

AUREA MARIA RANDI

"GERMINAÇÃO DE *STEVIA REBAUDIANA* BERT."



Tese de Mestrado apresentada ao
Instituto de Biologia - Departa-
mento de Fisiologia Vegetal - da
Universidade Estadual de Campinas

Orientador: Gil M. Felipe

- 1980 -

Empréstimo Proibido

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Gil Martins Felipe pela sua dedicada o rientação, incentivo e amizade.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio financeiro, que tornou possível a realização deste trabalho.

Aos professores, funcionários e estagiários do Departamento de Fisiologia Vegetal da Universidade Estadual de Campinas, bem como às Dr^{as}. Therezinha S. Melhem e Sonia M. C. Dietrich do Instituto de Botânica de São Paulo, pelo apoio e a mizade.

À Jacinta de Fatima Prada Lourenço pelo seu cuiu dado na datilografia deste trabalho, executado na Seção de Fi- toecologia do Instituto de Botânica, a quem estendo meus agra- decimentos.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO.....	1
MATERIAL E MÉTODOS.....	19
MATERIAL.....	19
MÉTODOS.....	19
A. Germinação.....	19
B. Clarificação de aquênios de <i>Stevia</i>	27
C. Efeito do esteviosídeo em germinação.....	28
D. Extração de substâncias endógenas.....	29
1. Separação dos aquênios.....	29
2. Método de extração.....	30
3. Bioensaio utilizado.....	31
4. Revelação de substâncias endógenas por métodos químicos.....	32
E. Análise estatística.....	35
RESULTADOS.....	36
A. Germinação.....	36
1. Efeito de luz.....	36
1.1. Germinação em luz branca constante e <u>escuro</u> constante.....	36
1.2. Efeito de luzes de diferentes comprimen- tos de onda.....	37
1.3. Efeito de choques de vermelho.....	38

1.3.1.	Choques longos de vermelho em aquênios sem prévia embebição no escuro constante.....	38
1.3.2.	Choques curtos de vermelho após 48 horas de embebição no escuro.....	38
1.3.3.	Reversão vermelho-vermelho extremo....	38
1.3.4.	Reversão vermelho extremo-luz branca.....	39
1.3.5.	Reversão de vermelho pelo azul.....	39
2.	Efeito de temperatura.....	40
2.1.	Efeito de temperatura constante na germinação.....	40
2.2.	Efeito de temperaturas alternadas na germinação no escuro constante.....	41
2.3.	Choque de temperatura baixa.....	41
2.4.	Choque de temperatura alta.....	42
3.	Efeito de substâncias reguladoras de crescimento na germinação.....	43
3.1.	Efeito de ácido giberélico (GA ₃).....	43
3.2.	Efeito de 6 benzil adenina (6BA).....	43
3.3.	Efeito de ácido indol-3-acético (AIA).....	44
3.4.	Efeito de ácido 2-cloroetilfosfônico (Etre1).....	44
3.5.	Efeito de ácido abscísico (ABA).....	44
B.	Observação de aquênios clarificados.....	45
C.	Efeito de esteviosídeo em germinação.....	45
D.	Detecção de esteviosídeo.....	46
E.	Substâncias reguladoras de crescimento.....	47

1. Detecção por testes de crescimento.....	47
2. Revelação por métodos químicos.....	47
DISCUSSÃO.....	54
RESUMO.....	70
SUMMARY.....	72
BIBLIOGRAFIA.....	74

INTRODUÇÃO

O processo de germinação de sementes de plantas superiores envolve uma série de etapas que induzem uma semente quiescente, com um baixo conteúdo de água a apresentar um aumento geral da atividade metabólica e iniciar o desenvolvimento de uma plântula, a partir do embrião. O momento exato no qual a germinação termina e o crescimento começa é extremamente difícil de ser definido. Geralmente, a germinação é identificada pela protusão de alguma parte do embrião através da casca da semente, o que é resultado do crescimento. Em muitas sementes, observa-se inicialmente a protusão da radícula (BROWN, 1972).

*glucose
e glicose*

Em certos casos, uma semente viável pode não germinar. Os fatores que regulam o processo de germinação são chamados de agentes de germinação. Uma semente está quiescente quando não são fornecidos a ela os agentes necessários para que se desencadeiem os processos metabólicos que culminam com a germinação. Uma semente quiescente germinará quando submetida a condições favoráveis de umidade, temperatura e aeração, fatores esses chamados de agentes não específicos. Uma semente dormente requer estímulos ambientais específicos, nem sempre constantes, mas que determinam sua germinação. Os mecanismos inibitórios mais comuns na dormência de sementes incluem a impermeabilidade da casca, períodos de amadurecimento e fotoblastismo (sensibilidade à luz). A luz vermelha quebra a dormência de sementes fotoblásticas porque induz níveis adequados de fi-

tocromo na forma Fve, fitocromo vermelho extremo (JANN e AMEN, 1977).

O fotoblastismo de sementes já havia sido verificado há muito tempo, embora suas bases fisiológicas fossem desconhecidas. Em 1860, Caspary (SMITH, 1975) observara que sementes de *Bulliarda aquatica* não germinavam na ausência de luz.

Ainda no fim do século XIX e início do século XX havia evidências de que a luz branca afetava a germinação de dois modos: estimulando a germinação de certas sementes e inibindo a de outras. O fato da luz branca afetar a germinação de sementes levou a diversos experimentos, usando-se diferentes espectros luminosos. Comprimentos de onda abaixo de 290 nm inibiam a germinação de todas as sementes testadas. Comprimentos de onda entre 290 nm a 400 nm não apresentavam efeitos nítidos sobre a germinação. Entre 560 nm e 700 nm e especialmente luz vermelha, observou-se promoção da germinação (MAYER e POLJAKOFF-MAYBER, 1975).

São chamadas sementes fotoblásticas positivas as que germinam na presença de luz e fotoblásticas negativas as que germinam na ausência de luz.

FLINT e MCALLISTER (1935, 1937) usando sementes fotoblásticas positivas de alface, constataram que a promoção de germinação ocorria em luz vermelha com um pico a 670 nm e que a inibição máxima ocorria no vermelho extremo com um pico a 760 nm.

WAREING e BLACK (1957, 1958) e EVENARI, NEUMAN e STEIN (1957) mostraram que a luz azul poderia inibir a germinação, mas sob certas condições a luz azul poderia também esti-

mular.

BORTHWICK et al (1952) mostraram que sementes de alface cuja germinação havia sido estimulada pela luz vermelha poderiam ser inibidas pela subsequente iluminação com vermelho extremo.

O fitocromo, pigmento responsável pelas respostas fotoblásticas em sementes, existe em duas formas fotoconvertíveis: fitocromo vermelho (Fv) e fitocromo vermelho extremo (Fve). A forma ativa é o Fve, ou seja, quando sementes são embebidas sob luz vermelha, a 660 nm, o fitocromo que se achava na forma inativa Fv se converte para a forma ativa Fve determinando a germinação. Sob ação do vermelho extremo (730 nm) o fitocromo que estava na forma ativa Fve se converte à forma inativa Fv.

A alternância de exposição à luz vermelha ou ao vermelho extremo vai induzir promoção ou inibição da germinação sendo que a resposta final é determinada pela última exposição ou seja, luz vermelha na última exposição promove a germinação e vermelho extremo inibe. Na verdade, para se afirmar que determinado fenômeno está sob a ação do fitocromo, é preciso mostrar a reversão vermelho-vermelho extremo. Vários autores mostraram essas respostas em sementes de várias espécies como tomate e pepino (YANIV, MANCINELLI e SMITH, 1967), *Rumex obtusifolius* (ISIKAWA e FUJII, 1961; VICENTE, ENGELHARDT e SILBERSCHMIDT, 1962) e *Cucumis anguria* (NORONHA, VICENTE e SILBERSCHMIDT, 1971; NORONHA, VICENTE e FELIPPE, 1978).

Sementes fotoblásticas positivas quando secas, apresentam um certo nível de fitocromo na forma Fv. Fv não po-

de ser revertido a Fve na semente desidratada e por esse motivo é necessário um período de embebição que torne a semente mais sensível à luz, ou seja, ^{para que a luz cause} ~~ocorra~~ a reversão de Fv a Fve (KENDRICK, 1976). Há algumas evidências para a síntese de fitocromo em sementes. Em *Amaranthus*, KENDRICK e FRANKLAND (1968)⁷⁶ observaram duas fases no aumento do fitocromo em sementes embebidas a 25°C. A primeira ocorre entre a oitava e a décima hora e é seguida de uma fase de latência após a qual ocorre um grande aumento no nível de fitocromo, culminando com a germinação. A primeira fase é uma fase de reidratação do fitocromo já existente e a segunda fase é devido à síntese de fitocromo.

Stevia rebaudiana Bertoni é uma composta originária do Nordeste do Paraguai (BERTONI, 1899; BERTONI, 1918). No Brasil, essa planta foi encontrada no atual Estado do Mato Grosso do Sul, em Ponta Porã, na divisa com o Paraguai (SCHMELING, 1967).

Suas folhas possuem sabor marcadamente doce, fato esse já há muito conhecido pelos indígenas do Paraguai, que a chamam, em guarani, de ca-ã-jhei ou cá-ã-yupi (THOMAS, 1937) ou de kaa-he (FLETCHER, 1955), que quer dizer erva doce. Esses indígenas utilizam folhas secas e segmentos de caule de *Stevia* para adoçar bebidas (BERTONI, 1899; THOMAS, 1937; FLETCHER, 1955; BRÜCHER, 1974). Mulheres indígenas também utilizam infusões de folhas dessa planta para fins anticoncepcionais (PLANAS e KUC, 1968; BRÜCHER, 1974; AKASHI e YOKOYAMA, 1975).

Em 1900, REBAUDI referiu-se à existência de uma substância doce, extraída das folhas de *Stevia*, que declarou ser um glucosídeo, a glicirrizina (BERTONI, 1918; BRIDEL e LA-

VIEILLE, 1931a, b; BRÜCHER, 1971).

Inicialmente, Bertoni classificou a planta como *Eupatorium rebaudianum* (BRIDEL e LAVIEILLE, 1931a, c, d; ROBINSON, 1930).

Na Europa, a planta foi mencionada pela primeira vez no Kew Bulletin (GOSLING, 1901). Examinando o material fornecido por Gosling, os cientistas de Kew, baseando-se nas características florais da planta, acreditaram que ela fosse uma *Stevia* e não um *Eupatorium*. Em 1905, ao publicar uma tradução dos trabalhos de Rebaudi, Bertoni transferiu a planta do gênero *Eupatorium* para o gênero *Stevia* (FELIPPE, 1977a).

O esteviosídeo, um glucosídeo 300 vezes mais doce que a sacarose é a substância encontrada em *Stevia rebaudiana*, que lhe confere o sabor doce (BRIDEL e LAVIEILLE, 1931a, b, c, d).

Pelo fato das folhas de *Stevia rebaudiana* apresentarem grandes quantidades de esteviosídeo, cerca de 7 por cento do peso seco das mesmas (BRIDEL e LAVIEILLE, 1931a), essa planta passou a ter grande interesse econômico, visto que o esteviosídeo poderá ser utilizado como adoçante desprovido de valor calórico (POMARET e LAVIEILLE, 1931). Uma vez que os ciclamatos foram proibidos e a sacarina poderá ser retirada do mercado (COHEN, 1978) mais uma vez o esteviosídeo torna-se uma opção na substituição desses adoçantes sintéticos.

Como o esteviosídeo possui poder adoçante extremamente alto e não é fermentável pelo organismo humano (BERTONI, 1918; THOMAS, 1937; POMARET e LAVIEILLE, 1931) isso o torna vantajoso com relação ao açúcar comum e aos adoçantes sinté

ticos. É um adoçante em potencial para as indústrias de alimentos.

O interesse industrial pelo esteviosídeo é o fator que tem estimulado o cultivo de *Stevia rebaudiana* no Japão, Coréia do Sul e mesmo em algumas regiões do Brasil (FELIPPE, 1977b; FELIPPE, 1978).

No Japão foram realizadas várias pesquisas onde o esteviosídeo foi ministrado a ratos e foi mostrado que esse glucosídeo não é tóxico e não apresenta propriedades anticoncepcionais (AKASHI e YOKOYAMA, 1975a, b; KATO, 1975). Assim, nesse país já há produção comercial pela Toyo Menka Larisha Co. (PARKER, 1978) e há vários trabalhos que especulam sobre a possível utilização industrial como substituto do açúcar e sacarina (ISIMA, 1976; FELIPPE, 1977c; PARKER, 1978).
e Kukurina

ESTUDOS BIOQUÍMICOS EM *STEVIA REBAUDIANA*

Os estudos bioquímicos em *Stevia rebaudiana* tiveram início com Rebaudi, em 1900, quando este menciona um glucosídeo, nas folhas de *Stevia*, que chamou de glicirrizina (BERTONI, 1918; BRIDEL e LAVIEILLE, 1931a, b; BRÜCHER, 1974).

Em 1908, RASENACK cristalizou uma substância de sabor doce, das folhas de *Stevia*. Essa substância era solúvel em água, álcool etílico e dificilmente solúvel em acetona ou álcool metílico.

DIETERICH (1909) isolou duas substâncias doces de folhas e caules de *Stevia rebaudiana*, que chamou de eupatorine e rebaudine. Eupatorine era 150 vezes mais doce que a sa-

carose e solúvel em etanol, enquanto que rebaudine era 180 vezes mais doce que a sacarose e insolúvel em etanol.

A resolução do problema a respeito da substância doce presente em *Stevia rebaudiana* coube, entretanto, a BRIDEL e LAVIEILLE (1931a) que conseguiram cristalizar o esteviosídeo por meio de extração alcoólica-aquosa de folhas. Eles obtiveram 60 a 65 g desse glucosídeo por Kg de folhas secas de *Stevia*, que correspondem a 7 por cento do peso seco das mesmas. Verificaram que essa substância tinha sabor doce quando em pequenas doses, mas que se tornava amargo quando em grandes doses. O ponto de fusão dessa substância foi estabelecido entre 238-239°C. Essa substância era solúvel em etanol, metanol e água, porém insolúvel em éter de petróleo e clorofórmio. Esteviosídeo era a substância que DIETERICH (1909) chamava de eupatorine e rebaudine era constituída de uma mistura de esteviosídeo e substâncias orgânicas e inorgânicas.

Por meio de hidrólise com ácido sulfúrico 5 por cento a 100°C, durante tres horas, BRIDEL e LAVIEILLE (1931a, e) obtiveram uma fração glucosídica e outra não glucosídica. A aglucona é o isosteviol. A fração glucosídica apresenta apenas D-glicose. 40,38 por cento constituim-se de fração não glucídica e 67,08 por cento de glucídica. A hidrólise de esteviosídeo é possível também por via enzimática utilizando-se suco de hepatopâncreas de *Helix pomatia*, o que foi verificado pelos mesmos autores. Entretanto, a hidrólise enzimática apresentou uma diferença quando comparada à hidrólise ácida. Na primeira, obteve-se uma fração não glucídica denominada de esteviol e uma fração glucídica. Na segunda, a fração não glucídica foi deno-

minada de isosteviol (BRIDEL e LAVIEILLE, 1931c; WOOD et al, 1955), uma vez que esse tratamento provocou uma isomerização do esteviol a isosteviol. Os autores definiram a fórmula do esteviol como sendo $C_{20}H_{30}O_3$ e a do esteviosídeo como sendo $C_{38}H_{60}O_{18}$. A molécula do esteviosídeo seria constituída por uma molécula de esteviol ligada a tres moléculas de glucose.

Em 1931, a morte prematura de Bridel pôs fim à fase inicial de pesquisas bioquímicas sobre o esteviosídeo, que somente foram retomadas na década de 1950 pelo "National Institute of Arthritis and Metabolic Diseases", em Bethesda, Maryland. Na época, interesses médicos a respeito de substâncias antiartríticas incluíram estudos em *Stevia rebaudiana*, com o intuito de uma possível aplicação de substâncias extraíveis dessa planta para fins terapêuticos (FLETCHER, 1955). Dos estudos liderados por Fletcher, concluiu-se que o esteviosídeo não apresentava propriedades antiartríticas, mas avançaram os conhecimentos a respeito da estrutura química da substância (ANÔNIMO, 1956).

Apenas em 1963, a estrutura química do esteviosídeo pode ser completamente elucidada. Ficou constatado que o esteviol, aglucona do esteviosídeo, é um diterpeno tetracíclico ácido (MOSETTIG e NESS, 1955; WOOD et al, 1955; WOOD e FLETCHER, 1956; VIS e FLETCHER, 1956; DJERASSI, RINIKER e RINIKER, 1956; DOLDER et al., 1960; DJERASSI et al, 1961; ARYA, 1962; WATERS, BECKER e MOSETTIG, 1962; MOSETTIG et al, 1963).

Quanto à ligação das unidades de glucose à aglucona de esteviosídeo, verificou-se que duas unidades ligam-se entre si, por ligação tipo C-2, rara na natureza, e ao oxigê-

nio da aglucona, pelo carbono 1 de uma das unidades de glucose. A terceira unidade de glucose liga-se pelo carbono 1 ao grupo carboxílico da aglucona.

A *Stevia rebaudiana* apresenta outros glucosídeos de esteviol: esteviolbiosídeo, rebaudiosídeo A (2 por cento do peso seco) rebaudiosídeo B (0,07 por cento do peso seco) e dulcosídeo A e B, 30 vezes mais doce que a sacarose (SAKAMOTO et al., 1975; KOHDA et al., 1976; YAMASAKI et al., 1976; KOBAYASHI et al., 1977). O que difere esses glucosídeos do esteviosídeo são as ligações dos açúcares ao esteviol e a natureza química dos açúcares que se ligam à aglucona.

PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DO ESTEVIOSÍDEO

Em 1915, KOBERT atribuiu propriedades hemolíticas ao esteviosídeo aplicado a glóbulos sanguíneos humanos. Entretanto, essas propriedades foram desacreditadas por POMARET e LAVIEILLE (1931) que acreditavam que tal efeito fosse causado por impurezas presentes no esteviosídeo, o que evidenciava a existência de outras substâncias nas folhas de *Stevia*, que seriam responsáveis pelo poder de hemólise.

A toxicidade do esteviosídeo foi verificada também por esses autores que ministraram doses de esteviosídeo a cobaias, coelhos e galinhas. Em nenhum desses animais, o esteviosídeo causou distúrbios orgânicos, constatando-se ausência de toxicidade. Esses mesmos autores alegam que um homem de 60 quilos pode ingerir sem problemas 144 g de esteviosídeo em 48 horas. Essas evidências indicam que o esteviosídeo poderá ser

utilizado por pessoas portadoras de diabetes sacarino, uma vez que o poder hipoglicemiante de *Stevia rebaudiana* tem sido verificado em cães e coelhos (SCHMELING, 1967; SCHMELING, CARVALHO e ESPINOSA, 1976). POMARET e LAVIEILLE (1931), já haviam mostrado que o esteviosídeo ingerido não era hidrolisado no organismo, sendo eliminado como tal e dessa forma não tem valor energético.

AKASHI e YOKOYAMA (1975) mostraram certa toxicidade causada pelo esteviosídeo. Esses autores ministraram a ratos, extratos de folhas de *Stevia*, por sonda estomacal. Os animais apresentaram sintomas de paralisia, seguidos de morte, após duas horas. Quando, porém, se aplicou esteviosídeo puro, os animais apresentaram certa dificuldade em se locomover, mas se recuperaram. O pó de folhas de *Stevia* poderia apresentar efeitos deletérios ao organismo humano (FELIPPE, 1977a).

Infusão de folhas de *Stevia* é usada pelas mulheres indígenas do Paraguai, como anticoncepcional (PLANAS e KUĆ, 1968; BRÜCHER, 1974; AKASHI e YOKOYAMA, 1975).

Nos trabalhos realizados por PLANAS e KUĆ (1968) observa-se que o chá de folhas de *Stevia*, tal qual é usado pelas mulheres indígenas do Paraguai, reduziu em 80 por cento a fertilidade de ratas. Não se observou efeitos secundários nas ratas e descendentes. Os autores acreditam que não é o esteviosídeo, a substância anticoncepcional, mas sim outra substância presente nas folhas de *Stevia*.

PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DO ESTEVIOL

O esteviol, aglucona do esteviosídeo, é um diterpeno tetracíclico muito semelhante às giberelinas, de modo que poderia atuar como as mesmas (FELIPPE, 1977a). O esteviol estimulou o crescimento de mutantes de milho anão d-5 (RUDDAT, LANG e MOSETTIG, 1963; NITSCH e NITSCH, 1965) an-1 (KATSUMI et al., 1964) que é promovido especificamente por giberelinas. Apresentou o mesmo efeito das giberelinas promovendo a síntese da alfa-amilase, provocando a hidrólise do endosperma de cevada (OGAWA, 1975).

VÁLIO e ROCHA (1976) mostraram que o esteviol a tua como ácido giberêlico promovendo o alongamento do hipocôtilo de pepino e crescimento de feijão e ervilha. Entretanto, o esteviol não teve efeito em testes de alongamento de mutantes d-1 e d-2 de *Zea mays*, sensíveis a giberelinas, bem como em plântulas de arroz, hipocôtilo de pepino, ervilha anã e plântula de ipoméia (KATSUMI et al., 1964).

O esteviol não teve efeito em induzir o escape floral e a floração em *Kalanchöe gastonis-bonnierei*, partenocarpia e alongamento de caule em *Stevia rebaudiana* (VÁLIO e ROCHA, 1976).

Quanto à forma química, o esteviol é muito semelhante ao caureno, um dos intermediários da biossíntese de giberelinas. Para que os compostos derivados do caureno atuem biologicamente como giberelinas é imprescindível a ligação etilênica exocíclica (CH₂) do sistema de quatro anéis desses diterpenóides. Se houver substituição desse grupo por outro, no a-

nel D, o composto torna-se biologicamente inativo (KATSUMI et al., 1964). O isosteviol, provavelmente, por não apresentar esse tipo de ligação etilênica C16 - C17, no anel D, é biologicamente inativo (RUDDAT et al., 1963).

Devido à semelhança estrutural entre caureno e esteviol, sugeriu-se que este pudesse ser convertido em giberelinas quando aplicado a mutantes d-5 e an-1 de milho (KATSUMI et al., 1964). Ênfase foi dada quanto a esse aspecto. Conseguiu-se a incorporação de DL-Mevalonato de sódio 2-¹⁴C em esteviol (HANSON e WHITE, 1968). Também foi mostrado que caureno (BENNET, LIEBER e HEFTMANN, 1967; HANSON e WHITE, 1968) e ácido caurenóico (HANSON e WHITE, 1968) podem agir como precursores de esteviol em *Stevia*. A síntese de esteviol é impedida pelo AMO-1618 (cloreto de 4-hidroxi-5-isopropil-2-metil-fenil-trimetil-amônio-carboxilato de 1-piperidina), um inibidor da biossíntese de giberelinas que atua impedindo a ciclização do geranilgeranil pirofosfato (GGPP) e, portanto, a formação do caureno (DENNIS, UPPER e WEST, 1965; BARNES, LIGHT e LANG, 1969). O CCC (cloreto de 2-cloroetil-trimetil-amônio) causou efeito semelhante; essa substância impede a transformação de transgeranilgeranil pirofosfato a copalil pirofosfato (SCHECHTER e WEST, 1969) e portanto, impede a síntese de caureno.

ROCHA (1975) mostrou uma diminuição de conteúdo de esteviol em ápices de plantas de *Stevia rebaudiana* tratadas com CCC. RUDDAT et al (1968), trataram mutantes de milho d-5 e d-1 com esteviol e observaram um aumento de giberelinas endógenas nestas plantas. Esses resultados são mais uma evidência de que o esteviol é convertido em substância de atividade gibe

relínica.

Estudou-se a via biossintética do esteviol, aplicando-se a folhas de *Stevia*, precursores marcados com ^{14}C (acetato 2- ^{14}C , ácido mevalônico-2- ^{14}C , caureno-17- ^{14}C , ácido caurenônico-7- ^3H) e ficou estabelecido que nessa planta, a biossíntese do esteviol ocorre a partir do acetato, ácido mevalônico, caureno e ácido caurenônico, ou seja, por meio do mesmo caminho biossintético das giberelinas (RUDDAT et al., 1965; BENNET et al., 1967; HANSON e WHITE, 1968).

Os estudos para elucidar a via biossintética do esteviol têm sido conduzidos também em linhagens de fungos.

A linhagem BI - 41a de *Gibberella fujikuroi* apresenta um bloqueio metabólico entre caurenol e ácido caurenônico, bloqueio esse que pode ser superado fornecendo-se esteviol que é metabolizado a GA_1 , GA_{18} , GA_{19} , GA_{20} e 13-hidroxi GA_{12} , que aparecem também em plantas superiores (BEARDER et al., 1975; BEARDER et al., 1976; HEDDEN et al., 1978). Observa-se que em fungos, o esteviol é convertido a substâncias que apresentam atividade giberelínica.

Em *Stevia rebaudiana*, entretanto, o esteviol não atua como giberelina, podendo até inibir o crescimento dessa planta como foi verificado por VÁLIO e ROCHA (1976).

HEDDEN et al (1978) sugerem que, uma vez que o aparecimento de esteviol parece estar restrito a *Stevia rebaudiana*, é possível que nessa planta, a sua síntese seja apenas um caminho alternativo para a síntese de giberelinas ou um ramo terminal, sem ter relação com a posterior biossíntese de giberelinas.

ESTUDOS FISIOLÓGICOS EM *STEVIA REBAUDIANA*

Muito já se fez a respeito da bioquímica do esteviosídeo e do esteviol, bem como a respeito das propriedades biológicas dos mesmos.

Do ponto de vista fisiológico, as pesquisas começaram a se desenvolver a partir da década de 1970. Antes, pouco se sabia a respeito da fisiologia de *Stevia rebaudiana*.

Estudos a respeito da floração de *Stevia rebaudiana* foram feitos por VÁLIO e ROCHA (1977) com plantas trazidas do Paraguai, cultivadas no Instituto de Botânica do Estado de São Paulo, na década de 1960. Seus resultados mostraram que é planta de dias curtos para a floração, com fotoperíodo crítico entre 13 e 14 horas (VÁLIO e ROCHA, 1977).

ZAIDAN, DIETRICH e FELIPPE (1980) trabalhando com plantas de *Stevia* recém introduzidas do Paraguai, observaram que essas plantas poderiam ser agrupadas em tres grupos distintos quanto ao seu comportamento à variação fotoperiódica: grupo A - floração ocorre apenas em fotoperíodos de 8, 10 ou 12 horas; grupo B - floração ocorre apenas em fotoperíodos de 10 ou 12 horas; grupo C - floração ocorre em fotoperíodos de 8, 10, 12 e 14 horas.

A planta está madura para a indução floral a partir do estágio de quatro pares de folhas (VÁLIO e ROCHA, 1977). CCC inibiu o crescimento de plantas de *Stevia rebaudiana*, crescimento esse acelerado por GA_3 , que também reverteu o efeito inibidor do CCC. O esteviol exógeno inibiu o crescimento de plantas de *Stevia rebaudiana* (VÁLIO e ROCHA, 1976). 0

conteúdo de esteviosídeo em folhas foi reduzido por tratamento com CCC (ROCHA, 1975). Em ápices, ROCHA (1975) encontrou uma substância com atividade giberelínica, cujo nível foi reduzido por tratamento com CCC. GA₃ induziu partenocarpia, enquanto que CCC e esteviol foram inefetivos (VÁLIO e ROCHA, 1976).

METIVIER e VIANA (1979a) realizaram uma série de ~~trabalhos~~ ^{estudos} a respeito do conteúdo de esteviosídeo, açúcares totais e proteína, em folhas de *Stevia*, submetida a dois fotoperíodos diferentes.

Condições de dias longos aumentam o comprimento do entrenó, a área foliar e o peso seco e reduzem o intervalo entre o aparecimento dos sucessivos pares foliares em relação a condições de dias curtos. Em condições de dias longos, o conteúdo de açúcares solúveis totais e proteínas aumentou, em termos relativos e absolutos, bem como a síntese de esteviol, que aumentou em 45 por cento (METIVIER e VIANA, 1979a).

Usando métodos diferentes de extração e dosagem de esteviosídeo, tanto METIVIER e VIANA (1979a, b) como ZAIDAN et al (1980) mostraram que dias longos aumentam o conteúdo de esteviosídeo.

Observou-se que o peso seco da folha e os níveis de açúcares solúveis e proteínas mostram um desenvolvimento em duas fases, durante o crescimento da folha, em *Stevia rebaudiana*. O grande aumento inicial no tamanho da folha foi devido, principalmente, ao aumento de água. O aumento no conteúdo de proteína absoluta foi inicialmente lento, mas rápido na segunda fase, concomitantemente ao aumento em peso seco e no conteúdo de açúcar solúvel. Em termos relativos, entretanto, a

concentração de açúcares livres diminuiu, conforme a folha cresceu. Os resultados indicam que a síntese de proteínas nas folhas, provavelmente seja dependente de um suprimento de carbono proveniente da fotossíntese (VIANA e METIVIER, 1979).

ZAIDAN et al (1980) observaram que o esteviosídeo ocorre apenas nas porções aéreas de plantas de *Stevia* e está ausente no sistema radicular.

Jimenez em 1917 (in ANÔNIMO, 1920) dizia que em geral os frutos de *Stevia* eram estéreis. FLETCHER (1955) readmitiu essa afirmação, o que foi novamente confirmado em 1956 (ANÔNIMO).

Os primeiros estudos a respeito da germinação de *Stevia rebaudiana* foram feitos por FELIPPE et al (1971) e FELIPPE e LUCAS (1971). *Stevia rebaudiana* apresenta dois tipos de frutos nitidamente distinguíveis a olho nu: frutos escuros e frutos claros. Os frutos claros são estéreis. Apenas 40 por cento dos frutos escuros ~~são férteis, germinando~~ ^{germinavam} a 25°C em luz constante (FELIPPE et al., 1971). Utilizando o teste do tetrazólio, FELIPPE e LUCAS (1971) mostraram que cerca de 50 por cento dos frutos escuros de *Stevia* eram férteis, sendo que esses resultados eram compatíveis com os testes de germinação em luz constante. Verificou-se, também, que os frutos de *Stevia* eram viáveis somente até o oitavo mês após a coleta (FELIPPE e LUCAS, 1971). ROCHA (1975) mostrou que a porcentagem de frutos claros produzidos pelas plantas por ela estudadas foi de 78 por cento.

MONTEIRO (1980) mostrou que em *Stevia rebaudiana* a polinização é cruzada e tres tipos de aquênios podem ser

formados: a) aquênio claro estéril: não ocorre a polinização, não há portanto embrião; b) aquênio escuro fértil: em que ela ocorre e há fecundação da oosfera, havendo a formação de um embrião normal; c) aquênio escuro estéril: ocorre a polinização, há o desenvolvimento do tubo polínico, porém este tem seu crescimento interrompido antes de atingir a oosfera (possivelmente por uma incompatibilidade esporofítica); a parede do aquênio (pericarpo) fica com a cor escura, mas o aquênio não possui embrião. FELIPPE et al. (1971) constataram que a germinação era maior em luz constante e se completava ao redor do décimo quarto dia, enquanto que no escuro, a porcentagem de germinação era bastante baixa. Os frutos de *Stevia*, são portanto, fotoblásticos positivos (FELIPPE, 1977a). Verificou-se que havia certa variação na porcentagem de germinação em luz constante, que estava na faixa dos 30 a 60 por cento (FELIPPE et al., 1971). Algumas plântulas germinadas em placas de Petri apresentaram radículas atrofiadas. Isto poderia ocorrer devido a um inibidor presente nos frutos considerados férteis. A fim de verificar a validade dessa hipótese, FELIPPE et al. (1971) fizeram biotestes com extratos de ^{aquênios} ~~folhas~~ considerados férteis e verificaram que havia um inibidor de crescimento de radícula de alface nas regiões entre os R_f s 0,80 e 0,90 no sistema de solventes por eles utilizados. Esse inibidor poderia ser o responsável pelo aparecimento de plântulas de *Stevia*, com radícula atrofiada. Aventureu-se a hipótese de que o inibidor do crescimento de radícula pudesse ser o esteviosídeo (FELIPPE e LUCAS, 1971).

Dois são os objetivos principais deste trabalho: a) verificar em detalhe a germinação de *Stevia*, estudando

quais os fatores que a afetam, de modo a se estabelecer as condições ótimas para a germinação; b) verificar se os aquênios (claros e escuros) possuem esteviosídeo como também dar uma idéia de quais substâncias de crescimento existem nesses aquênios.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL

Aquênios de *Stevia rebaudiana* Bert. foram obtidos a partir de plantas cultivadas na Universidade Estadual de Campinas ou fornecidos pelo Instituto de Botânica da Secretaria de Agricultura do Estado de São Paulo. As amostras eram utilizadas até seis meses de idade (~~com exceção de um experimento em que foi testada a influência da idade dos aquênios na germinação~~).

Em alguns experimentos foram também utilizadas *Lactuca sativa* L. cv. Crespa de Picar, *Rumex obtusifolius* L., *Cucumis anguria* L. e *Cucumis melo* L.

