

CARLOS ALEXANDRE MAROCHIO

**POLIMORFISMO DE α E β - ESTERASES EM VARIEDADES DE *STEVIA*
REBAUDIANA BERT. BERTONI**

**MARINGÁ
PARANÁ - BRASIL
FEVEREIRO - 2010**

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

CARLOS ALEXANDRE MAROCHIO

**POLIMORFISMO DE α E β - ESTERASES EM VARIEDADES DE *STEVIA*
REBAUDIANA BERT. BERTONI**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal, para obtenção do título de Mestre.

**MARINGÁ
PARANÁ – BRASIL
FEVEREIRO - 2010**

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

M354p Marochio, Carlos Alexandre, 1986-
Polimorfismo de α e β - esterases em variedades de
Stevia Rebaudiana Bert. Bertoni / Carlos Alexandre
Marochio. -- Maringá, 2010.
53 f. : figs. col., tabs.

Orientadora : Prof^a. Dr^a. Maria de Fátima Pires da
Silva Machado.
Co-Orientadora : Prof^a. Dr^a. Claudete Aparecida
Mangolin.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Maringá, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2010.

1. Stevia Rebaudiana (Bert.) Bertoni - Análise de
isozimas α e β - esterases. 2. Esteviosídeo. 3.
Edulcorantes - Stevia Rebaudiana (Bert.) Bertoni. 4.
Isozimas - Stevia Rebaudiana (Bert.) Bertoni. 5.
Stevia Rebaudiana (Bert.) Bertoni - Loc. I. Machado,
Maria de Fátima Pires da Silva, orient. II. Mangolin,
Claudete Aparecida, co-orient. III. Universidade
Estadual de Maringá, Programa de Pós-Graduação em
Agronomia. IV. Título.

CDD 21.ed. 631.5233

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus pelo dom da vida e sabedoria, pois nas mãos Dele encontro a força, que me puxa para cima, nesta caminhada profissional.

Aos meus pais Edvaldo Marochio e Elza Navarenski Marochio pela dedicação e auxílio na trajetória de minha vida. Que, sem os quais, eu jamais conseguiria este título, pois, seus esforços imensuráveis me promoveram esta conquista.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Maria de Fátima Pires da Silva Machado pela atenção, carisma e amparo, durante a realização deste trabalho.

À minha co-orientadora Prof^a. Dr^a. Claudete Aparecida Mangolin, por ter me ajudado, ao longo desta jornada, nos momentos de dúvidas e, sobretudo, por sua atenção e carinho.

À minha irmã Josiani e seu marido Diogo pela força incentivadora, que muito me serviu de sustentáculo para a conquista desta vitória.

Ao meu primo Marcos Euclides Alves e sua esposa Fabiana Fioravante Alves pelo acolhimento e auxílio, ao abrir a porta de sua casa, com calorosa receptividade.

Aos meus amigos Rafael e Luciano pelos agradáveis momentos vividos, neste processo de aprendizagem; reforçado pela sincera amizade e compreensão, que perdurou por todo o período de convivência, neste trilhado caminho.

Aos professores do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Paranaense – Unipar, Câmpus de Toledo - PR.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Maringá – UEM.

Ao CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela bolsa de estudo.

E, por fim, aos meus amigos, que fortaleceram o laço de igualdade, num ambiente fraterno, respeitável e inesquecível.

BIOGRAFIA

CARLOS ALEXANDRE MAROCHIO - nascido em 11 de julho de 1986, na cidade de Assis Chateaubriand - Paraná.

Em 2007, graduou-se em Ciências Biológicas, com Ênfase em Biotecnologia pela Universidade Paranaense (UNIPAR) - Campus, na cidade de Toledo – Paraná.

Iniciou, em março de 2008, a sua Pós-Graduação, em nível de Mestrado em Agronomia, na área de Concentração em Produção Vegetal, na Universidade Estadual de Maringá (UEM), na cidade de Maringá - Paraná.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	vii
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. Histórico.....	4
2.1.1. Aspecto do Material Botânico.....	6
2.1.2. O cultivo de <i>Stevia rebaudiana</i>	8
2.1.3. Avaliação de germoplasma para seleção.....	10
2.2 Adoçantes e Edulcorantes.....	11
2.2.1 Edulcorantes sintéticos.....	12
2.2.2 Edulcorantes naturais.....	13
2.3 Esteviosídeo.....	14
2.4 Marcadores enzimáticos.....	16
2.4.1 Controle genético de isoenzimas em plantas.....	17
2.4.2 Interpretação dos fenótipos eletroforéticos de proteínas e de isoenzimas.....	18
2.4.3 Vantagens e desvantagens dos marcadores isoenzimáticos	19
3. MATERIAS E MÉTODOS.....	21
3.1. Cultivares de <i>Stevia rebaudiana</i>	21
3.2 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (Sistema PAGE: <i>Polyacrilamide Gel Electrophoresis</i>).....	22
3.3. Análise do polimorfismo das isozimas α - e β -esterases	23
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
5. CONCLUSÕES.....	33
6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	34

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Isoesterases avaliadas em gel de poliacrilamida para folhas de 17 plantas de *Stevia rebaudiana*, coletadas na população P3.....23
- Figura 2.** Isoesterases avaliadas em gel de poliacrilamida para folhas de 20 plantas de *Stevia rebaudiana*, coletadas na população P3.....24
- Figura 3.** Isoesterases avaliadas em gel de poliacrilamida para folhas de *Stevia rebaudiana*, coletadas na população P2.....28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição dos alelos, nos <i>loci Est-2</i> e <i>Est-5</i> das 4 populações (P1, P2, P3, P4) de <i>Stevia rebaudiana</i>	26
Tabela 2. Valores dos qui-quadrados e dos índices de fixação (<i>F</i>) de Wright (1975), que informam o déficit ou excesso de heterozigotos nos 2 <i>loci Est-2</i> e <i>Est-5</i> das plantas de <i>Stevia rebaudiana</i>	27
Tabela 3. Número de plantas analisadas (N), número de alelos por <i>locus</i> polimórfico (<i>N_a</i>), número efetivo de alelos (<i>N_e</i>), heterozigosidade média observada (<i>H_o</i>) e esperada (<i>H_e</i>) nas 4 populações (P1, P2, P3, e P4) de <i>Stevia rebaudiana</i>	27
Tabela 4. Parâmetros de diversidade genética para as plantas das 4 populações de <i>Stevia rebaudiana</i>	29
Tabela 5. Coeficiente de similaridade e distância genética de Nei (1978), entre as quatro populações de <i>Stevia rebaudiana</i> . Os coeficientes foram calculados a partir de dois <i>loci</i> (<i>Est-2</i> e <i>Est-5</i>), analisados para isoesterases.....	31

RESUMO

MAROCHIO, Carlos Alexandre – Universidade Estadual de Maringá - UEM, fevereiro de 2010. **Polimorfismo de α e β - Esterases em Variedades de *Stevia Rebaudiana* Bert. Bertoni.** Prof.^a Orientadora: Dr^a. Maria de Fátima Pires da Silva Machado; Prof.^a Conselheira: Dr^a. Claudete Aparecida Mangolin.

A *Stévia rebaudiana* (Bert.) Bertoni é um arbusto dicotiledôneo pertencente à família Compositae, que ocorre espontaneamente na região da Serra do Amambá entre o Brasil e o Paraguai. Esta espécie possui em suas folhas edulcorantes doces, com destaque para o esteviosídeo e o rebaudiosídeo-A, cujo poder adoçante é 300 vezes superior ao da sacarose, tendo o produto o destaque pela ausência de calorias, sendo muito utilizado em dietas especiais. A produção de mudas de estévia é feita via semente, ou estaquia e a seleção de material botânico para ser utilizado, para a formação de campos mais produtivos, é realizada com base em caracteres morfo-anatômicos. Entretanto, a variação genética das plantas, analisadas em nível molecular, têm sido ainda um tema pouco explorado. A identificação de *loci* e/ou alelos, ligados a importantes aspectos agronômicos, parece ser uma perspectiva de novas oportunidades para subsidiar os processos de seleção. O presente estudo tem por objetivo estabelecer as condições adequadas, para a análise de isozimas α e β – esterases, em folhas de estévia, para estimar a diversidade em diferentes populações de plantas crioulas e cultivadas na região de Maringá-PR. E o material utilizado, é proveniente de quatro populações plantadas, em diferentes regiões próximas. Sendo que, os cultivos destas espécies de plantas - estévia são, geralmente, realizados por pequenos proprietários rurais, em pequenas áreas para este cultivo, medindo apenas 1 (hum) ha. Para extração das isozimas esterases, foram utilizadas folhas em estágio inicial de desenvolvimento. Foram coletadas cerca de 30 amostras da população P1, 100 amostras da população P2, 204 da população P3 e 94 amostras da população P4, analisadas em gel de poliácridamida. Após a revelação das regiões de atividade para as isozimas α e β -esterases, foram estimadas as frequências dos alelos e os parâmetros de diversidade genética, proporção de *loci* polimórficos, um número médio de alelos por *locus* e por *locus* polimórfico, a heterozigosidade observada e a esperada. A análise de

isoenzimas esterases, com os substratos α -naftil acetato e β -naftil, acetato em amostras de folhas das quatro populações de *Stevia rebaudiana* estudadas, indicaram a ocorrência de várias isozimas esterases, codificadas por pelo menos oito *loci*. A análise do polimorfismo de α e β -esterases, em folhas de estévia, mostrou que a pressão de seleção adotada em populações cultivadas, para fins comerciais, não tem reduzido a diversidade genética na espécie, considerando o nível alto de heterozigosidade observada nestas populações.

Palavras chaves: Esteviosídeo, edulcorantes, isozimas, *loci*.

ABSTRACT

MAROCHIO, Carlos Alexandre, State University of Maringá, Maringá - Paraná/BRAZIL, February, 2010. **Polymorphism of α and β - Esterases in Variety of *Stevia rebaudiana* Bert. Bertoni.** Prof. ^a Advisor: Dr. Maria de Fátima Pires da Silva Machado; Prof. ^a Advisor: Dr. Claudete Aparecida Mangolin.

The (*Stevia rebaudiana* Bertoni) is a dicot shrub belonging to the family Compositae, which occurs spontaneously in the region of Serra do Amambá between Brazil and Paraguay. This species has on its leaves sweeteners sweets especially the stevioside and rebaudioside-A, whose sweetness is 300 times that of sucrose, and the product is highlighted by the lack of calories and is much used in special diets. The seedling production of stevia is via seed or cuttings and the selection of plant material to be used for the training of most productive fields, is performed based on morphological and anatomical characters, however the genetic variation of plants analyzed at the molecular level has been still a relatively unexplored subject. The identification of loci and / or alleles linked to important agronomic features, it seems to be a prospect of new opportunities to support the processes of selection. The purpose of this study is to establish appropriate conditions for the analysis of isozymes α and β - esterases in stevia leaves to estimate the diversity among different plants populations and landraces cultivated in the region of Maringá-PR/Brazil. The material used came from four populations grown in different regions near, and the cultivation of these plants of stevia are usually carried out by small landowners and the area devoted to cultivation is around 1 ha. To extract the esterase isozymes leaves were at an early stage of development. We collected about 30 samples of the population P1, 100 population samples P2, P3, 204 population 94 population samples P4, were analyzed in polyacrylamide gel. After developing the areas of activity for the isozymes α and β -esterases were estimated allele frequencies and parameters of genetic diversity, proportion of polymorphic loci, the average number of alleles per locus and polymorphic loci, observed heterozygosity and expected. The analysis of esterase isozymes with the substrates α -naphthyl acetate and β -naphthyl acetate in leaf samples of four populations of *Stevia rebaudiana* studied showed the occurrence of several

esterase isozymes, encoded by at least eight loci. Polymorphism analysis of α and β -esterases in stevia leaves showed that the selection pressure adopted in populations grown for commercial purposes has reduced genetic diversity in the species, considering the high level of observed heterozygosity in these populations.

