações híbridas também evidenciaram elevada magnitude das estimativas de dissimilaridade genética, tais como aquelas entre ST59 e ST86, ST59 e ST141, ST86 e ST209, ST100 e ST141, bem como entre os clones ST114 e ST141. Tais combinações tendem a proporcionar a expressão de elevado valor heterótico e a geração de ampla variabilidade genética nas populações descendentes, o que eleva significativamente as chances de êxito no processo de identificação e seleção de indivíduos superiores.

Embora o clone ST209 tenha apresentado elevada concentração de edulcorantes totais, sendo considerado um dos mais divergentes, o mesmo ainda não possui as características ideais como fonte para melhoramento genético da estévia. Tal fato se deve a proporção de rebaudiosídeo A presente nestes edulcorantes totais, a qual foi considerada muito baixa em relação aos padrões industriais.

Para a relação rebaudiosídeo A/esteviosídeo (R/E), cujas estimativas da Distância Generalizada de Mahalanobis estão dispostas no quadrante localizado abaixo da diagonal da matriz, pode-se verificar que os clones ST140 e ST209, bem como os clones ST65 e ST71 mostraram-se muito similares, apresentando estimativas do parâmetro D^2_{ij} equivalentes a 0,000 e 0,002, respectivamente (Quadro 12). As combinações entre ST59 e ST145, ST92 e ST100, ST92 e ST114, bem como entre os clones ST100 e ST112, também se demonstraram bastante similares. Tais estimativas de dissimilaridade genética não ultrapassaram 0,210. Dessa forma, a hibridação entre esses clones deve ser evitada, uma vez que a heterozigose e o valor heterótico resultantes desses cruzamentos tendem a ser bastante reduzidos, coibindo, assim, as chances de êxito da seleção de indivíduos superiores.

Em contrapartida, o clone ST75 foi caracterizado como o mais divergente dentro do conjunto genotípico de estévia avaliado, uma vez que ele expressou valores notoriamente elevados de dissimilaridade genética com quase todos os demais clones. De forma semelhante, ST141 também expressou elevadas estimativas de dissimilaridade genética com a maioria dos clones de estévia avaliados, embora em menor magnitude que ST75. Portanto, a utilização de ST75 e ST141, como fonte de recurso genético em programas de melhoramento genético de estévia para elevação da relação rebaudiosídeo A/esteviosídeo, é perfeitamente justificada. Ambos apresentaram elevada divergência genética aliada ao alto potencial de síntese de rebaudiosídeo A.

O clone ST220 também participou de várias das combinações mais divergentes, evidenciando, assim, elevada divergência genética média para a característica R/E. Tal comportamento já era esperado, uma vez que ele foi o único clone que apresentou valores de R/E praticamente nulos. No entanto, esse padrão fenotípico não possui interesse econômico para a cultura da estévia, por estar indicando a ausência de rebaudiosídeo A nos edulcorantes totais. Pelo fato de o rebaudiosídeo A se tratar do principal edulcorante de propriedades adoçantes, enquanto que o esteviosídeo confere sabor amargo, esse clone só poderá ser utilizado como fonte de recurso genético para o melhoramento de características como massa fresca, massa seca e número de hastes por planta.

4.4.2. Contribuição relativa dos caracteres para a divergência genética

A utilização do critério proposto por Singh (1981) é apropriada para se quantificar a contribuição relativa dos caracteres agronômicos para a divergência genética total entre indivíduos de um determinado conjunto genotípico de todas as espécies (Amorin et al., 2007; Bento et al., 2007; Bertan et al., 2006; Vasconcelos et al., 2007; Silva et al., 2008).

No Quadro 13, estão apresentadas as estimativas do coeficiente de Singh (1981) para as características ALT, MF, MS, NH, ET e R/E, calculados a partir de médias fenotípicas de 15 clones de estévia, avaliados na região de Cambira – PR, durante os anos agrícolas de 2006, 2007 e 2008.

Quadro 13 – Contribuição relativa dos caracteres para divergência genética pelo método de Singh (1981). Cálculo realizado a partir das médias não-padronizadas

Característica	S_j	Valor (%)
Altura de plantas (ALT)	153,374793	1,29
Produção de massa fresca (MF)	382,868605	3,22
Produção de massa seca (MS)	161,999156	1,36
Número de hastes por planta (NH)	410,120419	3,45
Concentração de edulcorantes totais (ET)	1.425,364160	11,99
Relação rebaudiosídeo A /esteviosídeo (R/E)	9.355,089504	78,69

S_j : contribuição da variável x para o valor da Distância de Mahalanobis entre os clones i e i' .