MÉTODOS

A. Germinação

Os aquênios de *Stevia rebaudiana* podem ser separados em claros e escuros a olho nu. Aquênios claros não possuem embrião e são, portanto, estêreis. Só há germinação de aquênios escuros (FELIPPE et al. 1971). Os aquênios escuros foram separados um a um, sendo levemente pressionados com uma pinça. Eram selecionados apenas os mais rijos e consistentes.

Os aquênios selecionados para os experimentos foram esterilizados de acordo com as seguintes etapas:

- lavagem rápida em solução de detergente.
- lavagem em água corrente.
- imersão em solução de hipoclorido de sódio 4%, durante 30 minutos.
- lavagem em água destilada corrente durante 5 minutos.
- imersão em água destilada durante 60 minutos.
- secagem em papel de filtro.

Para cada tratamento, sempre se utilizaram duas placas de Petri, de 9 cm de diâmetro, com 50 aquênios por placa. As placas eram revestidas com uma folha de papel de filtro qualitativo (Klabin) e esterilizadas a 100°C durante 60 minutos. Os aquênios foram embebidos com 5 ml de água destilada ou da solução a ser testada.

Os experimentos de germinação foram realizados em câmara de crescimento "Forma Scientific", com temperatura controlada de 25°C, a não ser quando o efeito de temperatura era testado.

Na germinação em luz branca constante eram utilizadas duas lâmpadas fluorescentes de 15 W e intensidade de 3,6 $\mu\text{W}/\text{cm}^2 \cdot \text{nm}$.

Os experimentos de escuro constante foram realizados colocando-se as placas de Petri dentro de tres sacos plásticos pretos. Previamente foi testada a germinação no escuro constante dentro dos sacos pretos e sem os sacos pretos, nas câmaras. Não houve diferença na germinação entre esses dois tratamentos.

Testes de germinação sob luz branca constante e escuro constante foram realizados como controle para a maioria dos experimentos.

Geralmente fizeram-se tres a quatro contagens de germinação, a cada dois ou tres dias.

O efeito de luzes monocromáticas também foi verificado.

Os comprimentos de onda desejados ^(Fig. 21) foram obtidos a partir de lâmpadas fluorescentes e incandescentes e filtros feitos de papel celofane colorido, ajustando-se a intensidade ao redor de $1,2 \mu\text{W}/\text{cm}^2 \cdot \text{nm}$, por meio de um espectro-radiômetro ISCO, modelo SR (Figura 1).

A luz azul, com pico a 450 nm, foi obtida com uma lâmpada fluorescente azul (Westinghouse) de 15 W e filtro formado por uma folha de papel celofane azul. A luz verde, com pico a 525 nm foi conseguida com lâmpada fluorescente verde (General Electric) de 20 W e filtro formado por uma folha de papel celofane verde. Luz vermelha, com pico a 650 nm foi obtida a partir de uma lâmpada vermelha (Westinghouse) de 15 W. O vermelho extremo, com pico a 730 nm foi obtido a partir de uma lâmpada incandescente de 25 W (General Electric) e filtro formado por duas folhas de papel celofane vermelho e tres folhas de papel celofane azul. As contagens dos experimentos mantidos em escuro constante, ou sob os diferentes comprimentos de onda foram feitas sob luz verde de segurança, cujo espectro apresenta um pico a 525 nm e intensidade de $0,02 \mu\text{W}/\text{cm}^2 \cdot \text{nm}$ (Figura 1).

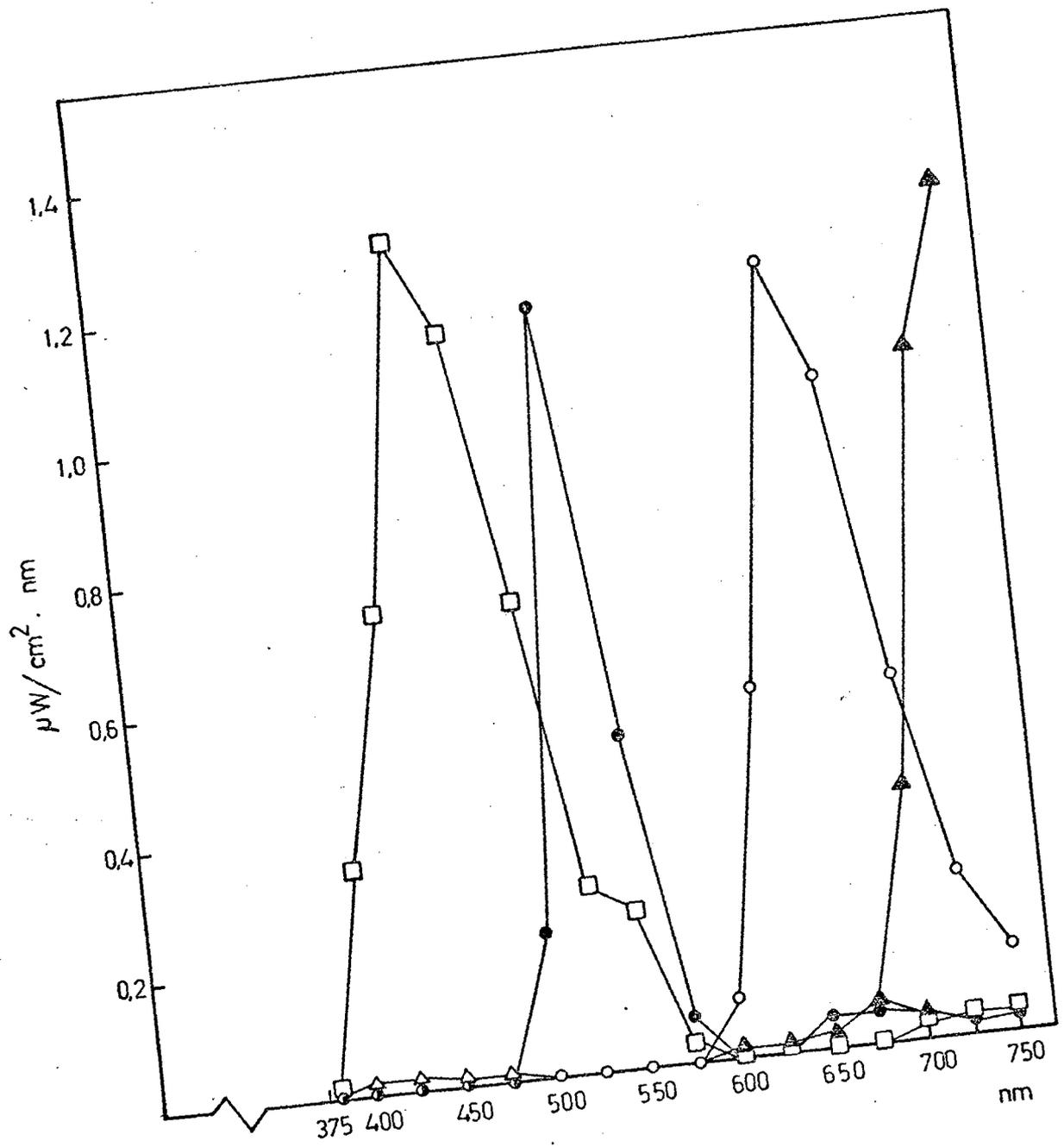
O efeito de choques de vermelho (de curta ou longa duração) também foi estudado.

Em um determinado experimento, os aquênios foram embebidos por 72 horas sob luz vermelha e a seguir foram transferidos para o escuro constante.

Figura 1. Espectros luminosos utilizados nos experimentos de germinação.

- Luz azul
- Luz verde
- Luz vermelha
- ▲ Vermelho extremo
- △ Luz verde de segurança

FIG 1



Em outros experimentos, os aquênios embebidos no escuro constante por 24 e 48 horas receberam choques de vermelho com duração de 24 horas (choques longos). Após os choques, os aquênios retornaram ao escuro, onde permaneceram até o final do experimento.

Aquênios embebidos também por 48 horas no escuro constante eram transferidos para câmara iluminada por lâmpa da vermelha, onde recebiam choques de 60, 180 e 300 minutos (choques curtos). Após os choques, retornaram para o escuro constante.

A reversão do vermelho pelo vermelho extremo foi estudada.

Aquênios que recebiam choques curtos de vermelho de 60 minutos (após 48 horas de embebição no escuro) foram tratados com choques curtos de vermelho extremo, de 60, 180 e 300 minutos de duração. Após os choques de vermelho extremo retornaram para o escuro constante.

Aquênios também foram embebidos sob vermelho extremo, durante 72 horas e a seguir transferidos para câmara iluminada com luz branca, onde permaneciam até o final do experimento. Em um outro experimento, os aquênios foram embebidos sob luz branca durante 72 horas e a seguir transferidos para câmara iluminada com vermelho extremo, onde ficaram até o final do experimento.

A reversão do vermelho pelo azul também foi verificada.

Aquênios que recebiam choques curtos de luz vermelha, de 60 minutos de duração, após 48 horas de embebição no

escuro, foram expostos à luz azul por 60 e 180 minutos e a seguir retornaram para o escuro, onde ficavam até o final do experimento. Em todos os experimentos de choques de luz, a transferência de aquênios de uma câmara para outra, foi feita mantendo-se a sala totalmente no escuro.

No que diz respeito ao efeito de temperaturas, testaram-se temperaturas constantes de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40°C com aquênios mantidos em luz branca constante e escuro constante.

Verificou-se o efeito das seguintes alternâncias de temperatura na germinação de *Stevia* mantida no escuro: 25 - 0°C, 25 - 5°C, 25 - 10°C, 25 - 15°C, 25 - 20°C, 25 - 30°C e 25 - 35°C.

O controle das temperaturas dentro das câmaras, durante o decorrer desses experimentos foi feito por meio de um termômetro digital marca Digitec tipo 581 c. Esse termômetro acusou uma alteração diária de $\pm 1^\circ\text{C}$ para cada temperatura testada. Experimentalmente, verificou-se o tempo de mudança de temperatura a partir da temperatura inicial básica de 25°C. Isto foi feito para as câmaras de crescimento e placas de Petri fechadas e forradas com papel de filtro umedecido, colocadas dentro das câmaras.

Para medidas das temperaturas dentro das câmaras e das placas de Petri utilizou-se o termômetro digital Digitec tipo 581 c, com um termopar dentro da câmara e outro dentro da placa de Petri. A variação da temperatura foi verificada de minuto a minuto (FELIPPE, 1978; JOLY e FELIPPE, 1979), confirmando os resultados desse autores.

A Figura 2 mostra curvas de alternância de temperaturas dentro das câmaras, determinada a cada minuto. Explícitamente, as curvas de alternância de temperaturas mostram o período de tempo decorrido até que a câmara atingisse a temperatura alternante desejada e retornasse à temperatura inicial. Nessas câmaras, o relógio de alternância de temperaturas foi regulado para 12 horas de temperatura básica e 12 horas de temperatura alternante, em ciclos de 24 horas. A Tabela 1 mostra o tempo necessário para a câmara atingir a temperatura alternante e retornar à temperatura básica. Assim, por exemplo, no par de alternâncias 25 - 20°C, a câmara leva 10 minutos para atingir a temperatura alternante e 15 minutos para retornar à temperatura de 25°C. Pela Tabela 1, pode-se verificar que na placa, o tempo decorrido até atingir a temperatura alternante foi de 18 minutos.

A Figura 3 representa curvas de alternância de temperatura dentro das placas de Petri expostas a períodos de temperaturas alternantes. Obviamente, como a mudança de temperatura é gradual, nunca se obteve um período de 12 horas de exposição a cada temperatura alternante (Tabela 2). Assim, para o par alternante de 25 - 0°C, a placa permaneceu durante 10 horas e 52 minutos na temperatura básica de 25°C e 10 horas e 8 minutos na temperatura alternante.

Denomina-se choque de temperatura ao período curto de tempo, durante o qual os aquênios permaneceram a uma temperatura diferente da temperatura controle (25°C). Nos experimentos com choques de temperatura estas foram 0°C e 45°C. Previamente, regulou-se uma câmara de crescimento a 0°C e uma

Figura 2. Alternância de temperatura nas câmaras. A variação de temperatura foi verificada a cada minuto.

Temperatura básica de 25°C

- 25 - 35°C
- 25 - 30°C
- 25 - 20°C
- 25 - 15°C
- △ 25 - 10°C
- ▲ 25 - 5°C
- ▽ 25 - 0°C

FIG 2

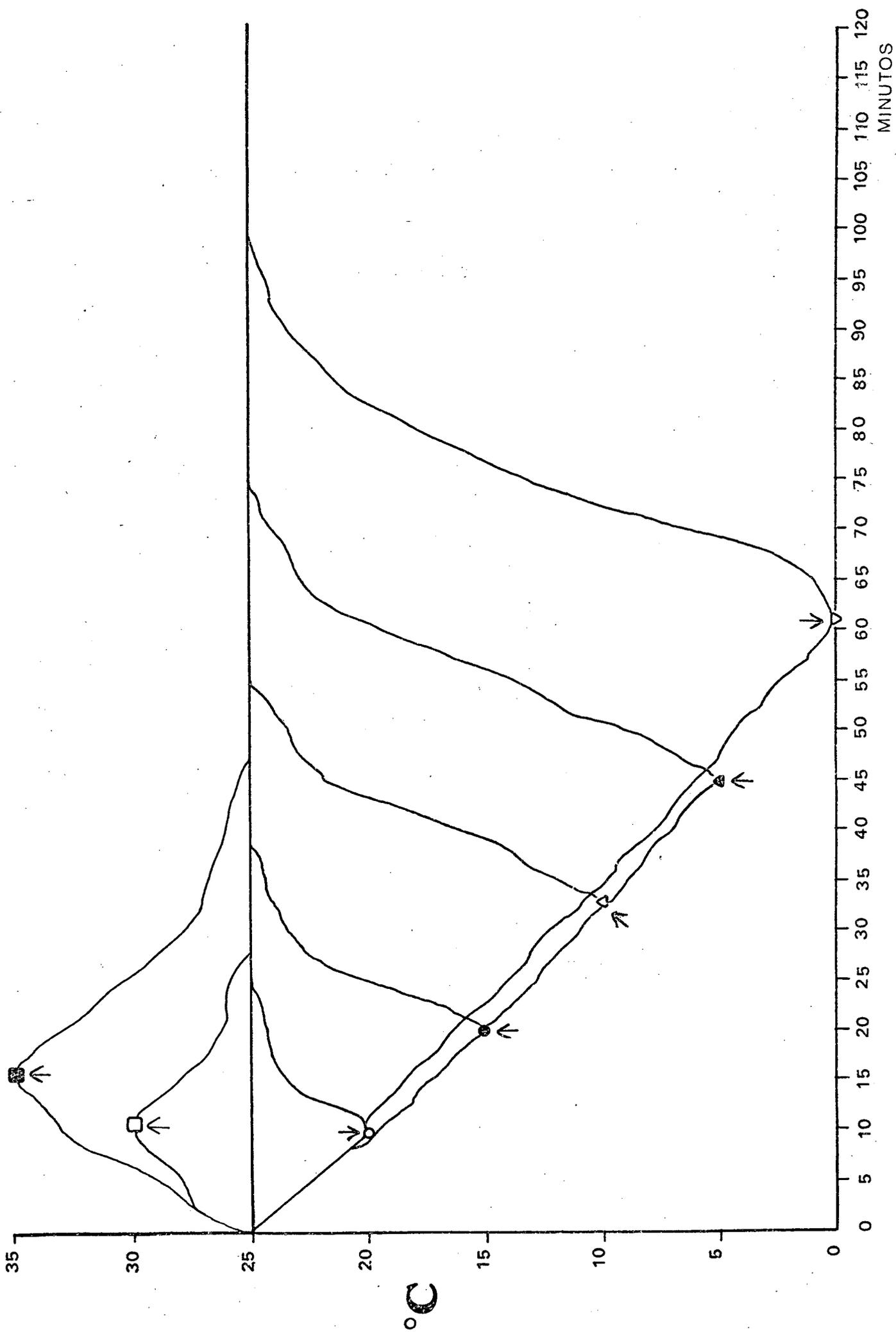


Tabela 1 - Alternância de temperatura em um ciclo de 24 horas.
 Temperatura básica de 25°C. Alternância regulada pa
 ra 12 horas.

Alternância de temperatura °C	Tempo para atingir a alternância desejada		Tempo para retornar a 25°C	
	minutos		minutos	
	Dentro da câmara	Dentro da placa	Dentro da câmara	Dentro da placa
25 - 35	16	35	31	43
25 - 30	11	17	17	51
25 - 20	10	18	15	47
25 - 15	20	35	19	46
25 - 10	33	62	21	69
25 - 5	45	87	30	76
25 - 0	61	112	39	68

Figura 3. Alternância de temperatura dentro de placas de Petri fechadas e forradas com papel de filtro umedecido. A variação da temperatura foi verificada a cada minuto. Temperatura básica de 25°C.

- 25 - 35°C
- 25 - 30°C
- 25 - 20°C
- 25 - 15°C
- △ 25 - 10°C
- ▲ 25 - 5°C
- ▽ 25 - 0°C

FIG 3

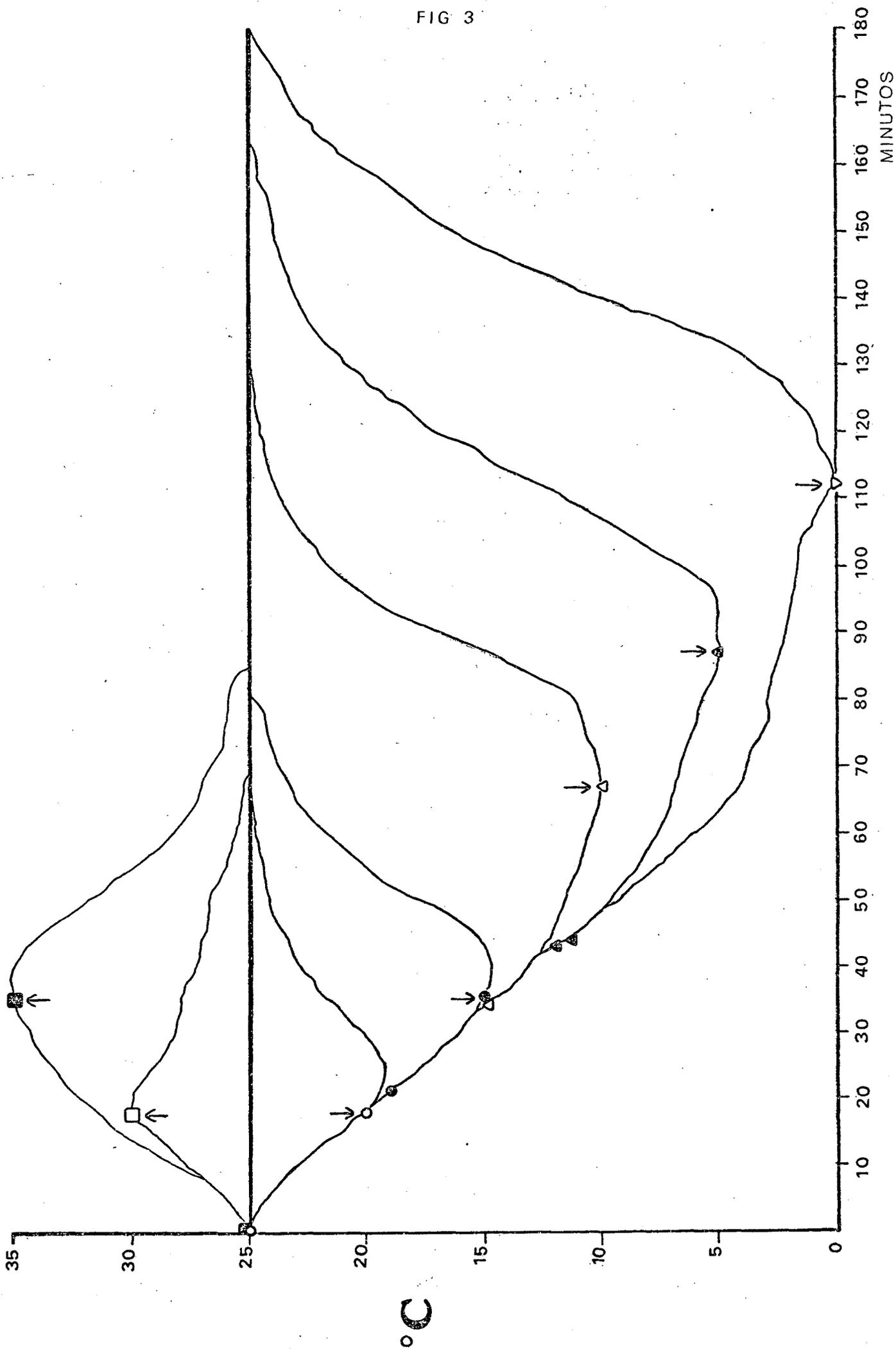


Tabela 2 - Período em que o interior da placa de Petri permanece em uma determinada temperatura.

Alternância de temperatura °C	Temperatura básica 25°C horas	Temperatura alternante horas
25 - 35	10 h. e 17 min.	11 h. e 25 min.
25 - 30	11 h. e 9 min.	11 h. e 43 min.
25 - 20	11 h. e 13 min.	11 h. e 42 min.
25 - 15	11 h. e 14 min.	11 h. e 25 min.
25 - 10	10 h. e 51 min.	10 h. e 58 min.
25 - 5	10 h. e 44 min.	10 h. e 33 min.
25 - 0	10 h. e 52 min.	10 h. e 8 min.

a 45°C.

Os choques de temperatura foram realizados após diferentes períodos de embebição no escuro constante: 24, 48 e 72 horas.

Na Figura 4 observam-se as curvas de alteração da temperatura, dentro das placas de Petri. Isso foi feito colocando-se placas de Petri até então mantidas a 25°C, dentro das câmaras já reguladas na temperatura do choque. As placas eram forradas com papel de filtro umedecido.

Mediu-se também a temperatura dos aquênios por meio de termometria termoelétrica. Utilizou-se um multímetro, ao qual se conecta um termopar composto por dois metais diferentes, que desenvolvem diferenças de potencial elétrico, quando as junções acham-se em diferentes temperaturas. O multímetro mede a voltagem desenvolvida pelo termopar,

O termopar utilizado foi o de cobre-constantan. Esse termopar desenvolve a seguinte relação: a cada °C correspondem quarenta microvolts (μV) de maneira que:

$$\text{Temperatura medida} = \frac{\mu\text{V lido no aparelho}}{40}$$

A temperatura de referência foi °C.

O aparelho utilizado nas medidas da voltagem desenvolvida pelo termopar foi um multímetro digital marca Hewlett-Packard, tipo 3465 B, com fundo de escala de 20 mV a 100 v - cc e sensibilidade de 1 μV na menor faixa de medição.

A Figura 5 mostra a mudança de temperatura nos aquênios.

Em um choque de 45°C, os aquênios demoram 30 mi

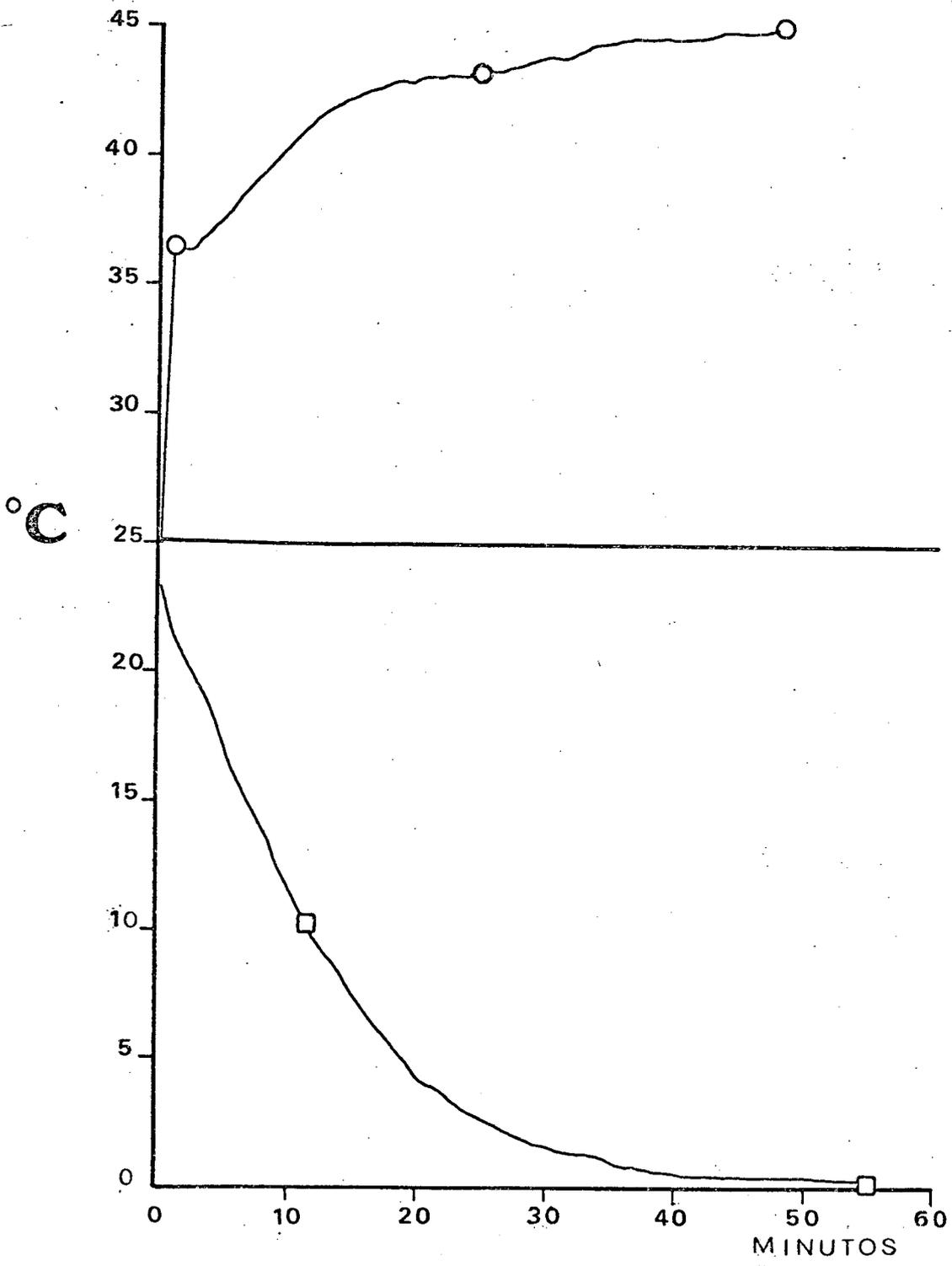
Figura 4. Tempo decorrido para as placas de Petri atingirem as temperaturas dos choques. A variação da temperatura foi verificada a cada minuto.

Temperatura básica de 25°C

○ 45°C

□ 0°C

FIG 4



nutos para atingirem a temperatura do choque, a partir da temperatura básica de 25°C (Figura 5). O tempo decorrido para os aquênios atingirem 0°C foi de 20 minutos, também a partir da temperatura básica de 25°C (Figura 5). Durante um choque de temperatura, as placas foram transferidas para câmaras já calibradas para a temperatura do choque.

Nos choques de 0°C, que tiveram duração de duas horas, os aquênios permaneceram 20 minutos na câmara, até atingir a temperatura do choque e a seguir permaneceram durante mais duas horas nesta temperatura, na câmara. Concomitantemente, fez-se um controle que permanecia na câmara a 0°C durante 20 minutos, além dos controles mantidos a 25°C. Esse controle foi feito para os tres períodos diferentes de embebição no escuro.

Os choques de 45°C também tiveram duração de duas horas e nesse caso, os aquênios permaneceram durante 30 minutos na câmara até que atingissem a temperatura do choque e então, por mais duas horas. Fez-se também o controle no qual os aquênios permaneceram na câmara por 30 minutos e a seguir retornaram para a câmara a 25°C. Esse controle foi feito também para os tres períodos de embebição no escuro. Controles mantidos o tempo todo a 25°C também foram utilizados.

As seguintes substâncias e reguladores de crescimento foram ensaiados na germinação no escuro, de *Stevia rebaudiana*, nas concentrações abaixo citadas:

- ácido giberélico, GA₃ (Baker): 50 e 100 mg/l
- ácido indol-3-acético, AIA (Sigma): 0,1; 1,0; 10,0; 25,0; 50,0 e 100,0 mg/l.

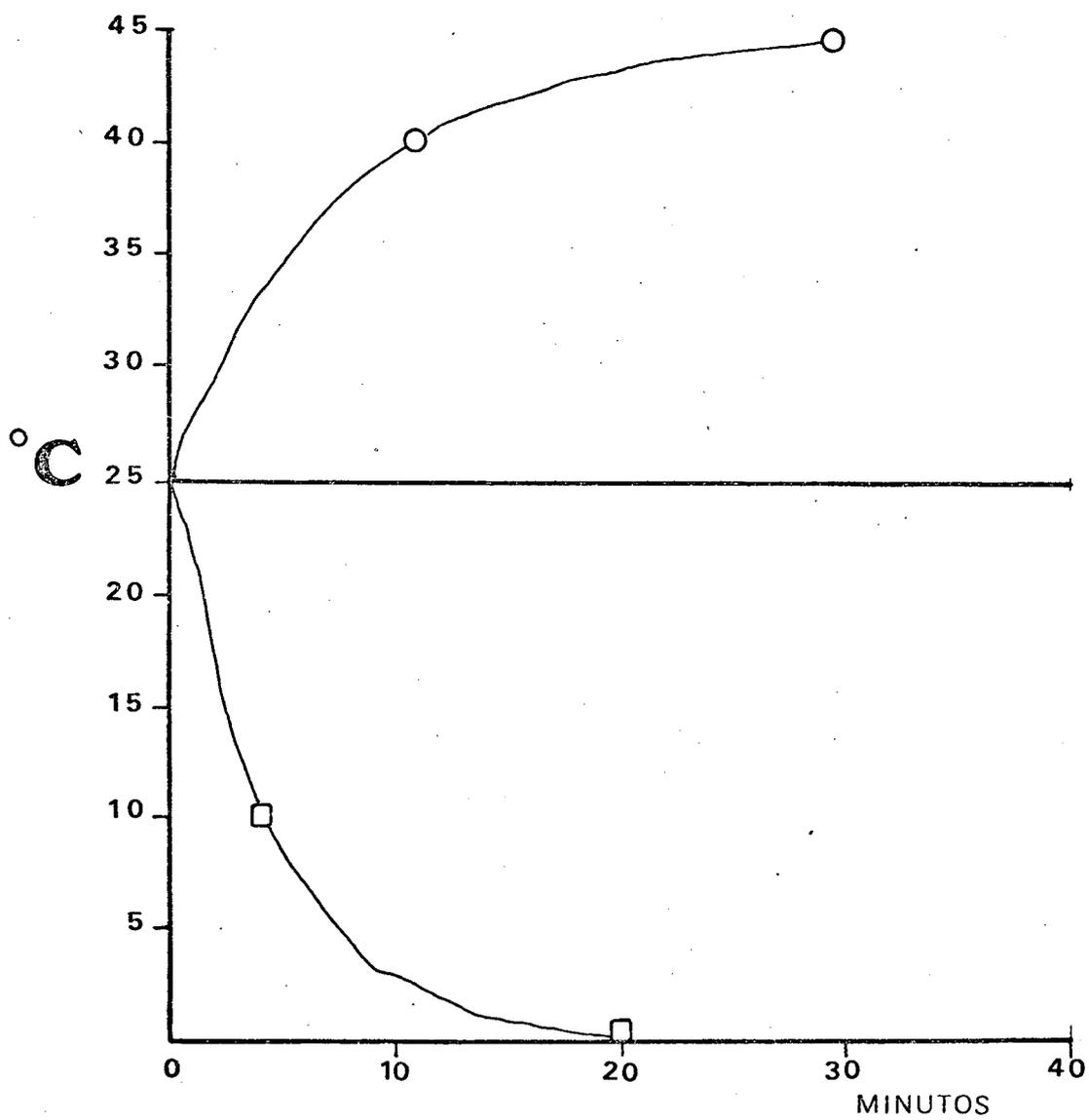
Figura 5. Tempo decorrido para os aquênios de *Stevia rebaudiana* atingirem as temperaturas dos choques. A variação da temperatura foi verificada a cada minuto.

Temperatura básica de 25°C.

○ 45°C

□ 0°C

FIG 5



- 6-benzil adenina, 6BA (Sigma): 1,0; 5,0; 10,0; 25,0; 50,0 e 100,0 mg/l.
- ácido 2-cloroetilfosfônico, etrel (Amchen): 5,0; 10,0 25,0; 50,0 e 100,0 mg/l.

O ácido abscísico, ABA (Sigma) foi aplicado a aquênios mantidos sob luz branca constante, nas concentrações de 1,0 e 10,0 mg/l.