Key words: Stevioside, sweeteners, isozymes, loci.

1. INTRODUÇÃO

A *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni é um arbusto dicotiledôneo pertencente à família Compositae, trata-se de uma planta alógama, semi-perene que ocorre espontaneamente na região da Serra do Amambá, entre o Brasil e o Paraguai (FILHO et. al 2004). *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni possui em suas folhas edulcorantes doces, com destaque para o esteviosídeo e o rebaudiosídeo-A (LIMA FILHO; MALAVOLTA, 1997).

A cultura de estévia teve um incremento de cultivo em diversos países, graças ao esteviosídeo, extraído de suas folhas, cujo poder adoçante é 300 vezes superior ao da sacarose. O produto tem o destaque pela ausência de calorias, sendo muito utilizado em dietas especiais, como pessoas portadoras de diabetes, obesidade, etc.

As plantas de estévia são muitas vezes cultivadas, em pequenas áreas agrícolas, sendo de alta lucratividade, por unidade de área. O uso dos compostos presentes nas folhas desta planta, tem aumentado, consideravelmente, com o avanço das técnicas de extração e preparação dos produtos, sendo que o Brasil possui indústrias com fornecimento de grande quantidade de edulcorantes, no mercado nacional e internacional; e a China no mercado internacional, como uma grande produtora. Dentro das várias aplicações dos adoçantes de *S. rebaudiana*, está o preparo de alimentos dietéticos ou semi-dietéticos e na indústria alimentícia em geral, para o preparo de sucos, refrigerantes, massas, doces e muitos outros tipos de produtos (STEVIAFARMA INDUSTRIAL S/A, 1993).

A produção de mudas de *S. rebaudiana* é realizada via semente e/ou estaquia (EMBRAPA, 2004), e a seleção de material botânico para ser utilizado, para a formação de campos mais produtivos, em geral é realizada, com base em caracteres morfo-anatômicos, como tamanho de folhas, robustez da planta e rápido crescimento.

O trabalho de revisão de Panpatil e Polasa (2008), mostra que a composição do extrato das plantas de estévia, tem sido amplamente investigada, e alguns autores descreveram que as diferenças morfológicas entre plantas são evidentes nas culturas, e dependentes de processos biológicos naturais da espécie e dos métodos de propagação (TATEO et al.,

1998). A variabilidade morfológica e de composição química, quanto aos teores de esteviosídeos e rebaudiosídeo em *S. rebaudiana*, têm sido caracterizados (ANAMI, 2008).

A seleção de plantas de estévia, com maiores concentrações de glicosídeos totais, tem sido feita por cromatografia líquida, numa fase tardia do cultivo, e usando um procedimento que requer um alto investimento de tempo e capital (BRANDLE; ROSA, 1992). Por isso, a seleção de plantas que produzam altas quantidades de glicosídeo é dispendiosa, consome reagentes de custo elevado, mão-de-obra especializada (RANK; MODMORE, 2006), e é relativamente lenta, pois é utilizada uma planta por análise.

Além disso, as características morfológicas das plantas, inclusive a produção de edulcorantes totais e a relação rebaudiosídeo A/esteveosídeo, em clones de estévia, são altamente influenciadas por variações das condições ambientais (ANAMI, 2008).

Por outro lado, a variação genética das plantas analisadas, em nível molecular tem sido ainda, um tema pouco explorado. Na literatura especializada, tem sido encontrado apenas um trabalho, onde a utilização de marcadores de RAPD (*Random Amplified Polymorphism DNA*), para a construção de mapas de ligação em *S. rebaudiana*, indicou que a frequência de segmentos de DNA polimórficos foi alta (YAO et al., 1999).

Neste sentido, a identificação de *loci* e/ou alelos ligados a importantes aspectos agronômicos, parece ser uma perspectiva de novas oportunidades, para subsidiar os processos de seleção. A análise dos *loci*, que codificam para as α e β -esterases, deve possibilitar uma estimativa da proporção de *loci* polimórficos, dos valores de heterozigosidade médias observadas e esperadas para cada *locus* analisado, e estimar a divergência genética entre as populações, devido à frequência divergente dos alelos, e o fluxo gênico entre as populações investigadas.

Tais estimativas, são importantes para ampliar a base de informações sobre a variabilidade genética, contida dentro de cada variedade crioula, ou de plantas de alguma forma selecionadas, no sentido de monitorar e orientar os processos de seleção de genótipos, geneticamente uniformes de interesse comercial, e de direcionar cruzamentos de genótipos divergentes, em programas de melhoramento genético. É possível que a pressão de seleção,

adotada para o cultivo de plantas, com maiores teores de glicosídeos, determine uma redução na diversidade genética da espécie. Além disso, a análise de isozimas α e β -esterases, em tecidos de folhas de estévia, deve disponibilizar marcadores (alelos e/ou fenótipos de esterases), que poderão ser usados futuramente, para verificar a ligação destes, com aspectos agronômicos de interesse, no sentido de orientar a seleção de exemplares, dispensando assim, as medidas de seleção consideradas como dispendiosas.

A seleção auxiliada por marcadores bioquímicos e/ou moleculares, pode aumentar a eficiência deste processo, por permitir uma seleção mais rápida, e reduzir o tamanho da amostra da população da planta (STAUB et al. 1996).

Nesse sentido, a proposta do presente estudo, é estabelecer as condições adequadas, para a análise de isozimas α e β -esterases em tecidos de folhas de estévia, para estimar a diversidade, em diferentes populações de plantas crioulas e cultivadas na região de Maringá-PR.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Histórico

O gênero *Estévia*, conta com aproximadamente 200 espécies e está amplamente distribuído em todo o mundo, principalmente na América do Sul, cujo clima tropical e subtropical, favorece o seu desenvolvimento. Carneiro (1990), registra que no Brasil foram identificadas quatro espécies, porém, existem informações sobre a ocorrência de 14 espécies no Rio Grande do Sul. Duas espécies merecem destaque, a *Stevia rebaudiana* e a *Stevia aristata*, por apresentarem princípios edulcorantes. Todas as 14 espécies, encontradas no Brasil e no Paraguai, incluindo a *Stevia rebaudiana*, estão agrupadas na série *Multiaristatae*.

Durante o seu desenvolvimento inicial, o caule não apresenta ramificações, tornando-se multicaule, após o primeiro período vegetativo, que vem produzir até 20 hastes em 3 a 4 anos. Em condições ótimas de cultivo, os caules podem atingir um metro e meio de altura (SAGAKUCHI; KAN, 1982). Segundo Frederico (1994), estudos do cariótipo de seis espécies do gênero de *Estévia*, mostraram que as mesmas são diplóides com $2n=22$ cromossomos. Pela análise da morfologia cromossômica, foi possível a identificação de cada espécie.

O número cromossômico básico, para as espécies brasileiras é $x=11$, sendo este o mesmo valor encontrado, em quase todas às espécies de *estévia* da América do Sul. Os estudos de poliploidia de plantas de *estévia*, podem revelar uma boa maneira, de obter ganhos de produtividade nas folhas, em termos de massa e conteúdo dos ativos, reduzindo a área plantada e, por conseguinte, os custos.

Alguns dados contidos em cópias de documentos informativos, enviados pelos conquistadores à Espanha e que se conservam no Arquivo Nacional de La Assunción, noticiavam que a planta era conhecida dos indígenas desde tempos remotos, e que eles a usavam para edulcorar bebidas medicamentosas, e especialmente para adoçar o mate cozido. Com a chegada dos conquistadores espanhóis na América do Sul, eles observaram a

existência de uma planta, que era utilizada pelos índios tupi-guaranis, para adoçar bebidas medicamentosas, e especialmente o mate (FILHO et al. 2004).

Em 1899, quando o naturalista suíço Moisés Santiago Bertoni (1857-1929), obteve referências da planta de ervateiros e de índios do Mondaíh, em uma de suas viagens às florestas do leste do Paraguai, Bertoni classificou a planta erroneamente, como *Eupatorium rebaudianum* sp., em homenagem ao químico Paraguaio Ovídio Rebaudi. No Paraguai, as plantas de *Estévia* são conhecidas na linguagem Guaraní por *ka'a he'e*, o que significa erva doce (FILHO et al., 2004).

Sumita (1980), descreveu uma série de experimentos, onde 22 variedades de *Stevia rebaudiana* foram estudadas, para correlacionar as várias características da planta, com a sua hereditariedade, e observou 11 características morfológicas e seis características de conteúdo. Destas 17 características avaliadas, somente a variável peso seco de folhas, mostrou uma baixa correlação com hereditariedade, concluindo então, que características morfológicas e de conteúdo, principalmente de princípios ativos, têm efeito selecionador evidente.

Na década de 1940, a *S. rebaudiana* despertou o interesse dos ingleses, pois os mesmos estavam a procura de um substituto para o açúcar e a sacarina, devido à crescente escassez de adoçantes, durante a II Guerra Mundial. Em um memorando do Jardim Botânico Real, na cidade de Kew em 1941, recomendava-se as plantas de *Estévia* como um substituto valioso da sacarose. Em 1942 e 1943, sementes de estévia foram enviadas de Kew para as áreas de clima mais ameno do Reino Unido, mais adequadas ao crescimento das plantas, que foram cultivadas nos condados de Devon e Cornwall, onde se desenvolveram bem durante o verão (FILHO et al. 2004).

A primeira descrição de estévia no Brasil, ocorreu em 1926, quando foi editado o primeiro volume do dicionário das Plantas Úteis do Brasil, do botânico brasileiro Manuel Pio Correa (FILHO et al. 2004).

Na década de 1970, o interesse comercial ressurgiu por intermédio dos japoneses, quando se intensificaram gradativamente os estudos relativos à planta. Atualmente, a comercialização dos edulcorantes tende a crescer, principalmente no sudeste asiático, e em outras partes do mundo.

2.1.1. Aspectos do Material Botânico

O princípio para a produção de *Stevia rebaudiana*, é que, aos produtores destas plantas, interessa os teores de edulcorantes presentes nas folhas, que são entregues para a indústria, após serem secas, sendo que um lote, contendo maiores teores destes compostos, possui maior valor comercial (EMBRAPA, 2004). Portanto, um material botânico melhorado, contendo folhas com altos teores, pode estimular o plantio, assim como contribuir com a economia de pequenos produtores rurais. Como se trata de um material biológico, utilizado em grande escala por indústrias, é compreensível o não aporte destes materiais, melhorados no mercado, cabendo aos interessados a obtenção de seus materiais.

A produção de mudas de *Stevia rebaudiana*, é realizada via semente e/ou estaquia (EMBRAPA, 2004), portanto, é possível a realização de cruzamentos assistidos, assim como de propagação, em grande escala de materiais botânicos selecionados, permitindo a formação de campos com plantas superiores. A seleção de material botânico, para ser utilizado na formação de campos mais produtivos, em geral, é realizada, com base em caracteres morfo-anatômicos, como tamanho de folhas, robustez da planta e rápido crescimento. Contudo, nem sempre os teores de edulcorantes estão diretamente relacionados, com os caracteres morfológicos, sendo indicado então, o uso de outras ferramentas, que proporcionem melhor conhecimento dos materiais genéticos plantados, assim, como uma melhor aplicação das técnicas de manejo da cultura de estévia (SHOCK, 1982).

A composição do extrato das plantas de estévia, tem sido amplamente investigada, e alguns autores descreveram que as diferenças morfológicas entre as plantas, são evidentes nas culturas, e dependentes de processos biológicos naturais da espécie e dos métodos de propagação (TATEO et al., 1998).

A estévia pertence ao grupo de plantas das asteráceas, família botânica, com o maior número de espécies, entre as Magnoliophytas, também conhecida por Compositae ou compostas, as quais são muito exigentes em água, desenvolvendo-se e alcançando produção agrícola. Quando a umidade

no solo esteja em torno de 80 % da água disponível, seu sistema radicular, atinge entre 0,20 a 0,30 m de profundidade, região na qual há maior concentração, de todo o sistema radicular da planta (FILGUEIRA, 2000).

