

TAXONOMIA E BIOLOGIA DA REPRODUÇÃO DE

Stevia rebaudiana (BERT.) BERT.

REINALDO MONTEIRO

Orientador :

GIL MARTINS FELIPPE

Dissertação apresenta
da ao Instituto de
Biologia da UNICAMP pa
ra obtenção do Título
de Mestre

- 1980 -

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Para JAIRO e JAYME

cientistas natos que
compreendem a nature-
za.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Gil Martins Felipe, Professor Titular da Universidade Estadual de Campinas, pela orientação, incentivo e amizade durante a realização deste trabalho e na iniciação de minha carreira universitária.

Ao Prof. Dr. Peter Edward Gibbs, Professor Colaborador da Universidade Estadual de Campinas e Titular da University of Saint Andrews, Escócia, pelas valiosas sugestões, críticas e orientação.

À Profa. Dra. Therezinha S. Melha, Chefe da Seção de Dicotiledôneas do Instituto de Botânica da Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo, pela orientação e auxílio nos estudos de palinologia do presente trabalho.

Ao Prof. Dr. George J. Shepherd, Professor Assistente Doutor da Universidade Estadual de Campinas, pelo estímulo e dedicação nas indispensáveis discussões na finalização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Hermógenes de Freitas Leitão Filho, Chefe do Departamento de Morfologia e Sistemática **Vegetais** da Universidade Estadual de Campinas, pelo apoio nas requisições de empréstimos de material botânico e pelas sugestões de trabalho.

Aos colegas e docentes do Curso de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Estadual de Campinas, em especial dos Departamentos de Morfologia e Sistemática Vegetais, Fisiologia Vegetal e Instituto de Botânica.

nica de São Paulo, pela colaboração prestada.

À Sra. Elza Hegemann De Lucca (São Paulo) e Eng. Agr. Alfredo E. Plate, de Assunção (Paraguai), pela bibliografia conseguida.

Ao Eng. Agr. Osvaldo Paradella Filho, Chefe da Seção de Microbiologia Fitotécnica do Instituto Agrônomo de Campinas, pelo empréstimo e uso das casas de vegetação na Fazenda Santa Elisa e pela disponibilidade de funcionários.

Ao Eng. Agr. João B. de Andrade, do Instituto de Zootecnia de Nova Odessa, pelas informações conseguidas junto aos Herbários "Barbosa Rodrigues" e do "Museu Botânico Municipal" de Curitiba.

Aos funcionários dos Departamentos de Morfologia e Sistemática Vegetais e Fisiologia Vegetal da UNICAMP, pelo auxílio e amizade.

Ao Instituto de Biociências de Rio Claro, da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", pelas facilidades concedidas junto ao Departamento de Botânica.

Minha gratidão aos meus pais, irmãos e esposa, pelo apoio e compreensão constantes.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo auxílio financeiro concedido.

Í N D I C E

I. INTRODUÇÃO	1
II. MATERIAL E MÉTODOS	9
Material	9
Métodos	10
1. Taxonomia	10
2. Reprodução de <i>S.rebaudiana</i>	11
2.1 Cultivo	11
2.2 Indução para a floração	12
2.3 Estudos morfológicos em <i>S.rebaudiana</i>	13
2.4 Palinologia	14
2.5 Investigação do sistema de reprodução	17
2.6 Formação do tubo polínico no estigma	21
2.7 Número de cromossomos	22
2.8 Embriologia	23
2.9 Análise estatística	24
III. RESULTADOS	25
1. Taxonomia da série <i>Multiaristatae</i> de <i>Stevia</i> Cav. no Brasil	25
2. Reprodução de <i>S.rebaudiana</i> (bert.) Bert.	50
2.1 Palinologia	51
2.2 Sistema de reprodução	53
2.3 Germinação do grão de pólen e formação do tubo polínico no estigma	55
2.4 Número de cromossomos	56
2.5 Embriologia	57
IV. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	63
V. RESUMO	87

VI. SUMMARY	89
VII. BIBLIOGRAFIA	91

I. INTRODUÇÃO

O gênero *Stevia* (Compositae, Eupatorieae), descrito por Cavanilles (1797), possui cerca de 200 espécies, com distribuição geral nas regiões tropicais e subtropicais das Américas (King e Robinson, 1967; Willis 1973; King *et al.*, 1976; Robinson e King, 1977). Em alguns gêneros de Eupatorieae próximos de *Stevia* como *Mikania*, *Ageratum* e *Eupatorium* as variações de número de flores por capítulo, a disposição e morfologia das brácteas involucrais permitem criar subdivisões distintas nestes taxons. Em *Stevia* a uniformidade e constância de cinco flores por capítulo e brácteas involucrais sempre unisseriadas, semelhantes em tamanho, forma e textura, caracterizam o gênero na tribo.

Cavanilles (1797) caracterizou as espécies do gênero *Stevia* pela forma do "pappus" no aqüênio. Posteriormente DeCandolle (1836) reuniu as espécies em três séries dentro deste gênero, baseando se na heterocarpia do grupo :

série *Exaristatae* : "pappus" não aristado, com 5-6 páleas escariosas, livres, pequenas, ou podendo formar uma coroa denteada.

série *Paleaceoaristatae* : "pappus" com poucas páleas curtas e escariosas e com 1-5 aristas rígidas e serrilhadas.

série *Multiaristatae* : "pappus" com páleas ausentes ou quase nulas, mas com 6-20 aristas.

Para a confecção de uma chave de identificação das espécies brasileiras, Baker (1876) utilizou a divisão feita por DeCandolle (1836), porém separando as espécies da série *Multiaristatae* em dois grupos, *Pauci* e *Multiaristatae*, não mencionando espécie alguma para a série *Exaristatae* :

série *Palaeeo-aristatae* : "pappus" coroniforme, páleas 0-4 com prolongamento aristado.

série *Pauci-aristatae* : "pappus" com poucas páleas largas, das quais 4-10 com prolongamento aristado e quilongo ao aquênio.

série *Multi-aristatae* : "pappus" com 10-20 páleas ou mais, confundidas, todas ou a maioria produzindo aristas cerdas.

A diversificação dos frutos em Compositae é um fenômeno bem frequente e, quando ocorre, está associada a diferenças de posição, exposição e função dos aquênios (Robinson, 1930). Burt (1977), entretanto, observou que a diversificação dos frutos dentro do capítulo segue os padrões estabelecidos para as flores (aquênios do raio e do disco sendo diferentes), mas esta diversificação não é dependente desta diferenciação floral. Esta afirmação de Burt (1977) é confirmada pela heterocarpia em *Stevia*, onde se encontram flores homógamas e indistintas, mas que produzem frutos morfologicamente diferentes (Robinson, 1930).

A heterocarpia em *Stevia* é bastante pronuncia

da e existe em cerca de um terço de suas espécies (Robinson, 1930), onde o "pappus" de diferentes aquênios, num mesmo capítulo, manifesta dissimilaridade marcante.

Basicamente, a distinção de espécies homocárpicas e heterocárpicas teria significado de classificação considerável e permitiria a divisão do gênero em grupos reconhecíveis por um caráter natural único (Robinson, 1930). Entretanto, nos estudos posteriores a Robinson não se tem utilizado este caráter com a ênfase que o mesmo merece, como pode ser visto nas revisões regionais do gênero citadas em seguida.

Robinson (1930) identificou treze formas de heterocarpia em *Stevia*. Utilizando este caráter, ao lado de outros critérios morfológicos, fez revisões do gênero para a América do Norte, Argentina, Paraguai, Colômbia, Equador, Peru e Bolívia (Robinson, 1930, 1931, 1932). Este autor chamou a atenção para o fato de que as espécies do Paraguai são todas multiaristadas (*sensu* DeCandolle, 1836), condição esta que se estabelece na espécie *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bert.. Ainda para a América do Sul, existem as revisões para a Venezuela (Aristeguieta, 1964) enquanto que para a América Central foram publicadas revisões do gênero para o Panamá (King e Robinson, 1975) e Guatemala (Grashoff, 1976).