Em um experimento preliminar verificou-se o efeito da variação do pH da solução de embebição na germinação de *Stevia*. Variou-se o pH da solução de embebição usando-se algumas gotas de solução diluídas de NaOH (0,1 M) e HCl (0,1 M). Os seguintes pHs foram testados: 5,5 (controle de água destilada), 6,2; 4,2; 3,7 e 3,0. Ao final do experimento todas as soluções apresentavam pH semelhante ao pH da água destilada. Não houve diferença estatisticamente significativa, a nível de 5 por cento, entre germinação de aquênios embebidos com soluções de embebição que apresentaram pHs variados (Tabela 3) e o controle.

Na Tabela 4 são dados os valores de pH para algumas concentrações de substâncias e reguladores de crescimento utilizados, onde pode-se ver que a faixa de pH está dentro da faixa de pH utilizado no experimento preliminar.

B. Clarificação de aquênios de *Stevia*

Aquênios escuros previamente selecionados foram separados em lotes de 100 ou 200 e foram clarificados. A clarificação foi feita pelo método de HERR (1971).

Tabela 3 - Efeito da variação do pH da solução de embebição na germinação de *Stevia* em luz contínua.

Dados em porcentagem de germinação. F não significativo a 5%.

pH	Dias de germinação			pH ao final do experimento
	7	9	11	
*5,5	21,00	34,00	40,00	6,0
6,2	14,00	29,00	42,00	6,0
4,2	29,00	43,00	51,00	5,5
3,7	18,00	34,00	38,00	5,5
3,0	28,00	39,00	42,00	5,0

*Controle - água destilada.

O método consiste em passar os aquênios, rapidamente em bateria de álcool de concentração crescente. Feito isso, diferencia-se o material em xilol, durante cinco minutos e a seguir o material é transferido para o líquido diafanizador por 2 a 4 horas.

O líquido diafanizador de Herr consiste numa mistura de hidrato de cloral, ácido fênico, óleo de cravo, ácido láctico e xilol na proporção de 2:2:2:2:1 (v/v).

O material diafanizado foi então dissecado sob lupa binocular, os aquênios observados e verificada a presença ou ausência de embriões.

C. Efeito do esteviosídeo em germinação

Verificou-se o efeito do esteviosídeo na germinação de *Lactuca sativa* L cv. Crespa de Picar, *Rumex obtusifolius* L, *Cucumis melo* L, *Cucumis anguria* L e *Stevia rebaudiana* Bert.

O esteviosídeo utilizado nesses experimentos foi cedido pelo ITAL (Instituto de Tecnologia de Alimentos).

Para o preparo das soluções, o esteviosídeo foi dissolvido em etanol 100% e o volume completado com água destilada. A relação entre água destilada e etanol foi de 400: 1 v/v. Em todos os experimentos fez-se um controle onde se utilizou essa relação de água destilada e etanol.

Usaram-se soluções de esteviosídeo nas concentrações: 5,0; 10,0; 50,0 e 100,0 mg/l.

A germinação de *Cucumis anguria* foi realizada

Tabela 4 - pH de algumas concentrações de substâncias e reguladores de crescimento testados.

Substância	Concentração mg/l	pH
AIA	50,00	4,5
	20,00	5,0
	10,00	5,6
GA ₃	100,00	5,0
6BA	5,00	6,2
	10,00	5,0
ABA	1,00	5,7
Etrel	10,00	4,6

sob escuro contínuo, pois as sementes dessa espécie são fotoblásticas negativas (NORONHA, VICENTE e SILBERSCHMIDT, 1971; NORONHA, VICENTE e FELIPPE, 1976, 1978). As demais sementes são fotoblásticas positivas.

D. Extração de substâncias endógenas

1. Separação dos aquênios

MONTEIRO (1980) mostrou que em *Stevia rebaudiana* ocorrem tres tipos de aquênios: a) claro estéril; b) escuro fértil; c) escuro estéril.

Neste trabalho a nomenclatura utilizada será a seguinte: a) aquênio claro; b) aquênio fértil; c) aquênio escuro estéril.

Duzentos aquênios escuros foram pesados em balança analítica, com cinco casas decimais e verificou-se que o peso dos aquênios variou de 100 µg a 540 µg sendo que a média foi de 309 µg. Nota-se, portanto que há uma grande variação no peso dos aquênios escuros. A partir desses dados tentou-se a separação de aquênios férteis e aquênios escuros estéreis, por diferença de peso. Amostras de aquênios escuros foram colocadas em bequer contendo água destilada e este era levado a um agitador magnético. Após 1 ou 2 minutos em agitação, verificou-se que parte dos aquênios submergia e parte flutuava, quando se desligava o agitador. Provavelmente, os aquênios sem embrião eram mais leves e flutuavam e os aquênios com embrião eram mais pesados e submergiam. Desta forma, a técnica poderia ser usada para a separação dos aquênios. Antes de adotá-la, foi

preciso testar a sua eficiência. Isto foi feito separando-se u ma amostra de aquênios da qual 100 aquênios que submergiram foo ram clarificados, conforme o método de HERR (1971) e dissecados sob lupa binocular, observando-se que 93 por cento apre sentavam embriões e apenas 7 por cento eram estêreis. Da mesma forma, 100 aquênios que flutuaram foram clarificados e constat ou-se que 90 por cento eram estêreis, concluindo-se que a téc nica poderia ser adotada para a separação dos aquênios a serem utilizados nas extrações.

As extrações foram feitas com aquênios claros, férteis e escuros estêreis. Algumas vezes as extrações foram feitas com aquênios escuros férteis e estêreis juntos.

2. Método de extração

O método de extração de substâncias endógenas foi baseado no de ZEEVART (1966).

Quinhentos aquênios foram macerados em almofariz, com 5 ml de metanol ^{99%} 100% a 5°C e mantidos em extração nes sa temperatura durante 24 horas. Após esse período, o macerado foi filtrado e o resíduo foi re-extraído em metanol 99% durante 24 horas na temperatura ambiente. Novamente filtrou-se o ma cerado e repetiu-se a extração. Os tres filtrados foram misturados e evaporados até que o extrato ficasse completamente seco. Ao extrato bruto obtido eram adicionados 2 ml de etanol e o extrato era aplicado em cromatoplasas a serem utilizadas em biotestes ou para revelação de substâncias endógenas a serem estudadas. Os extratos foram utilizados também para detecção de esteviosídeo.

3 - Bioensaio utilizado

Para substâncias giberelínicas e inibidores foi utilizado o bioteste do alongamento de hipocótilo de alface.

Esse bioteste foi descrito por FRANKLAND e WAREING (1960) e é específico para detecção de substâncias pro motoras de crescimento, com atividade giberelínica, as quais promovem o alongamento do hipocótilo de alface. O bioteste mos tra também a presença de inibidores no extrato.

Os extratos obtidos eram aplicados em placas de vidro de 20 x 20 cm onde se espalhou sílica gel G (Typ 60 Merck) dissolvida em água destilada na proporção de 1:2 v/v e espessura de 0,5 mm. O sistema de solventes utilizado como fase móvel foi butanol: metanol: água 8:1:1 v/v (GLÓRIA, 1966). Cada cromatograma foi dividido em 10 faixas iguais, correspondentes a os valores de R_f . Assim, a primeira faixa correspondia ao intervalo entre o R_f s 0,0 e 0,1. Cada faixa, por sua vez, foi dividida no sentido transversal correspondendo a tres repe tições. Após completa evaporação dos solventes utilizados no desenvolvimento das cromatoplas, as faixas eram raspadas e a sílica era colocada em cubeta de polietileno de 2,5 cm x 3,5 cm e recoberta por dois retângulos de papel Whatman nº 3. A se guir, acrescentavam-se 2 ml de água destilada a cada cubeta. O controle foi feito utilizando-se faixas de cromatoplasca onde não se aplicou o extrato.

Utilizaram-se sementes de alface cv. Crespa de Picar. As sementes germinaram sob luz fluorescente branca, em câmara de crescimento Forma, a 25°C e após 24 horas seleciona ram-se plântulas cujas radículas mediam cerca de 3 mm de com-

primento.

Foram colocadas 5 plântulas por cubetas. As cubas de bioteste eram mantidas durante 3 dias sob luz branca contínua a 25°C e após esse período mediu-se o comprimento dos hipocótilos.

O mesmo bioteste foi utilizado para a verificação do efeito dos extratos e de padrão de auxinas no crescimento das radículas de alface. Além das medidas do comprimento dos hipocótilos de alface, mediu-se também o comprimento das radículas.

O efeito de IAN (indol-3-acetonitrila) no crescimento de radícula de alface também foi testado. Nesse caso, eram feitas tres repetições de cada concentração a ser testada. No caso testou-se o efeito das seguintes concentrações: 0,015; 0,07; 0,15; 0,31 e 0,625 mg/l.

4 - Revelação de substâncias endógenas por métodos químicos.

A detecção por métodos químicos, de substâncias contidas nos extratos, foi feita utilizando-se a cromatografia em camada delgada. Para a detecção de esteviosídeo usou-se como fase móvel o sistema de solventes butanol: metanol: água na proporção de 8:1:1 v/v (GLÓRIA, 1966) em cromatogramas unidimensionais. Os cromatogramas bidimensionais para a revelação de esteviosídeo foram desenvolvidos nos seguintes sistemas de solventes, segundo METIVIER e VIANA (1979b):

- a. butanol: acetato de etila: isopropanol: água - 35:100:60:30 v/v.
- b. ácido acético: acetato de etila: água - 4:8:1 v/v.

Os extratos ensaiados em cromatografia bidimensional foram aplicados na extremidade inferior esquerda das cromatoplasmas. Os cromatogramas bidimensionais foram feitos do seguinte modo: após o cromatograma ter sido desenvolvido no primeiro sistema de solventes, deixava-se secar por 24 horas à temperatura ambiente. A seguir, a cromatoplasma era inclinada em ângulo de 90° a partir da direção do primeiro desenvolvimento e era desenvolvida no segundo sistema de solventes. Como padrão utilizou-se o esteviosídeo fornecido pelo ITAL (Instituto de Tecnologia de Alimentos). A pureza do esteviosídeo foi verificada por METIVIER e VIANA (1979b) que utilizaram a cromatografia unidimensional e 15 sistemas de solventes, observando sempre uma única mancha após a revelação. Neste trabalho, 5 mg de esteviosídeo eram dissolvidos em 4 ml de etanol e 100 µl eram aplicados como padrão. A revelação do esteviosídeo foi feita com antrona (UMBREIT e BURRIS, 1964). 200 mg de antrona (Fisher Scientific Co.) foram dissolvidos em 100 ml de ácido sulfúrico 95%. Foram aplicados 100 a 200 µl de extrato diluído em 2 ml de etanol, na cromatoplasma dividida em faixas verticais (cromatografia unidimensional) ou numa das extremidades da placa (cromatografia bidimensional). Após a pulverização com reagente de antrona, o esteviosídeo aparece como mancha de cor azul.

Para a detecção de substâncias indólicas usou-se como fase móvel o sistema de solventes clorofórmico: acetato de etila: ácido acético 60:40:5 v/v (ZEEVART, 1966) em cromatografia unidimensional ou bidimensional. Além desse os seguintes sistemas de solventes foram também usados em cromatografia bidimensional para a detecção de substâncias indólicas: a) ben

zeno: acetona 90:10 v/v (KALDEWEY, 1969), no primeiro desenvolvimento e b) clorofórmio: metanol 93:7 (KALDEWEY, 1969) no segundo desenvolvimento, sistemas estes que foram utilizados em cromatografia unidimensional.

Para a revelação de substâncias indólicas foram utilizados os seguintes reagentes:

a. Reagente de Salkowsky (MERCK, 1971).

3 ml de cloreto férrico 1,5 M eram acrescentados a 60 ml de ácido sulfúrico e 100 ml de água deionizada. Após pulverização as placas eram aquecidas a 100°C por 10 a 20 minutos.

b. Reagente de Ehrlich (MERCK, 1971).

10 g de 4-dimetilaminobenzaldeído (Carlo Erba) eram dissolvidos em 25 ml de ácido clorídrico 37% e completados com 75 ml de metanol. Após pulverização, as placas eram aquecidas a 100°C por 10 a 20 minutos.

c. Reagente de ácido nítrico-nitrito (SMITH, 1969).

1 ml de nitrito de sódio 5% era acrescentado a 5 ml de ácido nítrico concentrado e 45 ml de acetona. Esse reagente é específico para indol-3-acetonitrila sendo que reage com essa substância produzindo cor azul cinzento ou verde olivácea, com fluorescência azul ou verde sob luz ultra violeta.

Como padrões de auxinas utilizaram-se AIA (1 mg: 2 ml de etanol) e IAN, indol-3-acetonitrila (1 mg: 2 ml de etanol). Foram, em geral, aplicados 10 µl de cada padrão.

Os desenhos dos cromatogramas foram sempre feitos a partir do ponto de origem até a frente de corrida dos solventes.

E. Análise estatística

Para a análise estatística os valores de germinação dados em porcentagem foram transformados em $\text{arc sen } \sqrt{\%}$ ou extraiu-se a raiz quadrada desses valores, que foram utilizados na análise de variância, onde se usou o teste F. Quando os valores obtidos para F foram significativos a 5%, determinou-se a Diferença Mínima Significativa (DMS), que foi usada para análise das diferenças entre as médias dos tratamentos pelo teste de Tukey (SNEDECOR e COCHRAN, 1967). No caso dos bioensaios foram utilizados os valores obtidos (sem transformação) para a análise de variância e a DMS foi calculada sendo apresentada nos histogramas pelas regiões hachuradas.

RESULTADOS

A. Germinação

1. Efeito de luz

1.1. Germinação em luz branca constante e escuro constante

Quinze amostras de tres coletas diferentes, com diferentes períodos de armazenamento foram testadas quanto à germinação, sob luz branca constante e escuro constante, a 25°C. Como se observa na Figura 6, o percentual de germinação sempre foi maior sob luz branca constante do que no escuro constante, sendo que a diferença sempre foi estatisticamente significativa (teste t a 95 por cento). Nas quinze amostras, cujo período de armazenamento variou de 48 dias a 175 dias, a maior porcentagem de germinação observada para luz branca constante foi de 65 por cento e a menor de 38 por cento. A maior porcentagem de germinação no escuro constante foi de 19 por cento e a menor de 4 por cento. O fotoblastismo positivo é independente da coleta e do período de armazenamento, como se observa na coleta a, de 48 dias de armazenamento, cuja porcentagem de germinação sob luz branca constante foi de 63 por cento, enquanto que no escuro constante foi de 12 por cento, e na coleta b de 175 dias, com um percentual de germinação sob luz branca constante de 52,5 por cento e 15,5 por cento no escuro constante. Esses dados evidenciam que a resposta fotoblástica

Figura 6. Germinação de *Stevia rebaudiana* em luz branca e escuro constantes, a 25°C após 12 dias de embebição. Aquênios de coletas diferentes e períodos diferentes de armazenamento foram usados. Em todos os casos, a diferença entre a germinação na luz e no escuro é estatisticamente significativa (teste t). Usaram-se 100 aquênios por tratamento. As letras a, b e c indicam as tres coletas diferentes utilizadas:

Coleta a - UNICAMP, novembro de 1977

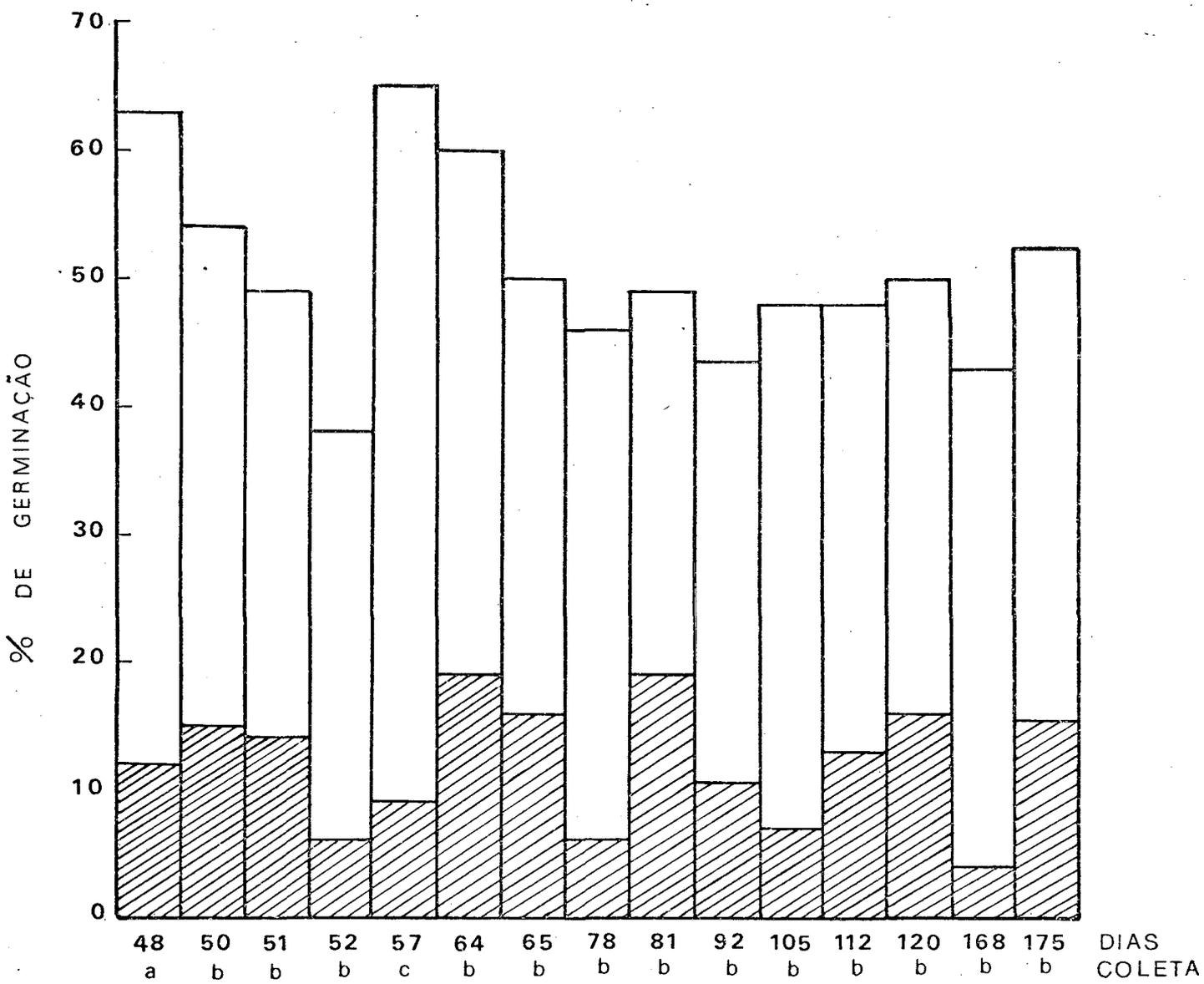
Coleta b - UNICAMP, março de 1977

Coleta c - Instituto de Botânica, SP - novembro de 1977.

Luz branca constante

Escuro constante

FIG 6



não variou (embora tenha variado a porcentagem de germinação) conforme o período de armazenamento e a coleta.

1.2. Efeito de luzes de diferentes comprimentos de onda

Verificou-se o efeito de luzes verde, azul, vermelha e vermelho extremo constantes na germinação de *Stevia*, a 25°C.

Os resultados apresentados na Tabela 5 indicam que as luzes azul (a) e verde (b) não têm efeito na germinação de *Stevia*, sendo que as porcentagens de germinação para aquênios embebidos sob esses comprimentos de onda são estatisticamente iguais a germinação no escuro constante. ^{Em um segundo} ~~Em outros~~ experimentos onde se verificou o efeito de luz azul na germinação de aquênios de *Stevia rebaudiana* observou-se 17 por cento de germinação no escuro e 15 por cento sob luz azul. Em um ^{terceiro} ~~segundo~~ experimento, a porcentagem de germinação no escuro foi de 16 por cento e de apenas 1 por cento sob luz azul. A luz vermelha (Tabela 5 c) promoveu a germinação, sendo que o percentual de germinação de aquênios submetidos a esse tratamento luminoso é estatisticamente igual ao percentual de germinação sob luz branca constante. Vermelho extremo inibiu a germinação e o percentual de germinação sob esse comprimento de onda é menor do que o de escuro constante (Tabela 5 d).

Tabela 5. Efeito de luzes azul, verde vermelho e vermelho extremo constantes na germinação de *Stevia rebaudiana*.
Dados em porcentagem.

a. Luz azul

	Dias de germinação			
	5	7	9	12
Luz branca constante	40,00	47,00	48,00	49,00
Escuro constante	2,00	5,00	10,00	14,00
Azul constante	2,00	8,00	15,00	21,00
DMS 5%				18,90

b. Luz verde

	Dias de germinação			
	4	7	9	11
Luz branca constante	16,00	42,00	47,00	47,00
Escuro constante	0,00	6,00	17,00	20,00
^{Verde} Azul constante	1,00	11,00	18,00	21,00
DMS 5%				11,00

Tabela 5. Continuação

c. Luz vermelha

	Dias de germinação		
	7	10	12
Luz branca constante	31,33	33,33	43,33
Escuro constante	3,33	5,33	10,66
Vermelho constante	37,33	40,00	46,00
DMS 5%			3,32

d. Vermelho extremo

	Dias de germinação		
	6	11	13
Luz branca constante	33,00	57,00	65,00
Escuro constante	1,00	5,00	9,00
Vermelho extremo constante	3,00	3,00	3,00
DMS 5%			5,12

1.3. Efeito de choques de vermelho

1.3.1. Choque longo de vermelho em aquênios sem embebição prévia no escuro constante

Na Figura 7 a observa-se que choque longo de vermelho, de 72 horas, em aquênios que não foram previamente embebidos em condições de escuro constante, é parcialmente revertido pelo escuro constante, que foi fornecido até o final do experimento. Diz-se que a reversão é parcial uma vez que o percentual de germinação obtido ao final do experimento é estatisticamente maior do que o de controle de escuro constante e estatisticamente menor do que o controle de luz vermelha constante.

1.3.2. Choques curtos de vermelho após 48 horas de embebição no escuro.

Na Figura 7 b, observa-se que choques curtos de vermelho, de 60, 180 e 300 minutos promovem a germinação de *Stevia*. O mesmo foi verificado quando os choques eram dados após 24 e 72 horas de embebição no escuro.

1.3.3. Reversão vermelho-vermelho extremo

Choques curtos de vermelho, de 60 minutos de duração, após 48 horas de embebição no escuro, foram revertidos por choques curtos de vermelho extremo, de 60, 180 e 300 minutos. Os percentuais de germinação para aquênios submetidos a esses tratamentos são estatisticamente iguais ao de controle

Figura 7. Efeito de choques de vermelho em *Stevia rebaudiana*. Foram usados 100 aquênios por tratamento. DMS a 5% para os valores finais é apresentado. Temperatura = 25°C.

a. Reversão de escuro pelo vermelho e vermelho pelo escuro.

▽ Vermelho constante

● Escuro constante

□ 72 horas de embebição sob luz vermelha seguidas de escuro até o final do experimento.

b. Choques curtos de vermelho após 48 horas de embebição no escuro.

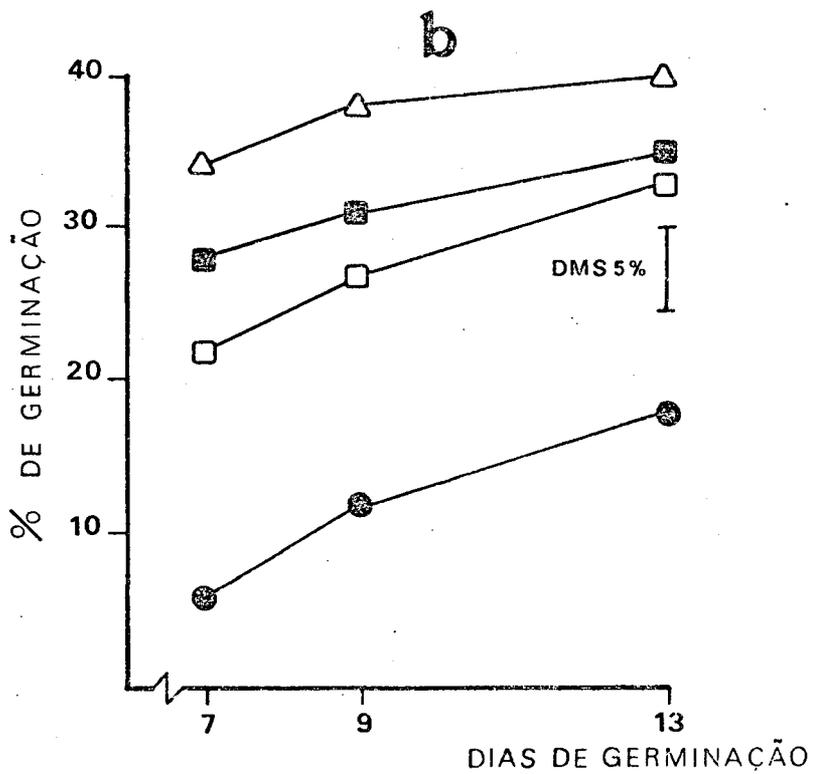
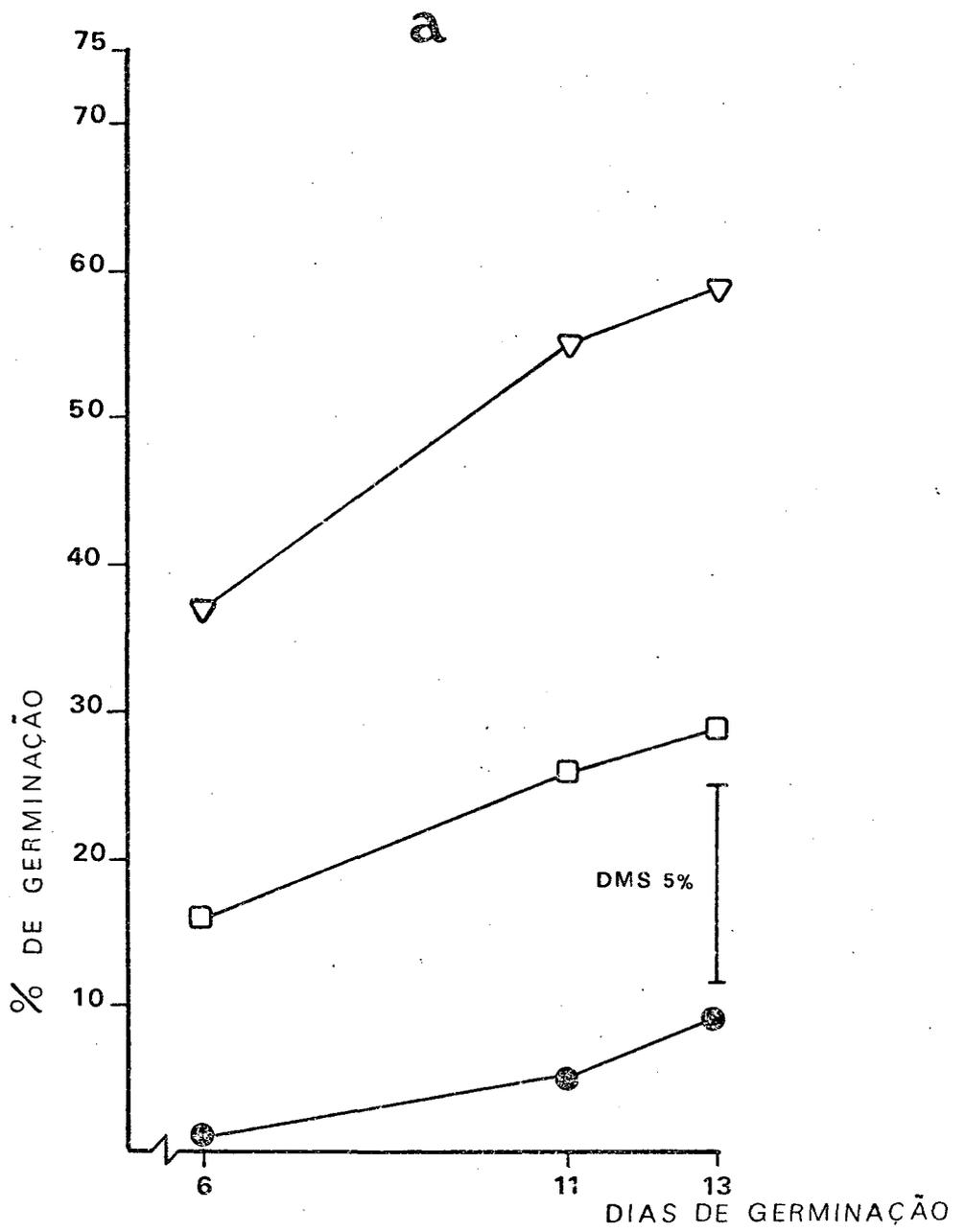
● Escuro constante

□ Choque de 60 minutos

■ Choque de 180 minutos

△ Choque de 300 minutos

FIG 7



de escuro constante, ao final do experimento (Figura 8 a).

1.3.4. Reversão vermelho extremo - luz branca

Na Figura 8 b, observa-se que choque longo de vermelho extremo, de 72 horas, em aquênios não submetidos à embebição no escuro, foi revertido pela luz branca constante até o final do experimento. O resultado obtido após esse tratamento foi estatisticamente igual, a nível de 5 por cento, ao controle de luz branca constante.

Choque longo de luz branca, de 72 horas, em aquênios não submetidos à embebição prévia no escuro, foi revertido pelo vermelho extremo fornecido até o final do experimento. O resultado obtido após esse tratamento mostrou que ele foi estatisticamente igual, a nível de 5 por cento, ao controle de escuro constante.

1.3.5. Reversão de vermelho pelo azul

Choques curtos de luz vermelha, de 60 minutos de duração, após 48 horas de embebição no escuro, foram seguidos por choques de luz azul, de 60 e 180 minutos de duração. Após esses tratamentos, as placas foram mantidas no escuro até o final do experimento.

Na Figura 9 observa-se que os choques de luz azul não reverteram o efeito de luz vermelha, que promoveu a germinação. Os resultados apresentados na Figura 7 b, são comparáveis aos resultados obtidos nesse experimento, visto que choques curtos de luz vermelha promovem a germinação de *Stevia*.

Figura 8. Efeito de reversão de vermelho pelo vermelho extremo e reversão de vermelho extremo pela luz branca e luz branca pelo vermelho extremo em *Stevia rebaudiana*. Foram usados 100 aquênios por tratamento. DMS 5% para os valores finais é apresentado.

a. Reversão de vermelho pelo vermelho extremo após 48 horas de embebição no escuro.

Choques de vermelho tiveram duração de 60 minutos.

- Luz branca constante.
- Escuro constante.
- Choque de vermelho, seguido de choque de vermelho extremo de 60 minutos de duração.
- Choque de vermelho, seguido de choque de vermelho extremo de 180 minutos de duração.
- △ Choque de vermelho, seguido de choque de vermelho extremo de 300 minutos de duração.

b. Reversão de luz branca pelo vermelho extremo e vermelho extremo pela luz branca.

- Luz branca constante.
- Escuro constante.
- 72 horas de embebição sob vermelho extremo seguidas de luz branca até o final do experimento.
- 72 horas de embebição sob luz branca seguidas de vermelho extremo até o final do experimento.

Todos os experimentos foram realizados a 25°C.