A cultura de estévia exige muita água para seu desenvolvimento, cujo consumo pode ser entre 1000 e 1400 milímetros anualmente. Por isso, a irrigação suplementar é essencial, para alcançar bons rendimentos. Em áreas com mais de 800 milímetros, pode ser alcançada uma produção, de cerca de 2.000 kg.ha⁻¹ por período de colheita. Com menos de 800 milímetros, é necessário a irrigação, onde não se recomenda a introdução de estévia (ZUBIATE, 2006). De acordo com Sakaguchi (1982), a temperatura mais adequada para a cultura de estévia é de 15 a 30 °C.

A planta de estévia cresce em solos de baixa fertilidade, tais como a areia orgânica e alta umidade (SHOCK, 1982). Alguns pesquisadores recomendam solo arenoso, com argila húmifera-ferruginosa, ou simplesmente húmifera. Desenvolve-se bem em solos vermelhos do Alto Paraná, é bem adaptada a argila do solo, com boa drenagem, mas não em locais com excesso de umidade. A planta cresce naturalmente no solo com pH 4-5, mas, desenvolve-se bem em solos com pH entre 6.5 - 7.5, (SHOCK, 1982).

A densidade de plantio é geralmente 110.000 plantas por hectare, distribuídos em linhas separadas para 50 cm, e de espaçamento entre plantas entre 35 a 30 cm. Densidades elevadas, podem reduzir o desenvolvimento de ramos laterais e de rendimento, por unidade de peso seco, aumentando o número de plantas mortas, após a colheita e as dificuldades da mesma (SAKAGUCHI; KAN, 1982).

A estévia é uma planta de dias curtos para a floração, com fotoperíodo crítico de 13 a 14 horas. A sensibilidade aos dias curtos, ocorre após a planta desenvolver quatro pares de folhas, sendo necessários apenas dois ciclos (dia/noite), para a indução ao florescimento. Apresenta um sistema radicular pivotante no início do seu desenvolvimento, após a sua primeira safra com o corte, a região do coleto e o sistema radicular, tornam-se fasciculado, com maior distribuição na camada superior do solo (FILHO et al., 2004).

Dentre os fatores climáticos, a precipitação pluviométrica é a que mais frequentemente, tem limitado o rendimento dos cultivos. Quando a taxa de absorção de água do solo pelas raízes, torna-se menor que da transpiração; a taxa de crescimento das plantas é afetada, pois ocorre o fechamento dos estômatos, evitando perda excessiva de umidade nos tecidos foliares, e a entrada de CO₂ é reduzida e, conseqüentemente, ocorre a fotossíntese e o crescimento celular. Deste modo, a redução da transpiração está diretamente relacionada ao decréscimo do crescimento e da produção (JARMA, et al., 2005).

2.1.2. O cultivo de *Stevia rebaudiana*

Os apontamentos de Alvarez (1984), registram que o primeiro cultivo de *Stevia rebaudiana* em larga escala, com sucesso foi realizado pelo engenheiro agrônomo Juan B. Gimenez, que cultivou 2 hectares desta espécie, em Porto Bertoni, no Alto Paraná em 1910. Desde esta época, estudos sistemáticos vêm sendo realizados em todo o mundo, com a finalidade de um aproveitamento racional, das propriedades edulcorantes e medicinais da *Stevia rebaudiana*.

Em 1970-1971, Tetsuya Sumida, agrônomo japonês, Ministro da Agricultura e Florestas do Japão, levaram sementes e mudas de estêvia do Instituto de Botânica de São Paulo para o Japão, onde foram realizados estudos, sobre as condições agronômicas da planta como: temperatura, umidade, determinação nutricional do solo, fatores relacionados à herdabilidade e qualidade da estêvia.

No Brasil, os estudos mais minuciosos sobre *S. rebaudiana*, tiveram início no final da década de 50, quando mudas de *S. rebaudiana* foram levadas e plantadas, no Centro de Botânica do Rio de Janeiro. Estas plantas foram perdidas, porém, mais tarde, novas mudas foram coletadas no Paraguai e então, plantadas no Instituto de Botânica de São Paulo (DIETRICH, 1981).

A partir de então, os pesquisadores procuraram demonstrar segurança no uso dos princípios edulcorantes, presentes na folha da estêvia, principalmente no Japão. Com isto, as maiores dificuldades passaram a residir no cultivo da planta, para a obtenção de folhas de boa qualidade e nos processos de extração, dos princípios ativos dentro de condições econômicas

da realidade do Brasil. Muita pesquisa tem sido realizada para a otimização destes dois pólos, visando à utilização desta espécie botânica de grande potencial.

Estudos de poliploidia são realizados desde a década de 70, com os trabalhos de Brücher (1947) e Utsunomiya (1977), Sato e Kawatani (1975), estes últimos pesquisadores obtiveram variedades de alta qualidade, embora a divulgação seja incerta, devido à finalidade comercial das pesquisas. Outros pesquisadores, como Ferreira e Handro (1982), também tentaram obter variações genótípicas da *S. rebaudiana*, a partir de cultura de tecidos, com a multiplicação de plantas regeneradas e indução por agentes mutagênicos, para aumentar a frequência de alterações genéticas.

A poliploidia pode ser uma boa solução, para o aumento na produtividade, em termos de massa foliar e conteúdo de princípios ativos, obtendo-se maiores quantidades de adoçantes naturais de *Stevia rebaudiana*, com menor área plantada e, conseqüentemente, menor custo. Alguns trabalhos, também são realizados no melhoramento genético, para a obtenção de cultivos resistentes às doenças e pragas; tendo em vista, o favorecimento ao ataque destes agentes, quando a monocultura é instalada (BRANDLE; ROSA, 1992).

Grashoff (1974), notou que a apomixia em estêvia é freqüente, e o comportamento reprodutivo, pode ser determinado, como um alto grau de segurança, a partir da morfologia de seus grãos de pólen. Sendo assim, as plantas com reprodução sexuada, produzem grãos de pólen normais, uniformes e tricolporados. As plantas apomíticas, apresentaram grãos de pólen anormais e desiguais, tanto em seu tamanho quanto ao seu formato, ocorrendo até o aparecimento de grãos abortivos.

A espécie *S. rebaudiana*, apresenta polinização cruzada, e três tipos de aquênios podem se formar. Os aquênios claro estéreis, os aquênios escuros férteis e os escuros não férteis. Os aquênios férteis, são fotoblasticamente positivos, com a luz induzindo a germinação e a taxa estando entre 40 a 60%. Substâncias giberelínicas e auxínicas, foram verificadas nos três tipos de aquênios (RANDI; FELIPPE, 1982). As sementes de estêvia são geralmente estéreis, por serem apomítica, sendo por isto, a multiplicação vegetativa por estaquia, ou clonagem às vias mais comuns de propagação.

Carvalho e Zaidan (1995), avaliaram a obtenção de plantas de estévia, obtidas, por meio de estacas e concluíram que, é possível a utilização desta forma de reprodução e sugeriram o uso de estacas apicais retiradas, em época de rebrota. Para a multiplicação de linhagens elite em larga escala, pode-se utilizar a técnica de cultura *in vitro* de células e tecidos vegetais (KERBAUY, 1982). Randi e Felipe (1982), realizaram um estudo, com a germinação de sementes de *Stevia rebaudiana* e citam que pode haver uma incompatibilidade esporofítica nesta espécie.

2.1.3. Avaliação de germoplasma para seleção

Tateo et al. (1998), comenta que o rendimento agrônomo de esteviosídeo na planta, está certamente ligado aos diferentes métodos, usados para a extração e purificação deste composto.

Contudo, também está ligado às características genéticas e expressão fenotípica, que por sua vez, dependem de fatores climáticos e ambientais. Os autores comentam ainda que, as diferenças morfológicas entre as plantas sejam evidentes e presentes nas culturas, sendo também ligadas aos processos biológicos naturais da espécie e aos métodos de propagação que, para a maior parte, é a divisão de touceiras.

Tateo et al. (1998), avaliando plantas de *S. rebaudiana*, realizou um estudo de comparação, entre o conteúdo de esteviosídeo e a variabilidade morfológica em *S. rebaudiana*, em uma população originária do Paraguai. Verificou que a porcentagem de folhas frescas, variou entre 37,7 e 58,2%, sendo este índice muito importante, considerando que somente as folhas contêm esteviosídeo. A determinação quantitativa por HPLC de esteviosídeo, foi realizado em 13 tipos morfológicos diferentes de plantas, e a média dos níveis de esteviosídeo, nas folhas secas variou de 102,3 a 134,6 g. Kg⁻¹.

Em outro estudo, sobre a relação do conteúdo de esteviosídeo e a morfologia de planta em *S. rebaudiana*, Tateo et al. (1999) avaliou plantas adultas, em uma área no leste do Paraguai, considerada a maior produtora daquele país. A determinação quantitativa de esteviosídeo, foi realizada em folhas secas, de 16 diferentes grupos de plantas. A porcentagem de folhas frescas para o total da parte aérea, variou de 56,1 a 75,4%. A quantidade de

esteviosídeo, variou de 43,6 a 98,9 g.Kg⁻¹, dentro dos 16 grupos de plantas analisados, e os resultados sugeriram que o meio ambiente e as práticas agronômicas, têm uma maior influência na produção de esteviosídeo, do que o hábito de crescimento da planta.

Brandle e Rosa (1992), estudando a herdabilidade de características agronômicas e bioquímicas, encontraram herança para rendimento, relação folha, caule e conteúdo de esteviosídeo, calculados de um cultivo de *S. rebaudiana*.

Mizukami et al., (1993), em trabalho para determinação enzimática de esteviosídeo, em folhas de *S. rebaudiana*, verificou uma variação grande no conteúdo de esteviosídeo nas plantas analisadas, indicando potencial de uso, em programas de melhoramento genético, por meio de seleção e multiplicação de plantas, altamente produtoras deste composto.

2.2. Adoçantes e Edulcorantes

No decorrer dos últimos anos, tem-se observado a grande procura de alimentos de baixa caloria, ou mesmo aqueles não calóricos. Os adoçantes dietéticos, em sua maioria, são compostos, a partir de substâncias não calóricas, naturais ou sintéticas, conhecidas como edulcorantes. Esses edulcorantes, são mais doces que o açúcar branco e responsáveis pelo sabor dos adoçantes de mesa (ANGELUCCI, 1986). Dentro das dosagens permitidas, essas substâncias são bem mais saudáveis para o paciente diabético, do que o açúcar. Suas particularidades começam, na classificação em dois grupos principais: as calóricas e as não calóricas. As substâncias calóricas (ou edulcorantes calóricos), são mais utilizadas para diluir ou dar textura ao adoçante, ou ao alimento dietético, do que propriamente adoçar o produto (MOURÃO, 2008).

Os edulcorantes, podem ser divididos em edulcorantes sintéticos e edulcorantes naturais. Por sua natureza, quase, essencialmente não calórica, e seu alto poder edulcorante, o que diminui sensivelmente a sua ingestão quantitativa, em relação aos adoçantes. Os edulcorantes são indispensáveis aos regimes dietéticos, caracterizados pela diabete, ou em dietas de emagrecimento e/ou manutenção de peso corporal (ANGELUCCI, 1986).

Entre os principais edulcorantes é possível destacar:

2.2.1. Edulcorantes sintéticos

Os adoçantes são compostos de sabor doce, como os açúcares, os derivados dos açúcares e os polióis, quase sempre energéticos, tendo a sacarose como membro principal, cujo poder edulcorante é unitário.

A) Sacarina

A sacarina foi à primeira substância adoçante sintética, descoberta em 1878, e tem poder adoçante, 500 vezes maior do que a sacarose. Em altas concentrações, deixa sabor residual amargo, e não é metabolizada pelo organismo, sendo de fácil solubilidade e estável em altas temperaturas. Em 1986, foi comprovada sua segurança, para a mediante realização de diversos estudos técnico-científicos. Sua ingestão diária aceitável (IDA), correspondente a 5 mg/kg de peso corpóreo (FERRIER; COLLINS, 1972).