Cabrera e Vittet (1963) em um levantamento das Eupatorieae do Estado de Santa Catarina estimaram para a flora brasileira cerca de trinta e cinco espécies de *Stevia*, das quais dezesseis pertencem à série *Multiaristatae*.

Entretanto, nenhuma revisão moderna foi, até o momento, dedicada ao estudo das *Stevia* do Brasil, fato que compromete os trabalhos de taxonomia e distribuição geográfica desta tribo no país.

Nos aspectos de biologia floral e mecanismos de reprodução, são básicos os trabalhos de Robinson (1930) com respeito à heterocarpia do gênero e os de King e Robinson (1967, 1968) com relação ao polimorfismo polínico e características de microestrutura de elementos das flores. Em cada um destes estudos são discutidos também os possíveis significados taxonômicos destes caracteres, também revistos por Robinson e King (1977) e Skvarla *et al.*, (1977).

Grashoff, Lierner e Northington (1972) chamaram a atenção para o fato de que em *Stevia* os números cromossômicos encontrados para algumas espécies das Américas do Norte e Central poderiam estar relacionados com alterações do sistema de reprodução destas espécies. Em 1972, Grashoff (*in* King *et al.*, 1976) estudou os cromossomos das espécies de *Stevia* destas regiões e observou que as variações morfológicas polínicas determinadas por King e Robinson (1967) estavam relacionadas com irregularidades na meiose.

Grashoff (1974, e *in* King *et al.*, 1976) também notou que a apomixia é frequentemente encontrada em *Stevia* e que, de uma maneira geral, o comportamento reprodutivo pode ser determinado com um alto grau de segurança, a partir da morfologia dos grãos de pólen. Assim, as plan

tas com reprodução sexuada produzem grãos normais, uniformes e tricolporados. As plantas anômicas possuem grãos de pólen anormais e desiguais, tanto no tamanho quanto na forma, sendo comum até o aparecimento de grãos abortivos.

Os aspectos de polinização em *Stevia* abordados por Grashoff (1974), nada mais são do que extrapolações a partir de observações realizadas por Grashoff e Beaman (1970) em espécies de *Eupatorium*.

A importância do número de cromossomos na taxonomia de *Stevia* foi revista por King *et al.* (1976) onde, por esta característica, os gêneros *Stevia*, *Cronquistia* e *Carpochaete* encontram-se bastante associados, embora pela morfologia do estilete estas relações estreitas não sejam confirmadas. Apesar disto, Bolick (1977) utilizou as características do mecanismo de apresentação e exposição dos ramos do estilete para aproximar *Stevia* de alguns gêneros de Eupatorieae, afins pelo número cromossômico.

A espécie *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bert. é herbácea, originária do Paraguai, onde cresce espontaneamente. Foi descrita, primeiramente, por Bertoni (1899) como *Eupatorium rebaudianum* e, mais tarde, transferida pelo mesmo autor para o gênero *Stevia* Cav. (Bertoni, 1905), tornando-se conhecida, desde então como *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bert., conforme o Artigo 49 do Código Internacional de Nomenclatura Botânica (Stafleu *et al.*, 1972).

Esta espécie, anteriormente citada como endêmica e restrita ao Paraguai (Bertoni, 1899, 1905, 1918; Robinson, 1930), ocorre naturalmente, tanto ao norte deste país, como nos limites das fronteiras Brasil-Paraguai tendo sido coletada no Brasil recentemente (Schmelling, 1967; E. Angelucci, com. pes.). Entretanto, não é conhecida nenhuma citação de *S. rebaudiana* para a flora brasileira.

Substâncias amargas são largamente distribuídas nas Compositae (Bohlman *et al.*, 1977; Wagner, 1977). Somente se conhece uma planta nesta família que produz uma substância doce (Wagner, 1977), que é a *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bert. *S. rebaudiana* tem sido usada há muito tempo pelos nativos paraguaios como adoçante de bebidas amargas (Felippe, 1977a,b).

S. rebaudiana há muito tempo tem despertado interesse pelo seu alto potencial econômico, devido à presença do glicosídeo esteviosídeo, que é 300 vezes mais doce do que a sacarose (Bertoni, 1918; Robinson, 1930; Bridel e Lavieille, 1931a, b, c; Thomas, 1937; Fletcher 1955; Mors e Rizzini, 1966; Dominguez, 1977; Felippe, 1977a; Wagner, 1977). Além do esteviosídeo, *S. rebaudiana* apresenta ainda outros glicosídeos, como o esteviolbiosídeo, rebaudiosídeo A, rebaudiosídeo B e os dulcosídeos A e B, que são cerca de 30 vezes mais doce do que a sacarose (Kohda *et al.*, 1976; Yamasaki *et al.*, 1976; Kobayashi *et al.*, 1977).

Curiosamente, as primeiras citações a respei-

to desta espécie (Bertoni, 1905, 1918; Anônimo, 1911 ; Anônimo, 1920) envolvem algumas informações a respeito da baixa fertilidade de suas sementes, fato que persiste até o momento sem explicação (Felippe, 1977b). O estudo da germinação das sementes de *S. rebaudiana* foi feito por Felippe e Lucas (1971) e Felippe *et al.* (1971). Foi constatado que as plantas produzem frutos claros e escuros, que podem ser distinguidos a olho nu. Os frutos claros não possuem embrião sendo, portanto, estéreis (Felippe e Lucas, 1971). Rocha (1975) observou que quando cultivada em estufa em condições naturais de iluminação, produzia cerca de 78 por cento de frutos claros.

Por outro lado, Felippe *et al.* (1971) mostraram que nem todos os frutos escuros eram férteis. Ficou demonstrado que a taxa de fertilidade para esses frutos era de 50 por cento. Felippe (1977a) afirmou que as plantas em cultivo no Instituto de Botânica em São Paulo apresentavam apenas 10 por cento de frutos férteis.

Enquanto que estas altas taxas de inviabilidade são conhecidas há longo tempo, a causa para tal ainda não foi estabelecida (Bertoni, 1905, 1918; Anônimo, 1918; Anônimo, 1920; Thomas, 1937; Fletcher, 1955; Anônimo, 1956; Felippe e Lucas, 1971; Felippe *et al.*, 1971; Kawatani, Kaneki e Tanabe, 1973; Brücher, 1974; Miyazaki e Watanabe, 1974; Felippe, 1977b).

Bertoni (1918) e Schmeling (1967) afirmaram que plantas isoladas de *S. rebaudiana* são incapazes de formarem frutos férteis, enquanto que Brücher (1974) de

duziu que deveria existir uma autoesterilidade na espécie, após experimentos de autopolinização forçada, que resultaram em frutos inférteis.

Em vista do fato da alta taxa de inviabilidade de seus aquênios, o cultivo de *S.rebaudiana* é difícil mas resolvido de maneira adequada pela reprodução vegetativa, ou seja, por brotamento (Fletcher, 1955; Anônimo, 1956; Sumida, 1973; Rocha, 1975).

Embora muito se conheça da fisiologia e aplicações científico-industriais (Felippe, 1977b; Viana, 1979; Randi, 1980), pouco se sabe a respeito da biologia floral e do sistema de reprodução desta espécie.

Em vista do potencial econômico de *S.rebaudiana*, há um grande interesse em seu cultivo, e para isto é imprescindível um programa de melhoramento. Para tanto é necessário o estudo do seu mecanismo de reprodução, o que é de auxílio também para o conhecimento de relações filogenéticas no gênero. Foi, portanto, o objetivo deste trabalho desenvolver uma série de experimentos para elucidar o sistema de reprodução de *Stevia rebaudiana*, além de uma revisão morfogeográfica da série *Multia ristatae* no Brasil.

II. MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL

Para o estudo taxonômico da série *Multiaristatae* de *Stevia* do Brasil foram obtidos empréstimos do material dos herbários das seguintes instituições : Instituto Agronômico de Campinas, Campinas, SP (IAC); Departamento de Botânica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS (ICB); Instituto Anchieta e Universidade do Vale do Rio dos Sinos, Herbário Anchieta, São Leopoldo, RS (PACB); Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ (RB); Instituto de Botânica de São Paulo, São Paulo, SP (SP); Departamento de Morfologia e Sistemática Vegetais do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP (UBC).

Foram também utilizadas as informações constantes nas fichas dos materiais identificados e depositados nos Herbários "Barbosa Rodrigues", Itajaí, SC (HBR) e "Herbário Hatschbach" (Museu Botânico Municipal), Curitiba, PR (MB), para completar as áreas de ocorrência das diversas espécies.

A citação do material examinado é colocada por ordem alfabética das espécies e dos estados da Federação. Para os materiais de um mesmo estado, foi obedecida, por localidade, uma ordem cronológica de coleta. Quando o coletor não tinha número de coleta, foi colocada a referên-

cia numérica do herbário. As abreviaturas para os estados estão de acordo com Vanzolini e Papavero (1969).

O material disponível para estudos de *S. rebaudiana* pode ser separado em três lotes:

lote Unicamp : derivado de um número pequeno de plantas de *S. rebaudiana* introduzidas do Paraguai no Instituto de Botânica de São Paulo, na década de 60, e cultivado aí desde então;

lote Paraguai : quatorze plantas transferidas do campo de cultivo da Cooperativa Agrícola de Cotia, localizado no município de Atibaia, Estado de São Paulo (o material foi coletado no Paraguai em maio de 1976);

lote Cotia : plantas provenientes de plântulas crescendo espontaneamente no campo de cultivo acima citado.

As plantas dos três lotes constituíram o material para as observações desta pesquisa que passaram a ser cultivadas nos canteiros do Departamento de Fisiologia Vegetal da UNICAMP, no Instituto de Botânica em São Paulo e nas casas de vegetação da Seção de Microbiologia Fitotécnica do Instituto Agronômico de Campinas.

MÉTODOS

1 - Taxonomia

A principal parte deste estudo na área de taxonomia foi devotada ao levantamento das espécies brasi

leiras de *Stevia* da série *Multiaristatae* (*sensu* Baker, 1876), através de : levantamento bibliográfico; revisão de nomenclatura, sinonímia e validade das espécies brasileiras; identificação do material de herbário e do cultivado; cômputo dos dados de distribuição geográfica.

O presente trabalho foi baseado no método clássico da morfologia comparada. Todos os elementos vegetativos, flores e frutos foram utilizados para caracterização específica dos binômios (Davis e Heywood, 1973). Os trabalhos utilizados para identificação do material foram os de DeCandolle (1836), Baker (1876), Löfgren (1897), Robinson (1930, 1931, 1932), Barroso (1957) e Cabrera e Vittet (1963). As espécies foram dispostas por ordem alfabética, como aconselha Leenhouts (1968).

Os desenhos de flores de *S. rebaudiana* foram feitos com o auxílio de uma câmara clara em estereomicroscópio Zeiss.

As localidades das coletas do material de herbário foram marcadas em mapas segundo a localização do Índice de Topônimos da Carta do Brasil ao Milionésimo (Vanzolini e Papaverio, 1968; IBGE, 1972).

2 - Reprodução de *S. rebaudiana*

2.1. Cultivo

a) Plantas cultivadas em canteiros. As plantas foram cultivadas a partir dos indivíduos originais

(clones) por reprodução assexuada (brotamento), o que permite a manutenção dos genótipos originais. Outra forma de cultivo foi a germinação de aquênios nos canteiros, em condições naturais de temperatura e luz.

b) Plantas cultivadas em casa de vegetação : as sementes dos três lotes de *S. rebaudiana* foram colocadas para germinar em bandejas com solo recoberto de areia, com os frutos semeados por cima do substrato, por serem fotoblásticos positivos (Felippe *et al.*, 1971). As plântulas oriundas de aquênios e plântulas por brotamento foram transferidas para vasos com terra vegetal, que eram mantidos em condições naturais de luz e temperatura nas casas de vegetação e supridos, semanalmente, com 50 ml de solução de Hoagland (Hoagland e Arnon, 1933). No caso de incidência de fungos as plantas eram pulverizadas com uma solução de Karathane (1g/l de água).

2.2. Indução para floração

Plantas envasadas, dos lotes Unicamp e Cotia, oriundas de sementes ou estacas, com mais de quatro pares de folhas e 15 cm de altura, foram mantidas em câmaras ambientais por uma semana, em oito horas de luz para indução da floração (Bocha, 1975). Após este período de indução, os vasos foram levados para as casas de vegetação e/ou áreas de cultivo e mantidos em condições naturais de luz e temperatura até o final dos experimentos.

Algumas modificações foram introduzidas nos comprimentos dos fotoperíodos indutores, tendo em vista os resultados obtidos por Saidan, Dietrich e Felipe (1980) para a floração de plantas do lote Paraguai, que podem ser divididas em três grupos:

grupo A : floresce nos fotoperíodos de 8, 10 e 12 h ,
mas não em 14 h (semelhante ao lote original
UNICAMP);

grupo B : floresce em somente dois fotoperíodos : 10 e
12 h, isto é, nos fotoperíodos intermediários;

grupo C : floresce nos fotoperíodos de 8, 10, e 12 h ,
mas também em 14 h.

Não obstante estas diferenças apresentadas em relação à floração, não foram observadas correlações destes aspectos fisiológicos com qualquer caráter morfológico. Portanto, para os estudos seguintes as plantas foram sempre tratadas como um lote único (Paraguai).

2.3. Estudos morfológicos em *S. rebaudiana*

As plantas de *S. rebaudiana* foram analisadas e comparadas por estudos morfológicos realizados em material vivo ou fixado em FAA-alcool 70%, com auxílio de estereomicroscópio Zeiss, câmara clara e fotomicroscópio Zeiss. Material herborizado também foi comparado.

As plantas dos três lotes cultivados mostraram uma diversidade na morfologia geral. Entretanto, com um estudo mais aprofundado foi verificado que as es

truturas florais permanecem praticamente inalteradas, e a diversidade morfológica existente (como por exemplo no porte, na forma e no tamanho das folhas, e na pilosidade dos ramos) não permitiu separar as plantas pelos lotes a que pertencem.

Para estudar o desenvolvimento dos elementos florais, embrião e aquênios, foi utilizada a técnica de diafanização de Herr (1971). O material fresco ou fixado foi colocado em uma solução diafanizadora composta de ácido láctico 35%, hidrato de cloral, cristais de fenol, óleo de cravo e xilol, nas proporções de 2:2:2:2.1 (por peso), de 2 a 24 horas. Depois de diafanizado, foi montado entre lâmina e lamínula, no próprio líquido diafanizador e observado em microscópio ou em estereomicroscópio.

2.4. Palinologia

a) Morfologia do pólen

Para o estudo da morfologia dos grãos de pólen, estes foram tratados pela técnica de acetólise (Erdtman, 1971).

