

# OBTENÇÃO DE PLANTAS DE *STEVIA REBAUDIANA* ATRAVÉS DE ESTACAS<sup>1</sup>

MARIA ANGELA MACHADO DE CARVALHO e LILIAN B. P. Z AidAN<sup>2</sup>

**RESUMO** - A capacidade de enraizamento de estacas de *Stevia rebaudiana* foi avaliada mensalmente, durante um ano. Observou-se maior percentagem de sobrevivência de estacas entre maio e outubro e de enraizamento entre maio e julho, quando as plantas apresentavam ramos jovens, oriundos de brotação. Durante o período reprodutivo das plantas matrizes, a percentagem de enraizamento foi baixa. Aplicação de AIB promoveu enraizamento em agosto e setembro e formação de maior número de raízes, enquanto AIA e ANA foram eficazes apenas em agosto. Estas substâncias não alteraram a sobrevivência das estacas. Produtos comerciais utilizados como enraizadores, apesar de conterem substâncias auxínicas, foram ineficientes na indução do enraizamento. A análise de açúcares solúveis totais (entre os quais encontra-se o esteviosídeo), em folhas de plantas obtidas por germinação ou por estacas tratadas ou não com substâncias promotoras de enraizamento, revelou que não houve variações significativas relacionadas à origem das plantas.

Termos para indexação: enraizamento, esteviosídeo.

## PROPAGATION OF *STEVIA REBAUDIANA* FROM STEM CUTTINGS

**ABSTRACT** - Rooting capacity of stem cuttings of *S. rebaudiana* was measured monthly during an one-year period. Highest percentages of live cuttings were found between May and October while rooting occurred preferentially from May to July, when new branches were used as cuttings. During the reproductive phase of the matrix plants rooting percentage was low. IBA promoted rooting and increased root number in August and September, whereas IAA and NAA were effective only in August. These substances had no effect on the survival of cuttings. Commercially available rooting products containing auxin-like substances were inefficient in inducing roots. Analysis of total soluble sugars (stevioside here included) present in leaves of plants obtained either from germination or stem cuttings pre-treated with root promoting substances showed no significant variation in relation to the origin of plants.

Index terms: rooting, stevioside.

## INTRODUÇÃO

*Stevia rebaudiana* é uma planta herbácea perene, pertencente às Asteraceae, subtribo Eupatorieae. Os indígenas paraguaios já utilizavam suas folhas para adoçar o mate, e desde o final do século XIX encontram-se referências na literatura sobre o poder edulcorante dessa espécie (Lewis, 1992). Esse sabor doce, várias vezes maior que o da sacarose, foi atribuído inicialmente apenas ao glicosídeo

esteviosídeo (Felippe, 1977); após 1970, outros compostos com propriedades edulcorantes foram extraídos e identificados (Handro & Ferreira, 1989).

No Japão, adoçantes extraídos de *S. rebaudiana* são usados em larga escala, em alimentos sólidos ou líquidos e como substitutos de açúcares convencionais ou dietéticos artificiais (Kinghorn & Soejarto, 1985). Essa demanda gerou a necessidade de instalar culturas comerciais para fornecimento de folhas para produção de adoçantes não-calóricos, tanto no Japão como em outros países, entre os quais o Brasil.

A propagação da espécie através de sementes é a mais utilizada, apesar da baixa percentagem de aquênios viáveis produzidos (Felippe & Lucas, 1971;

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 10 de novembro de 1994.

<sup>2</sup> Bióloga, Doutora em Ciência, UNICAMP, Seção de Fisiol. e Bioq. de Plantas, Inst. de Botânica, Caixa Postal 4005, CEP 01061-970 São Paulo, SP.

Felippe et al., 1971; Monteiro, 1980). Esse método impede a seleção imediata de populações homogêneas e altamente produtivas. Para isto, técnicas de cultura de células e de tecidos, e de micropropagação têm sido usadas com sucesso em *S. rebaudiana* (Handro et al., 1977; Ferreira & Handro, 1988a, 1988b; Handro & Ferreira, 1989; Bepalhok Filho et al., 1992), porém ainda são de uso restrito.

O presente estudo teve por finalidade obter plantas de *S. rebaudiana* através de estacas, em diferentes tipos de substratos e com adição de substâncias enraizadoras de uso laboratorial e comercial. Objetivou-se, ainda, verificar o efeito dessas substâncias no teor de esteviosídeo nas plantas obtidas por estaquia.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material vegetal

Utilizaram-se estacas apicais dos ramos vegetativos de plantas adultas de *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni, cultivadas em canteiros experimentais no Instituto de Botânica de São Paulo.