B) Ciclamato

O ciclamato foi descoberto em 1939, mas só entrou no mercado, a partir da década de 1950. Como a sacarina, o ciclamato é outro edulcorante artificial, largamente usado no setor alimentício, sendo aplicado em adoçantes de mesa, bebidas dietéticas, geléias, sorvetes, gelatinas etc, e já foi liberado nos EUA, da suspeita de ser cancerígeno. Com o menor poder adoçante, o ciclamato é 40 vezes mais doce que a sacarose, não calórico e possui sabor agradável e semelhante ao açúcar refinado (apresentando um leve gosto residual), não metabolizado pelo organismo; nem perde a doçura, quando submetido a altas e baixas temperaturas e meios ácidos. A ingestão diária aceitável (IDA), correspondente a 11 mg.kg⁻¹ de peso corpóreo (CÂNDIDO; CAMPOS, 1996).

C) Aspartame

O aspartame é um edulcorante artificial, descoberto em 1965, possui sabor agradável e semelhante ao açúcar branco, só que com potencial

adoçante, 200 vezes maior, permitindo o uso de pequenas quantidades. O aspartame é muito usado pela indústria alimentícia, principalmente nos refrigerantes *diet*, é sensível ao calor e perde o seu poder de adoçamento, em altas temperaturas. A doçura do aspartame, também poderá diminuir, quando for armazenado por muito tempo. O aspartame é contra-indicado aos portadores de fenilcetonúria, uma doença genética rara, que provoca o acúmulo da fenilalanina no organismo, causando retardo mental. A sua ingestão diária aceitável (IDA), correspondente a 40 mg.kg⁻¹ de peso corpóreo (FERRIER; COLLINS, 1972).

2.2.2. Edulcorantes naturais

A indústria de alimentos, tem usado tradicionalmente açúcar como agente adoçante. Porém, há uma demanda crescente para outros tipos de adoçantes, devido à necessidade e/ou preferência dos consumidores. Há no mercado, adoçantes sintéticos e naturais, e um segmento significativo de consumidores está interessado em adoçantes, que são conhecidos por apresentar qualidades como, baixo valor calórico, não ser tóxico, possuir ampla estabilidade, quanto ao calor e pH. Nos últimos anos, houve um interesse considerável em adoçantes de fontes naturais, baseados em edulcorantes encontrados nas folhas de *S. rebaudiana*, que possuem muitas destas qualidades (ZHANG et al., 2000).

A) Frutose

A frutose é um edulcorante natural, de sabor agradável e extraído do açúcar das frutas, sendo uma vez e meia, mais doce que a sacarose, com poder de adoçamento, 173 vezes maior. O excesso de frutose, pode causar aumento de triglicerídeos, e pessoas, com problemas no metabolismo de lipídios e gorduras, devem evitar o consumo desse edulcorante. Estudos comprovam que o uso por tempo prolongado, dificulta a absorção do cobre mineral importante, na síntese da hemoglobina (responsável pela pigmentação dos glóbulos vermelhos) (FERRIER; COLLINS, 1972).

B) Lactose

A lactose é um açúcar extraído do leite, muito usado como diluente nos adoçantes de mesa. A lactose é bastante usada industrialmente, como um excelente suporte e estabilizante de vários aromas, e produtos farmacêuticos fornece 4 calorias/grama e precisa da presença de insulina, para ser metabolizado no organismo. Seu potencial edulcorante é cerca de 0,16 a 0,23%, maior que a sacarose (CÂNDIDO; CAMPOS, 1996).

C) Malto dextrina

A malto dextrina é um açúcar extraído do milho, também muito usado como diluente nos adoçantes artificiais. Como a lactose, a malto dextrina é insulino-dependente e tem 4 calorias/grama, sendo cerca de 0,5% em relação à sacarose (FERRIER; COLLINS, 1972).

D) Dextrose

A dextrose é outro açúcar derivado do milho, com ampla aplicação na indústria alimentícia. Sua doçura é cerca de 0,7%, em relação à sacarose, e possui 4 calorias/grama, e também necessita de insulina para sua metabolização (CÂNDIDO; CAMPOS, 1996). O sabor doce da dextrose é uma percepção organoléptica, e é devido a compostos com maior ou menor dulçor.

2.3. Esteviosídeo

O esteviosídeo é descrito como sendo, até 300 vezes mais doce que a sacarose (PATRÃO et al., 2007). Apresenta sinergismo, associado à aspartame, acesulfame-K e ciclamato, mas não com sacarina. O perfil de sabor do esteviosídeo é semelhante ao da sacarose. Contudo, é mais persistente e mostra sabor residual amargo de mentol, que diminui com o aumento da pureza. Esta substância, também é caracterizada, como tendo baixa solubilidade em água, excelente estabilidade em sólidos e líquidos, resistência ao calor, além de modificar e realçar sabores e aromas e contribuir para diminuição da adstringência. Devido ao fato do esteviosídeo não ser fermentescível, não causa ou contribui com a cárie dentária.

Nas folhas de *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni, são encontrados os glicosídeos diterpênicos: esteviosídeo, rebaudiosídeo A, B, D e E; e o dulcosídeo B (rebaudiosídeo C), sendo que esteviosídeo rebaudiosídeo A e C estão presentes, em maior quantidade e são mais doces, e os outros relatados são encontrados, em menores quantidades (AHMED; DOBBERSTEIN, 1982).

Os teores de esteviosídeo e dos outros compostos, apresentam as seguintes quantidades: esteviosídeo 5-15% (300 a 400 vezes mais doce que a sacarose), rebaudiosídeo A 3-6% (350-450 vezes), rebaudiosídeo C ou dulcosídeo B (50 a 120 vezes) 1-2 %, e dulcosídeo A 0,5-1% (50-120 vezes). Outros glicosídeos, que podem estar presentes, são os rebaudiosídeo D (200 a 300 vezes), rebaudiosídeo E (250 a 300 vezes), e esteviolbiosídeo (100 a 125 vezes). O rebaudiosídeo B (300 a 350 vezes mais doce que a sacarose), tem sido detectado, mas é provavelmente, um artefato formado durante o isolamento. O teor de esteviosídeo aumenta, até o início do florescimento, diminuindo continuamente, até a produção de sementes, sendo aconselhável a colheita das folhas, no início de abertura das flores (FILHO et al., 2004).

O esteviosídeo foi aprovado no Brasil, em meados de 1987, como agente flavorizante e edulcorante, em várias classes de alimentos, e nos Estados Unidos, em 1996, foi liberado para ser utilizado como ingrediente para suplemento dietético (ANGELUCE, 1989; CANDIDO; CAMPOS, 1996; METIVIER; VIANA, 1979).

Mizukami (1982), considera e destaca que o esteviosídeo é um adoçante 100% natural, que possui alto poder edulcorante. Este composto, apresenta boa solubilidade em água (mínimo de 800 mg/L⁻¹), é inócuo à saúde, possui elevada estabilidade nos processos industriais, o que permite a obtenção de produtos sólidos e líquidos com excelente estabilidade (STEVIAFARMA INDUSTRIAL S/A, (1993).

Nos registros de empresas, tais como STEVIAFARMA INDUSTRIAL S/A (1993), o esteviosídeo é apresentando com outras vantagens, tais como: ser um produto não-calórico, não-metabolizável, não-fermentável, não-carcinogênico e anti-placa, apresenta-se sempre, com altos teores de pureza; podendo ser aplicado, com grandes vantagens, em todos os produtos alimentícios e bebidas, tais como refrigerantes, pós para refresco, café e mate, “cappuccino”, sorvetes, gomas de mascar, iogurtes, geléias, chocolate em pó,

balas, gelatinas, sucos naturais, bolos, molhos, adoçantes de mesa e outros segmentos, como cosméticos, medicamentos, tabaco etc. (STEVIAFARMA INDUSTRIAL S/A, 1993).

A empresa STEVIAFARMA INDUSTRIAL S/A destaca também, que o sabor do esteviosídeo, atinge elevado padrão de excelência, em misturas com aditivos de largo uso na indústria de alimentos, tais como, pectina, citratos, ácido cítrico, aromas naturais e que outra forma de uso é pela associação a outros edulcorantes, natural ou não, como sacarose, aspartame, sacarina, ciclamatos etc. Nestes casos, as misturas asseguram ótimo paladar. Ele pode ser consumido por diabéticos, obesos e toda a população em geral, que deseja manter-se em forma.

2.4. Marcadores enzimáticos

O termo isoenzima, também conhecido e encontrado na literatura como isozima, foi introduzido por Market e Moller (1959), para designar formas moleculares múltiplas de enzimas, que ocorrem em um mesmo organismo, e em membros da mesma espécie. As enzimas são controladas, geneticamente, por um ou, vários genes, situados em um mesmo *lócus*, ou em *loci* diferentes (MARKET; MOLLER, 1959; SCANDALIOS, 1969). Quando elas representam a expressão fenotípica de alelos, situados em um mesmo loco, são denominados alozimas (CONKLE et al., 1982).

As isoenzimas podem ser produtos de diferentes sítios genéticos, ou resultar de alterações secundárias, na estrutura de espécies polipeptídicas únicas. As isoenzimas podem ser geradas, pela duplicação do gene, com mutações subsequentes nos *loci*. Assim, mais de um gene, contribui para a estrutura de algumas enzimas, compostas por mais de um tipo de subunidade formas, multiplicadas de enzimas, que podem surgir pela ação de agentes físicos ou químicos não genéticos (SCANDALIOS, 1969).

Existem vários métodos bioquímicos, que detectam, isolam e distinguem as isoenzimas: cromatografia, filtração em gel, eletroforese e outras. A eletroforese é a mais poderosa técnica analítica, disponível para separar isoenzimas, devido a contínuas pesquisas e inovações na área (BROW, 1978; PIERCE; BREWBAKER, 1973). Os suportes, geralmente utilizados em

eletroforese, são os papéis filtros, os acetatos de celulose e os géis de agar, poliacrilamida e amido (BREWER; SING, 1970).

2.4.1. Controle genético de isoenzimas em plantas

O controle genético de isoenzimas mais comum em plantas, é o que apresenta segregação monogenética e co-dominância, ou seja, expressão de ambos os produtos alélicos no heterozigoto (BORÉM ; CAIXETA, 2006). Assim, os híbridos podem ser eficientemente distinguidos de seus genitores, desde que haja pelo menos uma banda isoenzimática, contrastando esses genitores. A dominância completa, ou seja, a exclusão de um dos alelos, na expressão gênica do heterozigoto, é um fenômeno raro neste tipo de marcador (PIERCE; BREWABAKER, 1973).

A formação de bandas híbridas, de mobilidade eletroforética intermediária, entre as formas parentais, é comum entre os sistemas, cuja enzima é funcionalmente dimérica ou polimérica. O aparecimento somente da molécula heteropolimérica, nos heterozigotos, é menos observado. O padrão “presença ou ausência” de determinada banda, geralmente tem controle monogênico, com presença de banda no heterozigoto (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Esse tipo de controle é conhecido, como dominância aparente, uma vez que a ausência da banda pode simplesmente, refletir a concentração muito baixa da enzima, em determinado órgão ou tecido, para que possa ser detectada no zimograma (BORÉM; CAIXETA, 2006). Esses alelos, que não se expressam, são referidos na literatura como alelos nulos, ou silenciosos (PAUSTER et al., 1988; PIERCE; BREWBAKER, 1973).

Para o estudo de marcadores enzimáticos, a eletroforese pode ser empregada, para separar as moléculas de proteínas. A técnica consiste na extração de proteínas, de um tecido vegetal (folha, raiz ou semente), e da migração destas proteínas, num gel, que pode ser de amido, ou de poliacrilamida, submetido a uma corrente elétrica contínua. O sentido e a velocidade de migração, são determinados pelo tamanho e pela carga das proteínas (ALFENAS et al., 1991).