Botões e Flores de plantas vivas foram fixados em ácido acético glacial. O fixador foi separado por centrifugação e o sobrenadante retirado para submeter o material à mistura de acetólise. Ao material polínico depositado juntaram-se 5 ml de solução de acetólise, formada de nove partes de anidrido acético para uma de ácido sulfúrico. Colocou-se o tubo contendo o material em banho-maria a uma temperatura de aproximadamente 80 °C ou mesmo até a

fervura, por dois minutos. Após nova centrifugação, a mistura de acetólise foi decantada e o material lavado com água destilada (à qual se adicionou uma ou duas gotas de álcool), que foi separada após nova centrifugação. O material foi então, preparado para montagem, acrescentando-se ao tubo uma mistura de água destilada e glicerina em partes iguais. O pólen permaneceu neste meio por 30 minutos. Após centrifugação e decantação desta mistura, o material polínico foi coletado e montado em lâminas histológicas com gelatina glicerinada (Erdtman, 1943). As lâminas foram seladas com parafina fundida.

Os grãos de pólen acetolizados foram caracterizados segundo as normas estabelecidas por Erdtman (1971). As medidas das seguintes grandezas foram efetuadas ao microscópio, com o auxílio de ocular micrométrica :

- a) diâmetros : o equatorial em vista polar, sem espinho, e o polar em vista equatorial, sem espinhos;
- b) aberturas : comprimento e largura de colpus e ós ;
- c) exina : espessura da nexina mais a sexina.

A descrição e os desenhos foram feitos com o auxílio de uma câmara clara e os grãos representados de acordo com os critérios padrão (palinograma).

b) Viabilidade e número de grãos de pólen por antera

A verificação da viabilidade e no número de grãos de pólen por antera foi efetuada de acordo com a

técnica de Bell (1974), utilizando-se carmin acético em gelatina-glicerinada. A verificação da viabilidade baseia-se na coloração do citoplasma do grão de pólen pelo carmin: grãos viáveis apresentam-se com coloração púrpura, e os inviáveis incolores ou púrpura muito claros, consequência da ausência ou da pequena quantidade de citoplasma.

O meio foi preparado em duas etapas. a) gelatina para estoque: foram adicionadas 0,25 g de carmin em pó a 50 ml de gelatina-glicerinada. A mistura deve atingir o ponto no qual o corante está espalhado por igual no conteúdo de gelatina; (b) gelatina-glicerinada em carmin acético: foram adicionados 40 ml de ácido acético 45% a 20 ml de gelatina do estoque derretida. Aqueceu-se lentamente até que todo o carmin estivesse dissolvido. Finalmente foram adicionados 4 ml de uma solução saturada de acetato férrico em ácido acético 45%.

As anteras foram coletadas antes da abertura da flor e o conteúdo polínico foi retirado sob uma gota do meio gelatina-glicerinada mais carmin acético, sobre uma lâmina. O pólen foi espalhado na gota com o auxílio de um estilete. A seguir, colocou-se uma lamínula sobre esta gota de meio mais pólen e, após oito horas, contaram-se os grãos viáveis e inviáveis ao microscópio.

A amostragem foi realizada ao acaso nos três lotes de *S. rebaudiana* em cultivo, tendo sido utilizadas dez plantas por lote. De cada planta foram montadas dez lâminas (dez flores diferentes) com o conteúdo polínico de uma antera por lâmina (uma antera de cada flor).

A contagem foi efetuada correndo-se todo o campo da lamínula e anotando-se o número total de grãos.

c) Citologia e germinação do pólen

A observação do número de núcleos dos grãos de pólen de *S. rebaudiana* foi feita com carmin acético (Weller e Ornduff, 1977), na concentração de 0,5%.

Os testes para verificar a germinação *in vitro* do grão de pólen e posterior formação do tubo polínico foram realizados em solução de sacarose (Bell, 1974) em diferentes concentrações: 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40%. Para cada concentração foram montadas cinco lâminas, com duas gotas de solução de sacarose e o conteúdo polínico de uma antera em condições de deiscência (por lâmina). As lâminas foram mantidas em câmara úmida e temperatura ambiente. Após vinte horas, as lâminas foram observadas ao microscópio, depois de cobertas com lamínulas e tendo sido a mistura de solução de sacorese mais pólen corada com carmin acético a 0,5%. As contagens efetuadas dos grãos germinados (formação do tubo polínico) são apresentadas como porcentagem.

2.5. Investigação do sistema de reprodução

Para o estudo do desenvolvimento da flor e a aplicação da técnica de emasculação, os capítulos de *S. rebaudiana* foram divididos, arbitrariamente, nos seguintes estádios de desenvolvimento (Figuras 1 e 2):

estádio I - início do escape floral. Capítulos com botões minúsculos, com até 2 mm de tamanho, pedúnculo

culos não evidentes (Figura 1A).

estádio II - capítulos com botões entre 2-5 mm de tamanho, pedúnculos com até 1 mm. Tecido esporogínico abundante nas anteras (Figuras 1A e 1B).

estádio III - capítulos de 5-8 mm, com botões florais pouco evidentes na altura das brácteas involucreis (Figura 1C).

estádio IV - capítulos de 8-10 mm de tamanho, pedúnculos entre 2-5 mm; ápice dos botões quase nos bordos das brácteas involucreis (Figuras 1D, 2A e 2B).

estádio V - a maior parte dos botões nos capítulos já abertos. Braços do estilete parcialmente apressos, com pólen (Figuras 2C e 2D).

estádio VI - capítulos com todas as flores abertas; estiletos com braços bem separados (Figura 2E).

Com o uso das técnicas de diafanização foi possível acompanhar este desenvolvimento da flor internamente e determinar, com segurança, a posição dos ramos do estilete dentro do cilindro de anteras. Desta forma, pode ser determinado o estágio em que a técnica de emasculação poderia ser aplicada.

a) Técnica de emasculação

Stevia rebaudiana possui o mecanismo clássico de apresentação de pólen das Compositae (Small, 1915).

Figura 1 - Etapas finais do desenvolvimento das flores de *S. rebaudiana*. Contorno dos capítulos :