A característica que mais contribuiu para a explicação da divergência genética entre os 15 clones de estévia avaliados foi a relação rebaudiosídeo **A**/esteviosídeo (R/E), a qual foi responsável por pouco mais de 78% da divergência genética total. A concentração de edulcorantes totais, por sua vez, explicou quase 12% da divergência genética. Essas duas características explicaram 90,68% da divergência genética total (Quadro 13), sendo as duas características de maior importância na seleção de parentais pelo método preditivo da divergência genética. A produção de massa seca, entretanto, também é uma característica intrínseca à exploração comercial da cultura da estévia, visto que a produção de edulcorantes (principalmente o rebaudiosídeo **A**) é dependente não somente da sua concentração nas folhas, mas igualmente da produção de folhas dessas plantas. Por este motivo, a característica produção de massa seca (MS) também foi considerada na análise da divergência genética, embora a sua contribuição para explicá-la tenha sido relativamente baixa (1,36%).

4.4.3. Análise de agrupamento

A Figura 5 apresenta o dendrograma representativo do agrupamento dos 15 clones de estévia, obtido pelo método de UPGMA com base nas médias da característica altura de plantas (ALT).

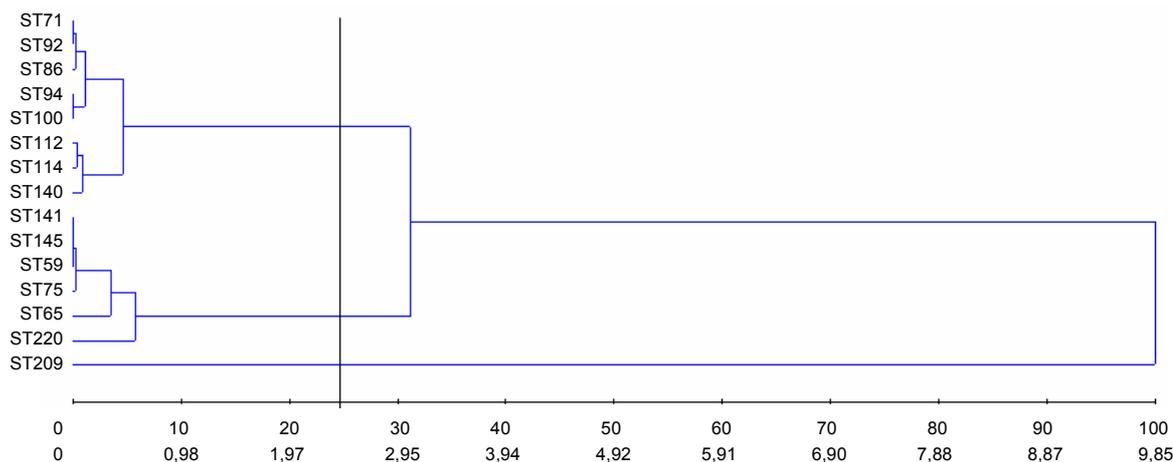


Figura 5 - Dendrograma representativo do agrupamento dos 15 clones de estévia avaliados em Cambira, PR nos anos agrícolas de 2006, 2007 e 2008, pelo método de UPGMA, com base na dissimilaridade estimada a partir da característica altura de plantas.

O método de UPGMA propiciou a formação de três grandes grupos. No grupo I, foram incluídos oito clones (Figura 5). Este grupo foi o mais representativo e caracterizado por alocar os clones com médias mais elevadas para a característica altura de planta.

O grupo II foi constituído por seis clones (Figura 5), enquanto que o grupo III alocou apenas o clone ST209; este último, portanto, o menos representativo. O grupo II se caracterizou por alocar os clones de estatura mediana, enquanto que o ST209 (grupo III) apresentou altura de plantas significativamente inferior aos demais clones de estévia avaliados.

Os resultados de agrupamento dos 15 clones de estévia pelo método de UPGMA confirmam as inferências feitas anteriormente com base nas estimativas individuais da Distância Generalizada de Mahalanobis. Os clones mais dissimilares foram alocados em grupos distintos, enquanto que os clones mais similares foram distribuídos lado a lado no diagrama da árvore de UPGMA.

No que se refere às características produção de massa fresca (MF), produção de massa seca (MS) e número de hastes por planta (NH), pôde-se verificar a formação de dois grandes grupos bem definidos; sendo que o clone ST100 ficou isolado no grupo II (Figura 6). A classificação do ST100 em um grupo isolado ocorreu em virtude das reduzidas médias das características MF, MS e NH apresentadas por ele nos anos de avaliação 2006 e 2007. Dado que a produção de massa fresca e de massa seca está diretamente ligada ao

rendimento de edulcorantes por unidade de área, mesmo tendo apresentado elevada divergência genética média, o clone ST100 não apresenta grande mérito para utilização como fonte de recurso genético em programas de melhoramento de estévia envolvendo hibridações.