Quanto maior a carga elétrica de uma proteína, mais rápida a sua migração no gel, em direção ao eletrodo de carga contrária. Em seguida, uma posição da enzima no gel, pode ser verificada pela sua atividade, que é detectada, por um sistema de coloração histoquímica. O procedimento básico para a detecção de isoenzimas, envolve três etapas principais: extração da enzima do tecido vegetal, separação das enzimas por eletroforese e a revelação das bandas, por métodos de coloração histoquímica do gel (BORÉM ; CAIXETA, 2006).

Por princípio, qualquer tecido vegetal pode ser utilizado para a análise de isoenzimas. No entanto, por facilidade de amostragem, tecidos foliares são preferidos para este tipo de estudo, apesar de apresentarem maior quantidade de compostos fenólicos e de enzimas oxidativas, em relação a tecidos de raízes e de sementes, por exemplo. O procedimento experimental, inclui a maceração a frio, de uma pequena quantidade de tecido vegetal, na presença de uma solução de extração (ALFENAS et al., 1991).

As isoenzimas, denominadas marcadores bioquímicos, começaram a ser utilizadas como marcadores genéticos, a partir de meados da década de 1960 (LEWONTIN; HUBBY, 1966). Os estudos sobre isoenzimas em plantas são muito extensos, o que mostra sua utilidade em diversas investigações, como: caracterização da variabilidade genética, de populações naturais de espécies cultivadas, estudos de evolução e dispersão de espécies, e análises filogenéticas. As aplicações no melhoramento vegetal, incluem a identificação de ligação gênica, entre marcadores isoenzimáticos e caracteres de herança simples (GAUER; SLINKARD 1990) e complexa (KAHLER; WEHRHAHN, 1986; TANKSLEY et al., 1982); identificação de acessos e cultivares.

2.4.2. Interpretação dos fenótipos eletroforéticos de proteínas e de isoenzimas

A interpretação dos zimogramas, o conjunto das diferentes faixas obtidas, em papel pela eletroforese de uma solução de enzimas, requer um conhecimento prévio, da estrutura quaternária da enzima e do seu controle genético. A enzima funcionalmente ativa, pode ser constituída, por um ou mais polipeptídeos, podendo ser monoméricas, diméricas, triméricas ou

tetraméricas, se forem constituídas por um, dois, três ou quatro polipeptídeos (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Cada polipeptídeo, constitui um monômero, e a união de dois ou mais monômeros, forma a estrutura quaternária das enzimas. A migração de uma enzima no gel, depende do seu tamanho, conformação e carga elétrica (BORÉM; CAIXETA, 2006).

A metodologia de construção de um mapa de ligação, envolve um grande número de técnicas e etapas, que incluem seus genitores para o desenvolvimento de populações segregantes, adequadas à identificação dos genótipos, de cada locus marcador e à utilização de diversas técnicas de análise estatística e computacional, para a estimativa de ligação e distância, entre os marcadores (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Numa eletroforese, para analisar proteínas inespecíficas, as “bandas” correspondentes a essas moléculas, são separadas e caracterizadas em razão de seus pesos moleculares. Para esclarecer a interpretação de zimogramas ou de fenótipos eletroforéticos isoenzimáticos, é necessário que os fatores envolvidos, com a formação das isoenzimas, sejam considerados detalhadamente. O estudo de várias isoenzimas, por meio de eletroforese, mostra que a ocorrência das isoenzimas é um fenômeno geral, em todos os organismos, e podem estar em diferentes formas (MACHADO et al., 1999).

2.4.3. Vantagens e desvantagens dos marcadores isoenzimáticos

De acordo com as colocações de Borém e Caixeta (2006), sobre as vantagens e desvantagens de usar isoenzimas, na caracterização genética dos organismos, a grande maioria dos sistemas enzimáticos, já revelados em géis de amido, ou poliacrilamida, apresenta geralmente, mais de uma isoenzima. Como consequência, muitos sistemas enzimáticos, são potencialmente informativos. A propriedade mais expressiva das isoenzimas, como marcadores genéticos, é a herança mendeliana simples, com co-dominância entre alelos, na maioria dos alelos, na maioria dos *loci* (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

As outras vantagens se referem a uma técnica, relativamente barata e, operacionalmente, acessível à determinação genotípica dos *loci*, podendo ser feita, em qualquer parte da planta, onde vários *loci* isoenzimáticos, podem ser

analisados simultaneamente, e não são detectados efeitos deletérios, epistáticos ou pleotrópicos, associados aos alelos isoenzimáticos.

Por causa dessas vantagens, apesar da existência de marcadores genéticos mais modernos e informativos, as isoenzimas continuam sendo muito utilizadas em análises genéticas, que não demandam ampla amostragem do genoma. De acordo com Borém e Caixeta (2006), as duas principais limitações dos marcadores isoenzimáticos, são a reduzida cobertura, que é feita nos genomas investigados, em função do pequeno número de *loci*, que podem ser detectados, e o baixo nível de polimorfismo identificado por *locus*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Cultivares de *Stevia rebaudiana*

As plantas de *S. rebaudiana* analisadas no presente estudo, foram provenientes de 4 populações plantadas em diferentes regiões próximas da cidade de Maringá-PR., que foram denominadas P1, P2, P3 e P4. Os cultivos destas plantas de estévia, geralmente são realizados por pequenos proprietários rurais, e a área destinada ao cultivo de estévia é em torno de 1 ha. Para a renovação da lavoura, o produtor separa uma quantidade de plantas no campo e não as corta, permitindo que estas terminem o seu ciclo, produzindo as sementes que serão utilizadas, para o novo plantio, podendo também, fazer a renovação ou aumento de área, por meio de multiplicação vegetativa, via estaqueamento. A população denominada de P1, é um centro de manutenção do germoplasma, sem cunho comercial, mantida para ser utilizada em pesquisas.

As plantas ali presentes, são renovadas, somente quando a touceira apresenta morte, e é feita com a utilização de sementes, provenientes de cruzamentos ao acaso, ocorridos nesta mesma área, de pequeno tamanho, contendo, aproximadamente, 250 plantas. Estas plantas são remanescentes do plantel, que foi inicialmente trazido do Paraguai para o Brasil, no início da década de 1980, para determinar o início dos estudos de domesticação da estévia no Brasil.

A área P2, é um centro de produção comercial de larga escala, e o material cedido por eles é resultado de cruzamentos direcionados, visando melhorias agrônomicas. A área P3, é de um pequeno produtor, que mantém aproximadamente 1 ha de estévia, realizando a reforma da área, por meio do plantio de novas mudas obtidas, a partir de sementes, produzidas pelas plantas presente na propriedade.

Contudo, este produtor por vezes, incrementa material genético novo para testes, que acabam sendo misturados com a estrutura genética da população pré-existente. A área P4, é um canteiro de aproximadamente 1m x 3m de plantas mantidas, com a finalidade de pesquisa em plantas medicinais, e

a sua reforma é realizada através de divisão de touceira, e/ou replantio de mudas que germinam no canteiro.

3.2. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (Sistema PAGE: *Polyacrilamide Gel Electrophoresis*)

Para extrair as isozimas esterases, foram utilizadas folhas em estágio inicial de desenvolvimento, obtidas de plantas de *S. rebaudiana*, das diferentes populações cultivadas do município de Maringá e região. As folhas foram coletadas, acondicionadas em sacos plásticos e transportadas para o laboratório em isopor, com gelo.

Foram coletadas cerca de 30 amostras da população P1, 100 amostras da população P2, 204 da população P3 e 94 amostras da população P4, foram analisadas. As folhas foram homogeneizadas com bastão de vidro, em tubo para microcentrífuga, usando 80µL de tampão fosfato de sódio 1,0M, pH 7,0, contendo 5% de PVP-40, 0,01 M de DTT (ditiotreitól), 10mM de metabissulfito de sódio, 50mM de ácido ascórbico, 1,0mM de EDTA, e 0,5% de solução de β-mercaptoetanol. Após a homogeneização, os tubos foram centrifugados com 14.000 r.p.m., durante 30 minutos com temperatura de 4 °C, em uma centrífuga *Jouan MR 23i*, e os sobrenadantes foram utilizados, como amostras na eletroforese em gel de poliacrilamida.

O gel de poliacrilamida (13%), foi preparado com Tris-HCl 0,375 M e pH 8,8. Nas cubas, foi utilizado como tampão o Tris-Glicina 0,1M em pH 8,3. O tempo de migração da eletroforese que, em testes preliminares melhor definiu bandas, foi o de 5 horas em 14 °C, com voltagem constante de 200 V/40mA.

Após a eletroforese, o gel foi incubado durante 30 minutos, na temperatura ambiente, em 50mL de uma solução de fosfato de sódio 0,1M, em pH 6,2. Para evidenciar as isozimas esterases, o gel foi transferido para uma solução preparada, com 50mL de fosfato de sódio, 40mg de β-naftil acetato, 40 mg de α-naftil aceato, 60mg do corante *Fast Blue RR Salt*, 5mL de N-propanol e 2mL de acetona. Sendo, em seguida incubado, durante o tempo necessário, para evidenciar as bandas. Após a coloração, o gel foi fixado na temperatura ambiente, durante 1-24 horas, em solução de ácido acético 7,5% e 10%, de

glicerol; em seguida embebido com 5mL de gelatina a 5%, e acondicionado, entre duas folhas esticadas de papel celofane e secos por 24-48h.

3.3. Análise do polimorfismo das isozimas α - e β -esterases

Após a revelação das regiões de atividade, para as isozimas α - e β -esterases, foram estimadas as frequências dos alelos e os parâmetros de diversidade genética. Foi estimada também, a proporção de *loci* polimórficos, o número médio de alelos, por *locus* e por *locus* polimórfico, a heterozigosidade observada (H_o) e a esperada (H_e). O afastamento do equilíbrio de Hardy-Weinberg, foi examinado para cada *locus* polimórfico. O coeficiente de endogamia (F_{IS}), o déficit de heterozigotos (F_{IT}), a proporção da diversidade genética, entre as populações (F_{ST}), e o fluxo gênico, entre as populações (N_m) foram estimados, empregando-se o programa POPGENE 1.32 (YEH et al., 1999).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de isoenzimas esterases (EST), com os substratos α -naftil acetato e β -naftil acetato, em amostras de folhas, das quatro populações de *Stevia rebaudiana* estudadas, indicam a ocorrência de várias isozimas esterases, codificadas por pelo menos oito *loci*. Os oito *loci* foram numerados, em ordem decrescente, em direção ao ânodo, de modo que, o *locus* menos anódico foi denominado *Est-8*, e o mais anódico foi denominado *Est-1* (Figura 1 e 2).

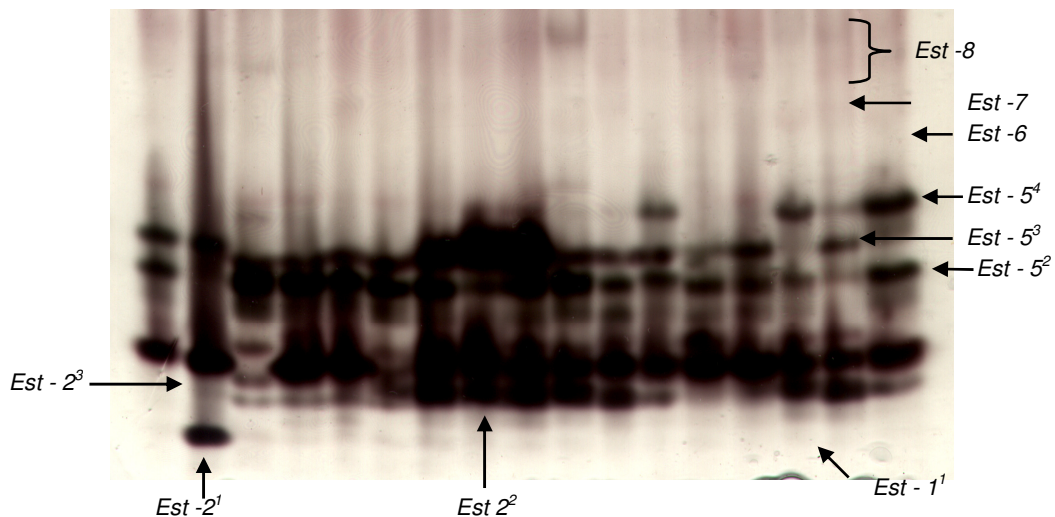


Figura 1. Isoesterases avaliadas em gel de poliacrilamida para folhas de 17 plantas de *Stevia rebaudiana*, coletadas na população P3.