### Preparo das estacas

Estacas caulinares apicais medindo 8 cm de comprimento foram preparadas retirando-se algumas folhas para impedir transpiração excessiva. Em seguida, as estacas (15 por tratamento) foram colocadas no escuro por 24 horas, com a região basal imersa em soluções aquosas contendo ácido indolil-3-acético (AIA -  $2 \times 10^{-4}M$ ,  $1 \times 10^{-4}M$  e  $1 \times 10^{-5}M$ ), ácido indolil-butírico (AIB -  $5 \times 10^{-5}M$ ,  $1 \times 10^{-5}M$  e  $5 \times 10^{-6}M$ ) ácido naftalenoacético (ANA -  $3 \times 10^{-4}M$ ,  $6 \times 10^{-5}M$  e  $6 \times 10^{-6}M$ ) ou água destilada (controle).

Após este período, as estacas foram lavadas com água destilada e plantadas em bandejas de plástico contendo uma mistura de terra de mata: vermiculita (1:1 v/v) umedecida com água destilada. As bandejas, colocadas em condições de casa de vegetação e fotoperíodo natural, foram cobertas com vidros transparentes, que eram retirados por curtos períodos de tempo no decorrer do dia para permitir melhor aeração. As percentagens de enraizamento e de sobrevivência das estacas foram registradas após 14 dias. As estacas enraizadas foram transplantadas para sacos de plástico, e, após um mês, transferidas para canteiros. Os experimentos de enraizamento foram realizados mensalmente, durante um ano.

### Determinação do conteúdo de açúcares solúveis totais

Folhas de plantas obtidas por estaquia no mês de maio, através de tratamentos com substâncias promotoras de enraizamento, foram coletadas, considerando-se apenas cada composto, independentemente da concentração inicialmente aplicada para obtenção das estacas. As amostras foram feitas nos meses de agosto, outubro e dezembro, e submetidas a secagem em estufa a 80 °C, até peso constante. Em seguida, procedeu-se à extração de açúcares solúveis totais, em triplicata, com metanol: clorofórmio: água (12:5:3, v/v), de acordo com Bielecki & Turner (1966). Os extratos foram clarificados pela adição de clorofórmio e água, seguida de centrifugação para separação da fase aquosa, que contém os açúcares solúveis.

O esteviosídeo presente nos extratos foi identificado por cromatografia bidimensional em camada delgada em placas de silicagel (Metivier & Viana, 1979a), com dois sistemas de solventes: n-butanol:acetato de etila:isopropanol:água (35:100:60:30, v/v) (sistema I), e acetato de etila:ácido acético:água (8:4:1, v/v) (sistema II). Utilizou-se, como padrão, esteviosídeo purificado, cedido por E. Angelucci (ITAL, Campinas). A revelação dos açúcares foi feita nebulizando-se as cromatoplaças com uma solução de antrona 0,2% em ácido sulfúrico, e em seguida aquecendo-as por 10 min, a 110 °C.

O método de fenol-sulfúrico (Dubois et al., 1956) foi aplicado para determinação do teor de açúcares solúveis totais, utilizando-se esteviosídeo como padrão. Os resultados foram submetidos a análise de variância, determinando-se a diferença mínima significativa (DMS) a 5% pelo teste Tukey.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um dos fatores que influenciam o enraizamento de estacas é o substrato utilizado no processo, pois deste depende a capacidade de retenção de água e a oxigenação do meio. Embora outros tipos de substrato (palha de arroz, areia, vermiculita, esfagno, terra de mata) tenham sido ensaiados, isoladamente ou combinados, optou-se por utilizar terra de mata misturada à vermiculita, em proporções iguais, o que favoreceu tanto a sobrevivência como o enraizamento das estacas. Experimentos preliminares indicaram que estacas apicais enraizam melhor e mais rapidamente que estacas subapicais.

A Fig. 1 mostra as percentagens de sobrevivência e de enraizamento de estacas a cada mês, pelo período de um ano. Observa-se que as estacas

apresentaram variações quanto aos dois parâmetros analisados. De maio a outubro, a sobrevivência das estacas foi superior a 50%, o mesmo ocorrendo em janeiro e fevereiro. A capacidade de enraizamento das estacas também não foi uniforme, tendo-se obtido percentagens mais elevadas apenas entre maio e julho. Esse período correspondeu à fase de intenso crescimento vegetativo das plantas matrizes, quando as estacas foram retiradas de ramos recém-formados (logo após a remoção dos órgãos aéreos senescentes). Sabe-se que a formação de raízes em estacas é dependente da idade e do estado fisiológico da planta matriz, da idade do ramo e também da espécie vegetal considerada (Dore, 1965). Maior capacidade de enraizamento foi observada em estacas retiradas de plantas de *Dioscorea composita* com um ano de idade e 0,2 cm de diâmetro em relação a estacas com dois anos e 0,5 cm de diâmetro (Viana & Felipe,

1988a). Por outro lado, a presença de gemas em crescimento ativo na estaca promove o enraizamento, ao passo que a presença de gemas dormentes (Hess, 1969) e de gemas florais (Viana & Felipe, 1987) inibem o processo.