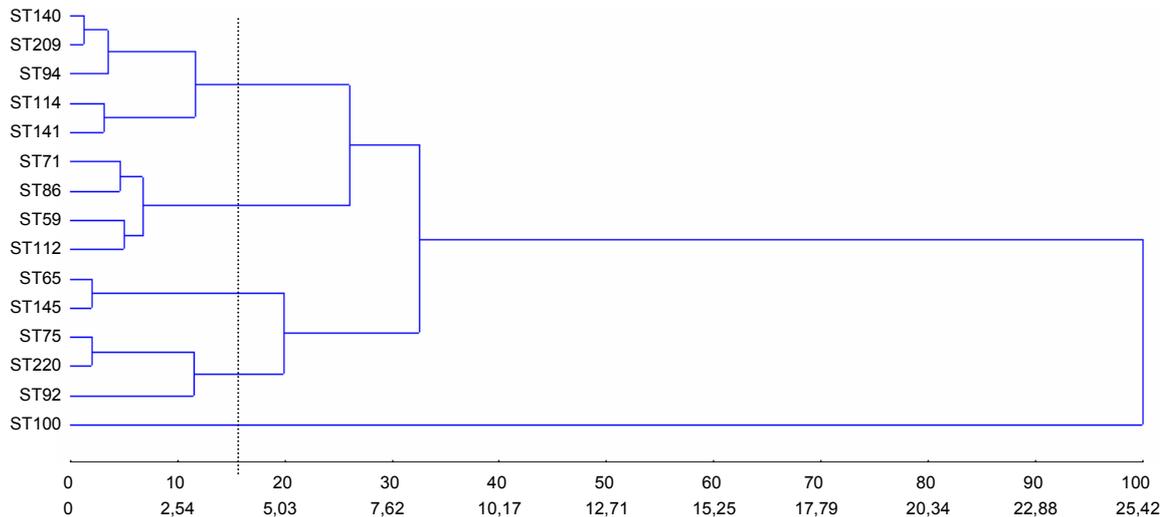


Figura 6 - Dendrograma representativo do agrupamento dos 15 clones de estévia avaliados Cambira, PR nos anos agrícolas de 2006, 2007 e 2008, pelo método de UPGMA, com base na dissimilaridade estimada a partir das características produção de massa fresca, produção de massa seca e número de hastes por planta.

O grupo I, por sua vez, evidenciou a formação de ramificações bem definidas no dendrograma, podendo, ser particionado em quatro subgrupos. Pode-se observar na Figura 6 que o primeiro subgrupo foi constituído pelos clones ST140, ST209, ST94, ST114 e ST141; o segundo formado pelos clones ST71, ST86, ST59 e ST112; o terceiro envolveu os clones ST65 e ST145; enquanto que ST75, ST220 e ST92 foram alocados no quarto subgrupo (Figura 6).

Baseado nos resultados do agrupamento de UPGMA (Figura 6) e nas médias fenotípicas das características MF (Quadro 5), MS (Quadro 6) e NH (Quadro 7), pode-se inferir que a hibridação entre clones do subgrupo II (ST71, ST86, ST59 e ST112) com os clones do subgrupo III (ST 65 e ST145) tende a propiciar maior variabilidade genética nas populações descendentes. Isso aumenta as chances de êxito do processo de seleção e, conseqüentemente, do melhoramento genético da estévia. Nesse contexto, maior ênfase pode ser dada às hibridações que envolveram o clone ST145, uma vez que ele apresentou

elevada relação rebaudiosídeo A/esteviosídeo e valores medianos de concentração de edulcorantes totais.

No que concerne à concentração de edulcorantes totais (ET), o método hierárquico de UPGMA proporcionou a distribuição dos 15 clones de estévia em três grupos muito bem definidos, o grupo 1 foi o mais expressivo. Neste primeiro grupo, foram alocados oito clones (Figura 7), os quais se caracterizaram pelas médias mais reduzidas dessa característica (Quadro 8).