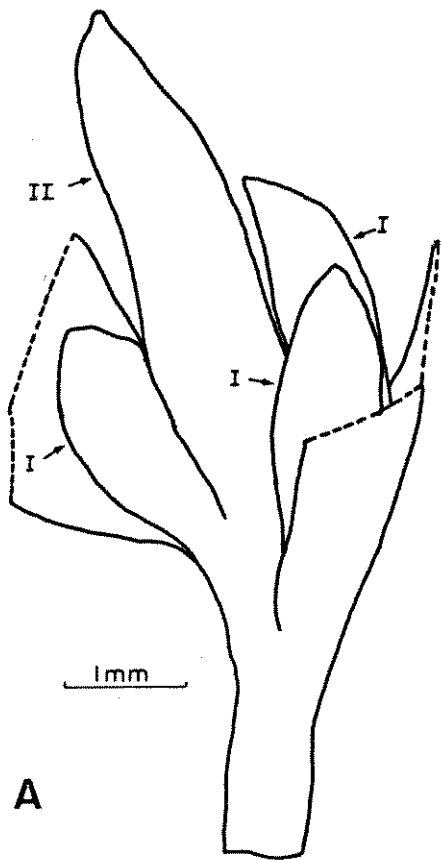
A - estádios I e II

B - estágio II

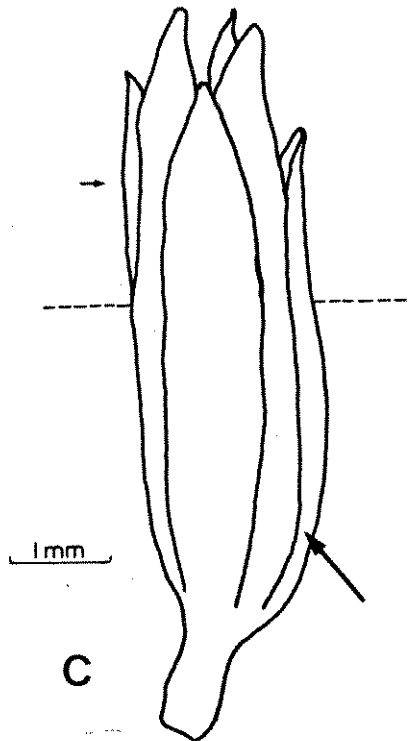
C - estágio III

D - estágio IV

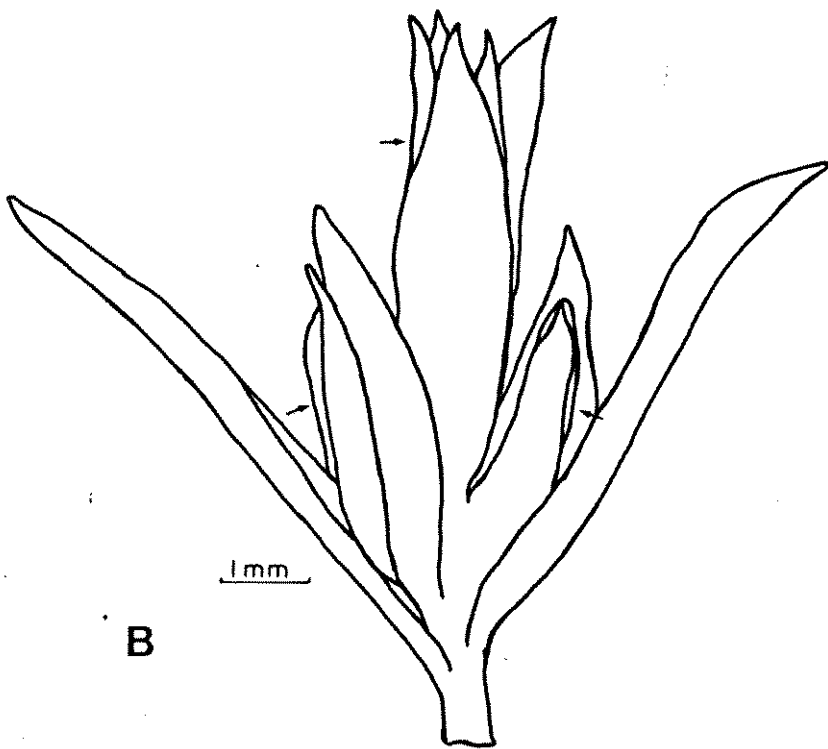
As setas indicam as posições dos ápices dos botões florais nos capítulos. Em C, a seta escura mostra uma bráctea foliar e a linha tracejada indica a altura da emasculação.



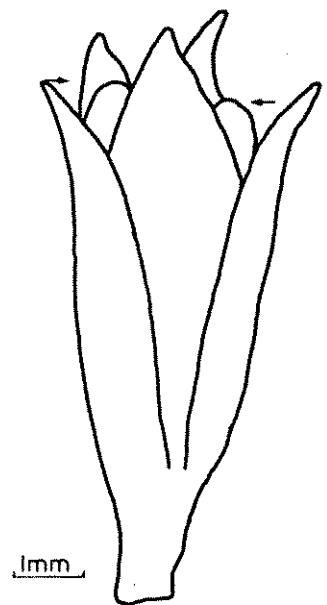
A



C



B



D

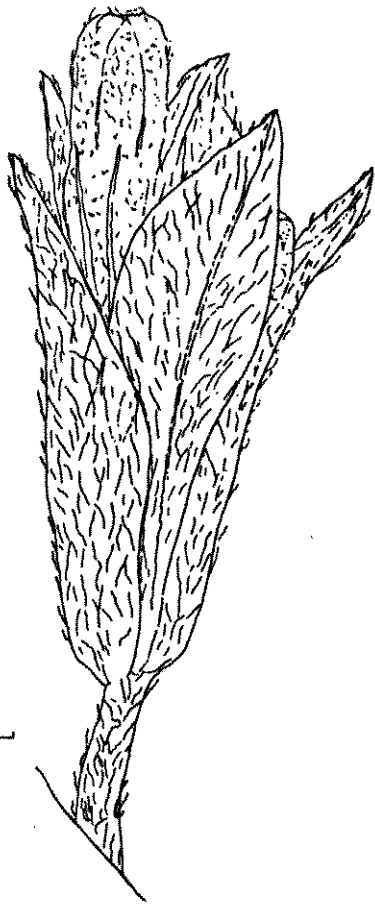
FIGURA 2 - Etapas finais do desenvolvimento das flores de
S.rebaudiana

A - capítulo no estágio IV

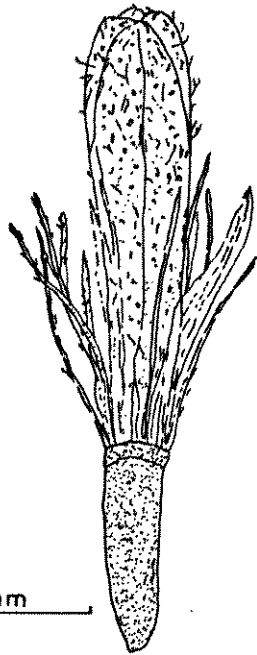
B - flor no estágio IV

C e D - flores no estágio V

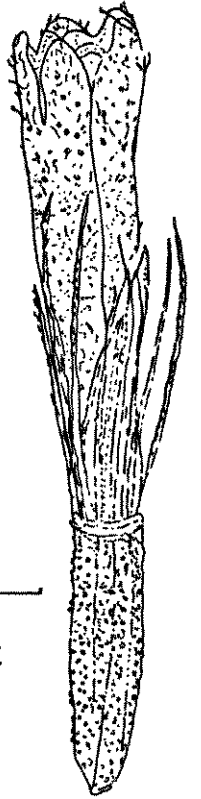
E - flor no estágio V.



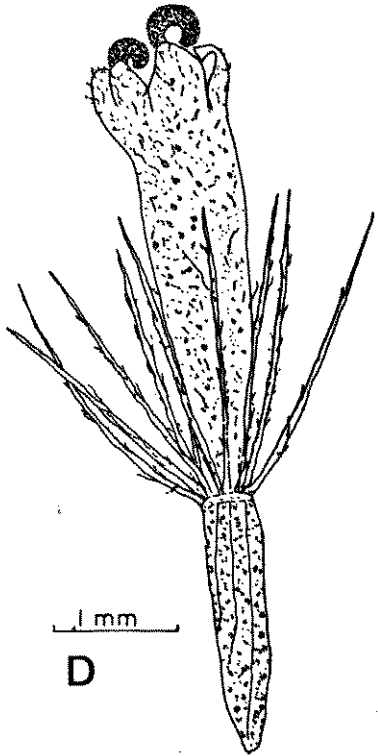
A



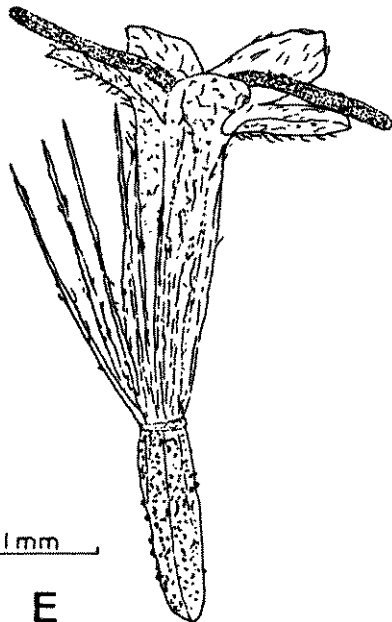
B



C



D



E

Nos estádios anteriores à antese floral, a região do estilete, com os ramos estigmáticos apressos, permanece a baixo do cilindro formado pelas anteras conadas, dentro de cada tubo floral. A maneira de apresentação do pólen indica a protandria nesta espécie. O pólen é liberado pelas anteras (antes da flor se abrir) e acumula-se em uma massa densa dentro do cilindro de anteras. Normalmente, esta massa de pólen é subsequentemente empurrada para fora da flor pelo estilete, que se alonga e, desta maneira, torna-se exposta e disponível para os vetores de polinização (Faegri e van der Pijl, 1971; Bell 1974).