FIG 8

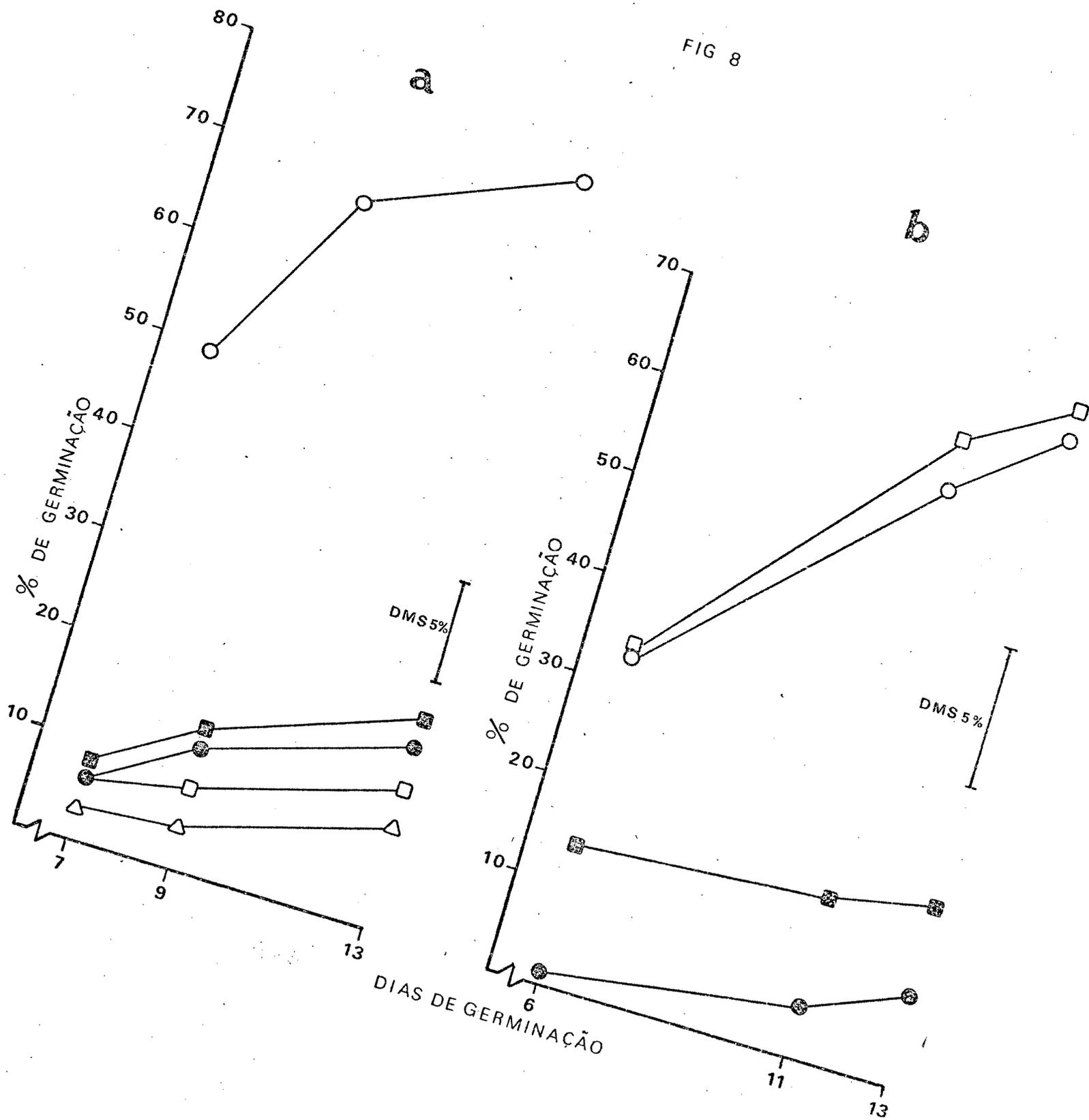
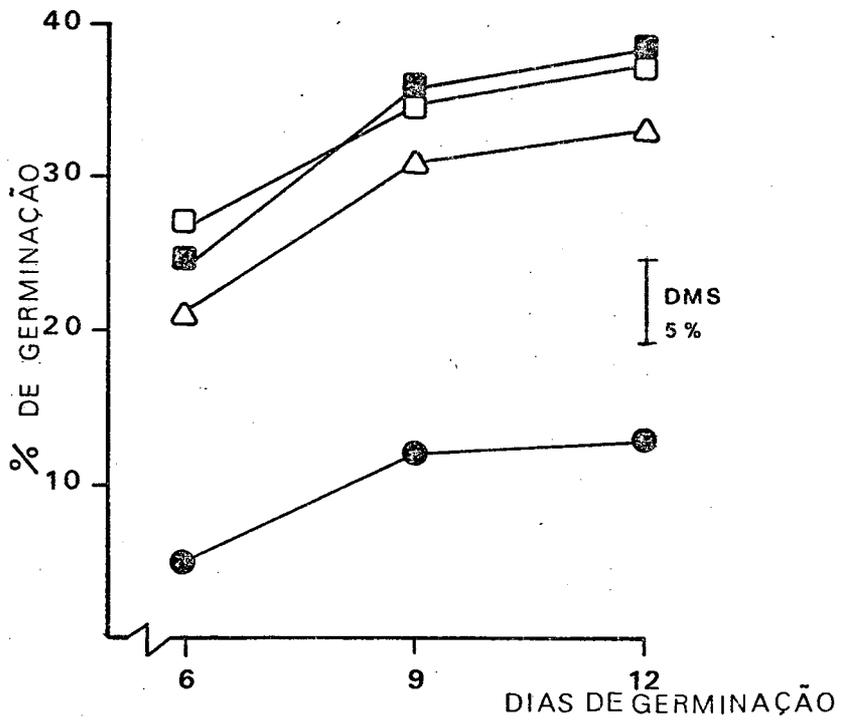


Figura 9. Efeito de luz vermelha seguida de luz azul, na germinação de aquênios de *Stevia rebaudiana*. Choques de luz realizados após 48 horas de embebição no escuro. Foram usados 100 aquênios por tratamento. DMS a 5% para o valor final é apresentada.

- Escuro constante
- Choque de vermelho de 60 minutos de duração
- Choque de vermelho de 60 minutos de duração, seguido de choque de azul de 60 minutos de duração.
- △ Choque de vermelho de 60 minutos de duração, seguido de choque de azul de 180 minutos.

FIG 9



2. Efeito de temperatura

2.1. Efeito de temperatura constante na germinação.

O efeito de temperaturas constantes foi verificado na germinação de aquênios mantidos sob luz branca e escuro constantes. Verificou-se o efeito das seguintes temperaturas: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40°C.

Na Figura 10 a, observa-se que a maior porcentagem de germinação no escuro constante, ocorre a 25°C, mas porcentagens de germinação a 10 e 15°C são estatisticamente iguais a de 25°C, a nível de 5 por cento. As porcentagens de germinação a 20, 30 e 35°C foram estatisticamente iguais entre si, mas menores que 10, 15 e 25°C. A germinação foi totalmente inibida nas temperaturas de 5 e 40°C.

A Figura 10 b mostra que em luz branca constante, a maior porcentagem de germinação ocorre a 25°C. As demais temperaturas testadas inibiram, estatisticamente a germinação de *Stevia*, a nível de 5 por cento. Observa-se que ocorre uma diminuição gradual da porcentagem de germinação a medida que a temperatura se elevou ou diminuiu, a partir de 25°C. As porcentagens de germinação a 20 e 30°C foram iguais entre si, mas menores que a do controle a 25°C e maiores que nas demais temperaturas; as porcentagens de germinação a 15 e 35°C foram iguais entre si, mas estatisticamente menores do que as porcentagens de germinação a 20 e 30°C. A porcentagem de germinação a 10°C foi estatisticamente menor do que a 15°C, porém igual a de 35°C. As temperaturas de 5 e 40°C inibiram totalmente a ger

Figura 10. Efeito de temperaturas constantes na germinação de *Stevia rebaudiana*. Foram usados 100 aquênios por tratamento. DMS a 5% para os valores finais é apresentada.

a. Germinação no escuro constante.

b. Germinação sob luz branca constante.

○ 25°C

● 5 e 40°C

△ 10°C

▲ 15°C

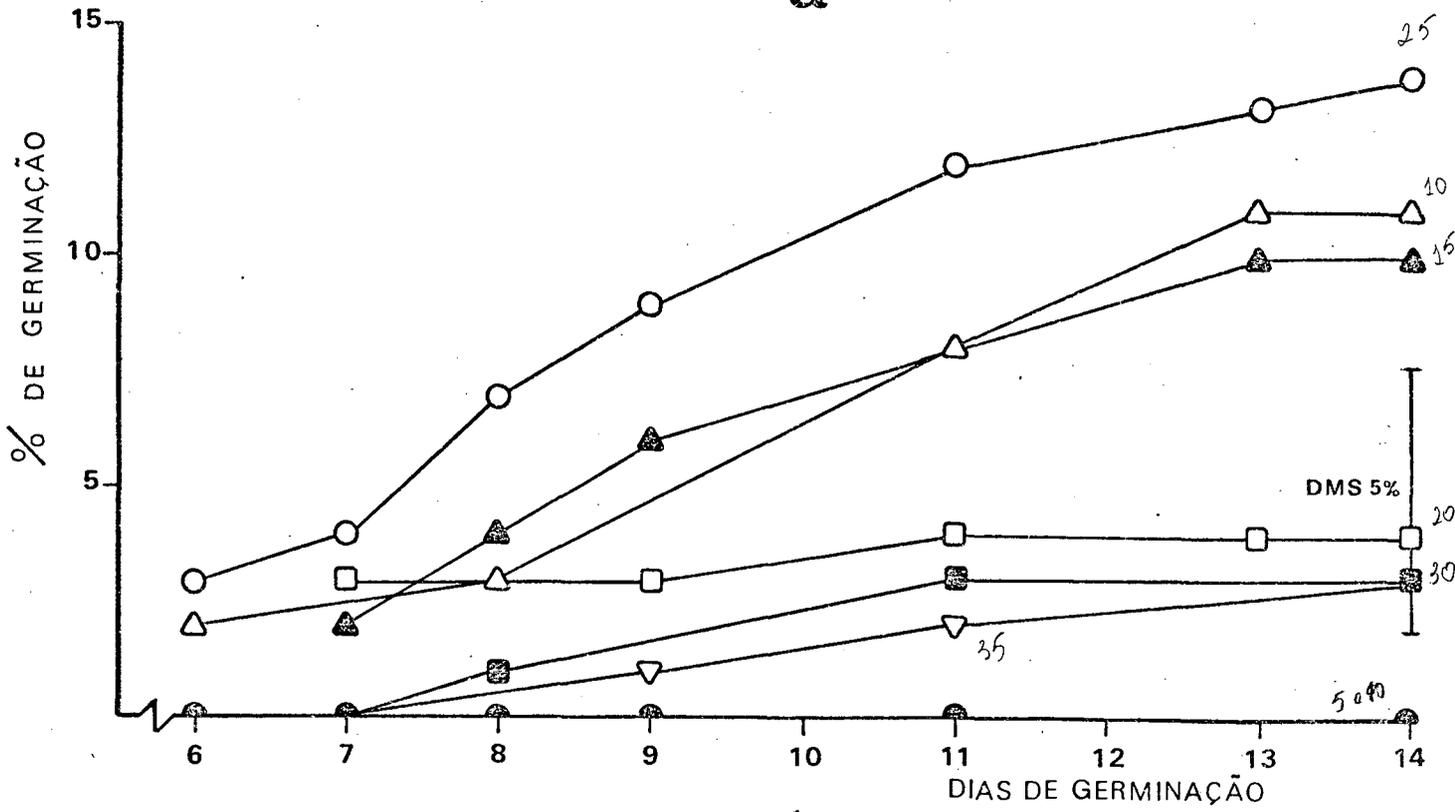
□ 20°C

■ 30°C

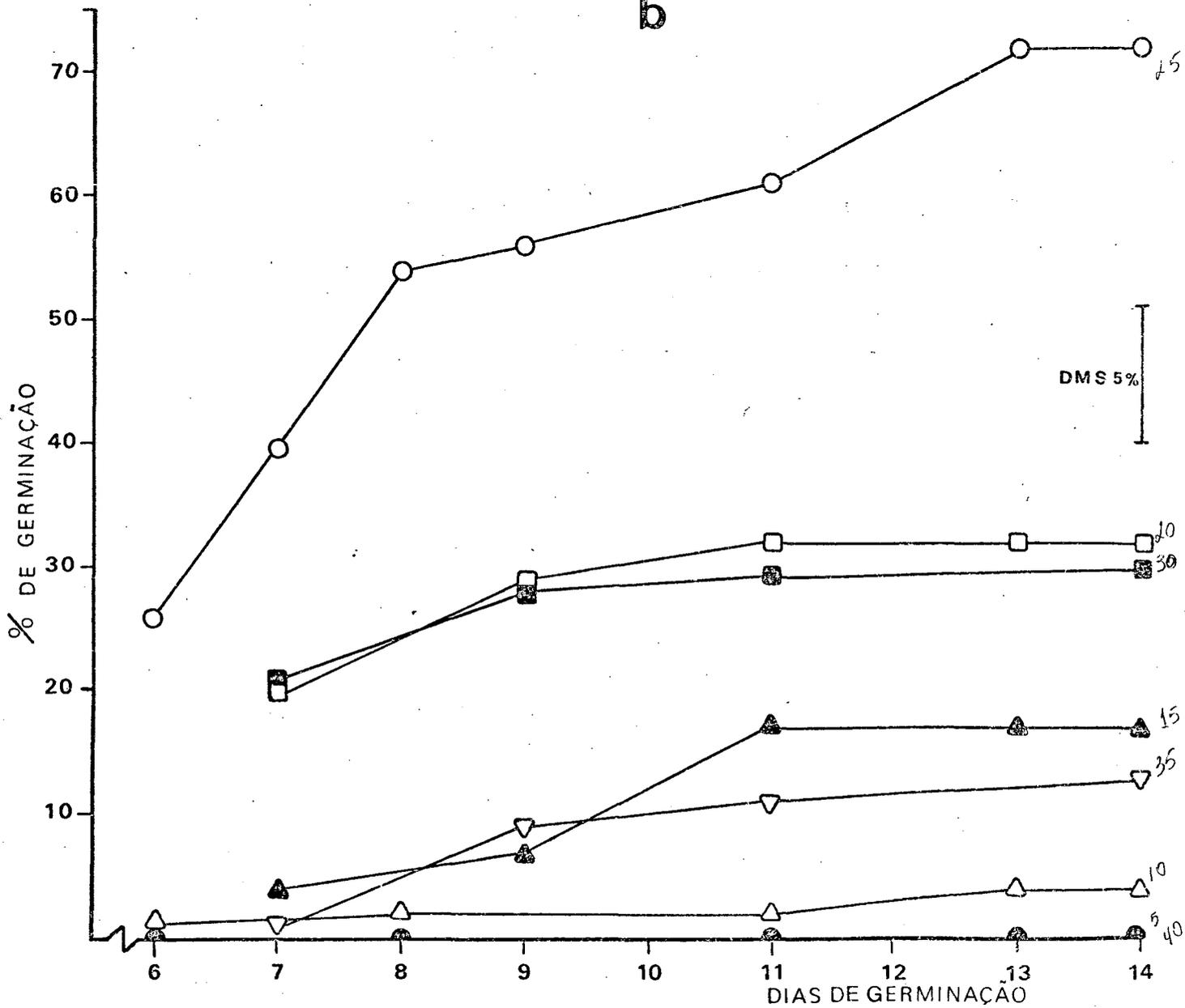
▽ 35°C

FIG 10

a



b



minação. Entretanto, aquênios que permaneceram durante 12 dias a 5°C germinaram normalmente quando transferidos para câmara a 25°C (luz constante) o que significa que a temperatura baixa não causa morte do embrião. A temperatura de 40°C causa a morte dos aquênios.

2.2. Efeito de temperaturas alternadas na germinação no escuro constante.

Verificou-se o efeito das seguintes alternâncias de temperaturas: 25 - 35°C, 25 - 30°C, 25 - 20°C, 25 - 15°C, 25 - 10°C, 25 - 5°C e 25 - 0°C.

Na Figura 11, observa-se que nenhuma das alternâncias testadas promoveu a germinação de *Stevia* no escuro constante.

O gráfico da Figura 11 é uma sobreposição de diferentes experimentos. Dessa forma, não foi possível a realização de uma única análise estatística para a referida figura, uma vez que nem sempre os dias das contagens de germinação foram coincidentes. Entretanto, para cada experimento realizado, fez-se a análise estatística, e observou-se que os valores obtidos para F sempre foram não significativos a 5 por cento, em relação à germinação a 25°C no escuro.

2.3. Choques de temperatura baixa

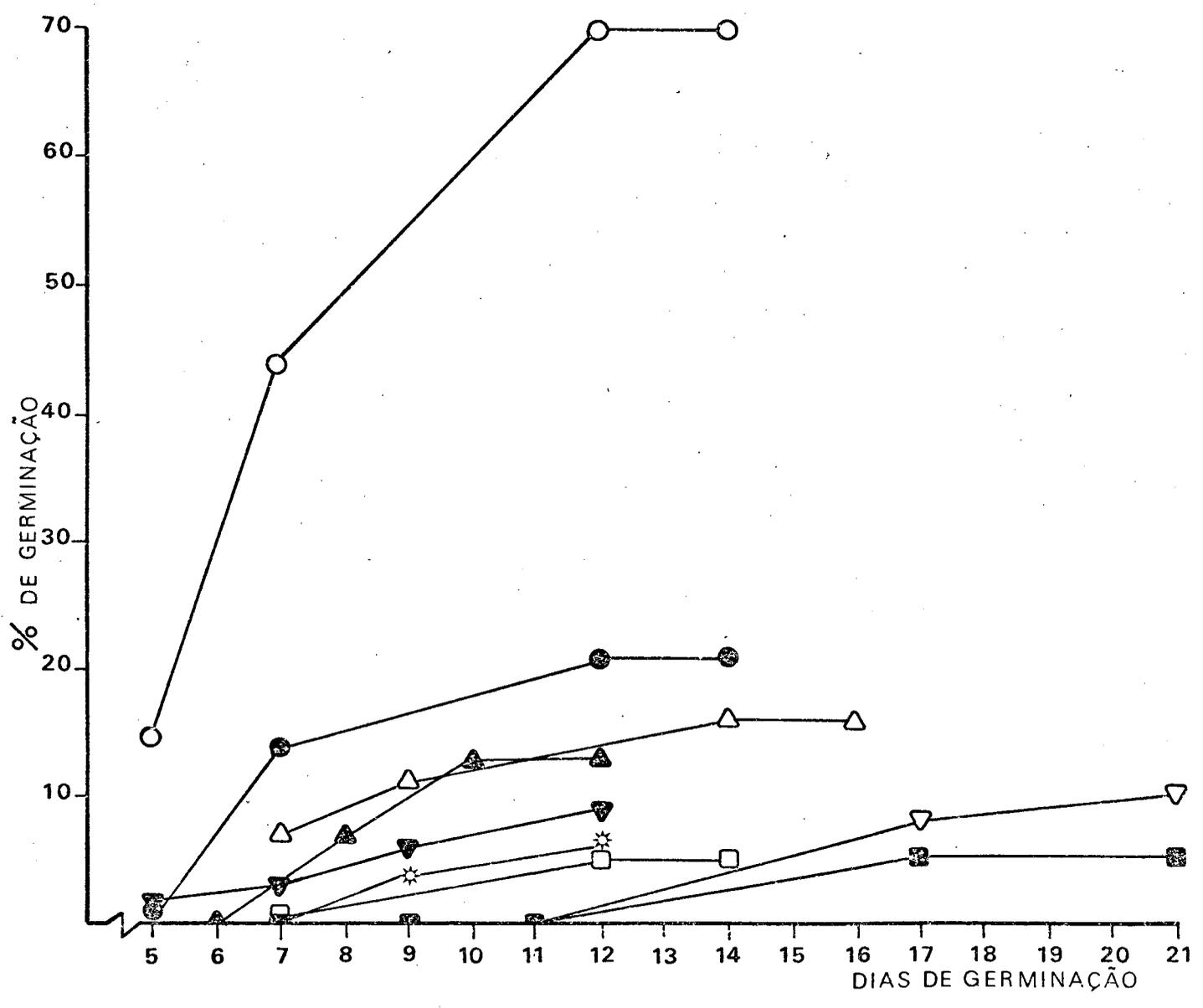
Na Tabela 6, observa-se o efeito de choques de 0°C em aquênios mantidos no escuro constante, a 25°C. Nesses experimentos foram feitos tres controles complementares, além

Figura 11. Efeito de alternância de temperaturas na germinação de *Stevia rebaudiana* no escuro constante.

Foram usados 100 aquênios por tratamento. O gráfico representa uma sobreposição de experimentos isolados. A análise estatística foi feita para cada experimento isolado, sendo que F foi não significativo a 5%, para a germinação no escuro a 25°C, em todos os experimentos.

- Luz branca constante, a 25°C
- Escuro constante, a 25°C
- * 25 - 35°C
- ▼ 25 - 30°C
- △ 25 - 20°C
- ▲ 25 - 15°C
- 25 - 10°C
- 25 - 5°C
- ▽ 25 - 0°C

FIG 11



dos usuais controles de luz branca constante e escuro constante, a 25°C . Os choques de temperatura foram realizados após 24, 48 e 72 horas de embebição no escuro a 25°C . Os aquênios permaneceram no escuro durante os choques. Os tres controles referidos dizem respeito ao período de tempo que os aquênios devem permanecer em uma câmara até que atinjam a temperatura regulada para o choque. Como se observa na Tabela 6, os aquênios permaneceram durante 20 minutos em câmara a 0°C (ver material e métodos). Os resultados dos controles de escuro constante a 25°C são semelhantes aos resultados dos controles de 20 minutos na câmara a 0°C , para 24, 48 e 72 horas de embebição no escuro a 25°C .

Os choques de 2 horas tiveram início após permanência dos aquênios por 20 minutos na câmara a 0°C . Os resultados dos choques após 24, 48 e 72 horas de embebição no escuro a 25°C são semelhantes ao resultado do controle de escuro a 25°C . Os dados apresentados foram determinados a partir de vários experimentos.

2.4. Choques de temperatura alta.

Para a realização dos choques de temperatura alta (45°C) procedeu-se da mesma maneira que para os choques de temperatura baixa. Nesse caso, o controle do tempo da elevação da temperatura do choque, dentro dos aquênios, foi de 30 minutos. Os choques tiveram início após decorrido esse intervalo de tempo. Os períodos de embebição no escuro foram de 24, 48 e 72 horas. Os tres controles foram semelhantes ao controle de escuro constante, a 25°C . Os choques realizados após 24, 48 e

Tabela 6. Choque de temperatura baixa (0°C) em aquênios de *Stevia rebaudiana* mantidos no escuro. Temperatura controle 25°C. Resultados em porcentagem, para 10 dias de germinação.

Controle de luz branca constante a 25°C = 49%

Controle de escuro constante = 21%

Período de embebição antes do choque horas	Germinação	
	Tratamento a 0°C (Choque)	
	20 min.	20 min. + 2 horas
24	17,00	16,00
48	13,00	16,00
72	20,00	17,00

72 horas de embebição no escuro apresentaram percentuais de germinação semelhantes aos de controle de escuro a 25°C (Tabela 7). Os dados apresentados foram determinados a partir de vários experimentos.

3. Efeito de substâncias e reguladores de crescimento na germinação.

3.1. Efeito de ácido giberélico (GA₃).

Na Tabela 8 observa-se o efeito de GA₃ na germinação de aquênios mantidos no escuro constante a 25°C.

GA₃ na concentração de 50 mg/l promoveu estatisticamente, a nível de 5 por cento, a germinação de *Stevia*, enquanto que na concentração de 100 mg/l a porcentagem final de germinação foi estatisticamente igual ao controle de escuro.

3.2. Efeito de 6 benzil adenina (6BA)

O efeito de 6BA na germinação de *Stevia* no escuro constante é mostrado na Tabela 9.

Os resultados finais de porcentagem de germinação mostram que 6BA não tem efeito em promover a germinação de aquênios de *Stevia* mantidos no escuro. Os dados apresentados na Tabela 9 e confirmados em outros experimentos parecem mostrar que a referida substância induz uma inibição da germinação de aquênios de *Stevia* mantidos no escuro.

Tabela 7. Choque de temperatura alta (45°C) em aquênios de *Stevia rebaudiana* mantidos no escuro. Temperatura controle = 25°C. Resultados em porcentagem, para 10 dias de germinação.

Controle de luz branca constante a 25°C = 60%

Controle de escuro constante a 25°C = 19%

Período de embebição antes do choque horas	Germinação	
	Tratamento a 45°C (Choque)	
	20 min.	20 min. + 2 horas
24	10,00	11,00
48	9,00	10,00
72	11,00	14,00

Tabela 8. Efeito de GA₃ na germinação de *Stevia rebaudiana* no escuro. Resultados em porcentagem. Temperatura = 25^o C.

GA ₃ mg/l	Dias de Germinação		
	6	8	11
0,00	1,00	3,00	6,00
50,00	6,00	18,00	28,00
100,00	2,00	9,00	10,00
Luz branca constante (água)	36,00	38,00	38,00
DMS 5%			5,18

Tabela 9. Efeito de 6BA na germinação de *Stevia rebaudiana* no escuro. Resultados em porcentagem. Temperatura = 25°C.

6BA mg/l	Dias de Germinação		
	7	9	11
0,00	1,00	5,00	8,00
1,00	0,50	3,50	5,50
5,00	1,50	2,00	5,00
10,00	1,00	4,50	6,50
25,00	0,00	0,00	1,00
50,00	1,00	1,00	2,00
Luz branca constante (água)	28,00	42,00	43,00
DMS 5%			1,50

3.3. Efeito de ácido indol-3-acético (AIA)

O efeito de várias concentrações de ácido indol-3-acético pode ser visto na Tabela 10. Os aquênios foram mantidos no escuro constante a 25°C.

A germinação de *Stevia*, no escuro, não foi afetada por AIA a 0,1 mg/l, ou seja, os valores finais de germinação nesse tratamento são estatisticamente iguais ao controle de água destilada. Já, as concentrações de 1 mg/l e 10 mg/l causam uma inibição de germinação estatisticamente significativa a nível de 5 por cento. A germinação foi totalmente inibida nas concentrações de 25 e 50 mg/l.

3.4. Efeito de ácido 2-cloroetil fosfônico (ETREL)

Etrei foi aplicado em aquênios mantidos no escuro constante, em várias concentrações. Na Tabela 11, observa-se que os valores finais de germinação de aquênios tratados com as referidas concentrações de Etrei são estatisticamente iguais, a nível de 5 por cento, ao controle de água destilada, em aquênios mantidos no escuro.

3.5. Efeito de ácido abscísico (ABA)

Ácido abscísico, nas concentrações de 1 mg/l e 10 mg/l foi aplicado a aquênios mantidos sob luz branca constante. A concentração de 1 mg/l inibiu estatisticamente, a nível de 5 por cento, a germinação de *Stevia* em luz constante. A

Tabela 10. Efeito de AIA na germinação de *Stevia rebaudiana* no escuro. Resultados em porcentagem. Temperatura = 25°C.

AIA mg/l	Dias de germinação			
	6	8	10	13
0,00	0,00	1,50	6,50	14,50
0,10	0,00	3,00	7,00	13,00
1,00	0,00	3,00	4,00	5,00
10,00	0,00	1,00	3,00	8,00
25,00	0,00	0,00	0,00	0,00
50,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Luz branca constante (água)	36,00	40,00	42,00	46,00
DMS 5%				3,34

Tabela 11. Efeito de Etre1 na germinação de *Stevia rebaudiana* no escuro. Resultado em porcentagem. Temperatura = 25°C.

Etre1 mg/l	Dias de Germinação	
	7	11
0,00	6,00	11,50
5,00	4,50	12,50
10,00	4,50	14,00
25,00	6,00	14,00
50,00	4,50	9,00
100,00	2,00	9,50
200,00	4,00	10,50
Luz branca constante (água)	32,00	36,00
DMS 5%		7,06

inibição de germinação foi total em aquênios embebidos com ABA 10 mg/l (Tabela 12).

B. Observação de aquênios clarificados

Na Tabela 13 observa-se o resultado obtido em testes onde nove amostras de aquênios foram clarificadas e estas dissecadas e observadas sob lupa binocular. Em seis dessas amostras foi feito também um controle de germinação sob luz branca constante. A porcentagem de aquênios férteis variou de um mínimo de 41 por cento a um máximo de 84 por cento, enquanto que a porcentagem mínima obtida para aquênios escuros estéreis foi de 16 por cento e a máxima de 59 por cento. No controle de germinação obteve-se um percentual mínimo de 38 por cento e um máximo de 63 por cento. Pela análise estatística foi mostrado que não há diferenças significativas entre os valores de germinação e os de aquênios férteis.

C. Efeito de Esteviosídeo em germinação

Na Tabela 14 observa-se o efeito de esteviosídeo na germinação de *Lactuca sativa* L c v. Crespa de Picar, *Rumex obtusifolius* L, *Cucumis melo* L, *Cucumis anguria* L e *Stevia rebaudiana* Bert.

O esteviosídeo não teve efeito na germinação das espécies testadas, ou seja, os valores finais de germinação das sementes tratadas com esteviosídeo são estatisticamente iguais a nível de 5 por cento, ao controle. Observa-se que

Tabela 12. Efeito de ABA na germinação de *Stevia rebaudiana* em luz branca constante. Resultados em porcentagem. Temperatura = 25°C. Teste t 95% para 2 graus de liberdade, entre controle (água) e ABA 1,0 mg/l = 6,64.

ABA mg/l	Dias de Germinação		
	6	8	13
0,00	27,00	40,00	48,00
1,00	0,00	1,00	6,00
10,00	0,00	0,00	0,00

Tabela 13. Aquênios clarificados de *Stevia rebaudiana*. Relação entre porcentagem de germinação e proporção de aquênios férteis e escuros estéreis. Resultados em porcentagem.

Diferenças não significativas entre os valores de germinação e a porcentagem de aquênios férteis (teste t a 95%).

Controle de germinação em luz branca constante a 25°C %	Proporção de aquênios férteis e estéreis na amostra	
	Aquênios férteis %	Aquênios escuros estéreis %
54,0	69,0	31,0
63,0	68,0	32,0
63,0	74,0	26,0
47,0	62,0	38,0
63,0	84,0	16,0
38,0	41,0	59,0
--	50,0	50,0
--	54,0	46,0
--	55,5	44,5

Tabela 14. Efeito de esteviosídeo na germinação de *Lactuca sativa* L cv. Crespa de Picar, *Rumex obtusifolius* L, *Cucumis anguria* L, *Cucumis melo* L e *Stevia rebaudiana* Bert.

Porcentagem final de germinação, F não significativo para todas as espécies estudadas, com exceção de *Stevia rebaudiana*.

Esteviosídeo mg/l	<i>L. sativa</i>		<i>R. obtusifolius</i>		<i>C. anguria</i>		<i>C. melo</i>		<i>S. rebaudiana</i>	
	dia 2	dia 6	dia 6	dia 10	dia 6	dia 12	dia 6	dia 12	dia 6	dia 12
0,0	98,0	95,0	95,0	81,0	92,5	54,0	92,5	92,5	54,0	54,0
5,0	99,0	89,0	89,0	85,0	97,5	51,2	97,5	97,5	51,2	51,2
10,0	96,0	95,0	95,0	82,0	90,0	54,6	90,0	90,0	54,6	54,6
50,0	96,0	93,0	93,0	89,0	97,5	48,4	97,5	97,5	48,4	48,4
100,0	87,0	96,0	96,0	87,0	97,5	45,8	97,5	97,5	45,8	45,8
Água: Etanol (controle)	93,0	93,0	93,0	87,0	82,5	45,4	82,5	82,5	45,4	45,4
DMS 5%	--	--	--	--	--	8,32	--	--	8,32	8,32

o controle de água destilada: etanol (400:1 v/v) causou uma inibição de germinação, em *Stevia*.

D. Detecção de Esteviosídeo

A Figura 12 representa cromatografia unidimensional de extratos de aquênios claros, aquênios escuros estéreis e aquênios férteis (Figura 12b, c e d respectivamente). O padrão de esteviosídeo foi detectado no R_f 0,34 e apresentou cor azul (Figura 12a). Os extratos de aquênios claros (Figura 12b), de aquênios escuros estéreis (Figura 12c) e de aquênios férteis (Figura 12d) apresentaram uma substância de cor azul em R_f s próximos ao do esteviosídeo padrão. Portanto, os tres tipos de aquênios de *Stevia rebaudiana* parecem apresentar este viosídeo.

A Figura 13 mostra resultados de cromatografia bidimensional para a detecção de esteviosídeo em aquênios escuros (estéreis e férteis juntos). O cromatograma representado na Figura 13 parece confirmar a existência de esteviosídeo no extrato.

Nos tres tipos de extratos de aquênios de *Stevia*, além da presença de esteviosídeo também se detectou uma mancha de cor marrom no R_f 0,90 (Figura 12b, c e d). Na cromatografia bidimensional onde foram usados dois sistemas de solventes, a mancha marrom detectada na cromatografia unidimensional separou-se em tres manchas. As duas primeiras apresentaram cor rosa e a terceira, cor marrom.

Figura 12. Cromatografia unidimensional para detecção de esteviosídeo.

Sistema de solventes: butanol: metanol: água (8:1:1 v/v).

Revelação: Antrona

- a. Padrão de esteviosídeo
- b. Extrato de aquênios claros
- c. Extrato de aquênios escuros estéreis
- d. Extrato de aquênios férteis.

A mancha do R_f menor é azul e a do R_f maior é marrom.