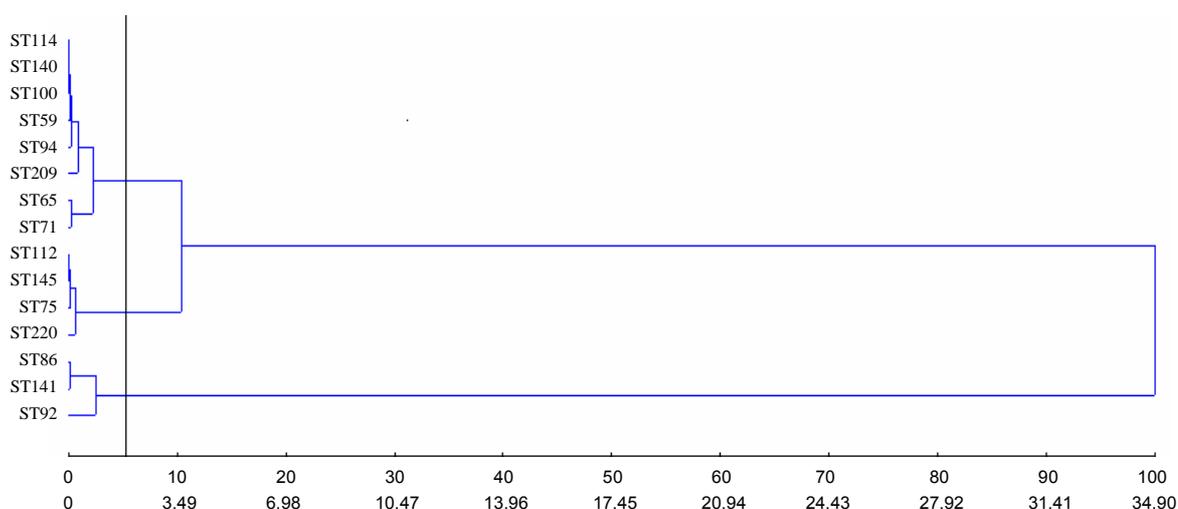


Figura 7 - Dendrograma representativo do agrupamento dos 15 clones de estévia, avaliados na região de Cambira – PR nos anos agrícolas de 2006 a 2008, pelo método de UPGMA, com base na dissimilaridade estimada a partir da característica concentração de edulcorantes totais (ET).

Conforme os resultados obtidos, pode-se recomendar a hibridação entre os clones do grupo III (ST86, ST92 e ST141) com clones alocados nos grupos I e II, visto que os ST86, ST92 e ST141 foram os mais divergentes em relação ao restante do conjunto genotípico de estévia avaliado (Figura 7), além de terem apresentado as maiores médias de edulcorantes totais (Quadro 8).

De acordo com Alvarez (1984), Brandle (1999) e Cabrera et al. (2001), a concentração de edulcorantes totais é a principal característica de interesse comercial na cultura da estévia, podendo atingir 30 mil kg para cada 500 t de folhas desidratadas. Dessa maneira, a utilização de folhas de clones com alto conteúdo de edulcorantes totais pelas indústrias, eleva o rendimento na extração da matéria-prima e minimizaria os custos, tornando o produto acessível ao

consumidor ávido por um produto natural de baixa caloria e a preço mais acessível.

Na Figura 8, encontra-se apresentado o dendrograma ilustrativo do agrupamento dos 15 clones de estévia pela dissimilaridade genética, estimada a partir das médias da relação rebaudiosídeo **A**/esteviosídeo (R/E). O método hierárquico de UPGMA permitiu classificar os clones em três grupos distintos, de forma que o grupo I conteve o maior número de clones, formado por nove dos 15 clones de estévia avaliados, o que perfaz 60% do conjunto genotípico. Este grupo foi constituído por clones de baixas estimativas de R/E, o qual apresenta menor interesse por parte da indústria de produção de adoçantes. Isto é explicado pelo fato de que o edulcorante presente nas suas folhas apresenta maior concentração de esteviosídeo em relação ao rebaudiosídeo **A**.