Se, entretanto, forem retirados (cortados com uma lâmina de barbear limpa e esterilizada) 2 mm dos ápices das flores de um capítulo (ou flores isoladas) no estágio em que o ápice do estilete encontra-se abaixo do cilindro de anteras ou mesmo um pouco dentro deste (estádios III e IV), é possível remover a maior parte do tecido das anteras e, virtualmente, todo o pólen. Após dois dias ou mais, os estiletos das flores envasculadas alongam-se normalmente e o capítulo apresenta-se, então, com flores "femininas" que podem ser usadas em experimentos de polinização controlada. Gibbs (1971) utilizou com êxito esta técnica em *Senecio*.

b) Programa de polinizações manuais controladas

As plantas dos três lotes foram utilizadas num programa de polinizações manuais controladas. Este trabalho foi realizado nas casas de vegetação da Seção de

Microbiologia Fitotécnica do Instituto Agronômico de Campinas.

O programa de polinizações foi estabelecido num total de 60 plantas para cada lote cultivado e consistiu de quatro tratamentos principais:

- I - determinação do possível ocorrência como também da taxa de autopolinização (ou aponixia). Dez capítulos em estágio de botão foram ensacados em saquinhos feitos com gaze fina e deixados sem tratamentos posteriores.
- II - Determinação de ocorrência de aponixia. Dez capítulos por planta foram ensacados, tendo as flores em estágio de botão; posteriormente foram emasculados e novamente ensacados sem polinização manual;
- III - determinação de compatibilidade genética (autofecundação forçada). Dez capítulos por planta foram ensacados, com as flores em botão; posteriormente foram emasculados. Quando estavam com os estigmas receptivos, foram polinizados manualmente, utilizando-se pólen da mesma planta. Após a polinização foram ensacados novamente;
- IV - controle teste de polinização cruzada. Dez capítulos por planta passaram pelo mesmo processo de emasculação sem contaminação com pólen estranho e foram, então, polinizados manualmente com grãos de pólen provenientes ou de plantas do mesmo lote ou de lotes diferentes.

O pólen utilizado para as polinizações foi coletado em flores que se encontravam nos estádios de apresentação do mesmo, ou seja, na fase de deiscência das anteras e exposição do pólen, para o exterior da flor, pelo estilete (estádios V e VI). O programa foi repetido cinco vezes entre janeiro e julho de 1970.

A verificação da presença de autopolinização e autofecundação automáticas foi feita também por isolamento de dez plantas de cada lote e cobrindo-as totalmente com gaiolas feitas de tela de náilon com malha fina (1,5 x 1,5 mm), ainda no estágio inicial da floração. Estas plantas foram isoladas das demais ou nas casas de vegetação ou no campo de cultivo da Seção de Microbiologia Fitotécnica do Instituto Agronômico de Campinas.

Os resultados obtidos nos programas de polinizações manuais controladas foram analisados em termos de produção de frutos férteis e estéreis (Felippe e Lucas, 1971; Felippe *et al.*, 1971). O reconhecimento da viabilidade dos aquênios foi feito através da técnica de diafanização.

2.6. Formação do tubo polínico no estigma

Uma série de capítulos resultantes de autopolinização e polinização cruzada foi fixada em FMA-alcool 70% em intervalos de uma hora até cerca de 24 horas após a polinização, e subsequentemente em intervalos de 12 horas até 5 dias. Flores destes capítulos foram preparadas de acordo com a técnica de Martin (1959),

modificada em relação aos períodos de imersão, como se segue: fixação, de 5 a 7 horas; diafanização em solução de hidróxido de sódio 9-normal, 5 horas; coloração em solução aquosa de azul de anilina e fosfato de potássio, com pH 7,0, até 12 horas.

O material foi montado na solução corante entre lâmina e lamínula, e observado ao microscópio de fluorescência Leiss.

2.7. Número de cromossomos.

Os frutos férteis foram colocados para germinar em terra e, após oito dias, as plântulas com aproximadamente 2 cm de comprimento foram fixadas em Carnoy 3:1 (Johansen, 1940; Radford *et al.*, 1974) sob vácuo, por uma hora. Após substituição do fixador, foi utilizado ou guardado na geladeira.

Portanto, plântulas foram submetidas à reação nuclear de Feulgen, para observação nas placas metafásicas do número de cromossomos da espécie segundo a técnica de Smith (1974) e que consiste em:

hidratação - : as plântulas fixadas e conservadas em Carnoy foram hidratadas em uma série alcoólica (alcoois 90, 70 e 50%) até a água. Em seguida foram lavadas em água corrente e água destilada,

hidrólise - : o material hidratado foi hidrolisado com HCl 1N a 60 °C, por 12 minutos e, a seguir, lavado como na etapa anterior,

reação de Feulgen - : a coloração da cromatina foi con-

guida através da reação com a solução de Schiff (Assumpção e Morita, 1968), na qual as plântulas hidrilizadas ficaram imersas por 40 minutos, à temperatura ambiente. A seguir, o material corado foi lavado três vezes em água sulfurosa (solução de bissulfito de sódio a 10%) e, finalmente, duas vezes em água destilada (10 minutos para cada banho).

As pontas das raízes foram preparadas utilizando o método do esmagamento em uma gota de carmim acético a 1%. Depois de vedar as lâminas, o material foi observado ao microscópio para a contagem do número de cromossomos.

2.8. - Embriologia

A embriologia das plantas dos três lotes foi estudada utilizando cortes em série das flores de capítulos de cada tratamento do programa de polinizações manuais controladas. Uma série completa desde o estágio III de desenvolvimento floral e do primeiro ao décimo quinto dia após a polinização (P + 1 até P + 15) foi obtida.

Os capítulos foram coletados inteiros e fixados em FAA-alcool 70% por três horas, a vácuo. As flores foram então separadas e transferidas para álcool etílico 70 % e o material guardado na geladeira (Johansen, 1940 ; Dickison, 1974).

Para obtenção de cortes histológicos, as flores foram retiradas do fixador, procedendo-se então, a uma desidratação através de uma série alcoólica até o

xilol. A inclusão foi feita em parafina, depois de banhos de vinte minutos cada. Os cortes em série, de 10µm de espessura, obtidos com micrótomo, foram realizados nos planos transversal e longitudinal do material e montados em lâminas histológicas com adesivo Haupt. Após vinte e quatro horas, os cortes foram desparafinados, hidratados e corados com uma combinação safranina e "fast green". As lâminas foram montadas em bálsamo do Canadá, (Johansen, 1940).

2.9. Análise estatística

Os resultados referentes à viabilidade dos aquênios, viabilidade polínica, germinação e formação do tubo polínico foram analisados através do teste t, "student's test" (Snedecor e Cochran, 1967), após a transformação em valor angular.

Para o estudo estatístico da frequência (no caso presente, porcentagem) dos frutos férteis obtidos em cada cruzamento, foi aplicada a análise de variância, após a normalização dos dados (Pimentel Gomes, 1976; Sokal e Rohlf, 1969).

III. RESULTADOS

1. Taxonomia da série *Multiaristatae* de *Stevia* Cav. no Brasil

As espécies da série *Multiaristatae* de *Stevia* no Brasil são caracterizadas da seguinte forma: "pappus" com 10-20 páleas ou mais, confundidas, todas ou a maioria produzindo aristas cerdosas.