FIG 12

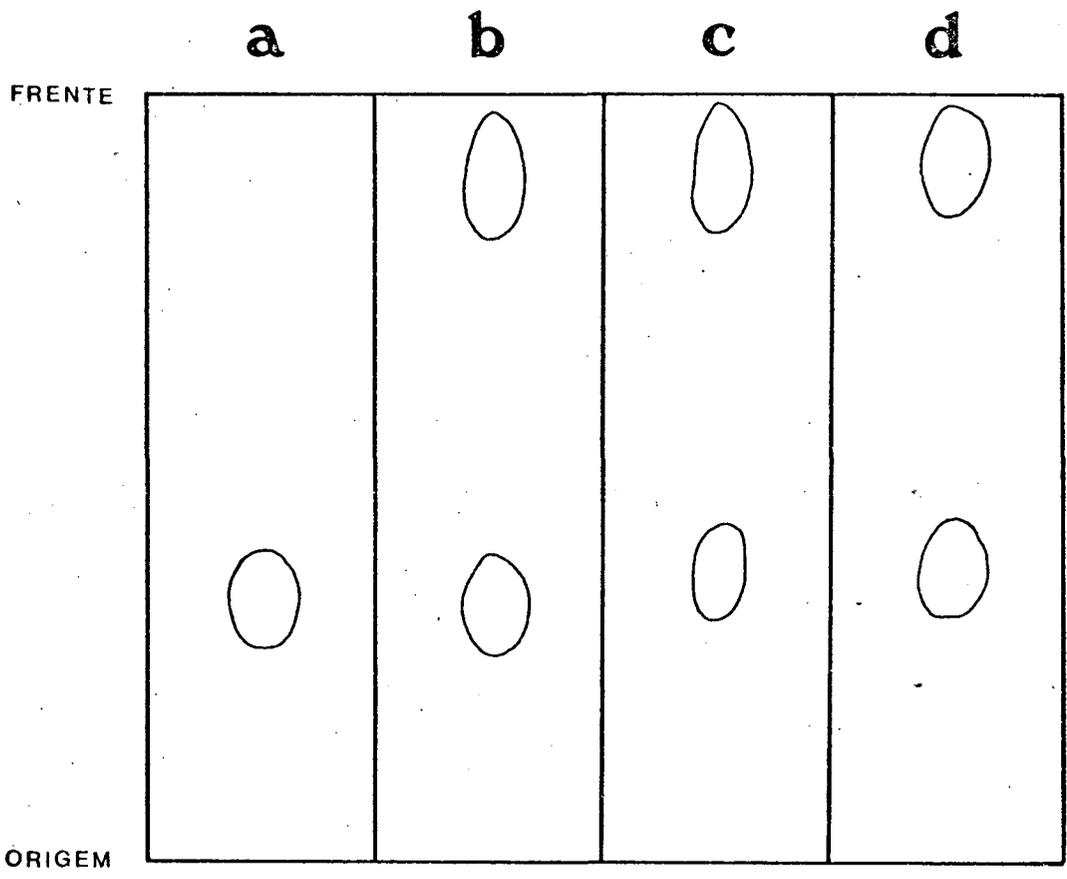


Figura 13. Cromatografia bidimensional para detecção de esteviosídeo.

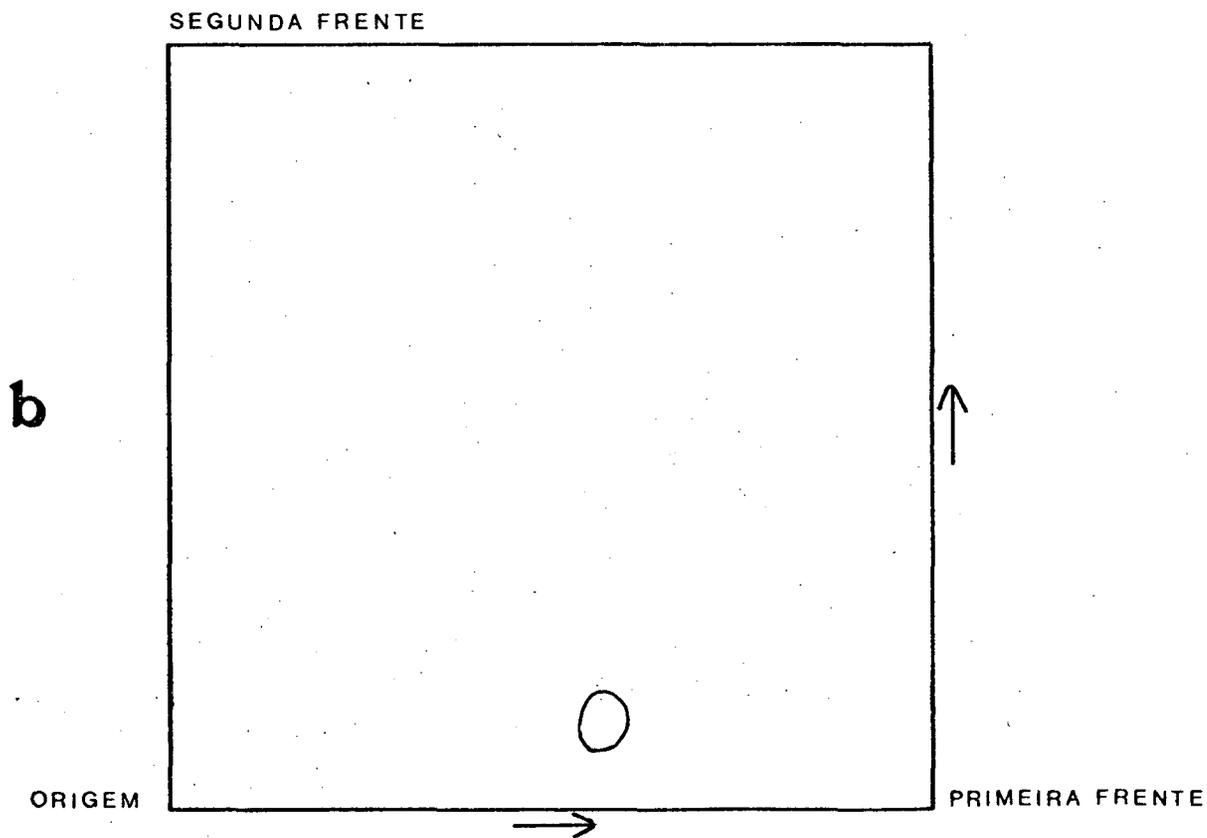
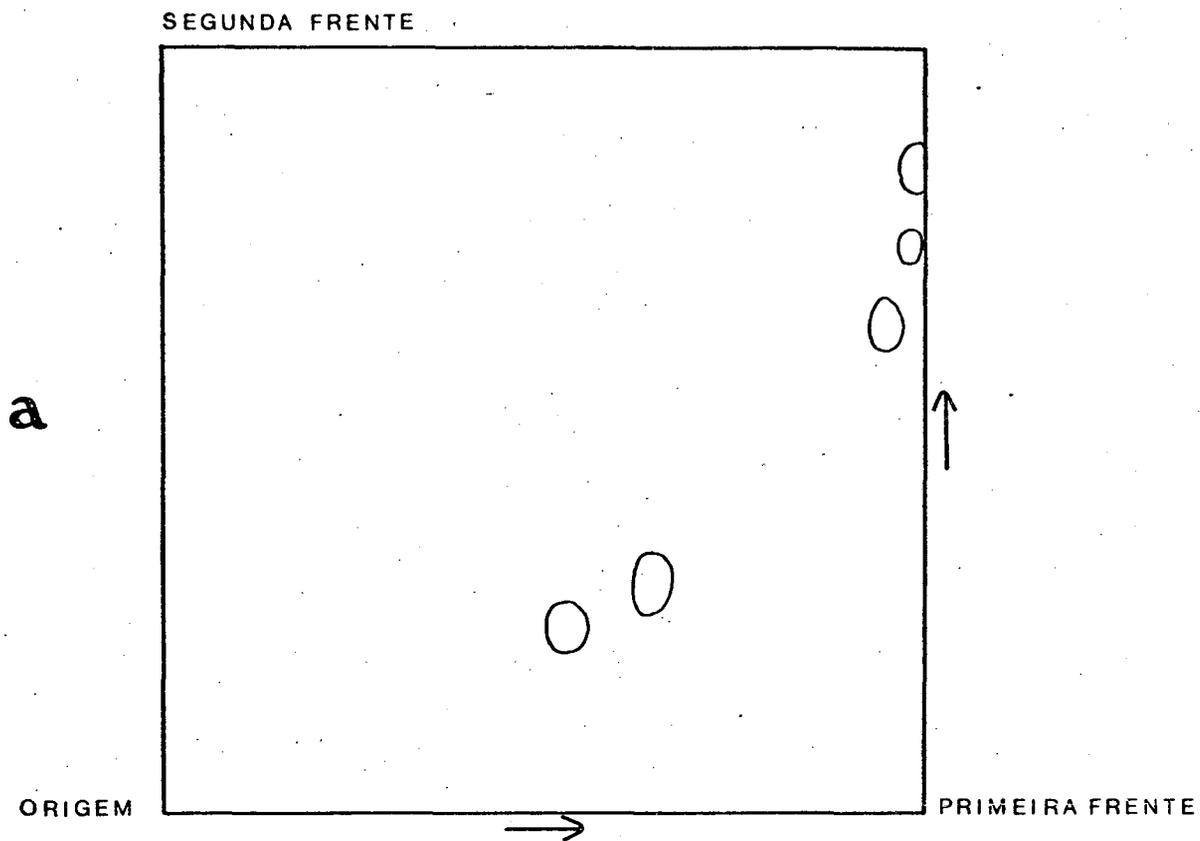
Sistemas de solventes:

- a. n-butanol: acetado de etila: isopropanol: água (35:100:60:30 v/v) no primeiro desenvolvimento (\rightarrow).
- b. acetato de etila: ácido acético: água (8:4:1 v/v) no segundo desenvolvimento (\uparrow). A seta indica a direção e o sentido do desenvolvimento.

Revelação - Antrona

- a. Extrato de aquênios escuros (mancha azul, R_f mais baixo).
- b. Esteviosídeo padrão (mancha azul).

FIG 13



E. Substâncias reguladoras de crescimento

1. Detecção por testes de crescimento

Os extratos dos tres tipos de aquênios de *Stevia rebaudiana* foram usados no bioteste do hipocôtilo de alface (FRANKLAND e WAREING, 1960). Não foram detectadas substâncias com atividade gibberelínica em extratos de aquênios claros (Figura 14a) e extratos de aquênios escuros estéreis (Figura 14b). Somente em extratos de aquênios férteis uma região de promoção de crescimento foi detectada entre os R_f s 0,90 e 1,00 (Figura 14c).

Numa variação do bioteste do hipocôtilo de alface, verificou-se também o efeito dos extratos no crescimento das radículas de alface. Na Figura 15a observa-se que extratos de aquênios claros apresentam uma região de promoção de crescimento de radícula entre os R_f s 0,90 e 1,00. A promoção de crescimento de radículas de alface ocorre também em extratos de aquênios escuros estéreis (Figura 15b) sendo que a faixa estende-se do R_f 0,80 ao R_f 1,00. A promoção de crescimento de radícula de alface foi observada em quase todos os R_f s dos extratos de aquênios férteis, não havendo promoção apenas entre os R_f s 0,1 e 0,2 e entre os R_f s 0,3 e 0,4. Entretanto, a máxima promoção de crescimento de radícula ocorreu entre os R_f s 0,8 e 0,9 (Figura 15c). A promoção de crescimento de radícula de alface parece ocorrer para extratos dos três tipos de aquênios de *Stevia rebaudiana*. Entretanto, a menor promoção ocorreu em extratos de aquênios claros onde houve um aumento de crescimen

Figura 14. Bioteste de hipocôtilo de alface.

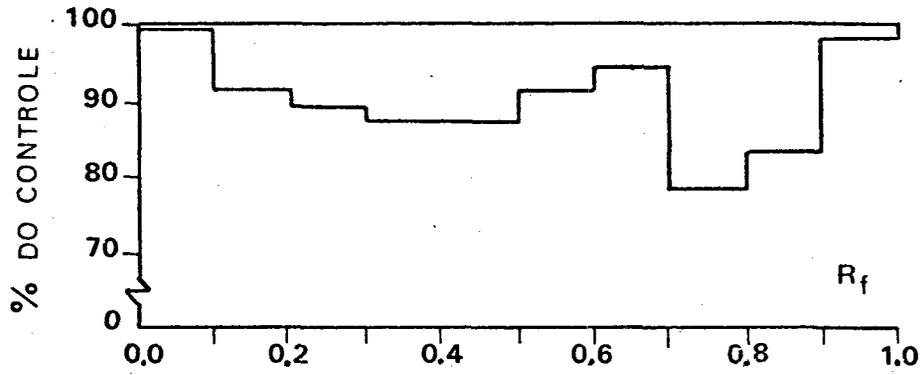
a. Extrato de aquênios claros

b. Extrato de aquênios escuros estéreis

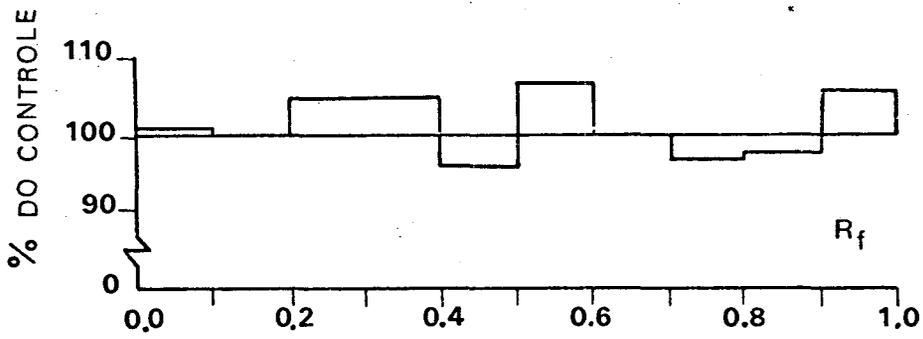
c. Extrato de aquênios férteis

FIG 14

a



b



c

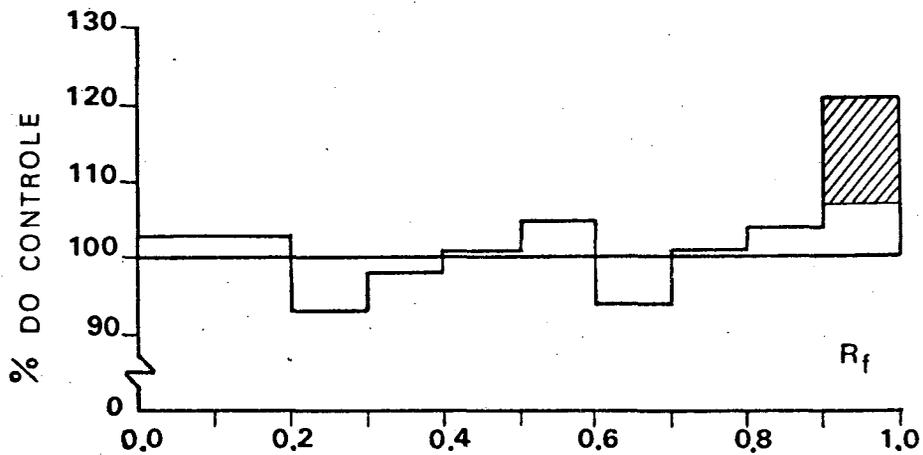
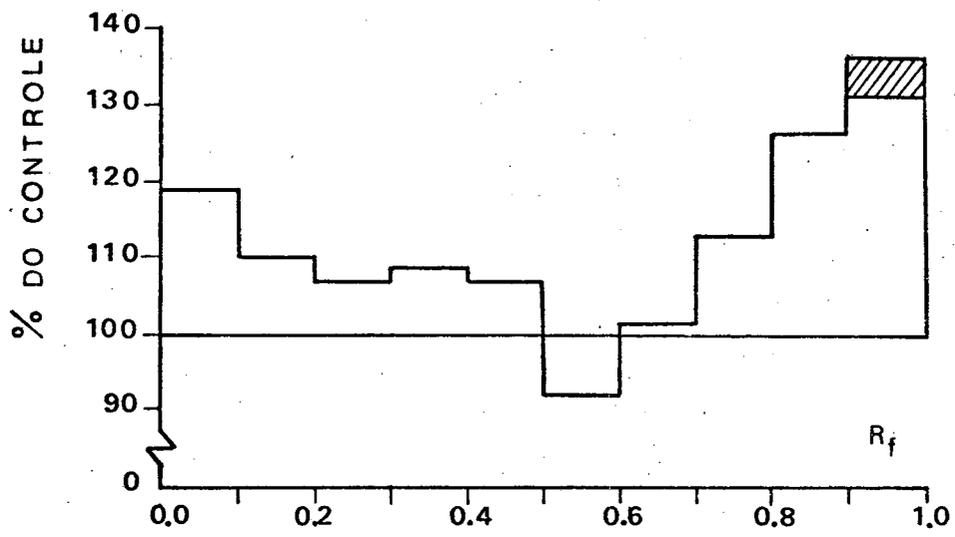


Figura 15. Efeito dos extratos de aquênios de *Stevia rebaudiana* no crescimento da radícula de plântulas de alfafa.

- a. Extrato de aquênios claros
- b. Extrato de aquênios escuros estéreis
- c. Extrato de aquênios férteis

FIG 15

a



b

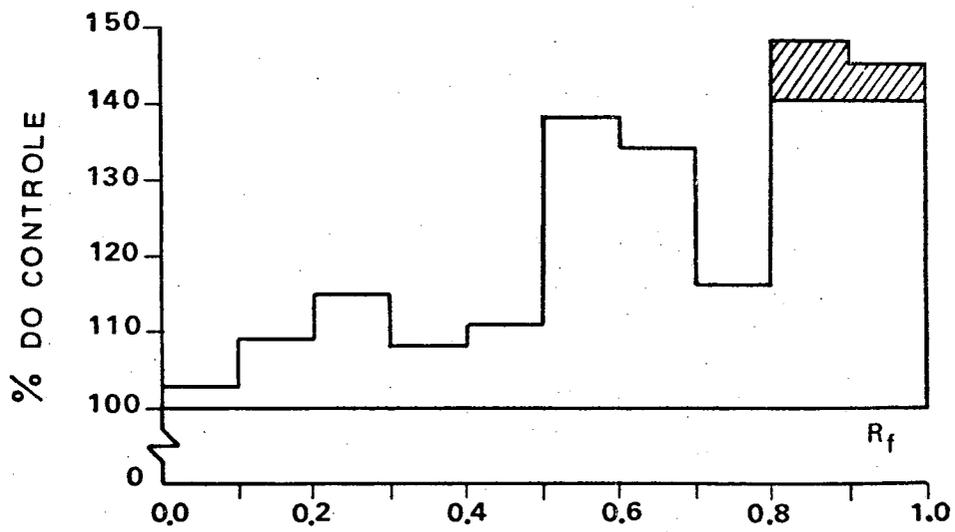
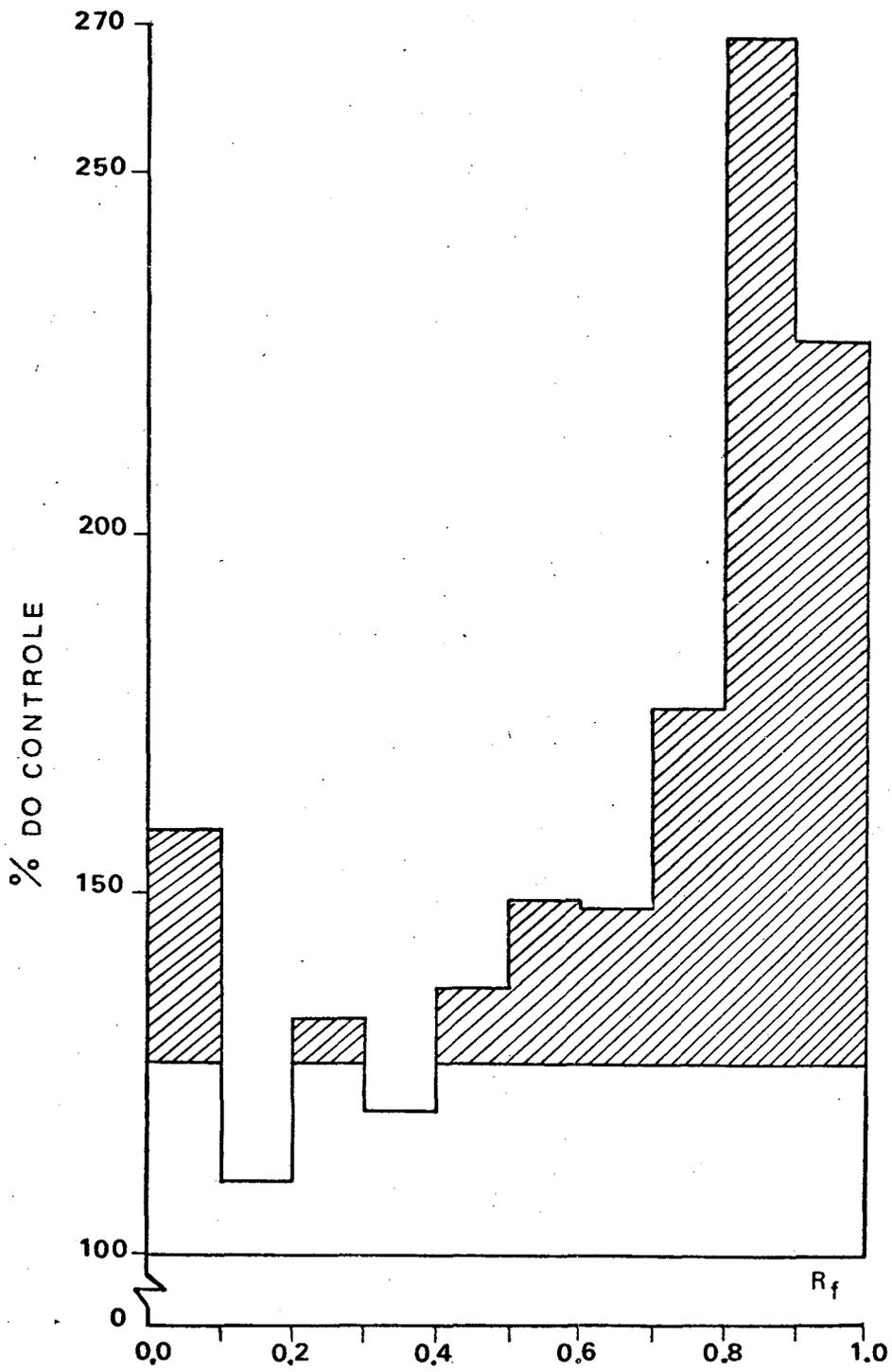


FIG 15

C



to de 36 por cento em relação ao controle e a maior promoção o correu em extratos de aquênios férteis, observando-se um crescimento de 169 por cento, em relação ao controle. Comparando-se os resultados obtidos nesse bioteste com os dados obtidos nos cromatogramas citados anteriormente, observa-se que a mancha de cor marrom detectada com antrona no R_f 0,9 parece coincidir com a região de promoção do crescimento de radículas de alface.

Houve pouca diferença na taxa de promoção obtida em extratos de aquênios claros e aquênios escuros estêreis. Na Figura 16, esses dados ficam bem evidenciados visto que essa figura representa uma sobreposição dos resultados obtidos em biotestes feitos para os tres extratos de aquênios de *Stevia rebaudiana*.

2. Revelação por métodos químicos.

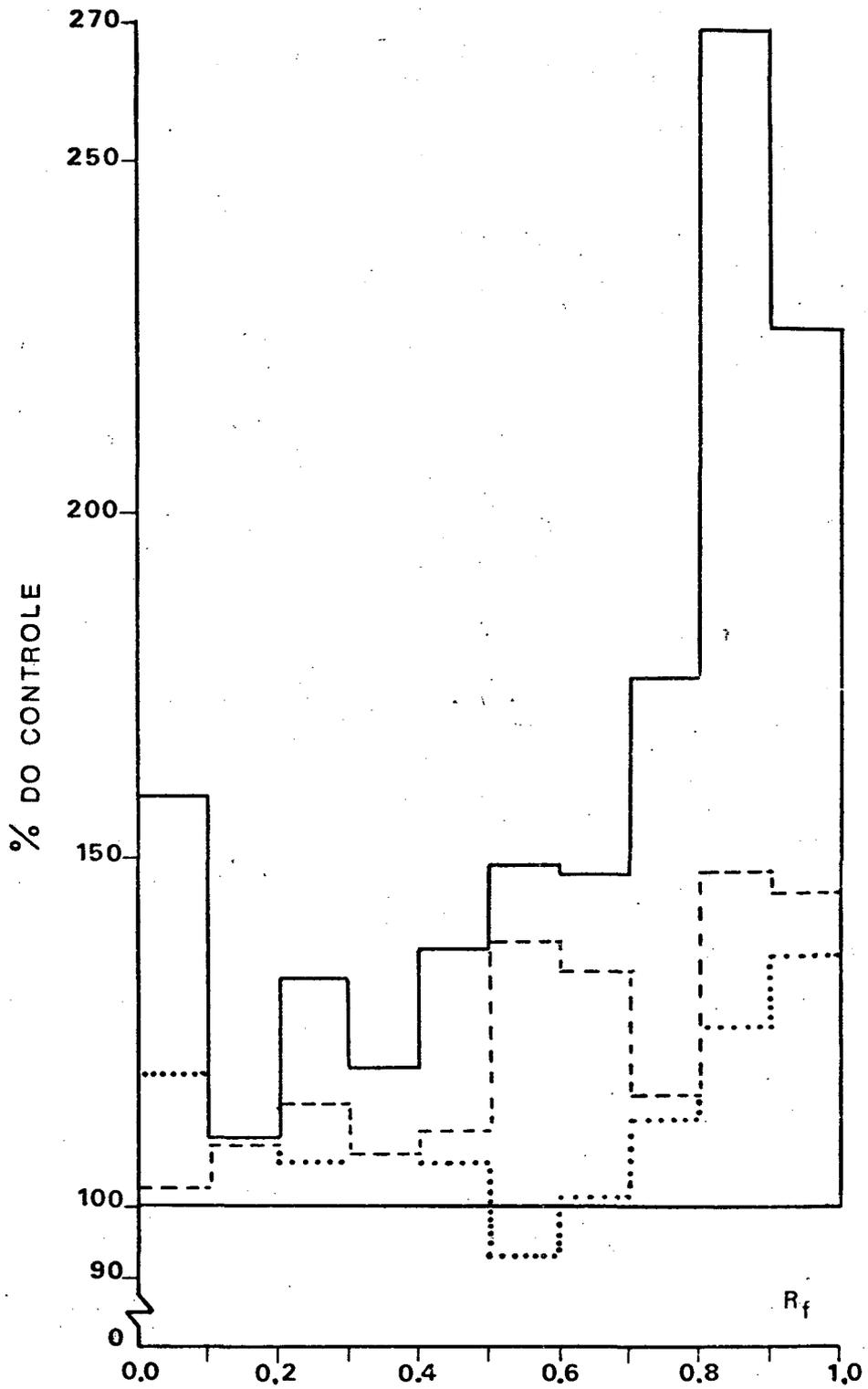
A fim de se determinar a natureza química da substância (ou grupo de substâncias) promotora do crescimento de radículas de alface, passou-se a usar reagentes químicos es pecíficos para determinados grupos de substâncias, as auxi nas, pois sabe-se que este grupo de substâncias promove o cre scimento de raízes, quando em baixas concentrações. Inicialmente, testou-se o reagente de Salkowsky, comumente usado para a detecção de substâncias indólicas.

A Figura 17 representa cromatografia unidimensional de extrato de aquênios claros e de aquênios férteis. Na região da mancha de cor marrom, detectada pelo reagente de An-

Figura 16. Efeito dos extratos dos aquênios de *Stevia rebaudiana* no crescimento de radículas de plântulas de alface.

- Extrato de aquênios claros
- Extrato de aquênios escuros estêreis
- Extrato de aquênios férteis

FIG 16



trona (Figura 12) foram reveladas tres manchas marrons de R_f s próximos para extrato de aquênios claros (Figura 17a) e de aquênios férteis (Figura 17b).

Padrões de AIA e IAN foram aplicados em faixas isoladas do cromatograma ou juntamente com os extratos (co-cromatografia), o que é visto na Figura 18. O sistema de solventes usado, embora seja utilizado para a separação de substâncias com atividade giberelínica mostrou-se bastante eficiente na separação de substâncias indólicas.

A Figura 18a representa a cromatografia de padrão de AIA (canal 1), sendo que esta substância, após a revelação apresentou cor rosa e foi detectada no R_f 0,65. O IAN padrão (canal 2) apresentou cor cinza azulado e foi detectado no R_f 0,87 (Figura 18a).

Pela Figura 18 pode ser verificado nos demais canais (Figura 18a, canais 3 e 4; Figura 18b, canais 3, 4, 5 e 6) que nos extratos dos tres tipos de aquênios ocorrem uma mancha de cor rosa que coincide com o AIA padrão e uma de cor cinza azulada que coincide com o padrão de IAN.

Esses resultados mostram que os tres tipos de aquênios de *Stevia rebaudiana* parecem conter as auxinas ácido indol-3-acético (AIA) e indol-3-acetonitrila (IAN), quando a revelação é feita com reagente de Salkowsky.

Utilizando-se o mesmo sistema de solventes foi feita a cromatografia unidimensional para extrato de aquênios escuros estéreis, porém a revelação foi feita com o reagente de Ehrlich (Figura 19). O padrão de AIA (canal 3) desenvolveu-se no R_f 0,70 e a cor obtida após a revelação foi azul escuro. O IAN padrão canal 4 (Figura 19) desenvolveu-se no R_f 0,87 e a

Figura 17. Cromatografia unidimensional para detecção de substâncias indólicas em extratos de aquênios de *Stevia rebaudiana*.

Sistema de solventes - butanol: metanol: água
(8:1:1 v/v).

Revelação: Reagente de Salkowsky

- a. Extrato de aquênios claros
- b. Extrato de aquênios férteis

FIG 17

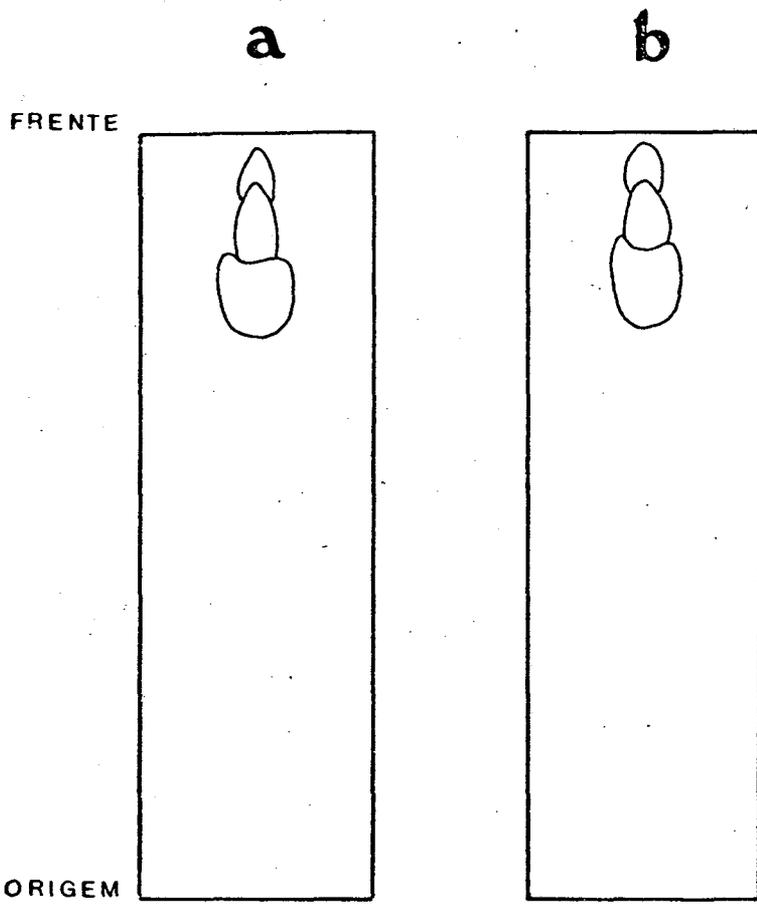


Figura 18. Cromatografia unidimensional para detecção de substâncias indólicas.