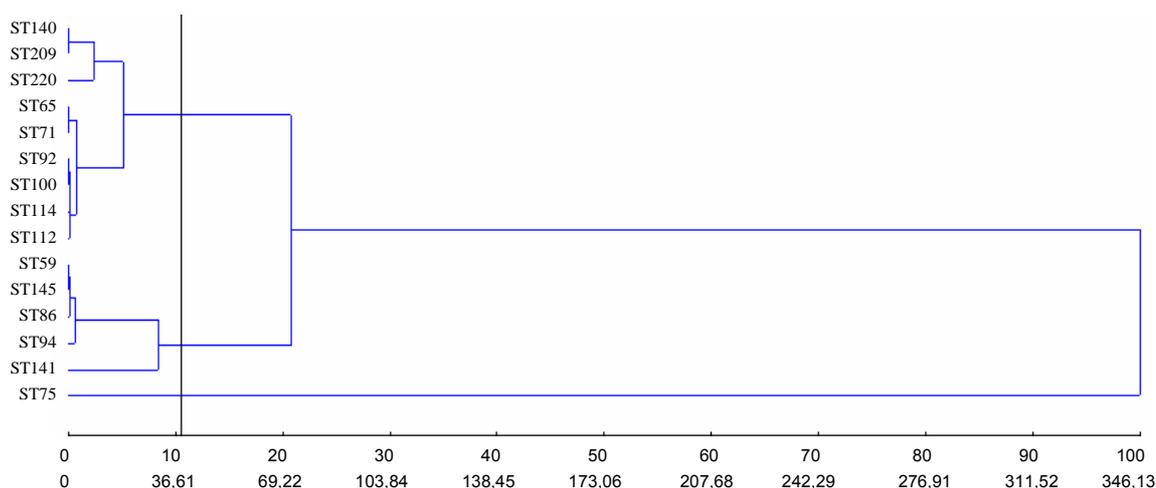


Figura 8 - Dendrograma representativo do agrupamento dos 15 clones de estévia, avaliados na região de Cambira – PR nos anos agrícolas de 2006, 2007 e 2008, pelo método de UPGMA, com base na dissimilaridade estimada a partir da característica relação rebaudiosídeo **A**/esteviosídeo (R/E).

O Quadro 9 apresenta os dados referentes ao grupo II, o qual foi constituído por cinco clones (ST59, ST86, ST94, ST141 e ST145), os quais revelaram elevada relação rebaudiosídeo **A**/esteviosídeo ($R/E \geq 1,0$). Por sua vez, o grupo I foi formado apenas pelo clone ST75, o qual se demonstrou significativamente superior ($P \leq 0,05$) aos demais clones de estévia avaliados.

Dessa forma, a hibridação do clone ST75 com os clones do grupo II tende a propiciar a geração de populações segregantes de elevado potencial para seleção de indivíduos superiores em termos de R/E. Tendo em vista que, ambos

apresentaram elevada divergência genética entre si (Figura 8), além de terem expressado médias satisfatórias (Quadro 9) para esta característica ($R/E \geq 1,0$).

4.5. Considerações finais

De forma geral, os clones ST75, ST86, ST141 e ST145 podem ser caracterizados como os clones mais promissores dentre todos os outros pertencentes ao conjunto genotípico de estévia avaliado. Os referidos clones apresentaram elevada relação rebaudiosídeo **A**/esteviosídeo, concentração de edulcorantes totais e produção de massa seca que variaram de níveis médios a altos, além de terem sido caracterizados como de estatura elevada. Todas essas características contribuem para a elevação da produção e do rendimento na extração de edulcorantes, em especial o rebaudiosídeo **A**.

Além das peculiaridades agronômicas e da composição química apontadas acima, vale lembrar que esses clones também evidenciaram elevada divergência genética para ambas as características estudadas, principalmente no que diz respeito à relação rebaudiosídeo **A**/esteviosídeo, concentração de edulcorantes totais e produção de massa seca, características estas que são consideradas chave na cultura da estévia. Para tanto, o intercruzamento destes clones (ST75, ST86, ST141 e ST145) tende a agregar alelos favoráveis em seus descendentes e, com isso, propiciar a geração de populações segregantes de elevado potencial genético para seleção de indivíduos superiores. Além disso, a estévia pode ser efetivamente propagada vegetativamente, embora tal prática demande maior volume de mão-de-obra, e a superioridade dos indivíduos selecionados a partir destas populações possa ser mantida e explorada por diversas gerações.

Por sua vez, os clones ST75 e ST141, em especial, destacaram-se para as características de maior interesse na cultura da estévia avaliadas no presente estudo, quais seja a concentração de edulcorantes totais, a relação rebaudiosídeo **A**/esteviosídeo e a produção de massa seca. A superioridade fenotípica verificada para ambos os clones sugere que eles apresentam maior concentração de alelos favoráveis envolvidos na expressão dessas características. Dessa forma, mesmo que os clones ST75 e ST141 tenham apresentado valores medianos de divergência genética em algumas dessas características, o que tende a propiciar

a geração de variabilidade genética média quando hibridados, é sugerida a hibridação entre eles. Esta indicação se deve ao fato de que se esses clones apresentem maior concentração de alelos favoráveis envolvidos na expressão dessas características fenotípicas. As suas gerações descendentes provavelmente apresentarão indivíduos de potencial genético superior aos seus parentais, cuja superioridade pode ser mantida pela propagação vegetativa em gerações futuras.