A. Flores exsertas do invólucro.

- a. Flores longamente exsertas (tubo da corola maior do que duas vezes o tamanho do ovário)
- b. Plantas griseo-pubérulas. Folhas opostas na base da planta, de posição fortemente oblíquas, inteiras, estreitas. Aquênios ciliados glandulosos ...
..... *S. satureiaefolia*
- b'. Plantas glanduloso-pubescentes. Folhas opostas, serrado-crenadas na porção média superior, agudas, nervuras pronunciadas. Aquênios ciliados
..... *S. lundiana*
- a'. Flores curtamente exsertas (tubo da corola até duas vezes o tamanho do ovário)
- c. Folhas oblongo-lanceoladas a romboídeas.
- d. Folhas com ambas as faces esparso-pilosas. Muitos capítulos dispostos em panículas laxas. Aquênios glanduloso-ciliados *S. rebaudiana*
- d'. Folhas em ambas as faces glabras e nítido-glandulosas. Poucos capítulos dispostos em cimeiras laxas. Aquênios glabros *S. veronicae*

- c'. Folhas linear-lanceoladas,
- e. Poucos capítulos dispostos em panículas laxas. Brácteas involucrais glanduloso-pubescentes. Aquênios glabros *S. catharinensis*
- e'. Muitos capítulos dispostos em panículas laxas .
Brácteas involucrais lanceoladas sem glândulas. Aquênios com glândulas sésseis esparsas e com pelos nos vértices. Folhas com bordos ciliados
..... *S. selloi*

B. Flores não exsertas do invólucro.

- a. Folhas alternas, subcoriáceas, com a face inferior apresentando muitos pelos hirtos
..... *S. alternifolia*
- a'. Folhas opostas, levemente oblíquas.
- b. Folhas sésseis, glabras ou laxamente pubescentes.
Aquênios com glândulas sésseis..... *S. cinerascens*
- b'. Folhas curtamente pecioladas.
- c. Folhas com a face inferior apresentando pelos setosos. Caule simples densamente coberto por pelos griseos. Brácteas involucrais glandulosas
..... *S. crenulata*
- c'. Folhas com a face superior glabra e a inferior levemente pilosa. Caule simples com pelos esparsos. Brácteas involucrais pubescentes.... *S. pohliana*
- d. Folhas lanceoladas, crenadas, curtamente pecioladas, com ambas as faces pilosas. Cimeiras terminais densas, semi-involucradas pelas folhas superiores *S. involucrata*

- d'. Folhas ovado-rômbicas ou rombo-ovadas.
- e. Folhas sêsseis. Bráctees involucrais com pelos purpúreos.
- Ramos da planta pubescentes e com glândulas sêsseis *S. ophryophylla*
- e'. Folhas brevemente pecioladas a pecioladas.
- f. Folhas crenado-serradas, com ambas as faces piloso-tomentosas, tendo 20-35x10-20 mm. Aquênios com 10-20 aristas.....*S. commixta*
- f'. Folhas distintamente crenadas, com a face superior glabra e a inferior punteado-glandulosa, tendo 30-35x20-25 mm. Aquênios com 20 aristas
..... *S. gardneriana*
- g. Folhas simples, grosso-crenadas e crenado-serradas, com a face superior punteado glandulosa . Inflorescências laxas *S. cruziana*
- g'. Folhas ternadas, grossamente inciso-crenadas, com pelos somente nas nervuras da face inferior. Capítulos sêsseis aglomerados..... *S. dubia*

Stevia alternifolia Hieronimus

Engl. Bot. Jahrb., 22:740 - 1 (1897)

Erva perene alcançando cerca de 40 cm de altura, com caule ereto, simples, cilíndrico, glanduloso-pubescente e densamente folioso. Folhas alternas, sêsseis, subcoriáceas, ovadas, agudas e obtusas, bordos crenados, tendo a face inferior densamente pubescente, 40-50x4-6 mm. inflorescência corimbosa-paniculada, com ramos glan

duloso-pubérulos, cimosos. Capítulos pedunculados, com brácteas involucrais linearmente lanceoladas, com 5 5,5 mm de comprimento, agudas, glanduloso-pubescentes no dorso. Corola com 4 mm de comprimento, esparsamente glanduloso pubérula. Aquênio laxamente glanduloso, "pappus" com 15-17 aristas ciliadas.

Material examinado :

PR: Mun. de Arapoti : estrada Arapoti Jagua-
riaiva, G.Hatschbach 12233, L.B.Smith e R.
Klein s/n*, 17/1/1965 (HH), G.Hatschbach
18932, 23/3/1968 (HH); Mun. de Guarapuava,
Fazenda Três Caões, G.Hatschbach 26335, 19/
2/1971 (HH).

Stevia catharinensis Cabrera et Vittet

Sellowia 15:157 (1963)

Erva perene, ereta, alcançando cerca de 50 cm de altura, com caule simples ou ramoso na parte superior curtamente glanduloso-pubescente, densamente folioso. Folhas opostas, ou com as superiores alternas, sêsseis, linear-lanceoladas, agudas no ápice e atenuadas na base, levemente serradas na parte superior da margem, tendo 30-40x2-3 mm. Panículas laxas com poucos capítulos, com pedicelos densamente glanduloso-pubescentes, tendo 5-30 mm de comprimento. Invólucro medindo 7 mm de comprimento com brácteas oblongo-lanceoladas, acuminadas, com o

* s/n - sem número próprio de coleta

dorso glanduloso-pubescente. Corola levemente pubescente, com 7 mm de comprimento. Aquênios glabros ou com poucos pelos curtos. "Pappus" formado por 16 cerdas ásperas.

Material examinado :

SC : Mun. de Joaçaba, Campo de Palmas, 55 km O de Caçador, L.B. Smith 11372, 1956/1957 (RB)
Mun. de Chapecô, 9 km O de Campo Erê, L.B. Smith 11534 e R. Klein s/n, 20/2/1957 (HBR, RD).

Stevia cinerascens Schultz-Miqontinus

ex Baker, Fl. Bras. 6(2):209 (1876)

Erva ereta alcançado cerca de 50 cm de altura, com caule lenhoso, pubescente, simples ou ramoso. Folhas ascendentes, sêsseis ou curtamente pecioladas, lanceoladas, agudas no ápice e atenuadas na base, crenadas, laxamente pubescente-hirsutas, tendo 15 20x3-6 mm. Panículas laxas, com muitos capítulos. Invólucro com 6-7 mm de comprimento, com bracteas lanceoladas, agudas, com o dorso pubescente. Corola com 5,5 mm, externamente ciliada, com lobos curtos. Aquênios com glândulas sêsseis, "pappus" com 14-20 aristas ásperas e rígidas.

Material examinado :

MG : Mun. de ?, Serra de Cipô, E. Pereira 8950, 16/3/1954 (RB); Mun. de ?, Serra do Espinhaço, ca. de 3 km N de São João da Chapada, H.S. Irwin et al. NY28494, 28/3/1970 (RB).

- PR : Mun. de Araucaria, E. Pereira 8097 e G. Matschbach 10701, 22/11/1963 (RS), Mun. de ?, Morro Pelado, Burtignol e Bossle s/n , sem data, (ICN 34598).
- RS : Mun. de Caxias, Vila Oliva, B. Rambo s/n , 21/2/1946 (PACA 31267), B. Rambo s/n 24/2/1954 (HBR); Mun. de Guaíba, N.I. Matzenbacher 172, 30/4/1975 (ICN); Mun. de Canela, S. Miotto 45, 25/4/1976 (ICN); Mun. de São Francisco de Paula, B. Rambo 51993, 20/2 / 1952 (HBR).
- SP : Mun. de São Caetano, A.C. Brade 7089, 24/2/1914 (SP).