Nas plantas matrizes utilizadas no presente trabalho, o período reprodutivo teve início na primavera, estendendo-se até abril. Após essa fase, os ramos apresentaram senescência e foram retirados por poda no final de abril. Seguiu-se uma fase de rebrota e intenso crescimento vegetativo, que coincidiu com o período de maior sobrevivência e enraizamento das estacas, isto é, de maio a julho (Fig. 1).

A capacidade de enraizar apresentada por estacas é determinada também pelo balanceamento de fatores nutricionais e de reguladores de crescimento (Nanda et al., 1971). Já é bem conhecido o papel das auxinas na iniciação de raízes adventícias. Esse efeito pode ser direto, atingindo as células onde se inicia o primórdio radicular (Haissig, 1970), ou indireto, favorecendo o movimento basípeto de nutrientes (Altman & Wareing, 1975). Em *S. rebaudiana*, a aplicação de substâncias auxínicas de modo geral não alterou a percentagem de sobrevivência das estacas. Apenas AIB  $10^{-5}$ M, nos meses de dezembro, fevereiro e março, afetou positivamente a sobrevivência das estacas (55%, 93% e 73%, respectivamente). Com relação ao enraizamento (Tabela 1), foi verificado que, em agosto, a aplicação de AIB, AIA e ANA, nas concentrações utilizadas, promoveu o enraizamento,

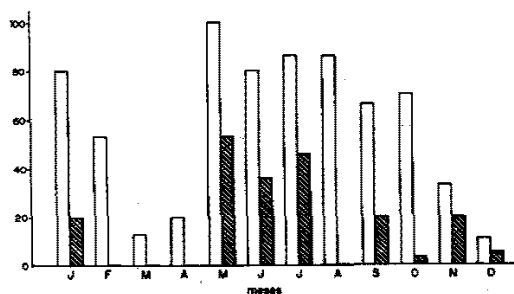


FIG. 1. Percentagens mensais de sobrevivência (□) e de enraizamento (▨) de estacas de *Stevia rebaudiana*.

TABELA 1. Percentagens de enraizamento de estacas de *S. rebaudiana* tratadas com substâncias auxínicas, nos diferentes meses do ano.

Tratamentos	Meses do ano											
	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
AIB $5 \times 10^{-5}$ M	20	0	0	0	26	0	40	80	50	3	0	0
$1 \times 10^{-5}$ M	6	0	0	0	73	0	53	53	50	6	0	22
$5 \times 10^{-6}$ M	26	0	0	0	46	0	33	40	46	16	0	0
AIA $2 \times 10^{-4}$ M	33	0	0	0	60	20	66	53	3	0	0	0
$1 \times 10^{-4}$ M	13	0	0	0	40	20	26	60	9	3	0	11
$1 \times 10^{-5}$ M	—	0	0	0	33	13	46	13	36	3	0	0
ANA $3 \times 10^{-4}$ M	6	0	0	0	46	0	6	13	6	0	0	11
$6 \times 10^{-5}$ M	6	0	0	0	26	0	40	33	16	6	0	0
$6 \times 10^{-6}$ M	—	0	0	0	40	20	53	20	20	6	0	0
H <sub>2</sub> O (Controle)	20	0	0	0	53	26	46	0	20	3	20	5

ao passo que em setembro houve promoção apenas nas estacas tratadas com AIB (Tabela 1). Entre fevereiro e abril, não se observou formação de raízes; esse período coincide com a fase final do processo de reprodução, ao qual segue a senescência. Observou-se que, em maio, a aplicação de substâncias auxínicas não promoveu o enraizamento das estacas jovens provenientes de ramos recém-brotados.

O AIB mostrou ser o regulador de crescimento mais eficiente, pois também promoveu a formação de maior número de raízes nas estacas, facilitando o estabelecimento das plantas em canteiro (dados não mostrados). Auxinas sintéticas, como AIB e ANA são utilizadas em horticultura preferencialmente ao AIA, por serem mais estáveis no tecido vegetal (Van Overbeek, 1952). O AIB foi notadamente eficiente na formação de raízes adventícias em estacas de *Pinus radiata* (Smith & Thorpe, 1975), *Prunus persica* (Fachinello et al., 1982) e *Dioscorea composita* (Viana & Felipe, 1988b).