Outra ressalva a ser feita é a grande semelhança observada entre os clones ST140 e ST 209 para todas as características avaliadas, o que sugere que esses dois clones apresentam um elevado grau de parentesco. Possivelmente, a origem e a genealogia de ambos devem ser bastante semelhantes. No entanto, para se fazer tal inferência com relativa certeza, mais estudos citogenéticos e moleculares são necessários.

A lavoura onde foi realizada a seleção inicial de plantas foi originada de sementes vindas do Paraguai, colhidas em plantas produtivas. Como os clones apresentam alto grau de heterozigose, os clones selecionados neste trabalho, quando em cruzamento, as progênies deverão apresentar alta segregação. Em outras palavras, poderão ser obtidos novos ganhos genéticos significativos.

5. CONCLUSÕES

- Os clones ST75, ST86, ST141 e ST145 foram caracterizados como os clones mais promissores para a relação rebaudiosídeo **A**/esteviosídeo, concentração de edulcorantes totais e produção de massa seca.
- A altura de plantas e a relação rebaudiosídeo **A**/esteviosídeo foram positivamente correlacionadas, cuja associação se deveu à seleção prévia efetuada no germoplasma de estévia.
- As características número de hastes por planta, produção de massa fresca e produção de massa seca apresentaram correlação significativa ($P \leq 0,01$) entre si.
- O número de hastes por planta pode ser usado na seleção antecipada para produção de massa fresca e de massa seca.
- Ampla variabilidade genética foi observada entre os 15 clones de estévia para todas as características avaliadas.
- As características que mais contribuíram para a explicação da divergência genética foram a relação rebaudiosídeo **A**/esteviosídeo (79%) e a concentração de edulcorantes totais (12%).
- Os clones ST75, ST86, ST141 e ST 145 foram os que apresentaram maior divergência genética média em relação a todo o conjunto genotípico avaliado.
- Hibridações entre os clones ST75, ST86, ST141 e ST 145 tendem a propiciar a geração de populações segregantes de elevado potencial genético para seleção de indivíduos superiores.
- As combinações entre os clones ST75 e ST141 propiciam gerar descendentes que apresentem características de maior interesse na cultura de estévia, sejam elas: concentração de edulcorantes totais, relação rebaudiosídeo **A**/esteviosídeo e produção de massa seca.
- Os clones ST140 e ST209 para todas as características avaliadas, apresentaram grande semelhança, o que sugere que estes dois clones apresentam um elevado grau de parentesco.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKITA, M.; SHIGEOKA, T.; KOIZUMI, Y.; KAWAMURA, M. Mass propagation of shoots of *Stevia rebaudiana* using a large scale bioreactor. **Plant Cell Reports**, 13:180-183, 1994.

ALVAREZ, M. **Stevia rebaudiana (Bert.) Bertoni: estado atual do conhecimento**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, referente a relatório de pesquisa, 1984. 118p. (Relatório de Pesquisa).

ALVES, L.M.; RUDDAT, M. The presence of gibberellin A₂₀ in *Stevia rebaudiana* and its significance for the biological activity of steviol. **Plant and Cell Physiology**, 20: 123-130, 1979.

ANAMI, E.T. **Cultura de tecidos de Stevia rebaudiana (Bert.) Bertoni, com elevada concentração de rebaudiosídeo A em relação ao steviosídeo**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2001. 115p. Dissertação (Mestrado em Agronomia).

AMORIN, E.P.; RAMOS, N.P.; UNGARO, M.R.G.; KIIHL, T.A.M. Divergência genética em clones de girassol. **Ciênc. Agrotec.**, 31:1637-1644, 2007.

BENTO, C.S.; SUDRE, C.P.; RODRIGUES, R.; RIVA, E.M.; PEREIRA, M.G. Descritores qualitativos e multicategóricos na estimativa da variabilidade fenotípica entre acessos de pimentas. **Scientia Agrária**, 8:149-156, 2007.

BERTAN, I.; VIEIRA, E.A.; CARVALHO, F.I.F.; COSTA DE OLIVEIRA, HARTWIG, I.; SCHMIDT, D.A.M.; VIEIRA, E.A.; SILVA, J.A.G.; VALEIRO, I.P.; BUSATO, C.C.; RIBEIRO, G. Comparação de métodos de agrupamento na representação da distância morfológica entre clones de trigo. **Rev. Bras. Agrosciência**, 12:279-286, 2006.

BERTAN, I.; VIEIRA, E.A.; CARVALHO, F.I.F.; COSTA DE OLIVEIRA, A.; SCHEEREN, P.L.; OLIVO, F. Variabilidade genética em trigo aferida por meio da distância genealógica e morfológica. **Scientia Agrária**, 8:67-74, 2007.