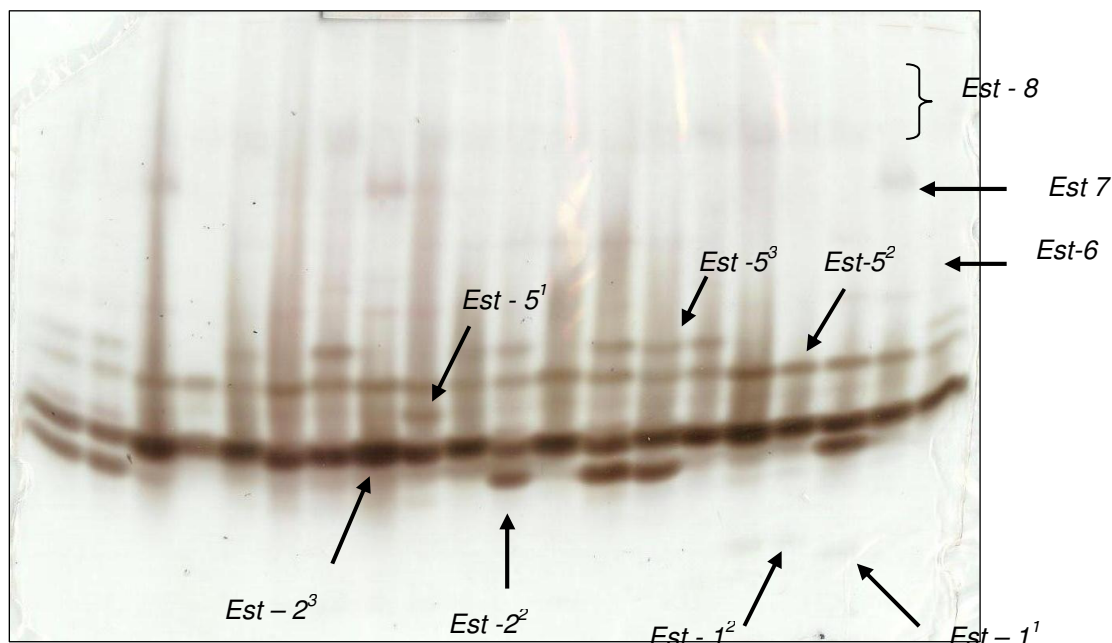


Figura 2. Isoesterases avaliadas em gel de poliacrilamida para folhas de 20 plantas de *Stevia rebaudiana*, coletadas na população P3.

O padrão de fracionamento para as α - e β -esterases dos *loci* *Est-1*, *Est-3*, *Est-4*, *Est-6*, *Est-7* e *Est-8* de *S. rebaudiana* no gel de poliacrilamida, foram complexos e não foi possível determinar o polimorfismo, para os referidos *loci* (Figura 1). As esterases codificadas pelo *locus Est-1* e pelo *loci Est-6*, *Est-7* e *Est-8* foram ausentes, ou evidentes, como bandas fracamente coradas, em várias amostras, e as esterases produzidas pelos *loci Est-3* e *Est-4*, apresentaram migração coincidente, com as esterases produzidas pelo *locus Est-2*. Desta forma, não foi possível definir com segurança os fenótipos homozigotos e heterozigotos para os referidos *loci*.

Uma alternativa adotada para induzir a separação dos alelos, codificados pelos *loci Est-2*, *Est-3* e *Est-4*, foi aumentar o tempo de duração da eletroforese para 6,5 horas. Mas, tal procedimento, não alterou a migração das bandas o suficiente, para identificar os fenótipos homozigotos e heterozigotos dos *loci Est-3* e *Est-4*. Modificações também foram realizadas no tempo de incubação do gel, para a revelação dos fenótipos eletroforéticos, mas também sem sucesso, na visualização adequada destes dois *loci*.

Portanto, o polimorfismo foi analisado apenas nos *loci Est-2* e *Est-5*, embora tenha sido evidente a presença de dois ou mais alelos nos *loci Est-1*, *Est-3*, *Est-6*, *Est-7*, e *Est-8*. Desta forma, a proporção de *loci Est* polimórficos

em gel de poliacrilamida, nas plantas das quatro populações de estévia corresponde a 100%.

O polimorfismo, nos *loci Est-2* e *Est-5*, apresenta quatro alelos em cada um destes *locus*, totalizando 8 alelos, com uma média de quatro alelos por *locus* polimórfico.

A Tabela 1, apresenta o número de alelos e suas respectivas frequências em cada um no *loci Est-2* e *Est-5*, analisados para cada população de *S. rebaudiana*. As frequências dos alelos do *locus Est-2* estão distribuídas, de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg na população P1, na população P2 e na população P4.

Tabela 1. Distribuição dos alelos, nos *loci Est-2* e *Est-5*, das quatro populações (P1, P2, P3, e P4) de *Stevia rebaudiana*.

Locus	Alelo	População			
		P1	P2	P3	P4
<i>Est-2</i>	1	-	0,0050	0,0049	0,0053
	2	0,1667	0,1400	0,1250	0,1330
	3	0,8333	0,7050	0,8676	0,7646
	4	-	0,1500	0,0025	0,0957
<i>Est-5</i>	1	0,0500	0,0700	0,0343	0,0106
	2	0,5833	0,5000	0,6005	0,6809
	3	0,2500	0,3350	0,3603	0,2287
	4	0,1167	0,0950	0,0049	0,0798

Um excesso de genótipos heterozigotos, no *locus Est-2* (valores negativos de F_{IS}) pode ser constatado nas referidas populações, e também no *locus Est-5* das populações de P3 e da P4 (Tabela 2). No *locus Est-5*, as frequências dos alelos, não estão distribuídas, de acordo com o esperado pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg, nas 4 populações de estévia. E também, foi observado excesso de plantas heterozigotas nas populações P2 e P3.

Tabela 2. Valores dos qui-quadrados e dos índices de fixação (F) de Wright (1975), que informam o déficit ou excesso de heterozigotos, nos 2 *loci* *Est-2* e *Est-5* das plantas de *Stevia rebaudiana*.

População								
Locus	P1		P2		P3		P4	
	X^2	F	X^2	F	X^2	F	X^2	F
<i>Est-2</i>	1,0653 ^{NS}	-0,20	27,83**	0,0669	2,4205 ^{NS}	-0,1009	1,4016 ^{NS}	-0,2186
<i>Est-5</i>	24,6756**	0,0249	12,1627**	-0,1381	6,6747**	-0,0510	42,3325**	0,1982

^{NS} – não significativo

** - significativo em nível de 5% de probabilidade

Os valores para as estimativas da proporção de heterozigotos, observada (H_o) e esperada (H_e), para cada uma das populações de *S. rebaudiana*, analisadas no presente estudo, estão relacionados na Tabela 3. A população P2, apresentou a maior proporção de genótipos heterozigotos observada ($H_o = 0,57$) e de heterozigotos esperada ($H_e = 0,5424$); a população P4, apresentou a menor proporção de genótipos heterozigotos observada ($H_o = 0,3883$), e a população P3, apresentou a menor proporção de genótipos heterozigotos esperada ($H_e = 0,37$).

Tabela 3. Número de plantas analisadas (N), número de alelos por *locus* polimórfico (N_a), número efetivo de alelos (N_e), heterozigosidade média observada (H_o) e esperada (H_e) nas 4 populações (P1, P2, P3, e P4) de *Stevia rebaudiana*.

Populações	N	N_a	N_e	H_o	H_e
1	30	3,0	1,88	0,4500	0,4294
2	100	4,0	2,25	0,5700	0,5424
3	204	4,0	1,66	0,3946	0,3700
4	94	4,0	1,77	0,3883	0,4320
Total	428	2,6	1,84	0,4381	0,4370

A heterozigosidade alta verificada na população P2, é uma evidência importante, porque um nível alto de heterozigosidade numa população, indica que esta contém, substancial quantidade de variação genética adaptativa suficiente, para escapar dos efeitos de agentes de controle diversos (ALLENDORF; LUIKART, 2007). Na população P2, apesar das plantas estarem sendo submetidas a uma pressão de seleção, onde são realizados cruzamentos direcionados, visando um processo de melhoramento, elas apresentam uma quantidade de variação genética, com potencial adaptativo, e

que pode ser usada para a seleção de linhagens, com características de interesses agrônômicos (figura 3).

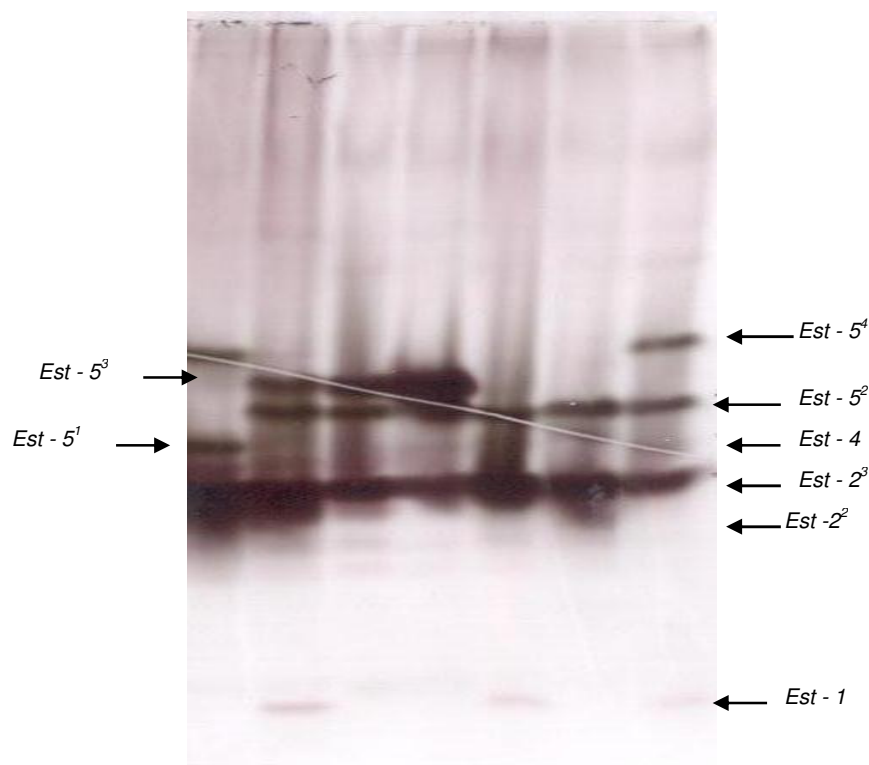


Figura 3. Isoesterases avaliadas em gel de poliacrilamida para folhas plantas de *Stevia rebaudiana*, coletadas na população P2.

A maior proporção de plantas heterozigotas, observadas na população P2, também sugere que os cruzamentos direcionados, que vêm sendo realizados, no sentido de melhorar a produção das substâncias de interesse produzidas, pela *S. rebaudiana*, podem estar selecionando os genótipos heterozigotos, para as isozimas α/β -esterases. A menor proporção de plantas heterozigotas, foi observada na população P4, onde o cultivo não tem finalidade comercial, e onde a reforma da área plantada, é feita por multiplicação vegetativa, por meio de divisão de touceiras.