Para uso em larga escala, recomendam-se produtos comerciais, que contêm a substância ativa no processo de enraizamento. A aplicação desses produtos não foi eficaz no enraizamento de estacas de *S. rebaudiana*, embora as concentrações utilizadas tenham sido as recomendadas pelos fabricantes.

Considerando os resultados obtidos com a aplicação de substâncias quimicamente puras e de produtos comerciais de reconhecida eficácia no enraizamento, conclui-se que as estacas de *S. rebaudiana* podem ser colocadas entre as que apresentam certa dificuldade para enraizar.

Em extratos de folhas de plantas obtidas por estaquia ou oriundas de germinação, verificou-se, através de cromatografia em camada delgada, que o esteviosídeo é o açúcar predominante. Usando-se desenvolvimento bidimensional com dois sistemas de solventes, o esteviosídeo foi identificado por comparação com um padrão, obtendo-se, nos dois compostos, valores semelhantes de R<sub>f</sub>, respectivamente: 0,51 e 0,52 no sistema de solventes I e 0,24 e 0,29 no sistema II.

Com base nesses resultados e na relação encontrada entre o teor de açúcares solúveis e esteviosídeo (Metivier & Viana, 1979b), o conteúdo de esteviosídeo em folhas foi estimado no presente

trabalho através do teor de açúcares solúveis totais (Tabela 2).

**TABELA 2.** Conteúdo de açúcar total em folhas de plantas de *S. rebaudiana* provenientes de germinação e de estacas tratadas com substâncias auxínicas, em três épocas do ano. Médias seguidas pela mesma letra não apresentam diferenças significativas entre si.

Origem das plantas	Açúcar solúvel total (% do peso seco)		
	Agosto	Outubro	Dezembro
Estacas/tratamento prévio			
H <sub>2</sub> O	14,22 Aab	15,46 Aa	19,43Ba
ANA	13,89 Aab	17,42 Ba	15,48 ABb
AIA	13,71 Aab	16,16 Ba	16,27 Bab
AIB	16,74 Aa	17,73 ABa	19,41 Ba
germinação	11,30 Ab	14,22 Ba	15,31 Bb

As letras maiúsculas comparam as diferentes épocas dentro de cada tratamento (horizontal).

As letras minúsculas comparam os diferentes tratamentos, dentro de cada época (vertical), DMS 5% (Tukey).

Os resultados indicam que as plantas obtidas por estaquia através dos diferentes tratamentos não apresentaram diferenças significativas no conteúdo de açúcares solúveis totais nas folhas coletadas em agosto e outubro. No entanto, algumas diferenças entre os tratamentos foram verificadas nas amostras de folhas coletadas no mês de dezembro.

Quando a comparação do conteúdo de açúcares totais foi feita dentro de um dado tratamento nos diferentes meses analisados, verificou-se que na maioria das vezes os dados obtidos relativos ao mês de agosto foram estatisticamente inferiores aos dos outros meses, em todos os tratamentos aplicados, incluindo as plantas obtidas por sementes, o que leva a supor que durante o ano ocorre uma variação no conteúdo de açúcares, e, portanto, também de esteviosídeo.

## CONCLUSÕES

1. É possível a obtenção de plantas de *S. rebaudiana* por estacas, recomendando-se a

utilização de estacas apicais retiradas em época de rebrota.

2. O teor de esteviosídeo nas folhas pode ser estimado através do teor de açúcares solúveis totais.

Agradecimentos - à FINEP, pelo auxílio concedido para a realização deste trabalho (Proc. 54/83/0212/00).