- BRANDLE, J.E. Genetic control of rebaudioside A and C concentration in leaves of the sweet herb, *Stevia rebaudiana*. **Canadian Journal of Plant Science**, 79: 85-92, 1999.
- 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**, 72:1263-1266, 1992.
- BRANDLE, J.E.; STARRATT, A.N.; GIJZEN, M. *Stevia rebaudiana*: its agricultural, biological, and chemical properties. **Canadian Journal of Plant Science**, 78:527-536, 1998.
- CABRERA A., G.; JIMENEZ V., T.; ALVAREZ, E.; GOMEZ, F. Evaluación del contenido de esteviósido y rebaudiósido "A" en una población de Ka a Hee e *Stevia rebaudiana* Bertoni. **Revista del Instituto Agronómico Nacional Caacupé**, 1:2-5, 2001.
- CARNEIRO, J.W.P.; MUNIZ, A.S.; GUEDES, T.A. Greenhouse bedding plant production of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. **Canadian Journal of Plant Science**, 77:473-474, 1997.
- CARVALHO, M.A.M.; ZAIDAN, L.B.P. Obtenção de plantas de *Stevia rebaudiana* através de estacas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 30:201-206, 1995.
- CASACCIA, J.; ALVAREZ, E. **Recomendaciones técnicas para una producción sustentable del ka'a he'e (*Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni) en el Paraguay**. Caacupe Ministerio de Agricultura y Ganadería, Dirección de Investigación Instituto Agronómico Nacional Agrícola, 2006. 51 p. (Manual técnico; n° 8).
- CHALAPATHI, M. V., B. SHIVARAJ. Nutrient uptake and yield of *Stevia* (*Stevia rebaudiana* Bertoni) as influenced by methods of planting and fertilizer levels. **Crop Research Hisar** 14(2): 205-208, 1997.
- CHALAPATHI, M. V., S. THIMMEGOWDA. Influence of fertilizer levels on growth, yield and nutrient uptake of ratoon crop of *Stevia* (*Stevia rebaudiana*). **Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences**, 21:947-949, 1999.
- CHANG, K. F.; R. J. HOWARD. First report of *Stevia* as a host of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease**, 81:311, 1997.

- CRUZ, C.D. **Programa GENES**: versão Windows: aplicativo computacional em Genética e Estatística. Viçosa: UFV, 2001. 648p.
- CRUZ, C.D.; CARNEIRO, P.C.S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa:UFV, v.2 2003. 585p.
- FALCONER, D.S. **Introdução à genética quantitativa**. Trad. SILVA, M.A. e SILVA, J.C. Viçosa-UFV, Imprensa Universitária, 1987. 279p.
- FAO. **Faostat database gateway**. Monografia 4 (2007) discutido no 67th JECFA. Disponível em: <http://www.fao.org/ag/agn/jecfa-aditives/specs/monograph4>. Acesso em 10 junho, 2008.
- FREDERICO, A.P. **Estudo citogenético em plantas do gênero Stevia. (Asteraceae)**. Londrina: Universidade Estadual de Londrina, 1994. 109p. Dissertação (Mestrado Genética).
- GEUNS, J.M.C., BUYSE, J.G., VANKEIRSBILCK, A., TEMME, E.H.T. Stevioside metabolism by human volunteers. **Exp. Biol. Med.**, 232:164-173, 2007.
- GOTO, A.; CLEMENTE, E. Influência do rebaudiosídeo **A** na solubilidade e no sabor do esteviosídeo. **Cienc. Tecnol. Aliment**, 18:34-36, 1998.
- KIM, K. K.; H. SHIBATA. Characterization of ent-kaurenoic acid 13-hydroxylase in steviol biosynthesis of *Stevia rebaudiana* Bertoni. **Agricultural Chemistry and Biotechnology**, 40:501-507, 1997.
- KINGHORN, A. D.; N. C. KIM. Discovery of highly sweet substances from plants. **Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, 33:63-75, 1997.
- KVITSCHAL, M.V. **Caracterização e divergência genética de germoplasma de mandioca-de-mesa da região urbana de Maringá, Paraná**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2008. 140p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento).
- LEWIS, W.H. Early uses of *Stevia rebaudiana* (Asteraceae) leave as a sweetener in Paraguay. **Econ. Bot.**, 46:336-337, 1992.