Embora a função *in vivo*, das isoenzimas esterases seja desconhecida, pode estar envolvida, em uma ampla gama de reações bioquímicas na planta, de modo que é possível que o efeito de heterose, para os *loci* *Est-2* e *Est-5*, possa estar associado, com uma maior produção de esteviosídeos.

A despeito de ser verdadeira esta hipótese, o fato é que a discriminação de genótipos homozigotos e heterozigotos, para os *loci* *Est-2* e *Est-5* em *S. rebaudiana*, pode ser útil como marcador bioquímico. Para verificar a maior ou

menor produção de glicosídeos, que podem estar associados também, com uma maior ou menor susceptibilidade, ao ataque de pragas e doenças, com a capacidade de rebrota da touceira, dentre outros fatores agronômicos.

A utilidade destes marcadores bioquímicos, é um aspecto importante para a cultura de estévia. Isto porque, embora tenha sido verificado por Anami (2008), que caracteres morfológicos, tais como, a altura de plantas, podem estar positivamente correlacionados, com a relação rebaudiosídeo A/esteviosídeo, e que a produção de massa seca e o número de hastes, por planta também estão, positivamente, correlacionados em clones de estévia. Todas estas características foram descritas, como sendo altamente influenciadas por diferentes condições ambientais.

No que se refere ao polimorfismo de alelos nos *loci Est-2* e *Est-5*, por princípio, a presença de tais alelos, determinando fenótipos eletroforéticos específicos, ou mesmo a frequência destes alelos, não deve ser influenciada por condições ambientais.

Apesar da suspeita de que cruzamentos direcionados na população P2, para o melhoramento de estévia, possam estar selecionando genótipos heterozigotos nos *loci Est-2* e *Est-5*, a frequência dos alelos, estimada nas quatro populações, foi similar e determinou uma baixa diferenciação genética, entre as populações de *S. rebaudiana* ($F_{ST} = 0,0195$; Tabela 4). De acordo com Wright (1978), valores de F_{ST} igual ou inferior a 0,05 indicam uma divergência interpopulacional baixa.

Tabela 4. Parâmetros de diversidade genética para as plantas, das 4 populações de *Stevia rebaudiana*.

Locus	N	F_{is}	F_{IT}	F_{ST}	N_m
<i>Est-2</i>	428	-0,0407	-0,0161	0,0237	10,2939
<i>Est-5</i>	428	-0,0013	0,0156	0,0169	14,5167
Média	428	-0,1162	0,0036	0,0195	12,5713

N=número de indivíduos amostrados; F_{is} =coeficiente de endogamia; F_{IT} =déficit de heterozigotos; F_{ST} =proporção da diversidade gênica entre os acessos; N_m =fluxo gênico entre os acessos.

Esta baixa diferenciação, encontrada entre as quatro populações, indica que a introgressão de genes nas populações P1 e P3, feita pela introdução de mudas de sementes de outras regiões, é um fator que pode contribuir para a baixa diferenciação entre populações. A alta variabilidade genética, estimada dentro de cada população, também pode ser um fator determinante da baixa diferenciação, entre as populações, e a origem comum dos genótipos introduzidos no Brasil (efeito fundador), pode determinar um nível baixo de diferenciação, entre as plantas das quatro populações.

Desta forma, é possível concluir que o processo de seleção para a formação das populações de *S. rebaudiana*, com finalidades comerciais, tem conduzido à formação de progênies, pouco diferenciadas das populações, cuja finalidade é simplesmente, a manutenção do germoplasma original (população P1, por exemplo), para os dois *loci*, *Est-2* e *Est-5*, analisados. Em termos práticos, a baixa diferenciação entre as quatro populações de estêvia, implica que uma amostra de qualquer uma das quatro populações, pode representar a variabilidade genética, presente nos *loci* de α/β -esterases.

O excesso de genótipos heterozigotos, nas quatro populações, está indicado pelo valor negativo do coeficiente $F_{IS} = -0,1162$ (Tabela 4). O valor negativo para F_{IS} , indica um excesso de 11,62% de genótipos heterozigotos. Uma seleção artificial de genótipos heterozigotos, bem como, uma suposta vantagem adaptativa dos heterozigotos (MITTON, 1989), ou até mesmo a falta de material geneticamente diferenciado, poderiam explicar os valores negativos para F_{IS} .

O valor positivo e baixo para o coeficiente F_{IT} ($F_{IT} = 0,0036$), indicado na Tabela 4, que reflete a endogamia global, determinada por cruzamentos, não causais presente nas populações (WRIGHT, 1975), deve estar relacionado com a forma de polinização aberta e cruzada, predominante nas quatro populações de *S. rebaudiana*, analisadas no presente estudo. O sistema reprodutivo, como a forma de dispersão de genes em plantas, é o fator que influencia a distribuição da variação genética (LOVELESS; HAMRICK, 1984; HAMRICK; GODT, 1989). Em geral, as espécies que realizam polinizações cruzadas, apresentam maior variação genética, dentro das populações e menor diferenciação, entre as populações, do que as populações que realizam autofecundação.

As relações de similaridade e dissimilaridade, entre as plantas das quatro populações de *S. rebaudiana*, apresentaram valores de identidade, variando de 0,9816 (entre as plantas da população P3 e as plantas da população P1) a 0,9930 (entre as plantas da população P2 e as plantas da população P4) (Tabela 5), indicando uma base genética estreita para a espécie.

Desta forma, o efeito do genótipo fundador, nas populações de estévia introduzidas no Brasil, determina a grande similaridade, entre as populações. De modo que, a introdução e/ou troca de mudas, entre produtores brasileiros, na formação das diferentes populações, pareçam não ser suficientes para ampliar a base genética da espécie.

A indicação de uma base genética, estreita para as populações de estévia, é uma informação importante, no que se refere a projetos que visem o melhoramento genético da espécie. Para ampliar a base genética de estévia, uma alternativa seria buscar novos genótipos no centro de origem.

Tabela 5. Coeficiente de similaridade e distância genética de Nei (1978), entre as quatro populações analisadas. Os coeficientes foram calculados, a partir de dois loci (*Est-2* e *Est-4*) analisados para isoesterases.

População				
	P2	P3	P4	P1
P2	*****	0,9839	0,9930	0,9920
P3	0,0163	*****	0,9827	0,9816
P4	0,0070	0,0175	*****	0,9822
P1	0,0081	0,0186	0,0180	*****

O número de isozimas esterases, identificadas no presente estudo em folhas de *S. rebaudiana*, foi menor que o número de α - e β - esterases identificadas no sistema PAGE. Utilizando-se, de diversos e diferentes tecidos de outras espécies de plantas (PEREIRA et al., 2001; CARVALHO et al., 2003; FARIA, 2006; ORASMO et al., 2007; FRIGO, 2008). Consequentemente, o número de loci analisado em folhas de *S. rebaudiana*, também foi menor.

Entretanto, a evidência de polimorfismo e dos alelos, identificados nos *loci Est-2* e *Est-5*, são importantes para estimar a diversidade genética nesta espécie, e para verificar de que forma, as diferentes populações de *S. rebaudiana* cultivadas, estão estruturadas. Além disso, os alelos encontrados poderão ser utilizados, como marcadores bioquímicos moleculares, para acompanhar e/ou orientar processos de seleção artificial, em programas de seleção de genótipos de interesse, ou em programas de melhoramento genético da espécie.

Viana (1979), estudando o crescimento de plantas e o conteúdo de esteviosídeo e proteínas, em folhas de estévia submetidas a dois fotoperíodos, verificou que plantas que cresceram recebendo 8 horas/luz, produziram 400µg de esteviosídeo. Enquanto plantas sob fotoperíodo de 16 horas/luz, produziram 2.000µg, indicando que os teores de edulcorantes nas folhas, sofrem influência do ambiente e que o marcador bioquímico, quantificação de compostos, o mais utilizado para discriminação de genótipos, no melhoramento genético, pode levar a um resultado equivocado.

Portanto, é importante e interessante, o uso de uma ferramenta, que consiga inferir, de forma mais objetiva, independentemente de influências ambientais, a característica do genoma no material analisado. Atualmente, os esforços do melhoramento genético têm sido concentrados, na busca por plantas com maiores proporções de rebaudiosídeo A/Esteviosídeo, sendo que a característica, de maior produção de rebaudiosídeo A, é uma herança monogênica (BRANDLE; ROSA. 1992).

Esta informação, caracteriza a importância de se conhecer a estrutura alélica da estévia, na tentativa de se buscar correlacionar estes com os fenótipos de maiores proporções. Para que estes indivíduos sejam direcionados, para análises de quantificação de teores, e introduzidos em jardins clonais, e/ou em programas de melhoramento genético.

Uma vez conhecidos os *loci*, e a distribuição dos alelos nestes *loci* de *S. rebaudiana*, é possível agregar à eletroforese às técnicas de extração e à quantificação dos edulcorantes, presentes nas folhas, para buscar uma correlação positiva, a fim de se realizar uma seleção dirigida, para a formação e/ou manutenção de novos campos produtivos.

O entendimento da estrutura genética das populações de estévia, é um aspecto importante, porque pode prover estratégias de cultura diferencial para populações, com maior ou menor nível de heterozigosidade. O conhecimento e controle da diversidade genética, pode ser um requerimento necessário, para direcionar o desenvolvimento de estratégias efetivas, para a seleção de parentais, em programas de melhoramento genético, e à proteção de cultivares com características agronômicas de interesse.

A análise do polimorfismo das α - e β -esterases, em folhas de estévia neste estudo, justifica e direciona uma proposta de aplicar a metodologia, desenvolvida no presente estudo, para a investigação de mais variedades de *S. rebaudiana*, para o conhecimento e divulgação de informações, sobre a estrutura genética das populações desta espécie.

5. CONCLUSÕES

A) A análise do polimorfismo de α - e β -esterases, em folhas de estévia, mostrou que a pressão de seleção, adotada em populações cultivadas, para fins comerciais, não tem reduzido a diversidade genética na espécie, considerando o nível alto de heterozigosidade observada nestas populações.

B) A proporção alta de *loci* para α - e β -esterases e o nível alto de heterozigosidade, verificado nas populações cultivadas de estévia, são fatores que estimulam a organização de programas de melhoramento genético, para esta espécie; mas, para isso é importante buscar novos alelos no centro de origem da espécie, no sentido de ampliar a base genética estreita. verificada nas populações de estévia.

C) Como foi indicado uma baixa diferenciação genética, entre as quatro populações de estévia, qualquer uma delas pode ser usada, como fonte de material (amostras), para representar a diversidade genética da espécie, no que se refere ao polimorfismo nos *loci* para α - e β -esterases; amostras de qualquer uma das quatro populações, pode representar a diversidade genética das isozimas α - e β -esterases.

D) Em razão da indicação, de que as quatro populações de estévia são geneticamente pouco diferenciadas, as estratégias e/ou alternativas de manejo das culturas (para indução de aumento na produção, ou controle de pragas e doenças, por exemplo) podem ser similares para as quatro populações.

E) O polimorfismo dos quatro alelos, em cada um dos *loci Est-2* e *Est-5*, nas folhas de plantas de estévia, pode ser usado como marcador bioquímico, para originar e monitorar a uniformidade e homogeneidade, em cultura de clones de plantas, com características agronômicas de interesse, propagadas via multiplicação vegetativa.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

AHMED, M.S.; DOBBERSTEIN, R. H. High-performance liquid chromatographic separation and quantitation of stevioside, rebaudioside A and rebaudioside C. **Journal of Chromatography**, v. 236, p. 523-526, 1982.

ALFENAS, A.C.; PETERS, I.; BRUNE, W.; PASSADOR, G. C. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 1991.

ALLENDORF F.W.; LUIKART, G. Units of conservation. In: Conservation and the genetics of populations. **Blackwell Publishing**, Oxford, p.380-420. 2007.