## REFERÊNCIAS

- ALTMAN, A.; WAREING, P.F. The effect of IAA on sugar accumulation and basipetal transport of <sup>14</sup>C-labelled assimilates in relation to root formation in *Phaseolus vulgaris* cuttings. *Physiologia Plantarum*, v.33, p.32-38, 1975.
- BESPALHOK FILHO, J.C.; VIEIRA, L.G.E.; HASHIMOTO, J.M. Fatores influenciando a micropropagação in vitro de gemas axilares de *Stevia rebaudiana* (Bert.), Bertoni. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v.4, p.59-61, 1992.
- BIELESKI, R.L.; TURNER, N.A. Separation and estimation of amino acids in crude plant extracts by thin layer electrophoresis and chromatography. *Analytical Biochemistry*, v.17, p.278-293, 1966.
- DORE, J. Physiology of regeneration in cormophytes. In: RHULAND, W. (Ed.). *Encyclopedia of Plant Physiology*. Berlin: Springer-Verlag, 1965. v.15, p.1-91.
- DUBOIS, M.; GILLES, K.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. A colorimetric method for the determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, v.28, p.350-356, 1956.
- FACHINELLO, J.C.; KERSTEN, E.; MACHADO, A.A. Efeito do ácido indolbutírico no enraizamento de estacas lenhosas de pessegueiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.17, p.247-242, 1982.
- FELIPPE, G.M. *Stevia rebaudiana* Bert.: uma revisão. *Ciência e Cultura*, v.29, p.1240-1248, 1977.
- FELIPPE, G.M.; LUCAS, N.M.C. Estudo da viabilidade dos frutos de *Stevia rebaudiana* Bert. *Hoehnea*, v.1, p.95-105, 1971.
- FELIPPE, G.M.; LUCAS, N.M.C.; BEHAR, L.; OLIVEIRA, M.A.C. Observações a respeito da germinação de *Stevia rebaudiana* Bert. *Hoehnea*, v.1, p.81-93, 1971.
- FERREIRA, C.M.; HANDRO, W. Micropropagation of *Stevia rebaudiana* through leaf explants from adult plants. *Planta Medica*, v.54, p.157-160, 1988a.
- FERREIRA, C.M.; HANDRO, W. Production, maintenance and plant regeneration from cell suspension cultures of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. *Plant Cell Reports*, v.7, p.123-126, 1988b.
- HAISSIG, B.E. Influence of indole-3-acetic acid on adventitious root primordia of brittle willow. *Planta*, v.95, p.27-35, 1970.
- HANDRO, W.; FERREIRA, C.M. *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni: production of natural sweeteners. In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.). *Biotechnology in agriculture and forestry*. Berlin: Springer-Verlag, 1989. v.7, p.468-487.
- HANDRO, W.; HELL, K.G.; KERBAUY, G.B. Tissue culture of *Stevia rebaudiana*, a sweetening plant. *Planta Medica*, v.32, p.115-117, 1977.
- HESS, C.E. Internal and external factors regulating root initiation. In: WITTINGTON, W.J. *Root Growth*. London: Butterworths, 1969. p.42-52.
- KINGHORN, D.; SOEJARTO, D.D. Current status of stevioside as a sweetening agent for human use. In: WAGNER, H., HIKINO, H., FARNSWORTH, N.R. (Eds.). *Economic and medicinal plant research*. London: Academic Press, 1985. v.1, p.2-52.
- LEWIS, W.H. Early uses of *Stevia rebaudiana* (Asteraceae) leaves as a sweetener in Paraguay. *Economic Botany*, v.46, p.336-337, 1992.
- METIVIER, J.; VIANA, A.M. Determination of microgram quantities of stevioside from leaves of *Stevia rebaudiana* Bert. by two dimensional thin layer chromatography. *Journal of Experimental Botany*, v.30, p.805-810, 1979a.
- METIVIER, J.; VIANA, A.M. The effect of long and short day length upon the growth of whole plants and the level of soluble proteins, sugars and stevioside in leaves of *Stevia rebaudiana* Bert. *Journal of Experimental Botany*, v.30, p.1211-1222, 1979b.
- MONTEIRO, R. *Taxonomia e biologia da reprodução da Stevia rebaudiana Bert.* Campinas: UNICAMP, 1980. Tese de Mestrado.
- NANDA, K.K.; JAIN, M.K.; MALHOTRA, S. Effect of glucose and auxins in rooting etiolated stem segments of *Populus nigra*. *Physiologia Plantarum*, v.24, p.387-391, 1971.

- SMITH, D.R.; THORPE, T.A. Root initiation in cuttings of *Pinus radiata* seedlings. **Journal of Experimental Botany**, v.26, p.193-202, 1975.
- VAN OVERBEEK, J. Agricultural application of growth regulators and their physiological basis. **Annual Review of Plant Physiology**, v.3, p.87-108, 1952.
- VIANA, A.M.; FELIPPE, G.M. Efeitos de fatores endógenos no enraizamento de estacas foliares de *Dioscorea composita* Hemsl. **Ciência e Cultura**, v.39, p.618-622, 1987.
- VIANA, A.M.; FELIPPE, G.M. Efeito do diâmetro do caule no enraizamento de estacas foliares de *Dioscorea composita*: translocação de IBA e IAA. **Revista Brasileira de Biologia**, v.48, p.985-990, 1988a.
- VIANA, A.M.; FELIPPE, G.M. Root formation in cuttings of *Dioscorea composita*. **Journal of Agricultural Science**, v.110, p.451-454, 1988b.