- LIMA FILHO, O.F.; MALAVOLTA, E. Nutritional interactions in stevia (*Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni). **Arquivos de Biologia e Tecnologia Curitiba**, 40: 351-357, 1997.
- LIMA FILHO, O.F.; VALOIS, A.C.C.; LUCAS, Z.M. **Estévia**. Dourados. Embrapa Agropecuária Oeste, 2004, 55p. (Sistema de Produção 5).
- LIMA FILHO, O.F.; MALAVOLTA, E.; YABICO, H.Y. Influence of nutritional stress on content and production of stevioside during *Stevia rebaudiana* development. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 32:489-494, 1997.
- MIDMORE, D.J.; RANK, A.H. **A new rural industry – Stevia – to replace imported chemical sweeteners**. Rural Industries Research and Development Corporation:Kingston, 2002. 50p.
- NEPOVIM, A.; T. VANEK. In vitro propagation of *Stevia rebaudiana* plants using multiple shoot culture. **Planta Medica**, 64:775-776, 1998.
- NEPOVIM, A.; DRAHOSOVA, H.; VALICEK, P.; VANEK, T. The effect of cultivation conditions on the content of stevioside in *Stevia rebaudiana* Bertoni plants cultivated in the Czech Republic. **Pharmaceutical and Pharmacological Letters**, 8:19-21, 1998.
- RAMALHO, M.A.P.; FERREIRA, D.F.; OLIVEIRA, A.C. **Experimentação em genética e melhoramento de plantas**. Lavras: UFLA, 2000. 326p.
- RAMALHO, M.A.P.; SANTOS, J.B.; PINTO, C.B.P. **Genética na agropecuária**, 3 ed. Lavras: Revista Editora UFLA, 2004. 472p.
- REELEDER, R. Septoria leaf spot of *Stevia rebaudiana* in Canada and methods for screening for resistance. **Journal of Phytopathology**, 147:605-613, 1999.
- RICHMAN, A. S.; M. GIJZEN. Diterpene synthesis in *Stevia rebaudiana*: Recruitment and up-regulation of key enzymes from the gibberellin biosynthetic pathway. **Plant Journal**, 19:411-421, 1999.
- ROSSE, L.N.; FERNANDES, J.S.C. Escolha de caracteres para melhoramento genético em erva mate por meio de técnicas multivariadas. **Ciência Florestal**, 12:21-27, 2002.

SAGRILO, Edvaldo ; VIDIGAL FILHO, P. S. ; PEQUENO, M. G. ; Gonçalves-Vidigal, M.C. ; KVITSCHAL, Marcus Vinicius . Dry matter production and distribution in three cassava (*Manihot esculenta* Crantz) cultivars during the second cycle in Paraná state. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 51: 10-18, 2008.

SILVA, G.O.; PEREIRA, A.S.; SOUZA, V.Q.; CARVALHO, F.I.F.; OLIVEIRA, A.C.; BERTAN, I.; NETO, R.F. Importância de caracteres na dissimilaridade de progênes de batata em gerações iniciais de seleção. **Bragantia**, 67:112-119, 2008.

SINGH, D. 1981. The relative importance of characters affecting genetic divergence. **The Indian Journal of Genetic e Plant Breeding**, 41: 237-245, 1981.

SCOTT, A.J.; KNOTT, M. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, 30:507-512, 1974.

TAMURA, Y.; NAKAMURA, S.; FUKUI, H.; TABATA, M. Clonal propagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni by stem-tip culture. **Plant Cell Reports**, 3:183-185, 1984a.

TAMURA, Y.; NAKAMURA, S.; FUKUI, H.; TABATA, M. Comparison of *Stevia* plants grown from seeds, cuttings and stem-tip cultures for growth and sweet diterpene glucosides. **Plant Cell Reports**, 3:180-182, 1984b.

TATEO, F.; SANCHEZ, M.L.E.; BONONI, M; LUBIAN, E. Stevioside content of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni grown in east Paraguai. **Italian Journal of Food Science**, 11:265-269, 1999.

TATEO, F.; MARIOTTI, M.; BONONI, M.; LUBIAN, E.; MARTELLO, S.; CORNARA, L. Stevioside content and morphological viability in population of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni from Paraguai. **Italian Journal of Food Science**, 10: 61-267, 1998.

UEDA, M. ; BERSANI-AMADO, C. A. ; WEFFORT, R. M. M. ; ZUBIOLI, A. ; BERSANI-AMADO, C. A. ; BAZOTTE, R. B. ; GAETI, W. P. ; ALVAREZ, M. . Efeito do extrato aquoso da *Stevia Rebaudiana* Bertoni sobre o teste de tolerância à glicose. **Revista Unimar**, 5:111-115, 1983.

VASCONCELOS, E.S.; CRUZ, C.D.; BHERING, L.L.; RESENDE JUNIOR, R.R. Método alternativo para análise de agrupamento. **Pesq. Agropec. Bras**, 42:1421-1428, 2007.

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

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)