ALVAREZ, M. *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni: estado atual do conhecimento. Maringá, Universidade Estadual de Maringá, 1984.

ANGELUCCI, E. Adoçantes e Edulcorantes. Seminário Brasileiro sobre *Stevia Rebaudiana* (Bert.) Bertoni, Campinas, 1986.

ANAMI, E.T. **Caracterização e divergência genética em clones de estévia (*Stevia rebaudiana* Bert. Bertoni)**. Tese de doutorado, Universidade Estadual de Maringá, 65 p., 2008.

BOREM, A.; CAIXETA, E. T. **Marcadores moleculares** Viçosa, 2006.

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

BREWER, G.L.; SING C.F. **An introduction to isozyme techniques**. New York: Academic Press, 1970.

BROWN, A.H.D. Enzyme polymorphism in plant populations. **Theoretical Population Biology**, v.15, p. 1-42, 1978.

BROWN, A.H.D.; CLEGG, M.T.; KAHLER, A.L.; WEIR, B.S. **Plant population genetics, breeding and germplasm resources**. Sunderland: Sinauer Associates, p. 43-63 1989.

BRÜCHER, H. Paraguays "SüBstoff" – Pflanze *Stevia rebaudiana*. **Naturw. Rdsch.** n. 6, p.231-233, 1947.

CÂNDIDO, L.M.B.; CAMPOS, A.M.; **Alimentos para fins especiais – dietéticos**. 1ª Edição, São Paulo, Livraria Varela Ltda, 1996.

CARNEIRO, J.W.P. *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni: produção de sementes. Maringá: UEM, 1990. 95p.

CARVALHO, M.A.M.; ZAIDAN, L.B.P. Obtenção de plantas de *Stevia rebaudiana* através de estacas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.30, p.201-206, 1995.

CARVALHO, V.M.; MARQUES, R.M.; LAPENTA, A.S.; MACHADO, M.F.P.S. Functional classification of esterases from leaves of *Aspidosperma polyneuron* M. Arg. (Apocynaceae). **Genetics and Molecular Biology**, v.26, p.195-198, 2003.

CONKLE, M.T.; HODGSKISS, P.D.; NUNNALLY, L.B.; IMRIE, B. C. *Starch gel electrophoresis of conifer seeds: a laboratory manual*. Berkeley: USDA, Forest Service, 1982. 18 p.

DIETRICH, S.M.C. História da *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. I Seminário Brasileiro Sobre a *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni, 1981.

EMPRAPA. **Sistemas de Produção Stévia**. Mato Grosso do Sul, 2004.

FARIA, J.S. **Esterases para a análise de variabilidade genética em acessos de *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae)**. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Maringá, 64 p., 2006.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3º Ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEM, 1998.

FERREIRA, C.M.; HANDRO, W. Observações de variantes genotípicas de *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni a partir da cultura de tecidos. **II Seminário sobre *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni**. Campinas. VII, p.1-2, 1982.

FERRIER, R.J.; COLLINS, P.M. **Monossaccharide chemistry**, 1º ed. Harmondsworth, Midelessex England, Penguin Books, 1972.

FILGUEIRA, F.A.R. Asteráceas. **In: Manual de olericultura**. 3. ed. Viçosa, Editora Universidade Federal de Viçosa, 2000. p. 289-295.

FILHO, O.F.L.; VALIOS, A.C.C.; LUCAS, Z.M. **Sistemas de produção de *Stevia***. Embrapa Agropecuária Oeste. Steviafarma Industrial S/A. Dourados, março 2004.

FREDERICO, A.P. **Estudo citogenético em plantas do gênero *Stevia*. (*Asteraceae*)**. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Londrina, 109p., 1994.

FRIGO, M.J.; MANGOLIN, C.A.; OLIVEIRA JR.; R.S.; MACHADO, M.F.P.S. Esterase Polymorphism for analysis of genetic diversity and structure of wild poinsettia (*Euphorbia heterophylla*) populations. **Weed Science**, v.57, p.54-60, 2009.

GAUER, P.M.; SLINKARD, A.E. Inheritance and linkage of isozyme coding genes in chickpea. **Journal of Heredity**, v.81, p.455-461, 1990.

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

HAMRICK J.L.; GODT, M.J.W.; KAHLER, A.L; WEHRHAHN C.F. Allozyme diversity in plant species. In: Associations between quantitative traits and enzyme loci in the F2 population of a maize hybrid. **Theoretical Applied Genetics** v.74, p.15-26, 1986.

KERBAUY, G.B. Propagação “in vitro” de *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. II **Seminário Sobre *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni**. Campinas, SP, v.1, p. 1-3, 1982.

JARMA, A.; RENGIFO, T.; TATIS, H.A.; Aspectos fisiológicos de *Stevia rebaudiana* (Bertoni) na Colômbia Caraíbas. Efeito da radiação incidente a área foliar e da distribuição da biomassa. **Agronomia Colombiana**, Colômbia, v.23, n.2, p. 207-216, 2005.

LEWONTIN, R.C.; HUBBY, J.L. A molecular approach to the study of genetic heterozygosity in natural populations. II. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*. **Genetics**, v.54, p.595-609. 1966.

LIMA FILHO, O.F.; MALAVOLTA, E.; Estimativa da área foliar em estêvia (*Stevia rebaudiana* Bert. Bertoni), **Ciência e Agrotecnologia**, v.21, n.2, p.228-232, 1997.

LOVELESS, M.D.; HAMRICK, J.L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v.15, p.65-95, 1984.

MACHADO, M.F.P.S.; OLIVEIRA-COLLET, S.A.; MANGOLIN, C.A. **Expressão gênica no desenvolvimento de tecidos vegetais *in vitro***. Maringá: EDUEM, 1999.

MARKET, C.L.; MOLLER, F. Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenetic, and species specific patterns. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.45, p.753-763, 1959.

METIVIER, J.; VIANA, A.M. Determination of microgram quantities of stevioside from leaves of *Stevia rebaudiana* Bert. by two-dimensional thin layer chromatography. **Journal of Experimental Botany**, p.311, 1979.

MITTON, J.B.; LINHART, K.B.; STURGEON, J.; HAMRICK, L. Allozyme polymorphisms detected in mature needle tissue of ponderosa pine. **Journal of Heredity**, n.70, p.86–89, 1979.

MIZUKAMI, H.; SHIIBA, K.; OHASHI, H. Effect of temperature on growth and Stevioside formation of *Stevia rebaudiana*. **Shoyakugaku Zasshi**, v.37, p.175-179, 1993.

MOURÃO, D. M. Você sabia que adoçantes dietéticos podem ser calóricos? Idmed, 2008. Disponível em: <http://idmed.com/nutricaoMateria.php?sessao=nutricao> Acesso em 15 de junho de 2009.

ORASMO, G.R.; OLIVEIRA-COLLET, S.A., LAPENTA, A.S.; MACHADO, M.F. P.S. Biochemical and genetic polymorphism for carboxylesterase and acetyesterase in grapes clones of *Vitis vinifera* L. (Vitaceae) cultivars. **Biochem Genet**, v.9/10, p.663-670, 2007.

PANPATIL, V.V.; POLASA, K. Assessment of stevia (*Stevia rebaudiana*)-natural sweetener: A review. **Journal of Food Science and Technology**, v.45, p.467–473, 2008.

PASTEUR, N.; PASTEUR, G.; BONHOMME, F.; CATALAN. J.; BRITTON-DAVIDIAN, J. **Practical isozyme genetics**. EllisHorwood, Chichster, UK. 1988.

PATRÃO, A.; CUNHA, A.; CELLOTO, V.; SOUTO, E.; GONÇALVES, R.; OLIVEIRA, A. **Comparação de diferentes metodologias para obtenção de cultura de calos de *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni** - DOI: 10.4025/actascihealthsci.1090. **Acta Scientiarum Health Science**, Brasil, 29 março, 2008. Disponível em:

<<http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciHealthSci/article/view/1090/535>>

Acesso em: 02 fev. 2010.

PEREIRA, A.J.; LAPENTA, A.S.; VIDIGAL-FILHO, P.S.; MACHADO, M.F.P.S. Differential esterase expression in leaves of *Manihot esculenta* Crantz infected by *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. **Biochem Genet**, v.39, p.289-296, 2001.

PIERCE, L.C.; BREWBAKER, J.L. Applications of isozyme analysis in horticultural science. **HortScience**, St. Joseph, v.8, n.1, p.17-22, 1973.

RANDI, A.M., FELIPPE, G.M. Efeito de temperatura, luz e reguladores de crescimento na germinação de *Stevia rebaudiana* Bert. **Ciência e Cultura**, v. 33, p.404 - 411, 1982.

RANK, A.H.; MIDMORE, D.J. Stevia – An intense, natural sweetener. Laying the groundwork for a new rural industry. Australian Government. RIRDC - Rural Industries Research and Development Corporation. 2006.

SAKAGUCHI, M.; KAN, T. As pesquisas japonesas com *Stevia rebaudiana* (Bert) Bertoni e o esteviosídeo. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v.34, n.2, p. 235-248, 1982.

SATO, M.; KAWATANI, T. Cytological studies of artificial tetraploid in *Stevia rebaudiana* Bertoni. Jap. **Journal of Crop Science**, n.25, p.88-89, 1975.

SUMITA, T. Studies on *Stevia rebaudiana* Bertoni as a new possible crop for sweetening resource in Japan. **Nooji Shi Shiken Jhoo Hookuko**, v.31, p.1-17, 1980.

SCANDALIOS, J.G. Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants. **Biochemical Genetics**, v.3, p.37-79, 1969.

SHOCK, C.C. Experimental Cultivation of Rebaudi's Stevia in California. **Agronomy Progress Report**. Univ. of California, n. 122, April. 1982.

STEVIAFARMA INDUSTRIAL S/A. Departamento Comercial, Dossiê técnico comercial. **Adoçantes naturais da Stevia**. Maringá, maio, 1993.

STAUB, J.E.; SERQUEN, F.E.; GUPTA, M. Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. **HortScience**, v.35, p. 729–741, 1996.

TANKSLEY, S.D.; MEDINA-FILHO, H.; RICK, C. Use of naturally- occurring enzyme variation to detect and map genes controlling quantitative traits in an interspecific backcross of tomato. **Heredity** n.49, p.11-25, 1982.

TATEO, F.; MARIOTTI, M.; BONONI, M.; LUBIAN, E.; MARTELLO, S.; CORNARA, L. Stevioside content and morphological variability in a population of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni from Paraguay. **Italian Journal Of Food Science**, v.10, p.261-267, 1998.

TATEO, F.; ESCOBAR SANCHEZ, M.L.; BONONI, M.; LUBIAN, E. Stevioside content of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni grown in east Paraguay. **Italian Journal Of Food Science**, v.11, p.265-270, 1999.

UTSONOMIYA, T. Cultivation of Stevia containing sweetening agents. **Nogyo Oyobi Engei**, v.52, p.543-547, 1977.

VIANA, A.M. **Estudos sobre crescimento e conteúdo de esteviosídeo, açúcares solúveis totais e proteína de folhas de *Stevia rebaudiana* Bert. em dois fotoperíodos**. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas Instituto de Biologia, 1979.

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

YEH, F.C.; BOYLE, T.; RONGCAI, Y.; YE, Z.; XIYAN, J. M. Popgene Version 1.32. Microsoft Windows-based freeware for population genetic analysis, 1999.

WRIGHT, S. **Evolution and the genetics of populations**. Chicago:University of Chicago, 1975. v. 2.: (The theory of gene frequencies).

ZUBIATE, I. F. **Agricultura** - Artículo: Manual del Cultivo de La Stevia Avenida La Universidad 238, p. 206, La Molina. Lima. Peru, 2006.

ZHANG, S.Q.; KUMAR, A.; KUTOWY, O. Membrane-based separation scheme for processing sweeteners from stevia leaves. **Food Research International**, v. 33, p. 617-620, 2000.

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](#)