Sistema de solventes - clorofórmio: acetato de etila: ácido acético (60:40:5 v/v)

Revelação - Reagente de Salkowsky

1.a. Padrão de AIA

2.a. Padrão de IAN

3.a. Extrato de aquênios férteis e AIA

4.a. Extrato de aquênios férteis e IAN

1.b. Padrão de AIA

2.b. Padrão de IAN

3.b. Extrato de aquênios claros

4.b. Extrato de aquênios claros e padrão de AIA e IAN

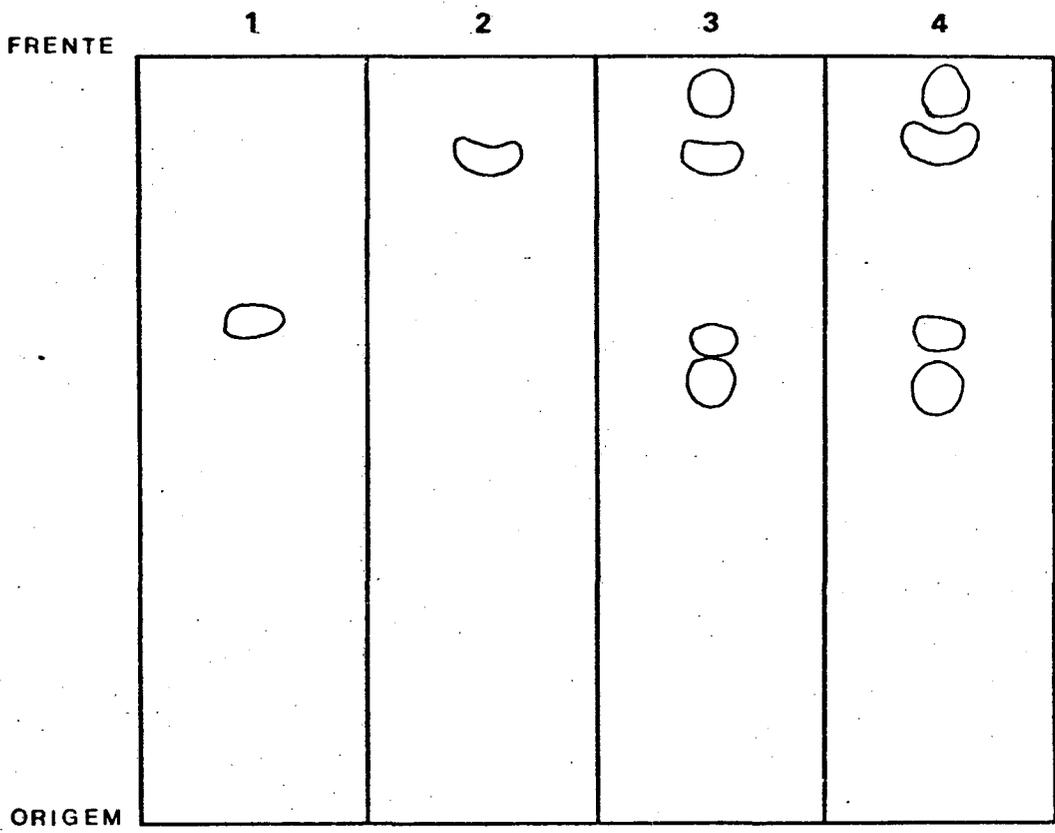
5.b. Extrato de aquênios escuros estéreis

6.b. Extrato de aquênios escuros estéreis e padrões de AIA e IAN

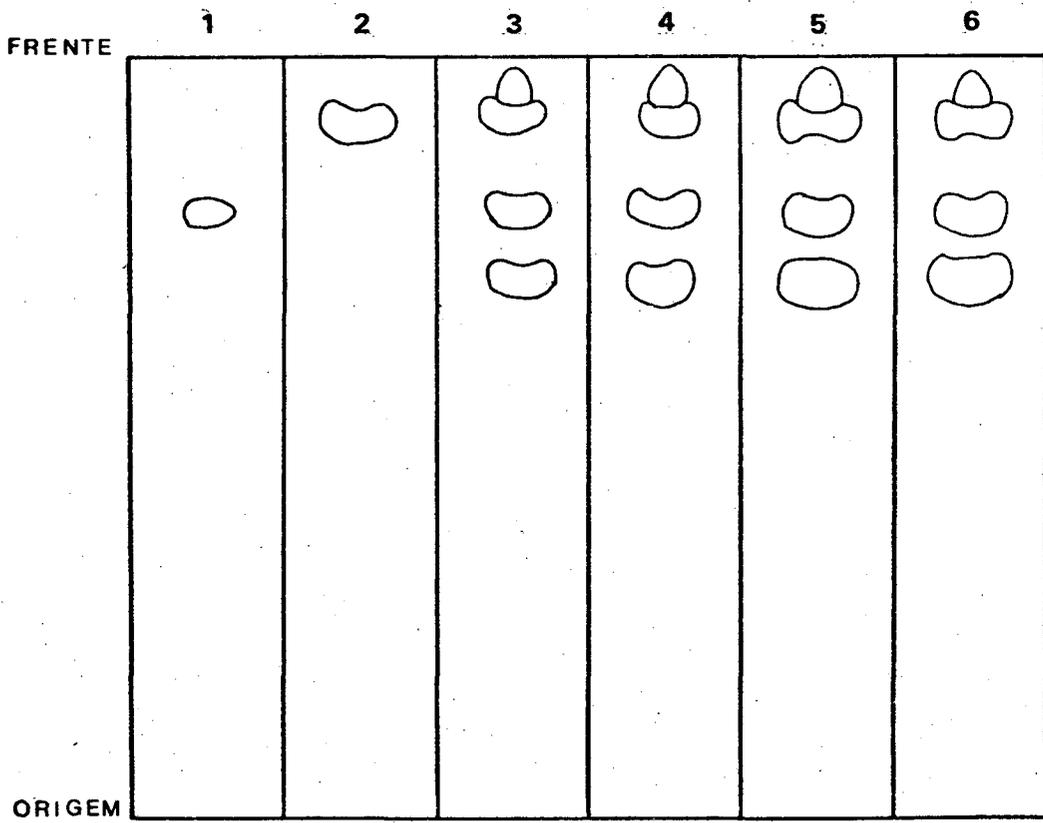
a		b	
R _f	Cor	R _f	Cor
1.	0,65 rosa	1.	0,80 rosa
2.	0,87 cinza azulado	2.	0,92 cinza azulado
3.	0,58 rosa	3.	0,71 rosa
	0,63 rosa		0,80 marrom claro
	0,87 cinza azulado		0,93 cinza azulado
	0,96 marrom		0,96 marrom escuro
4.	0,57 rosa	4.	0,71 rosa
	0,64 rosa		0,80 marrom claro
	0,88 cinza azulado		0,92 cinza azulado
	0,97 marrom		0,96 marrom escuro
		5.	0,72 rosa
			0,80 marrom claro
			0,92 cinza azulado
			0,96 marrom escuro
		6.	0,72 rosa
			0,80 marrom claro
			0,92 cinza azulado
			0,95 marrom escuro

a

FIG 18



b



presentou a cor roxo claro após a revelação.

Na cromatografia dos extratos não apareceu nenhuma mancha correspondente ao AIA, mas apareceram manchas correspondentes ao IAN. Na co-cromatografia, o AIA foi detectado no R_f 0,72, não havendo substância correspondente em 19 (canal 1). Na cromatografia do extrato não apareceu mancha correspondente ao AIA.

A Figura 20 representa a cromatografia bidimensional para extrato de aquênios escuros estéreis. Novamente, o IAN padrão se desenvolveu junto a uma substância presente no extrato. Na co-cromatografia (Figura 20c) foi aplicado também um padrão de AIA que foi detectado nos R_f s 0,64 e 0,65 (primeiro e segundo desenvolvimentos), apresentando a cor roxa. Observa-se que na região correspondente ao AIA, no cromatograma onde foi aplicado somente o extrato (Figura 20a) não se detectou substância alguma, mostrando que aquênios de *Stevia rebaudiana* parecem não possuir AIA. Portanto, com o uso do reagente de Ehrlich mostra-se que o extrato de aquênios estéreis parece possuir IAN, mas não AIA.

Extratos de aquênios claros, férteis e escuros estéreis foram aplicados em cromatogramas bidimensionais usando-se padrão de IAN e a revelação foi feita com o reagente de Salkowsky. Foi feita também a co-cromatografia onde se aplicou o padrão de IAN juntamente com o extrato a ser analisado (Figuras 21, 22 e 23). Pelas Figuras 21, 22 e 23 nota-se que o padrão de IAN se desenvolveu exatamente junto à substância que apresentou a mesma cor e o mesmo R_f , presente nos extratos.

Nos extratos dos tres tipos de aquênios há uma

Figura 19. Cromatografia unidimensional para detecção de substâncias indólicas em extratos de aquênios de *Stevia rebaudiana*.

Sistema de solventes - clorofórmio: acetato de etila: ácido acético (60:40:5 v/v)

Revelação - Reagente de Ehrlich

- a. Extrato de aquênios escuros estéreis
- b. Extrato de aquênios escuros estéreis e padrões de AIA e IAN
- c. Padrão de AIA
- d. Padrão de IAN

	R_f	Cor		R_f	Cor
1.	0,12	verde	2.	0,12	verde
	0,48	roxo claro		0,49	roxo claro
	0,55	azul claro		0,55	azul claro
	0,62	roxo claro		0,65	roxo claro
	0,69	roxo claro		0,69	roxo claro
	0,84	roxo claro		0,72	azul escuro
	0,88	roxo		0,85	roxo claro
	0,93	marrom		0,90	roxo
				0,94	marrom
3.	0,70	azul escuro (AIA)	4.	0,87	roxo claro (IAN)

FIG 19

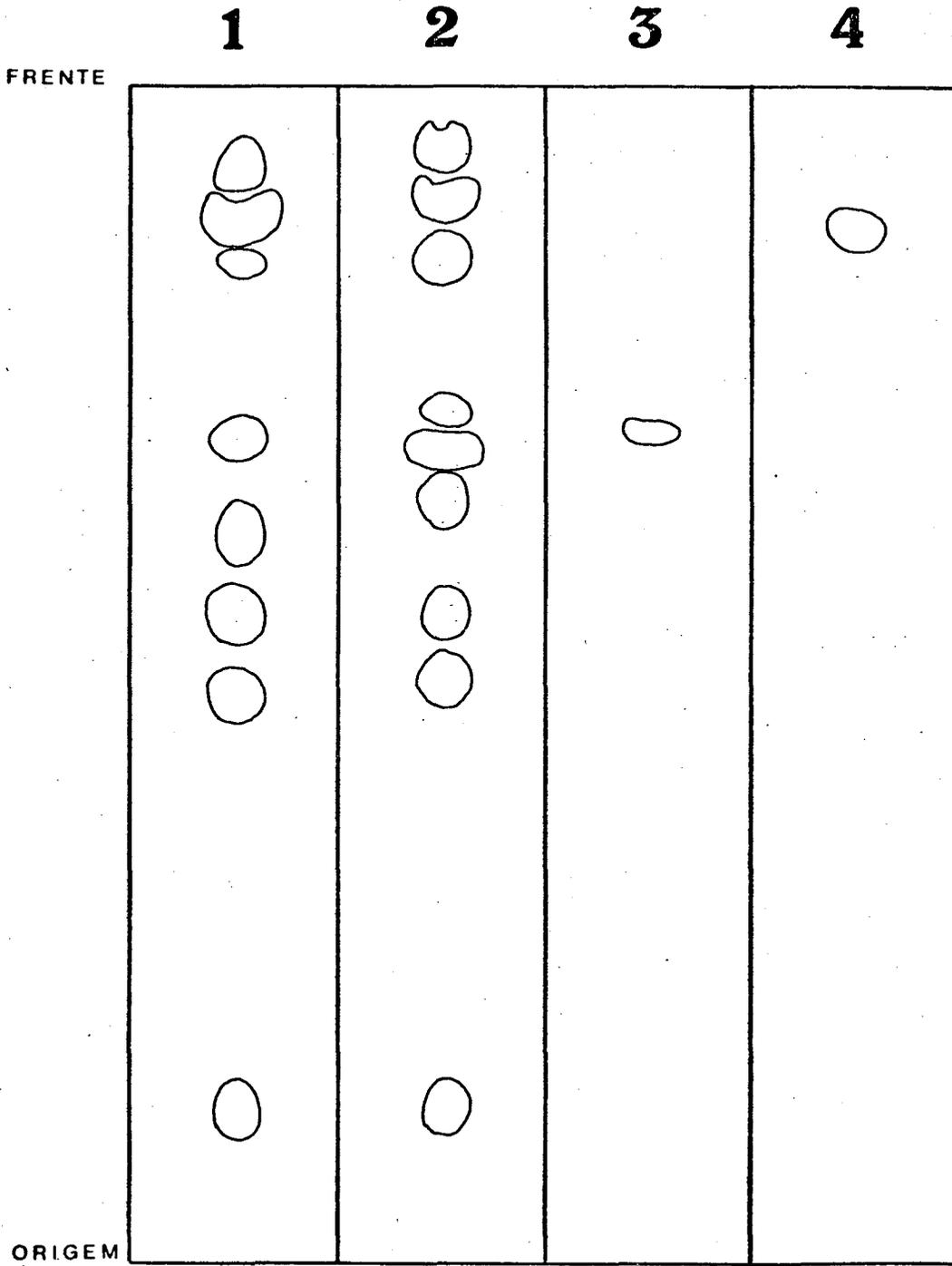


Figura 20. Cromatografia bidimensional para detecção de substâncias indólicas em extratos de aquênios escuros estéreis de *Stevia rebaudiana*.

Sistema de solventes - Clorofórmio: acetato de etila: ácido acético (60:40:5 v/v).

Revelação - Reagente de Ehrlich.

a. Extrato de aquênios escuros estéreis

b. Padrão de IAN

c. Extrato de aquênios escuros estéreis e padrão de IAN e de AIA.

	R_f (\rightarrow)	R_f (\uparrow)	Cor		R_f (\rightarrow)	R_f (\uparrow)	Cor
a.	0,10	0,09	amarelo	c.	0,09	0,08	amarelo
	0,05	0,18	roxo		0,08	0,17	roxo
	0,11	0,27	roxo		0,14	0,29	roxo
	0,20	0,41	roxo		0,23	0,50	roxo
	0,88	0,85	rosa claro		0,64	0,65	roxo
	0,91	0,88	roxo		0,80	0,87	rosa claro
	0,95	0,91	amarelo		0,88	0,89	roxo
					0,97	0,92	amarelo
b.	0,80	0,87	rosa claro				

FIG 20

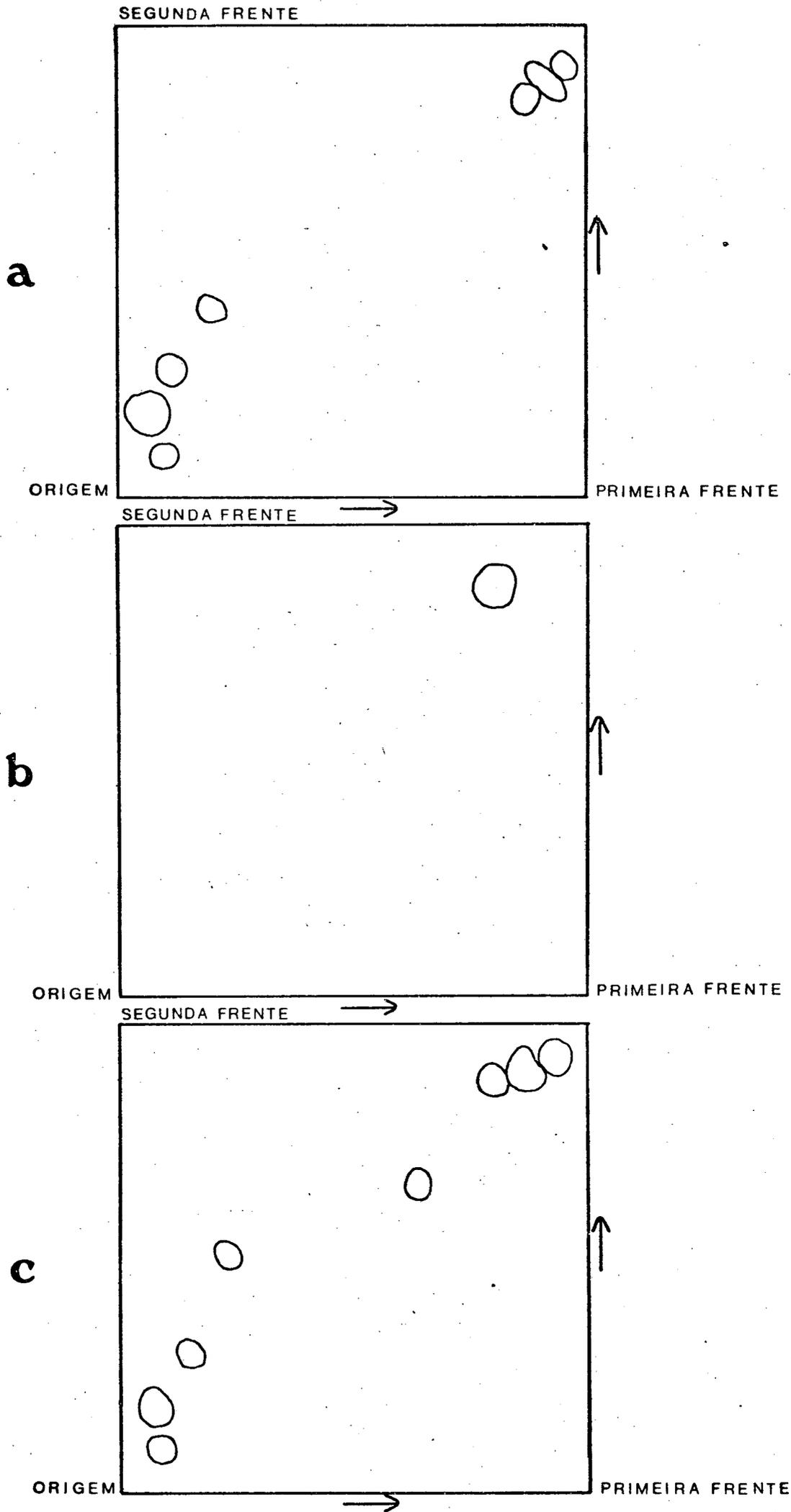


Figura 21. Cromatografia bidimensional para detecção de substâncias indólicas em extratos de aquênios de *Stevia rebaudiana*.

Sistema de solventes - Clorofórmio: acetato de etila: ácido acético (60:40:5 v/v).

Revelação - Reagente de Salkowsky

a. Extrato de aquênios claros

b. Padrão de IAN

c. Extrato de aquênios claros e padrão de IAN

	R_f (→)	R_f (↑)	Cor		R_f (→)	R_f (↑)	Cor
a.	0,08	0,08	cinza	c.	0,08	0,06	cinza
	0,50	0,58	cinza		0,49	0,55	cinza
	0,61	0,67	cinza		0,61	0,62	marrom
	0,65	0,70	marrom		0,62	0,65	marrom
	0,83	0,88	cinza azulado		0,81	0,84	cinza azulado
	0,95	0,97	cinza		0,89	0,94	marrom
b.	0,72	0,90	cinza azulado				

FIG 21

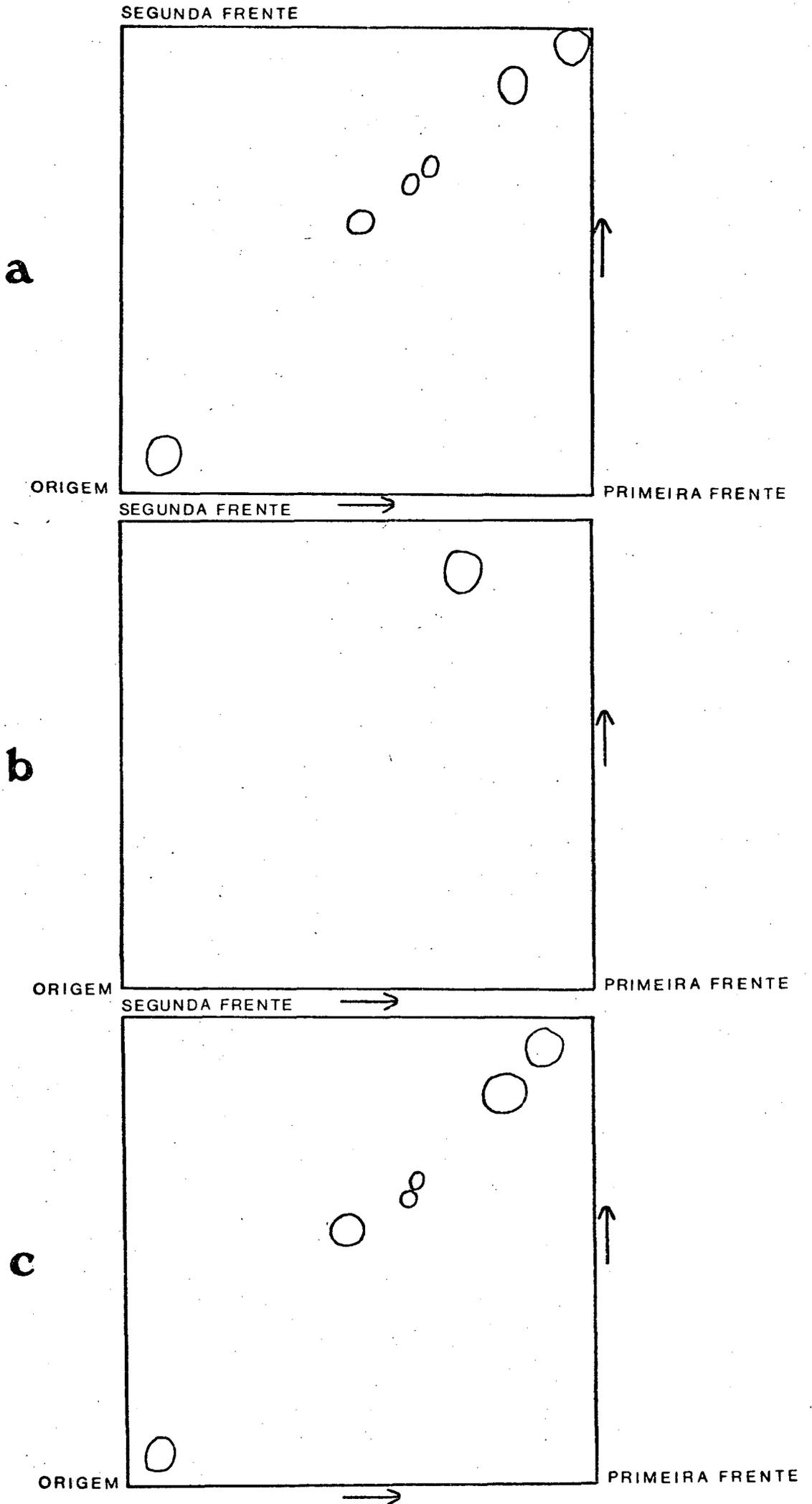


Figura 22. Cromatografia bidimensional para detecção de substâncias indólicas em extratos de aquênios escuros estéreis de *Stevia rebaudiana*.

Sistema de solventes - Clorofórmio: acetato de etila: ácido acético (60:40:5 v/v).

Revelação - Reagente de Salkowsky.

a. Extrato de aquênios escuros estéreis

b. Padrão de IAN

c. Extrato de aquênios escuros estéreis e padrão de IAN.

	R_f (→)	R_f (↑)	Cor		R_f (→)	R_f (↑)	Cor
a.	0,06	0,04	azul	c.	0,08	0,04	azul
	0,21	0,04	rosa		0,21	0,06	rosa
	0,33	0,08	rosa		0,34	0,10	rosa
	0,47	0,21	rosa		0,47	0,18	rosa
	0,86	0,81	cinza azulado		0,87	0,74	cinza azulado
	0,87	0,88	marrom claro		0,91	0,83	marrom claro
	0,92	0,94	marrom claro		0,96	0,98	marrom claro
b.	0,87	0,75	cinza azulado				

FIG 22

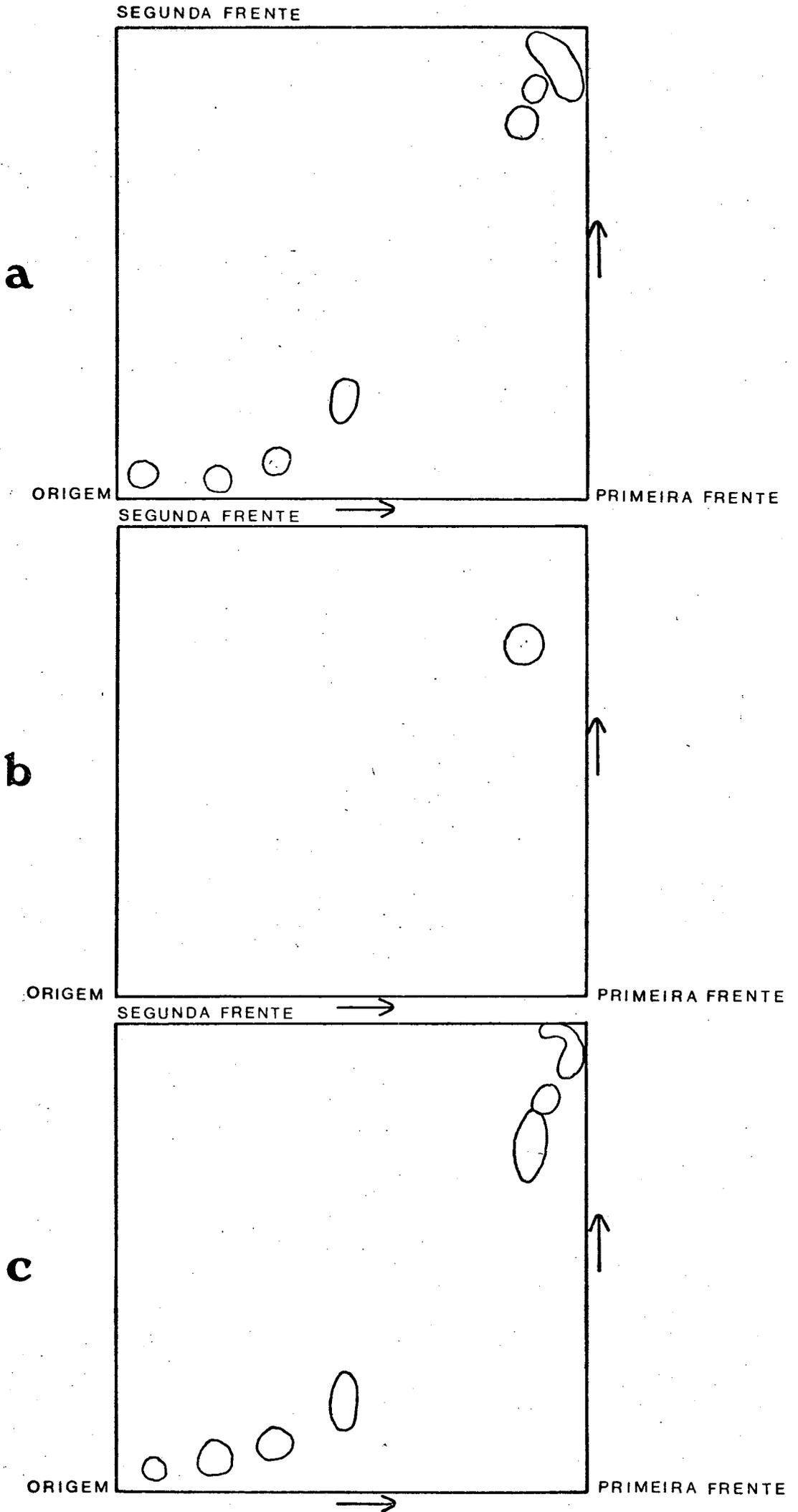


Figura 23. Cromatografia bidimensional para detecção de substâncias indólicas em extratos de aquênios férteis de *Stevia rebaudiana*.

Sistema de solventes - Clorofórmio: acetato de etila: ácido acético (60:40:5 v/v).

Revelação - Reagente de Salkowsky

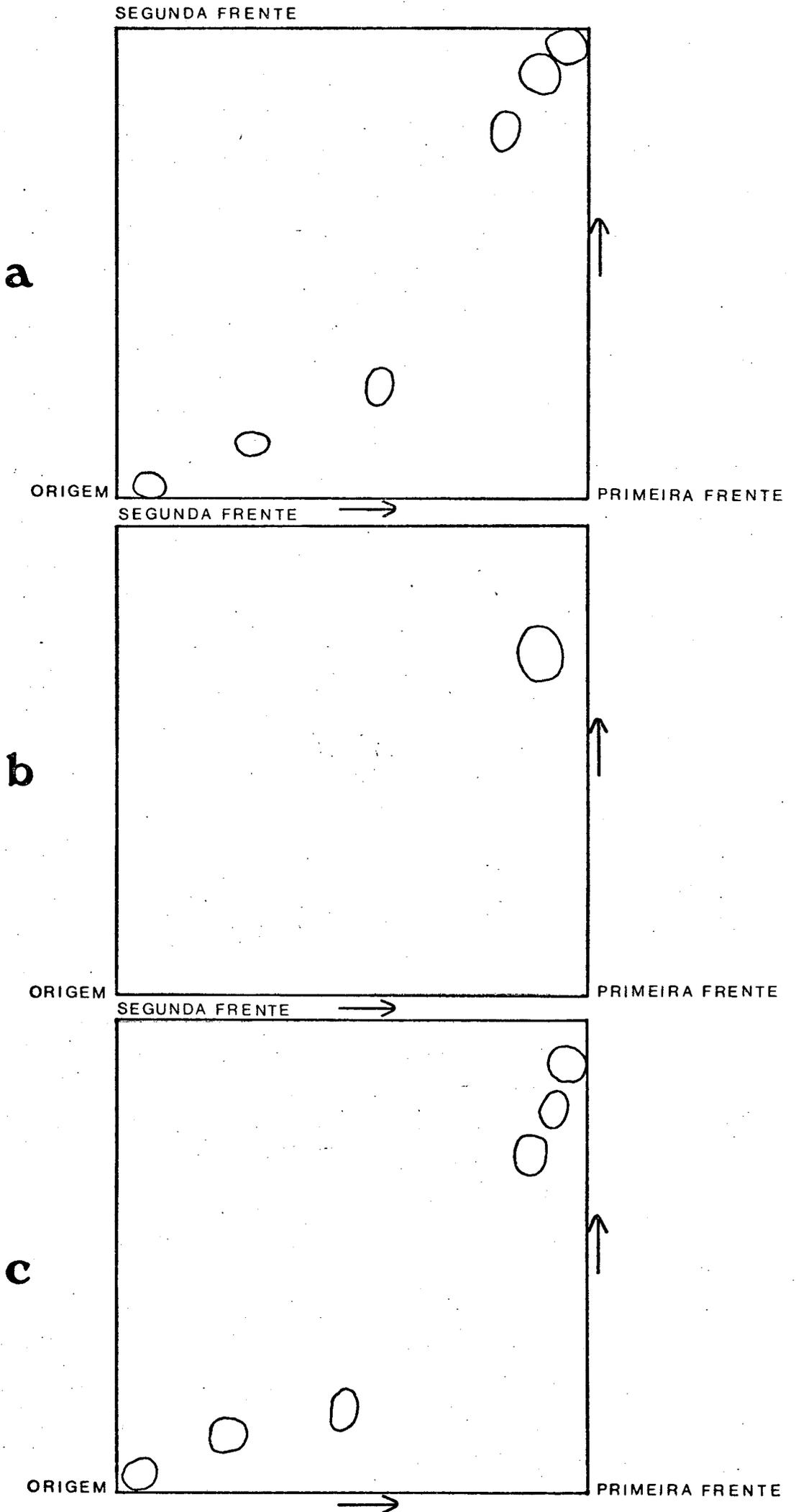
a. Extrato de aquênios férteis

b. Padrão de IAN

c. Extrato de aquênios férteis e padrão de IAN.

	R _f (→)	R _f (↑)	Cor		R _f (→)	R _f (↑)	Cor
a.	0,05	0,04	rosa	c.	0,06	0,02	rosa
	0,23	0,12	rosa		0,29	0,11	rosa
	0,49	0,27	rosa		0,55	0,24	rosa
	0,87	0,72	cinza azulado		0,82	0,78	cinza azulado
	0,93	0,82	marrom claro		0,90	0,91	marrom claro
	0,95	0,91	marrom escuro		0,96	0,97	marrom escuro
b.	0,90	0,72	cinza azulado				

FIG 23



substância que corre juntamente com o IAN. Pelos resultados apresentados nas Figuras 21, 22 e 23 fica evidente que os tres tipos de aquênios de *Stevia rebaudiana* apresentam a mesma distribuição de substâncias indólicas, basicamente. A substância que apresenta a cor cinza azulado após revelação com o reagente de Salkowsky parece ser IAN. Deve ainda ser mencionado que a mancha marrom clara só aparece nos extratos de aquênios escuros (férteis e estéreis, Figuras 22 e 23).

Um terceiro reagente considerado específico para IAN foi utilizado na revelação de substâncias presentes nos extratos de aquênios escuros estéreis (Figura 24). Pela Figura 24 pode-se ver que uma das manchas do extrato correu junto com o IAN confirmando mais uma vez a possível presença dessa substância em aquênios de *Stevia rebaudiana*. Parece que o extrato possui ainda uma outra substância que responde ao reagente, emitindo fluorescência, como o IAN.

A Figura 25 representa cromatogramas bidimensionais de extratos de aquênios férteis, porém usando sistema de solventes diferentes. A revelação foi feita com o reagente de Salkowsky. A mudança do sistema de solventes permitiu que o IAN apresentasse uma alteração de R_f . Novamente, a substância presente nos extratos coincidiu em cor e em R_f com IAN, o que permitiu uma confirmação da possível presença dessa substância em aquênios de *Stevia rebaudiana*. Tanto em 25a como em 25c não foram representadas outras substâncias indólicas presentes no extrato uma vez que o objetivo era confirmar a presença de IAN.

O efeito de soluções de IAN no crescimento de

Figura 24. Cromatografia bidimensional para detecção de substâncias indólicas em extratos de aquênios escuros estéreis de *Stevia rebaudiana*.

Sistema de solventes - Clorofórmio: acetato de etila: ácido acético (60:40:5 v/v).

Revelação - Reagente de ácido nítrico-nitrito.

a. Extrato de aquênios escuros estéreis

b. Padrão de IAN

c. Extrato de aquênios escuros estéreis e padrão de IAN

	R _f (→)	R _f (↑)	Cor	Fluorescência (luz UV longa)
a.	0,08	0,17	rosa	-
	0,19	0,43	rosa	-
	0,72	0,68	rosa	-
	0,82	0,91	amarelo	verde claro (IAN)
	0,90	0,94	amarelo	verde claro
b.	0,74	0,80	amarelo	verde claro (IAN)
c.	0,30	0,29	rosa	-
	0,47	0,49	rosa	-
	0,50	0,60	rosa	-
	0,74	0,80	amarelo	verde claro (IAN)
	0,94	0,94	amarelo	verde claro

FIG 24

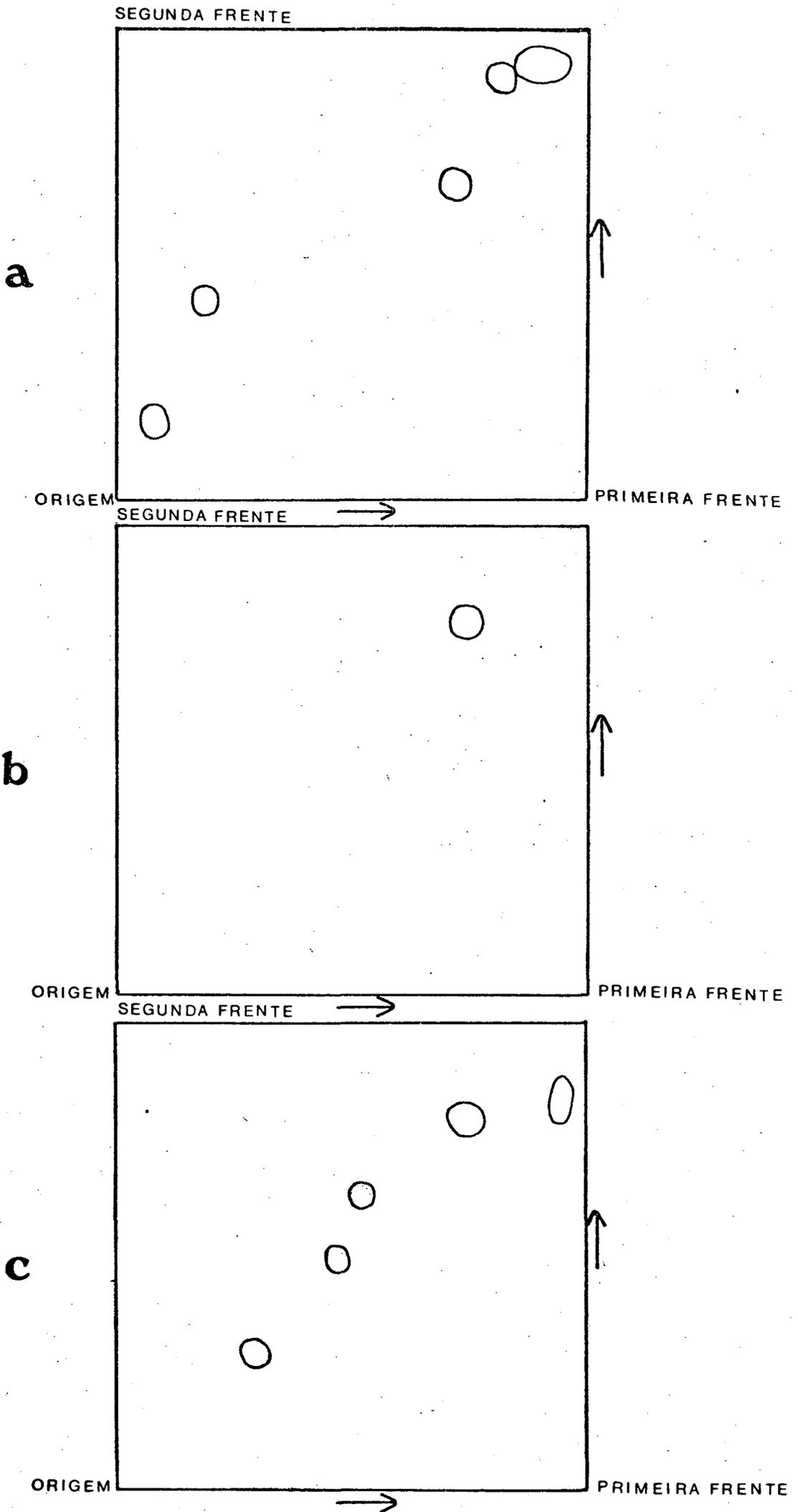


Figura 25. Cromatografia bidimensional para detecção de substâncias indólicas em extratos de aquênios férteis de *Stevia rebaudiana*.

Sistemas de solventes

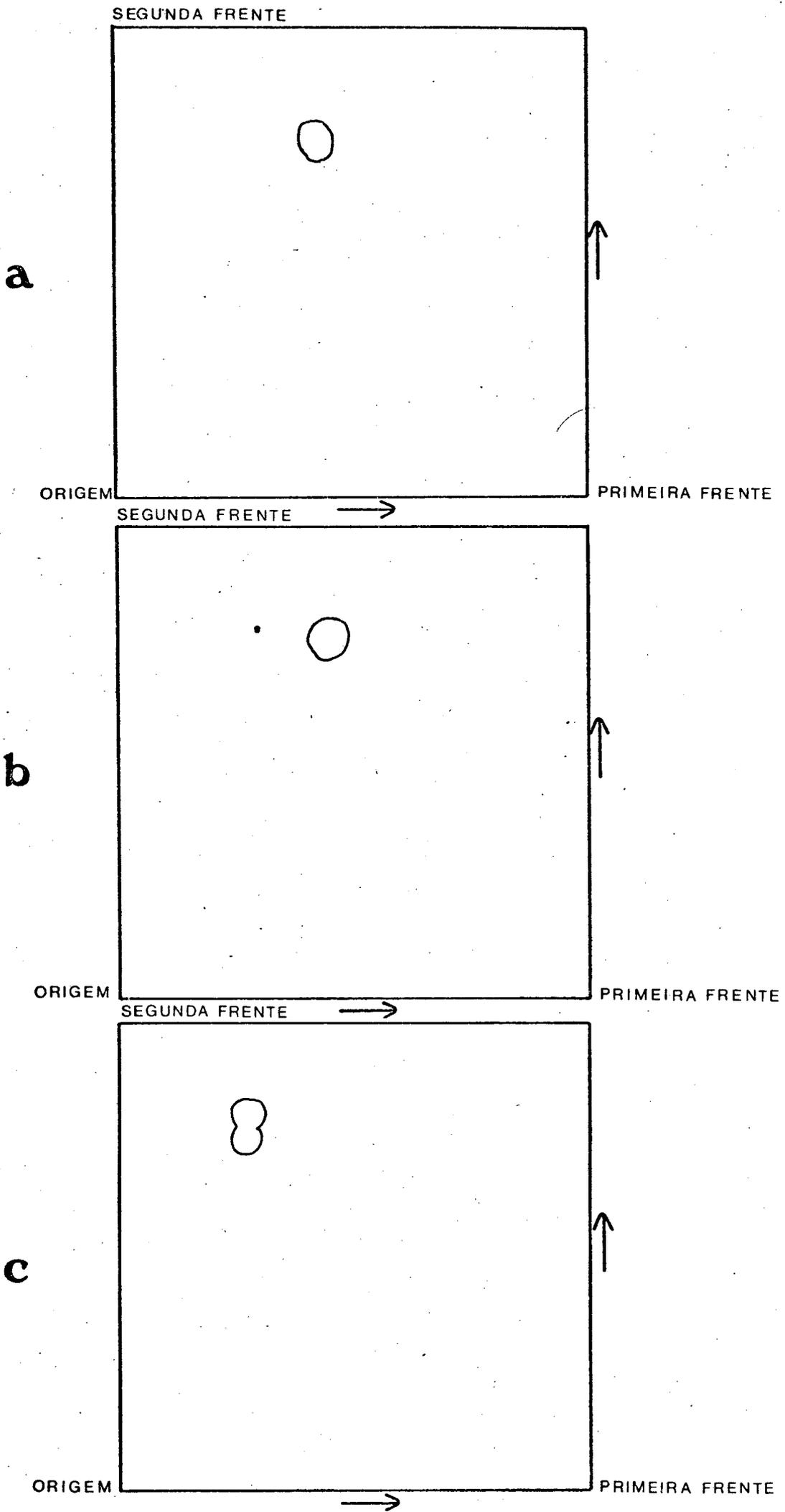
1. benzeno: acetona (90:10 v/v) no primeiro desenvolvimento.
2. clorofórmio: metanol (93:7 v/v) no segundo desenvolvimento.

Revelação - Reagente de Salkowsky

- a. Extrato de aquênios férteis
- b. Padrão de IAN
- c. Extrato de aquênios férteis e padrão de IAN

	R_f (→)	R_f (↑)	Cor
a.	0,43	0,77	cinza azulado
b.	0,45	0,77	cinza azulado
c.	0,28	0,76	cinza azulado
	0,28	0,79	cinza azulado

FIG 25



radículas de alface foi verificado, constatando-se que essa substância induz uma promoção do crescimento de radículas de alface de 10%, na concentração de 0,07 mg/l (Figura 26). Houve inibição nas concentrações mais altas utilizadas.

De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que:

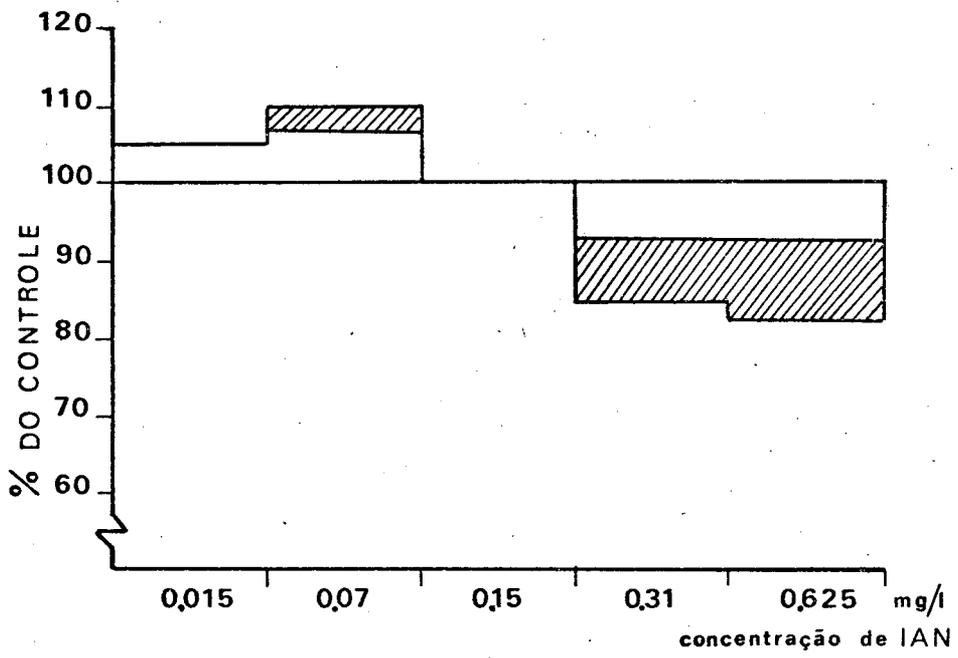
- a. O fotoblastismo positivo é independente da época da coleta e do período de armazenamento. Luz verde e luz azul não afetam a germinação de *Stevia*; vermelho extremo inibe e vermelho constante ou choques de vermelho promovem a germinação de *Stevia*. Vermelho extremo reverte o efeito promotor do vermelho.
- b. A melhor temperatura constante para a germinação em luz e escuro é a de 25°C. Nessa temperatura *Stevia* é fotoblástica positiva. A alternância de temperaturas não afeta a germinação de *Stevia* no escuro. Choques curtos de 0°C e 45°C não afetam a germinação no escuro.
- c. No escuro, GA₃ promove, 6BA parece inibir, etrel não afeta a germinação de *Stevia* e AIA inibe. ABA inibe a germinação em luz constante.
- d. Pela clarificação dos aquênios escuros é mostrado que não há diferença entre o número de aquênios que germinam em luz constante e o número de aquênios férteis.
- e. O esteviosídeo não afeta a germinação das espécies testadas.
- f. Os tres tipos de frutos apresentam esteviosídeo. Parece que o esteviosídeo ocorre na parede dos aquênios (pericarpo)

Figura 26. Efeito de IAN no crescimento de radículas de plântulas de alface.

Foi feito o teste F e o valor de DMS foi determinado quando F significativo a 5%.

A parte hachurada do histograma representa região estatisticamente significativa.

FIG 26



pois foi detectado em frutos claros.

- g. Substâncias giberelínicas foram detectadas somente em aquênios férteis.
- h. Substâncias promotoras ocorrem nos tres tipos de aquênios, mas a quantidade aumenta de aquênios claros para escuros estéreis e férteis. Entre as substâncias promotoras do crescimento de radícula, os aquênios parecem não possuir AIA (testes realizados com reagentes de Salkowsky e Ehrlich).
- i. Pelo uso de cromatografia unidimensional e bidimensional, sistemas de solventes diferentes na bidimensional (dois sistemas) e pelo uso dos reagentes de Salkowsky, Ehrlich e ácido nítrico-nitrito parece que os aquênios claros, férteis e escuros estéreis de *Stevia rebaudiana* apresentam IAN. Pelo reagente de ácido nítrico-nitrito parece que uma substância semelhante ao IAN também ocorre nesses aquênios.

DISCUSSÃO

A *Stevia rebaudiana* apresenta aquênios fotoblásticos positivos (FELIPPE et al., 1971). Neste trabalho, observou-se que a resposta fotoblástica é independente da época da coleta e do período em que os aquênios permaneceram armazenados. Observou-se também que a maior porcentagem de germinação em luz constante foi de 65 por cento e a menor de 38 por cento, resultados esses que confirmam os encontrados por FELIPPE et al. (1971) que afirmaram haver certa variação na porcentagem de germinação de aquênios de *Stevia* em luz branca constante.

Os experimentos conduzidos com luzes de diferentes comprimentos de onda mostram que luzes azul e verde constantes não afetam a germinação de *Stevia*, embora em aquênios de *Bidens pilosa* a germinação seja promovida por choques breves de luzes azul, verde, vermelha e vermelho extremo (VÁLIO, KIRZENZAFT e ROCHA, 1972). A luz vermelha constante promove a germinação de *Stevia*, enquanto que vermelho extremo inibe. Estes resultados sugerem que essa espécie é controlada pelo fitocromo, quanto à germinação.

Choques breves de luz vermelha, após embebição prévia no escuro constante promovem a germinação de *Stevia*. Esses mesmos choques são revertidos por choques breves de vermelho extremo.

Choques longos de vermelho, de 72 horas, em aquênios não submetidos à embebição prévia no escuro constante são parcialmente revertidos pelo escuro constante fornecido a-

tê o final do experimento. É importante salientar que o aparecimento do fitocromo em sementes é proporcional ao tempo inicial de embebição (TOOLE, 1973). Dessa forma, os choques de luz vermelha fornecidos durante as primeiras 72 horas de embebição, em aquênios de *Stevia rebaudiana* são revertidos apenas parcialmente pelo escuro, visto que é nesse período que deve ocorrer a síntese de fitocromo e sua conversão para a forma ativa, na presença de luz branca ou vermelha. Aquênios de *Stevia* começam a germinar após o quarto dia de embebição. O fato de que a exposição ao escuro, após os choques longos de luz vermelha, apenas reverte parcialmente o efeito promotor desses choques pode ser explicado pela reversão lenta do fitocromo da forma ativa Fve para a forma inativa Fv que ocorre no escuro. A defasagem de tempo que ocorre durante a reversão de Fve e Fv, no escuro, permitiria que uma parte de Fve continuasse desencadeando as transformações metabólicas que determinam a germinação. A reversão de escuro de Fve para Fv é uma reversão térmica que parece ocorrer via uma série de intermediários que normalmente ocorrem na interconversão de Fve a Fv, mediada por vermelho extremo (KENDRICK, 1976).

Quando sementes de alface embebidas a 20°C no escuro foram irradiadas durante 10 minutos com luz vermelha ocorreu a germinação devido a conversão de Fv a Fve, mas quando foram submetidas a temperaturas mais altas (35°C) após o choque de vermelho, não ocorreu a germinação, possivelmente devido à perda de Fve, provocada pela alta temperatura (BORTHWICK et al., 1954). Nesse caso, a reversão térmica de escuro deve ter sido antecipada pela temperatura alta.

Quando aquênios de *Stevia rebaudiana* foram submetidos a choques longos de vermelho extremo, de 72 horas, sem embebição prévia no escuro e a seguir foram transferidos para luz branca, houve reversão total do efeito do vermelho extremo. O vermelho extremo fornecido após o choque longo de luz branca (de 72 horas) sem embebição prévia no escuro reverteu totalmente o efeito promotor da luz branca. Observa-se que em ambos os casos houve reversão total dos choques longos, sendo que os tratamentos que induziram a reversão dos tratamentos anteriores foram realizados imediatamente após os primeiros. Em *Rumex obtusifolius*, VICENTE, ENGELHARDT e SILBERSCHMIDT (1962) observaram que a máxima ação do vermelho extremo em reverter o efeito do vermelho ocorre quando o segundo é fornecido imediatamente após o primeiro, portanto, em *Stevia*, observou-se resposta semelhante. Nesses casos, é possível que ocorra uma reversão total, ou a níveis que induzem uma resposta fisiológica, do fitocromo, de uma forma para outra. Entretanto, não se pode concluir nada acerca dos níveis de fitocromo em *Stevia*, visto que este pigmento não foi dosado neste trabalho.

A luz azul constante tem o mesmo efeito do escuro, na germinação de *Stevia rebaudiana*. É sabido que o fitocromo mostra certa absorbância na região azul do espectro luminoso, a 450 nm (KENDRICK e FRANKLAND, 1976). Entretanto, alguns autores acreditam que os efeitos fisiológicos induzidos pela luz azul sejam mediados por outro pigmento, que não o fitocromo.

A riboflavina parece ser o mais provável fotorreceptor da luz azul na resposta de curvatura fótotropica de

coleoptile de *Avena sativa* (BARA e GALSTON, 1968). SCHMIDT et al. (1977) trabalhando com respostas fototrópicas em coleoptiles de milho, usaram inibidores de flavinas e obtiveram inibição da curvatura fototrópica. Sugerem que as flavinas sejam os fotorreceptores da luz azul não só em fototropismos como também em fotomorfogênese.

Em *Stevia*, choques curtos de luz azul de 60 e 180 minutos de duração, não reverteram o efeito do choque de luz vermelha de 60 minutos de duração. O fato da luz azul não promover a germinação de *Stevia* poderia sugerir que ela atue mantendo o fitocromo na forma inativa Fv ou inibindo sua síntese. Poderia também reverter o efeito promotor da luz vermelha caso atuasse mantendo o fitocromo na forma Fv. Os choques de luz azul utilizados nesse trabalho foram suficientemente longos para reverter o efeito da luz vermelha principalmente se for levado em consideração que a luz azul é mais energética que a luz vermelha (KENDRICK e FRANKLAND, 1976). A hipótese mais viável é que realmente outro pigmento esteja envolvido na absorção de luz azul, produzindo um efeito semelhante ao do escuro constante na germinação de *Stevia rebaudiana* e que simplesmente aquênios fotoblásticos positivos dessa espécie sejam indiferentes à luz azul.

Sementes fotossensíveis, na ausência ou na presença de luz podem ter a germinação drasticamente modificada pela temperatura.

O termo "temperatura ótima" é usado para descrever a temperatura ou faixa de temperatura na qual a melhor taxa de germinação é obtida. Fica evidente que qualquer processo

fisiológico, onde um passo mediado por enzimas está envolvido, só pode ocorrer dentro de certos limites de temperatura. Cada semente contém os substratos para realizar os vários processos bioquímicos da germinação. A atividade de muitas enzimas é caracterizada por uma fase de latência cuja duração pode ser dependente da temperatura. Parte do processo que contribui para a presença da fase de latência na germinação é estritamente físico (etapas iniciais da embebição) e não são dependentes da temperatura. Outros processos preparatórios envolvem alterações bioquímicas que tornam sua fase de latência dependente da temperatura (KOLLER, 1972). A atuação da temperatura na semente se faz presente também no fitocromo. A temperatura afeta o número total de sementes que germinam em resposta à taxa de reidratação e síntese do fitocromo e às taxas de ação de Fve, reversão e destruição (TOOLE, 1973).

A melhor temperatura constante para a germinação de *Stevia rebaudiana* foi 25°C. Observa-se que ocorre uma diminuição gradual da porcentagem de germinação à medida que a temperatura se elevou ou diminuiu a partir de 25°C. As temperaturas de 5 e 40°C inibiram totalmente a germinação. Embora a germinação no escuro seja bastante baixa, a maior porcentagem foi obtida a 25°C.

Experimentos mostrando alterações na germinação de sementes fotoblásticas quando submetidas a condições especiais de temperatura foram bastante explorados em *Rumex obtusifolius*, uma espécie que apresenta sementes fotoblásticas positivas. VICENTE et al. (1968) observaram que choques de 1 hora, a 40°C após 86 horas de embebição no escuro, promoviam a germi

nação de *Rumex obtusifolius* em condições não indutoras, sendo que a promoção era revertida pela subsequente exposição ao vermelho extremo a 25°C. MENECHINI, VICENTE e NORONHA (1968) observaram que choques de temperatura alta ou baixa promoviam a germinação de *Rumex* e que a porcentagem de germinação aumentava quanto mais as temperaturas dos choques se distanciavam da temperatura controle a 25°C.

FELIPPE (1980) mostrou que temperaturas alternadas promovem a germinação de *Rumex obtusifolius* no escuro constante. Os pares de alternância 15 - 35°C e 25 - 35°C foram bastante efetivos em promover a germinação de *Rumex* em condições não indutoras.

A semente fotoblástica negativa de *Cucumis anguria* também tem sua germinação promovida por temperaturas alternadas quando exposta à luz contínua (FELIPPE, 1980).

Sementes indiferentes à luz também podem ter sua germinação promovida por ciclos de alternância de temperatura, como se observa em *Rapanea guianensis* (JOLY e FELIPPE, 1979).

Há várias hipóteses para explicar o efeito da alternância de temperaturas na germinação de sementes. O efeito da alternância de temperaturas poderia aumentar o processo de crescimento do embrião, o que iria produzir uma ruptura da casca, fato que poderia não ocorrer com a mesma força caso fosse mantido um regime de temperatura constante (KOLLER, 1972). Outra idéia proposta por TOOLE et al. (1956) é que intermediários do metabolismo respiratório poderiam se acumular durante o período de alta temperatura do ciclo, que seria desfavorável

Para a germinação. Esses intermediários ficariam disponíveis para o processo de germinação durante o período de baixa temperatura, que é desfavorável para a respiração. COHEN (1958) propôs que poderia existir, por exemplo, um precursor enzimático, que inibiria a germinação no escuro. Este composto hipotético seria termolábil e poderia ser suficientemente modificado pela mudança de temperatura permitindo que a germinação se iniciasse. MENEHINI et al. (1968) postularam um modelo físico-químico para explicar a resposta de *Rumex obtusifolius* às temperaturas alternadas. De acordo com esses autores haveria um intermediário, um inibidor, em um sistema de duas reações químicas reversíveis.

Essas respostas têm um significado ecológico. Uma alternância diurna de temperatura é uma característica comum de todos os ambientes que estão sob a influência do ciclo diurno da energia radiante solar. Parece provável que o mecanismo de resposta de germinação a regimes específicos de alternância de temperaturas é de grande valor para as espécies em caracterizar seus macro e micro ambientes. Mais importante ainda é o provável papel na caracterização do submicro ambiente, uma vez que muitas sementes de plantas cultivadas exibem uma profundidade ótima no solo, que permite a germinação, a emergência da plântula e a sobrevivência. É provável que o mesmo ocorra para plantas invasoras, na natureza. As alternâncias diárias na troca de energia entre a superfície do solo e o ambiente resultam em alterações da superfície do solo, que são transmitidas para as regiões mais profundas, onde as características físicas do solo determinarão a temperatura. Certas semen-

tes que requerem uma termoperiodicidade diurna para germinar i rão encontrar a condição ambiental ótima quando enterradas a u ma profundidade específica do solo de seu habitat (KOLLER, 1972). Para *Rumex obtusifolius*, FELIPPE (1980) concluiu que es sa espécie fotoblástica positiva pode vir a germinar mesmo quando as sementes estiverem enterradas a uma determinada profundidade do solo onde as alternâncias diárias de temperaturas ainda se fazem presentes, fenômeno esse que é de grande importância para a sobrevivência da espécie.

As alternâncias de temperatura não tiveram efeito em promover a germinação de aquênios de *Stevia rebaudiana* no escuro constante. Choques de temperatura não promoveram a germinação de *Stevia* no escuro constante.

Com relação a temperatura conclui-se que a máxi ma germinação de *Stevia* ocorre a 25°C. A maioria dos aquênios dessa planta não poderão germinar se estiverem enterrados no solo, visto que a espécie é fotoblástica positiva e as alternâncias de temperatura não têm efeito em promover sua germinação. A germinação da espécie também não é promovida por choques de temperatura. Dessa forma, os aquênios devem permanecer sempre sobre a superfície do solo para que ocorra sua máxima germinação.

Um grande número de evidências demonstraram a influência de fatores provenientes do embrião no desenvolvimento da atividade enzimática em cotilédones e endosperma, ou vice-versa, atividade essa que muitos autores acreditam estar sob controle hormonal (MAYER e SHAIN, 1974).

As giberelinas podem estimular a germinação no

escuro, em sementes fotoblásticas positivas, mas não está elucidado se essa resposta ocorre na ausência de Fve (TAYLORSON e HENDRICKS, 1977).

As citocininas, assim como outras substâncias hormonais, estão envolvidas em muitos fenômenos fisiológicos tais como dormência de sementes e germinação (TAYLORSON e HENDRICKS, 1977). As citocininas muitas vezes são mais efetivas que GA em neutralizar o efeito de inibidores tais como ácido abscísico, em vários processos sensíveis a GA. Em sementes de várias espécies, o etileno parece ser liberado durante a germinação. Sementes dormentes parecem liberar menos etileno do que sementes não dormentes (TAYLORSON e HENDRICKS, 1977). O etileno não afeta a germinação de sementes de muitas espécies, entretanto pode estimular a de outras (TAYLORSON e HENDRICKS, 1977).

O etileno, a cinetina e o ácido giberélico reverteram a dormência induzida por altas temperaturas em *Lactuca sativa* cv. Premier Great Lakes (DUNLAP e MORGAN, 1977).

WEBB, STADEN e WAREING (1973) observaram alterações nos níveis endógenos de citocininas, giberelinas e inibidores da germinação em sementes dormentes de *Acer saccharum* submetidas a estratificação.

Foi mostrado que após choque de luz, em sementes de *Rumex obtusifolius* havia um aumento na quantidade de citocininas endógenas (STADEN e WAREING, 1972) e de giberelinas (FELIPPE et al., 1970).

A aplicação de auxinas em sementes tem produzido resultados ambíguos (MAYER e POLJAKOFF-MAYBER, 1975).

O ácido abscísico (ABA) inibiu a germinação de *Stevia rebaudiana* em luz constante. 6BA e etrel não tiveram efeito sobre a germinação de *Stevia* no escuro. Concentrações de AIA, acima de 1 mg/l inibiram a germinação de *Stevia* no escuro e GA₃ na concentração de 50 mg/l promoveu.

Como se observa, a germinação de *Stevia rebaudiana* foi promovida pela luz vermelha e pelo GA₃, que parece substituir em parte o efeito da luz nessa espécie, atuando na quebra da dormência imposta pelo escuro.

A luz vermelha poderia então atuar induzindo a síntese de giberelinas. COOKE, SAUNDERS e KENDRICK (1975) observaram que folhas estioladas de trigo homogeneizadas, apresentam aumento no nível de giberelinas quando tratadas com luz vermelha. COOKE e SAUNDERS (1975) observaram também que a luz vermelha aumenta o nível de substâncias semelhantes a giberelinas em folhas estioladas de trigo e que essas substâncias são capazes de causar o desenrolamento de folhas mantidas no escuro, efeito característico de giberelinas.

Em *Stevia rebaudiana* os resultados sugerem que o fitocromo Fve esteja atuando na síntese ou liberação de giberelinas, visto que tanto a luz vermelha como essa substância promovem a germinação. Por causa da próxima relação entre fitocromo e giberelinas na germinação, é provável que a ação da luz na estimulação da germinação de sementes possa ser mediada por aumento nos níveis endógenos de giberelinas. Esta hipótese ainda não está confirmada em sementes (TAYLORSON e HENDRICKS, 1977) mas os resultados obtidos neste trabalho dão margens a futuros experimentos envolvendo a ação da luz na síntese de gi

berelinas de *Stevia*.

FELIPPE e LUCAS (1971) aventaram a hipótese de que o esteviosídeo pudesse ser um inibidor de germinação. O esteviosídeo foi testado na germinação de *Lactuca sativa* L cv. Crespa de Picar, *Cucumis anguria* L, *Cucumis melo* L, *Rumex obtusifolius* L e *Stevia rebaudiana* Bert., observando-se que a germinação dessas espécies foi normal. Portanto o esteviosídeo não deve ser um inibidor de germinação.

A observação de aquênios escuros clarificados de *Stevia rebaudiana* mostrou que 16 a 59 por cento desses aquênios são estéreis e por esse motivo nunca se obtém 100 por cento de germinação visto que é impossível se distinguir aquênios férteis de aquênios escuros estéreis, sem se utilizar métodos de clarificação. Durante a reprodução sexuada em *Stevia* podem ser formados aquênios férteis, aquênios escuros estéreis e aquênios claros estéreis, conforme foi mostrado, em detalhe, por MONTEIRO (1980, tese de mestrado, inédito).

ZAIDAN et al. (1980) observaram que o esteviosídeo ocorre nas partes aéreas de plantas de *Stevia* e está ausente na parte radicular. No presente trabalho foi verificado que o esteviosídeo também está presente nos tres tipos de aquênios de *Stevia rebaudiana*. Uma vez que o esteviosídeo foi detectado também em aquênios claros estéreis, parece que esse glucosídeo ocorre na parede do aquênio (pericarpo) visto que estes não apresentam embriões.

A presença de substâncias com atividade gibberelínica foi observada somente em extratos de aquênios férteis. Nos experimentos de germinação observou-se que GA₃ na concen-

tração de 50 mg/l pode substituir a luz, promovendo a germinação de aquênios de *Stevia* em condições não indutoras. É provável que a presença de giberelinas seja uma condição imprescindível para a germinação desses aquênios e pode-se concluir por esses resultados que sua ocorrência está restrita ao embrião visto que extratos de aquênios claros e de aquênios escuros es t é r e i s não apresentaram picos de promoção de crescimento de h i p o c ó t i l o de alface.

A presença de indol-3-acetonitrila foi verificada em extratos dos tres tipos de aquênios de *Stevia rebaudiana* usando-se reagentes cromogênicos. Essa substância parece ocorrer na parede do fruto visto que aquênios claros também a possuem.

Indol-3-acetonitrila é uma auxina que foi isolada por JONES, HENBEST, SMITH e BENTLEY, em 1952, a partir de folhas e caules de *Brassica oleracea*. A presença de uma substância com alta atividade de auxina em extratos já havia sido verificada também em espécies de outras Cruciferae, como rabanete, couveflor e nabo (JONES et al., 1952).

Essa substância é sintetizada a partir do triptofano via glucobrassicina ou indol-3-acetaldoxime (SCHNEIDER e WIGHTMAN, 1974). Através da enzima nitrilase ocorre a conversão de indol-3-acetonitrila a ácido-indol-3-acético (THIMANN e MAHADEVAN, 1964). Essa enzima parece ter distribuição bastante limitada, sendo que apenas alguns membros de Gramineae, Cruciferae e Musaceae parecem contê-la (RAJAGOPAL e LARSEN, 1972).

RAJAGAPAL e LARSEN (1972) infiltraram tecidos vivos de diversas espécies que representam 17 famílias, com in

indol-3-acetaldoxime e observaram que 8 espécies acumularam IAN. Dentre essas espécies está *Helianthus annuus*, da família Compositae. Nessa planta, o indol-acetaldoxime foi convertido em AIA, mas houve acúmulo de IAN em extratos de gemas apicais e cotilédones. Parece que na maior parte das espécies estudadas ocorreu a formação de AIA via indol-3-acetaldeído. Esses autores sugerem que o caminho metabólico via IAN pode operar apenas em circunstâncias especiais, mas é provável que seja de importância limitada. LIVERMAN e DANNENBURG (1957) sugeriram que a formação de nitrila poderia funcionar como um mecanismo de controle dos níveis de AIA nos tecidos. Uma vez que a germinação de *Stevia* em condições não indutoras foi totalmente inibida pelo AIA em concentrações de 1 mg/l a formação de nitrila nesses frutos poderia realmente ser uma forma de evitar o acúmulo de AIA nesses tecidos.

Não foi possível confirmar a presença de AIA nos extratos dos tres tipos de aquênios de *Stevia rebaudiana*, por meio da cromatografia em camada delgada. Esses dados poderiam sugerir que a enzima nitrilase não estaria presente nesses aquênios de maneira que ocorre um acúmulo de IAN.

O papel das auxinas no crescimento de raízes foi bastante discutido por ÅBERG (1957). A estimulação do crescimento de raízes por baixas concentrações de auxinas foi verificada em diversas espécies. Foi mostrado que em *Helianthus annuus* AIA a 10^{-11} M, durante um período de crescimento de 5 horas promoveu fortemente o crescimento das raízes. O crescimento longitudinal de raízes de plantas intactas submetidas a baixas concentrações de auxinas foi estudado especialmente em a-

grião e a estimulação foi usada como um critério pelo qual as auxinas verdadeiras podem ser diferenciadas de inibidores que atuam no crescimento de raízes. Em raízes de agrião com um comprimento inicial de 5 mm e crescendo por um período de 17 horas em papel de filtro umedecido, observou-se uma estimulação máxima de crescimento de cerca de 15 por cento quando se aplicou $5,7 \times 10^{-11}$ M de AIA. Em alguns casos, a estimulação do crescimento parece surgir apenas depois do desaparecimento da auxina aplicada ao meio. Tais efeitos podem ser interpretados como uma adaptação das raízes a altos níveis de auxinas e logo são compatíveis com o clássico efeito da regulação do crescimento de raízes pelas auxinas (ÅBERG, 1957).

Em segmentos isolados de raízes, observou-se que AIA na concentração de 10^{-9} M promove o crescimento em 30 por cento. Esses fatos sugerem uma curva ótima para crescimento de raízes, como aquela para caules, mas com o ponto ótimo deslocado para cerca de $0,02 \mu\text{g/l}$, ou 10^{-10} M de AIA (THIMANN, 1972).

O fato de que auxinas em concentrações mais elevadas inibem o crescimento de raízes de plântulas de aveia pode ser devido a um efeito indireto das auxinas via etileno (THIMANN, 1972).

Foi verificado que indol-3-acetonitrila inibe o crescimento de raízes de plântulas de aveia de maneira semelhante ao AIA, enquanto que no agrião, o efeito de inibição é 60 a 100 vezes menor do que o AIA (ÅBERG, 1957).

Neste trabalho testou-se o efeito de indol-3-acetonitrila no crescimento de radículas de plântulas intactas de alface e observou-se que a concentração de $0,07 \text{ mg/l}$ promo-

Veu o crescimento das radículas de alface em 10 por cento. Concentrações de 0,31 mg/l e 0,625 mg/l inibiram o crescimento de radículas de alface.

Extratos dos tres tipos de aquênios de *Stevia rebaudiana* apresentam uma região de promoção de crescimento de radículas de plântulas de alface. A promoção é menor em extratos de aquênios claros e maior em extratos de aquênios férteis. Pela cromatografia em camada delgada verificou-se que os tres tipos de aquênios de *Stevia rebaudiana* apresentam indol-3-acetonitrila na região entre os R_f s 0,80 e 1,00. Embora essa substância pareça ocorrer na parede do fruto é possível que o embrião também a contenha, visto que extratos de aquênios férteis apresentam maior promoção do crescimento da radícula. Os resultados sugerem que essa substância poderia estar promovendo o crescimento de radículas de alface. Entretanto, a promoção observada em biotestes onde se verificou o efeito dos extratos sobre o crescimento de radículas é muito maior do que a promoção encontrada quando se utilizaram soluções de IAN. Nos cromatogramas ficou bem nítida a presença de outras substâncias nos extratos dos tres tipos de aquênios, na referida região. Observou-se também que nos extratos de aquênios escuros foram detectadas tres substâncias nessa região, incluindo o IAN e que nos extratos de aquênios claros foram detectadas apenas duas. É possível que ocorra uma interação sinérgica entre essa auxina e outras substâncias presentes no extrato, de forma que ocorra uma intensificação da promoção do crescimento da radícula. Um resultado diferente foi encontrado por FELIPPE et al. (1971). Esses autores verificaram que havia um inibidor do crescimento da radícula de

alface em extratos de aquênios escuros de *Stevia*, entre os R_f s 0,80 e 0,90, no sistema de solventes que utilizaram. Sugeriram também que este inibidor poderia ser o responsável pelo aparecimento de plântulas de *Stevia* com radículas atrofiadas e que tal efeito pudesse ser causado pelo esteviosídeo.

Foi observado neste trabalho que não ocorreu inibição do crescimento de radículas de alface na região correspondente ao esteviosídeo, portanto, não é essa substância a responsável pelo aparecimento de plântulas de *Stevia* com radículas atrofiadas. É possível que nos biotestes realizados por esses autores, a substância presente nessa região tenha se concentrado de tal forma que durante a realização do bioteste as plântulas de alface tenham absorvido uma concentração supraótima dessa substância de forma que ocorreu uma inibição do crescimento das radículas.

O aparecimento de plântulas com radículas atrofiadas em placas de Petri também poderia ser devido aos altos níveis endógenos desse hormônio em aquênios férteis.

O fotoblastismo positivo em aquênios de *Stevia rebaudiana* foi confirmado nesse trabalho onde ficou também estabelecido que a temperatura ideal para a germinação de aquênios dessa planta, sob luz branca constante é 25°C. A germinação é promovida pela luz vermelha e GA₃ pode substituir parcialmente o efeito promotor da luz. Pelos resultados obtidos em bioensaios e cromatogramas de extratos de tres tipos de aquênios de *Stevia* ficou evidenciada a presença de uma substância promotora de crescimento de radículas de alface, possivelmente uma auxina, indolacetonitrila.

RESUMO

A 25°C, os aquênios de *Stevia rebaudiana* Bert. são fotoblásticos positivos. Luzes verde e azul não afetaram a germinação, a qual era promovida por luz vermelha e inibida por vermelho extremo. Choques de vermelho extremo reverteram o efeito promotor de vermelho. O efeito promotor de vermelho não foi revertido pela luz azul.

Em temperatura constante, sob luz branca, a melhor porcentagem de germinação ocorreu a 25°C. As temperaturas de 5 e 40°C inibiram totalmente a germinação. O efeito de temperaturas alternadas foi verificado em aquênios mantidos no escuro. Nenhum dos pares de temperaturas utilizados promoveu a germinação de *Stevia* no escuro. Choques curtos de 45°C e 0°C não afetaram a germinação de *Stevia*, no escuro.

Ácido abscísico inibiu a germinação de aquênios mantidos em luz.

Em aquênios mantidos no escuro constante, a germinação foi promovida por ácido giberélico na concentração de 50 mg/l. Etrei e 6 benzil adenina em concentrações baixas não afetaram a germinação, enquanto que ácido indol-3-acético na concentração de 1 a 10 mg/l inibiu a germinação no escuro (em relação ao controle).

A germinação a 25°C em luz branca foi sempre ao redor de 40 a 60 por cento. Pela clarificação dos aquênios foi demonstrado que apenas 40 a 60 por cento dos aquênios escuros eram férteis.

Esteviosídeo, em várias concentrações, foi testado na germinação de *Stevia rebaudiana* Bert., *Rumex obtusifolius* L, *Cucumis melo* L, *Cucumis anguria* L e *Lactuca sativa* L. c.v. Crespa de Picar. O esteviosídeo não afetou a germinação de nenhuma das espécies estudadas.

Por extração, com o uso de cromatografia (uni e bidimensional) e revelação por antrona, ficou demonstrado que os tres tipos de aquênios de *Stevia* (claros, escuros estéreis e férteis) possuem esteviosídeo.

Utilizando o biensaio do hipocótilo de alface, foram detectadas substâncias giberelínicas somente nos aquênios férteis.

Foi verificado que os extratos de tres tipos de aquênios promoviam o crescimento de radículas de alface, dando, portanto a idéia de que os extratos possuíam alguma substância auxínica.

Através de cromatografia (uni e bidimensional) com diferentes sistemas de solventes e revelação por métodos químicos foi mostrada a existência de uma substância apresentando o mesmo R_f e a mesma cor que o padrão de indol-3-acetonitrila, nos extratos dos tres tipos de aquênios.

SUMMARY

Achenes of *Stevia rebaudiana* have been shown to exhibit a positive photoblastic reaction at 25°C. Germination is not affected by blue or green lights, but is promoted by red light and inhibited by far red light.

Exposure to far red reverses the promotive effect of red light, whilst blue light has no such action.

Under white light at constant temperature maximum germination rate occurs at 25°C, and germination is completely inhibited at 5°C and 40°C.

The effect of a varying temperature was investigated by maintaining achenes in darkness and comparing germination in a series of diurnal temperature ranges. None of these treatments promoted germination. Exposure to short periods of 45°C and 0°C likewise did not promote germination.

It was established that abscisic acid inhibits germination in light whilst gibberellic acid at 50 mg/l promoted germination in darkness. Ethrel and 6-Benzyladenine at low concentrations did not affect germination but IAA at concentrations of 1 - 10 mg/l inhibited germination in darkness.

Germination under white light at 25°C was always of the order 40 - 60%. It was subsequently established by using a clearing-squash technique that only 40 - 60% of achenes have fully formed embryos, whilst the remainder are inviable due to mal-formation of the embryo.

The effect on germination of stevioside at

various concentrations was tested with seeds of *Stevia rebaudiana* Bert, *Rumex obtusifolius* L, *Cucumis melo* L, *Cucumis anguria* L and lettuce cv. Crespa de Picar. It was concluded that stevioside has no effect on the germination of any of these species.

Chromatographic analysis (one and two dimension with anthrona's reagent) of achene extracts indicated that both fertile and sterile achenes contain stevioside, whilst lettuce hypocotyl bioassay showed gibberelin-like substances to be present only in fertile achenes. It was established that extracts from cell types of achenes which contain an auxin-like substance promoted growth of the roots of lettuce seedlings. Analysis by thin-layer chromatography under different solvent systems revealed a substance with the R_f and colour reaction characteristic of IAN.

BIBLIOGRAFIA

- ÅBERG, B., 1957. Auxin relations in roots. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 8: 153-180.
- ANÔNIMO, 1920. The Caa-ehe plant as a sweetening agent. *Bull. of the Imperial Institute.* 18: 123-125.
- ANÔNIMO, 1956. Sweetest of all. *Chem. Eng. New.* 34: 124-126.
- AKASHI, H. & YOKOYAMA, S., 1975a. Sobre a inocuidade dos extratos de folhas secas de *Stevia* (em Japonês). *Ind. Alim.* 18: 1-11.
- AKASHI, H. & YOKOYAMA, Y., 1975b. Não toxidez do extrato da folha seca de *Stevia rebaudiana*. Comunicação sobre os resultados de diversos testes de toxidez (em Japonês). *Shokuhin Kogyo.* 18: 34-43.
- ARYA, V. P., 1962. Position and configuration of the carboxyl group in steviol and isosteviol. *J. Sci. Ind. Res. (India)* 21b: 93-95.
- BARA, M. & GALSTON, A., 1968. Experimental Modification of Pigment Content and Phototropic Sensitivity in Excised Coleoptiles. *Physiol. Plant.* 21: 109-118.
- BARNES, M. F., LIGHT, E. N. & LANG, A., 1969. The action of plant growth retardants on terpenoid biosynthesis. Inhibition of gibberellic-acid production in *Fusarium moniliforme* by CCC and AMO-1618; action of these retardants on sterol biosynthesis. *Planta.* 88: 172-182.

- BEARD, J. R., MACMILLAN, J., WELLS, C. M., & PHINNEY, B. O., 1975. The metabolism of steviol to 13-hydroxylated ent-gibberellanes and entkauranes. *Phytochemistry*. 14: 1741-1748.
- BEARDER, J. R., FRYDMAN, V. M., GASKIN, P., MACMILLAN, J., WELLS, C. M. & PHINNEY, B. O., 1976. Fungal Products: XVI. Conversion of isosteviol and steviol acetate into gibberellin analogues by mutant B1-41a of *Gibberella Fujikuroi* and the preparation of (³H) gibberellin A₂₀. *J. Chem. Soc. Perkin. Trans* 1.2: 173-178.
- BENNET, R. D., LIEBER, E. R. & HEFTMANN, E., 1967. Biosynthesis of steviol from (-) kaurene. *Phytochemistry*. 6: 1107-1110.
- BERTONI, M. S., 1899. El Caã-êhê (*Eupatorium rebaudianum*, species nova) una nueva planta sacarífera. *Revta Agron. (Assuncion)* 35-37.
- BERTONI, M. S., 1918. La *Stevia rebaudiana* Bertoni. La stevina y la rebaudiana: nuevas substancias edulcorantes. *An. Cient. Parag. Ser.* 11 (2): 129-134.
- BORTHWICK, H. A., HENDRICKS, S. B., PARKER, M. W., TOOLE, E. H. & TOOLE, V. K., 1952. A reversible photoreaction controlling seed germination. *Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A.* 38: 662-666.
- BORTHWICK, H. A., HENDRICKS, S. B., TOOLE, E. H. & TOOLE, V. K., 1954. Action of light on lettuce seed germination. *Botanical Gazette*. 115: 205-225.

- BRIDEL, M. & LAVIEILLE, R., 1931a. Le principe à saveur sucrée du Kaá-hê-é (*Stevia rebaudiana* Bert.) Bull. Soc. Chim. Biol. 13: 636-655.
- BRIDEL, M. & LAVIEILLE, R., 1931b. Le principe à saveur sucrée du Kaá-hê-é (*Stevia rebaudiana* Bert.) Compt. Rend. 14: 99-113.
- BRIDEL, M. & LAVIEILLE, R., 1931c. Sur le principe sucré des feuilles de Kaá-hê-é (*Stevia rebaudiana* Bert.) Compt. Rend. 192: 1123-1335.
- BRIDEL, M. & LAVIEILLE, R., 1931d. Sur le principe sucré du Kaá-hê-é (*Stevia rebaudiana* Bert.) II. Les produits d'hydrolyse diastasique du stéviol: glucose et stéviol. Compt. Rend. 193: 72-74.
- BRIDEL, M. & LAVIEILLE, R., 1931c. Le principe à saveur sucrée du Kaá-hê-é (*Stevia rebaudiana* Bert.) II. L'hydrolyse diastasique du stéviol. III. Le stéviol de l'hydrolyse acide. Bull. Soc. Chim. Biol. 13: 781-796.
- BROWN, R., 1972. Germination. In "Plant Physiology a Treatise" Vol. VIC Edited by Steward, Academic Press.
- BRÜCHER, H., 1974. Paraguays "Susstoff" Pflanze *Stevia rebaudiana*. Naturw. Rdsch. 27: 231-233.
- COHEN, B. L., 1978. Saccharin- the risks and benefits. Nature 271: 492.

- COHEN, D., 1958. The mechanism of alternating temperatures. Bull. Res. Council. Isr., Sect. D. 6: 111.
- COOKE, R. J. & SAUNDERS, P. F., 1975. Photocontrol of gibberellin levels as related to the unrolling of etiolated wheat leaves. Plant. 126: 151-160.
- COOKE, R. J., SAUNDERS, P. F. & KENDRICK, R. E., 1975. Red light induced production of gibberellin - like substances in homogenates of etiolated wheat leaves and in suspensions of intact etioplasts. Planta. 124: 319-328.
- DENNIS, D. T., UPPER, C. D. & WEST, C. A., 1965. An enzymic site of inhibition of gibberellin biosynthesis by AMO-1618 and other plant growth retardants. Plant Physiol. 40: 948-952.
- DIETERICH, K., 1909. Über die Bestandteile der Paraguay Substoffpflanze *Eupatorium rebaudianum* Kaá-hê-é und ihre pharmaceutische Verwertbarkeit. Pharm. Zentralh. 50: 435-441.
- DJERASSI, C., RINIKER, R. & RINIKER, B., 1956. Optical rotatory dispersion studies. VII. Application to problems of absolute configuration. J. Am. Chem. Soc. 78: 6362-6377.
- DJERASSI, C., QUITT, P., MOSETTIG, E., CAMBIE, R. C. RUTLEDGE, P. S. & BRIGGS, L. H., 1961. Optical rotatory dispersion studies LVIII. The complete absolute configuration of steviol, kaurene and the diterpene alkaloids of the garryfoline and atisine group. J. Am. Chem. Soc. 83: 3720-3733.

- DOLDER, F., LICHTI, H., MOSETTIG, E. & QUITT, P., 1960. The structure and stereochemistry of steviol and isosteviol. *J. Am. Chem. Soc.* 82: 246-247.
- DUNLAP, J. R. & MORGAN, P. W., 1977. Reversal of induced dormancy in lettuce by ethylene, kinetin and gibberellic acid. *Plant Physiol.* 60: 222-224.
- EVENARI, M., NEUMANN, G. & STEIN, G., 1957. Action of blue light on the germination of seeds. *Nature* 180: 609-610.
- FRANKLAND, B. & WAREING, P. F., 1960. Effect of gibberellic acid on hypocotyl growth of lettuce seedlings. *Nature* 185: 255-256.
- FELIPPE, G. M., 1977a. *Stevia rebaudiana* Bert.: Uma Revisão. *Ci. e Cult.* 29: 1240-1248.
- FELIPPE, G. M., 1977b. Erva do Paraguai. O Estado de São Paulo, Suplemento agrícola. 1137: 14.
- FELIPPE, G. M., 1977c. *Stevia*: Uma nova fonte adoçante? O Estado de São Paulo. Suplemento Cultural. 55: 14-15.
- FELIPPE, G. M., 1978. *Stevia rebaudiana*: a planta doce do Paraguai. O Estado de São Paulo. Suplemento Cultural. 76: 14-15.
- FELIPPE, G. M., 1980. Germination of the light sensitive seeds of *Cucumis anguria* and *Rumex obtusifolius*: effects of temperature. *New Phytol* (no prelo).

- FELIPPE, G. M. & LUCAS, N. M. C., 1971. Estudo da viabilidade dos frutos de *Stevia rebaudiana* Bert. *Hoehnea* 1: 95-105.
- FELIPPE, G. M., LUCAS, N. M. C., BEHAR, L. & OLIVEIRA, M. A. C., 1971. Observações a respeito da germinação de *Stevia rebaudiana* Bert. *Hoehnea* 1: 81-93.
- FELIPPE, G. M., GHERARDI, E., PENTEADO, L. B. K., ANNES, V. C. S. & SENE, C. M., 1970. Detecção de giberelinas durante a germinação de *Rumex obtusifolius* L. *Arq. Inst. Biol. S. Paulo*. 37 (3): 177-187.
- FLETCHER Jr., H. G., 1955. The sweet herb of Paraguay. *Chemurgic Digest*. 14: 7-18.
- FLINT, L. H. & MCALISTER, E. D., 1935. Wavelength of radiation in the visible spectrum inhibition the germination of light sensitive lettuce seed. *Smithsonian Inst. Misc. Coll.* 94: 1-11.
- FLINT, L. H. & MCALISTER, E. D., 1937. Wavelength of radiation in the visible spectrum promoting the germination of light sensitive lettuce seed. *Smithsonian Inst. Misc. Coll.* 96: 1-8.
- GLÓRIA, I. S., 1966. Thin layer chromatography of pharmaceutical agents. *Rev. Fac. Farm Bioq. S. Paulo*. 4: 341-400.
- GOSLING, C., 1901. Letter form C. G. consul at Assuncion. *Kew Bull.* 1901: 173-174.

- HANSON, J. R. & WHITE, A. F., 1968. Studies in terpenoid biosynthesis II. The biosynthesis of steviol. *Phytochemistry*. 7: 595-597.
- HEDDEN, P., MACMILLAN, J. & PHINNEY, B., 1978. The metabolism of bibberellins. *A. Rev. Pl. Physiol.* 29: 149-192.
- HERR Jr, J. M., 1971. A new clearing-squash technique for the study of ovule development in angiosperms. *Am. J. Bot.* 58 (8): 785-790.
- ISIKAWA, S. & FUJII, T., 1961. Photocontrol and temperature dependence of germination of *Rumex* seeds. *Plant & Cell Physiol.* 2: 51.
- ISIMA, N. & KAKAYAMA, O., 1976. Sensory evaluation of stevioside as a sweetener. *Rep. Natl. Food Res. Inst. (Tokyo)*. 31: 80-85.
- JANN, R. C. & AMEN, R. D., 1977. "What is germination?" In: *The physiology and biochemistry of seeds dormancy and germination*. Edited by A. A. Khan, North-Holland Publ. Co.
- JOLY, C. A. & FELIPPE, G. M., 1979. Dormência das sementes de *Rapanea guianensis* Aubl. *Revta Bras. Bot.* 2: 1-6.
- JONES, E. R. H., HENBEST, H. B., SMITH, G. F. & BENTLEY, J. A. 1952. 3-Indolylacetonitrile, a naturally occurring plant growth hormone. *Nature*. 169: 485-487.
- KALDEWEY, H., 1969. Simple indole derivatives and plant growth regulators. In "Thin Layer Chromatography". Edited by Stahl, E. Springer, Verlag Berlin, Heidelberg, New York.

- KATO, I., 1975. Técnica de aproveitamento do esteviosídeo e sua não toxidez (em japonês). *Shokuhin Kogy.* 18: 44-49.
- KATSUMI, M., PHINNEY, B. O., JEFFRIES, P. R. & HENDRICK, C. A., 1964. Growth response of the d-5 and an-1 mutants of maize to some Kaurene derivatives. *Science.* 144: 849.
- KENDRICK, R. E., 1976. Photocontrol of seed germination. *Sci. Prog. Oxf.* 63: 347-367.
- KENDRICK, R. E. & FRANKLAND, B., 1976. Phytochrome and Plant Growth. *Studies in Biology*, number 68. Edward Arnold.
- KOBAYASHI, M., HORIKAWA, S., DEGRANDI, I. H., VENO, J. & MITSUHASHI, H., 1977. Dulcosides A and B, new diterpenes glycosides from *Stevia rebaudiana*. *Phytochemistry* 16 (9): 1405-1408.
- KOBERT, R., 1915. Über zwei subschmeekende drogen. *Ber d. deutsch Pharm. Ges.* 25: 162-184.
- KOHDA, H., KASAI, R., YAMASAKI, K., MURAKAMI, K. & TAMAKA, O., 1976. New Sweet diterpene glucosides from *Stevia rebaudiana*. *Phytochemistry.* 15: 981-983.
- KOLLER, D., 1972. Environmental control of seed germination. In: "Seed Biology". Vol. III. Edited by T. T. Kozlowski, Academic Press.
- LIVERMAN, J. L. & DANNENBURG, W. N., 1957. Conversion of tryptophan and indol acetonitrile to indoleacetic acid by *Avena coleoptille* tissue. *Plant Physiol. Suppl.* 32, XVIII.

- MAYER, A. M. & POLJAKOFF-MAYBER, A., 1975. The germination of seeds. Pergamon Press.
- MAYER, A. M. & SHAIN, Y., 1974. Control of seed germination. A. Rev. Pl. Physiol. 25: 167-193.
- MENEHINI, M., VICENTE, M. & NORONHA, A. B., 1968. Effect of temperature on dark germination of *Rumex obtusifolius* L. seeds. A tentative physico chemical model. Arq. Inst. Biol., S. Paulo 35 (1): 33-38.
- MERCK, E., 1971. Dyeing Reagents for Thin Layer and Paper chromatography. Darmstadt, Germany.
- METIVIER, J. R. & VIANA, A. M., 1979a. The effect of long and short daylength upon the growth of whole plants and the levels of soluble proteins, sugars and stevioside in leaves of *Stevia rebaudiana*. J. Exp. Bot. (no prelo).
- METIVIER, J. R. & VIANA, A. M., 1979b. Determination of microgram quantities of stevioside from leaves of *Stevia rebaudiana* Bert by thin layer chromatography. J. Exp. Bot. 30: 805-810.
- MONTEIRO, R., 1980. Biologia Floral de *Stevia rebaudiana* Bert. Tese de Mestrado, inédito.
- MOSETTIG, E. & NEW, W. R., 1955. Stevioside II. The structure of the aglicon. J. Org. Chem. 20: 884.
- MOSETTIG, E., BEGLINGER, U., DOLDER, F., LICHTI, H., QUITT, P. & WATERS, J. A., 1963. The absolute configuration of steviol and isosteviol. J. Am. Chem. Soc. 85: 2305-2309.

- NITSCH, J. P. & NITSCH, C., 1965. Terpenoides Naturels actifs sur la croissance végétale. *Ann. Physiol. Vég.* 7: 259-272.
- NORONHA, A., VICENTE, M. & FELIPPE, G. M. 1978. Photocontrol of germination of *Cucumis anguria* L. *Biologia Plantarum.* 20: 281-286.
- NORONHA, A., VICENTE, M. & SILBERSCHMIDT, K., 1971. Observações sobre a germinação de sementes de *Cucumis anguria* L. *Ci e Cult.* 23: 321-332.
- OGAWA, Y., 1975. Biological activities of gibberellin biosynthesis related substances in the barley endosperm test. *Plant & Cell Physiol.* 16: 265-270.
- PARKER, K. J., 1978. Alternatives to sugar: the search for an ideal non nutritive sweetener is almost a century old. *Nature* 271: 493-495.
- PLANAS, G. M. & KUĆ, J., 1968. Contraceptive properties of *Stevia rebaudiana*. *Science* 162: 1007.
- POMARET, M., & LAVIEILLE, R., 1931. Le principe à saveur sucrée du kaā-hê-é (*Stevia rebaudiana* Bert.) IV. Quelques propriétés physiologiques du stevioside. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 13: 1248-1252.
- RAJAGOPAL, R. & LARSEN, P., 1972. Metabolism of Indole-3-Acetaldoxime in Plants. *Planta.* 103: 45-54.

- RASENACK, P., 1908. Über die Süsstoffe des *Eupatorium rebaudianum* und des süßholzes. Arbeiten aus dem kaiserlichen Gesundheitsamte. 28: 420-443.
- ROBINSON, B. L., 1930. Records preliminary to a general treatment of the Eupatoriaceae VIII. Observations on the genus *Stevia*. The stevias of the Argentine Republic. The stevias of Paraguay. The stevias of North America. Contrib. Gray Herb. Harvard Univ. 90: 3-160.
- ROCHA, R. F., 1975. Estudos em *Stevia rebaudiana* Bert.: Fotoperiodismo, esteviosídeo e substâncias giberelínicas. Escola Paulista de Medicina. Tese de Mestrado.
- RUDDAT, M., HEFTMANN, E. & LANG, A., 1965. Biosynthesis of steviol. Arch. Biochem Biophys. 110: 496-499.
- RUDDAT, M., LANG, A. & MOSETTIG, E., 1963. Gibberellin activity of steviol, a plant terpenoid. Naturwissenschaften 50: 23.
- SAKAMOTO, L., KOHDA, H., MURAKAMI, K. & TANAKA, O., 1975. Quantitative analysis of stevioside (em Japonês). Yakugaku Zasshi. 95: 1507-1511.
- SCHECHTER, I. & WEST, C. A., 1969. Biosynthesis of gibberelins. IV. Biosynthesis of cyclic diterpenes from trans-geranylgeranyl pyrophosphate. J. Biol. Chem. 244: 3200-3209.
- SCHMELING, G. A. Von, 1967. Caá-heê: edulcorante natural não calórico (*Stevia rebaudiana* Bert.) Bol. Sanatório S. Lucas. 29: 67-68.

- SCHMELING, G. A. Von, CARVALHO, F. V. & ESPINOSA, A. O., 1976.
Stevia rebaudiana Bertoni II. Efeito hipoglicemiante em coe-
lhos aloxinizados. Ci e Cult. 28 (7): 571.
- SCHMIDT, W., HART, J., FILNER, P. & POFF, K. L., 1977.
Specific inhibition of phototropism in corn seedlings.
Plant Physiol. 60: 736-738.
- SCHNEIDER, E. & WIGHTMAN, F., 1974. Metabolism of Auxin in
Higher Plants. Ann. Rev. Plant Physiol. 25: 487-513.
- SMITH, I., 1969. Chromatographic and Eletrophoretic Techniques.
William Heinemann, Medical Books Ltd. 3rd edition.
- SMITH, H., 1975. Phytochrome and Photomorfogenesis. Mac Graw
Hill.
- SNEDECOR, G. W. & COCHRAN, W. G., 1967. Statistical methods.
The Iowa State University Press, Ames., Iowa.
- STADEN, J. Van & WAREING, P. F., 1972. The effect of light
on endogenous cytokinin levels in seeds of *Rumex obtusifol-*
lius. Planta. 104: 126-133.
- TAYLORSON, R. B. & HENDRICKS, S. B., 1977. Dormancy in Seeds.
A. Rev. Pl. Physiol. 28: 331-354.
- THIMANN, K. V., 1972. The Natural Plant Hormones. In: Plant
Physiology, A Treatise. Vol. VI B. Edited by Steward, F. C.
Academic Press, New York and London.

- THIMANN, K. V. & MAHADEVAN, S., 1964. Nitrilase I. Occurrence, preparation and general properties of the enzyme. Arch. Biochem. 105: 133-141.
- THOMAS, E., 1937. *Stevia rebaudiana*. Bull. Assoc. Chim. 54: 844-847.
- TOOLE, V. K., 1973. Effects of light, temperature and their interactions on the germination of seeds. Seed Sci & Technol. 1: 339-396.
- TOOLE, E. H., HENDRICKS, S. B., BORTHWICK, H. A. & TOOLE, V. K., 1956. Physiology of seed germination. A.Rev. Pl. Physiol. 7: 299.
- UMBREIT, W. W. & BURRIS, R. H., 1964. Method for glucose and other sugars. In: Manometric Techniques. Edited by Umbreit, W. W., Burris, R. J. & Stauffer, J. P. 4th edition, Minneapolis, Burgess Publishing Co.
- VÁLIO, I. F. M. & ROCHA, R. F. 1976. Physiological effects of steviol. Z. Pflanzenphysiol. 78: 90-94.
- VÁLIO, I. F. M. & ROCHA, R. F. 1977. Effect of photoperiod and growth regulator on growth and flowering of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Japan. Jour. Crop. Sci. 46: 243-248.
- VÁLIO, I. F. M., KIRSZENZAFT, S. L. & ROCHA, R. F., 1972. Germination of achenes of *Bidens pilosa* L. New Phytol. 71: 677-682.

- VIANA, A. M. & METIVIER, J. R., 1979. Changes in the levels of total soluble proteins and sugars during leaf ontogeny in *Stevia rebaudiana* Bert. Ann. Bot. (aceito para publicação).
- VICENTE, M., ENGELHARDT, M. & SILBERSCHMIDT, K., 1962. The influence of temperature on the germination response to light of seeds of *Rumex obtusifolius* L. *Phyton* 19: 163-167.
- VICENTE, M., NORONHA, A. B., SILBERSCHMIDT, K. & MENEHINI, M. 1968. Successive reversion of the effect of temperature on germination of *Rumex obtusifolius* L. by far red light. *Phyton* 25 (1): 11-13.
- VIS, E. & FLETCHER Jr, H. G., 1956. Stevioside IV. Evidence that stevioside is a sophoroside. *J. Am. Chem. Soc.* 78: 4709-4710.
- WAREING, P. F. & BLACK, M., 1957. Sensitivity of light inhibited seeds to certain spectral regions. *Nature* 180: 395.
- WAREING, P. F. & BLACK, M., 1958. Similar effects of blue and Intra-red radiation on light sensitive seeds. *Nature* 181: 1420-1421.
- WATERS, J. A., BECKER, E. D. & MOSETTIG, E., 1962. Anodic decarboxylation of isosteviol acid. *J. Org. Chem.* 27: 4689-4691.
- WEEB, D. P., STADEN, J. Van. & WAREING, P. F., 1973. Seed Dormancy in *Acer*. *J. Exp. Bot.* 24: 105-116.

- WOOD, H. B. & FLETCHER Jr, H. G., 1956. Stevioside III. The anomeric 2, 3, 4, 6-tetra-O-acetyl- α -D-glucopyranosides and their behavior with alkali. J. Am. Chem. Soc. 78: 207-210.
- WOOD, H. B., ALLERTON, R., DIEHL, H. W. & FLETCHER Jr, H. G., 1955. Stevioside I. The structure of the glucose moieties. J. Org. Chem. 20: 875-883.
- YAMASAKI, K., KOHDA, H., KOBAYASHI, T., KASAI, R. & TANAKA, O., 1976. Structures of *Stevia* diterpene-glucosides: applications of ^{13}C NMR. Tetrahedron 13: 1005-1008.
- YANIV, Z., MANCINELLI, A. & SMITH, P., 1967. Phytochrome and Seed Germination III. Action of prolonged far red irradiation on the germination of Tomato and Cucumber seeds. Plant Physiol. 42: 1479-1482.
- ZAIDAN, L. B. P., DIETRICH, S. M. C. & FELIPPE, G. M., 1980. Effect of photoperiod on flowering and stevioside content in plants of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Japan. Jour. Crop. Sci. (no prelo).
- ZEEVART, J. A. D., 1966. Reduction of the gibberellin content of *Pharbitis* seeds by CCC and after-effects on the progeny. Plant Physiol. 41: 856-862.