Stevia commixta Robinson

Contr. Gray Herb. Harv. 90:9 (1930)

sin : *S. collina* Baker

Fl. Bras. 6(2):206 (1876)

Erva perene lenhosa alcançando 100 cm de altura, com caule ramificado na parte superior, densamente piloso-tomentoso, com pelos pluricelulares. Folhas membranáceas, opostas, curtamente pecioladas ou subsésseis, ovoidorômbicas, obtusas ou semi-agudas no ápice e cuneiformes na base, crenado-serradas, em ambas as faces piloso tomentosas, tendo 20-35x 10-20 mm. Muitos capítulos dispostos em densas cimbras corimbiformes terminais. Invólucro de 7-9 mm de comprimento, com brácteas linear-lanceoladas, atenuadas no ápice, densamente hirsutas e com pou-

cas glândulas sêsseis. Corola com cerca de 6 mm de comprimento. Aquênios com vêrtices curtamente pilosos. "Pappus" com 15-21 aristas rígidas.

Material examinado :

- GO Mun. de Goiania, Buritisaí, A.C.Brade 15397, 12/1936 (RB).
- MG : Mun. de Lavras, T.Castro 9, 12/1933 (SP) ; Mun. de Campina Verde, A.Macedo 166, 26/12/1943 (SP); Mun. de Bento Pires, próximo de Belo Horizonte, L.O.Williams e V.Assis 5907 13/3/1945 (RB); Mun. de Carandaí, Km 416 da Estrada de Ferro, A.Duarte 577, 20/11/1946 (RB), Km 417, A.Duarte 596, 20/11/1946 (RB); Mun. de Ituiutaba, Serra de São Vicente, A.Macedo 1371, 12/11/1948 (RB,SP) Mun. de São João Del Rey, A.Duarte 5120 , 1/1960 (RB); Mun.de Carandaí, A. Duarte 6354, 15/2/1962 (RB); Mun. de Caldas, sem coletor, sem data (SP 20738).
- PR : Mun. de Rio Negro, Campo do Tenente, G.Hatschbach 2205, 1/4/1951 (HH); Mun. de Jaguariava, G. Hatschbach 12198 L.B.Smith e R. Klein s/n , 17/1/1965 (HH); Mun. de Laranjeira do Sul, G. Hatschbach 12545, 14/4/1965 (HH); Mun. de Bolsa Nova, barra do Rio Papagaios, G. Hatschbach 18746, 14/3/1968, Mun. de Ponta Grossa, Arroio Quebra-Perna, G. Hatschbach s/n, 2/3/1962 (RB118248) ,

- Horto Florestal Caracará, G. Hatschbach 18764, 20/3/1968; Mun. de Pirai do Sul, G. Hatschbach 18807, 21/3/1968; Mun. de Lapa, Rio Passa Dois, G. Hatschbach 31734, 5/3/1973 (HH) Mun. de São José dos Pinhais, Rio Guamirim, G. Hatschbach 40963 e E.A. Zadini s/n, 11/2/1978 (HH); Mun. de Guarapuava, Condoi, G. Hatschbach 26349, 19/2/1971 (RB), Mun. de Senegés, Rio Itararé, G. Hatschbach 26734, 15/6/1971 (RB).
- RS : Mun. de ?, próximo a Santo Ângelo, B. Rambo s/n, 18/2/1941 (PACA 4653); Mun. de Bom Jesus, Serra da Rocinha, D. Rambo s/n - HA 53878, 12/2/1941 (HBR).
- SC : Mun. de Chapecô, Fazenda Campo São Vicente, L.B. Smith 11597 e R. Klein s/n, 20-21/2/1957 (HBR, RB).
- SP : Mun. de Araraquara, A. Loeffgren 1119, 1/12/1883 (SP); Mun. de São Paulo, São Paulo, Horto Botânico, Bairro da Cantareira, A. Hammar 29, 24/3/1901 (SP), I. Hauff 1003/1941 (SP), Bairro do Ipiranga, H. Luederwaldt 470, 5/1907 (SP), Jardim da Comissão Geográfica, A. Loeffgren s/n, 6/3/1914 (SP 16205), Botequim, A.C. Brade 7083 1/2/1915 (SP), Bairro do Butantan, F.C. Hoehne s/n, 22/6/1917 (SP 242), ídem ,

F.C.Hoehne s/n, 14/12/1917 (SP1081), ídem
F.C.Hoehne s/n, 4/8/1919 (SP3401), Parque
 Jabaquara, G. Hashimoto 415, 9/3/1939
 (SP), Vila Ema, A.C.Brade 16208, 3/1940
 (RB), ídem A.C.Brade 16211, 3/1940 (RB),
A.C.Brade 18725, 3/1947 (RB); Mun. de
 Jundáí, Serra dos Cristais, A.P.Viêgas
 s/n, 5/4/1939 (SP 43389); Mun. de Mogi
 das Cruzes, B.Pickel 5287, 21/2/1941 (SP)
 Mun. de Itapetininga, SSE de Itapetinin-
 ga, S.M.Campos 199, 16/3/1960 (RB); Mun.
 de São Carlos, Km 22 da Rod. Washington
 Luiz. G.M.Felippe 180, 25/3/1963 (RB) ;
 Mun. de ?, Morro Sapucaia, J.E.Leite 3142,
 10/1942 (SP).

Stevia crenulata Baker

Fl. Bras. 6(2):211 (1876)

Erva perene alcançando cerca de 100 cm de al
 tura, com caule simples densamente griseo-pubescente e
 na metade superior com ramificação corimboso-paniculada.
 Folhas ascendentes, na porção média superior crenuladas
 e na inferior íntegras, com a base atenuada, na face su
 perior piloso-setosas e na face inferior tenuamente pi-
 losas. Panículas longas, com ramos conspicuamente glan-
 dulosos. Invólucro de 8-12 mm de comprimento, com brác -
 teas glanduloso-pubérulas. Corola com 5 mm de comprimen-
 to, externamente ciliado-pilosa . Aquênio com cílios nas
 margens. "Pappus" com 5 mm de comprimento e de 13-15 a

ristas.

Material examinado :

MG : Mun. de Ouro Fino, F.C.Hoehne s/n, 6/5 /
1927 (ICN 17982, SP 19428); Mun. de ? ,
Regnell s/n, sem data (SP 20734).

PR : Mun. de Castro, Castro, G. Hatschbach -
18770, 20/3/1968 (HH, HBR).

Stevia cruziana Malme

K.svenska Vetensk-Akad. Handl 32:32 - 34 (1933)

Erva perene alcançando cerca de 75 cm de altura com caule simples ou pouco ramificado. Ramos lenhosos , com base glabra e ápice curtamente piloso. Folhas opostas, pecioladas, com pecíolo de 10-15 mm de comprimento, ovadas a ovado-romboidais, agudas, com base cuneada , grosso-crenadas a crenado-serradas, face superior glanduloso-punteadas e na inferior albo-pubérulas, tendo 50-60x3-4 mm. Inflorescência laxa, terminal. Brácteas in volucrais linear-lanceoladas de 9 mm de comprimento, agudas e com o dorso piloso. Corola exserta, com 8 mm de comprimento, com o tubo glabro. Aquênios glabros a levemente escabradós ou glandulosos. "Pappus" com 15-20 aristas ferrugíneas.

Material examinado :

RS : Mun. de Jari, próximo a Tupanciretan, B.
Rambo s/n, 25/1/1942 (PACA 9104); Mun. de
Vacaria, Passo do Socorro, B.Rambo 51494,
26/12/1951 (HBR).

SP : Mun. de Campos do Jordão, Bosque de Podocarpus, col. indet., 19/3/1956 (RB 146308)

Stevia dubia Robinson

Contr. Gray Herb. Harv. 104:7 (1934)

Erva perene ereta alcançando 50 cm de altura, com caule cilíndrico, esparsamente piloso e folioso na parte superior. Folhas ternadas brevemente pecioladas rombo-ovadas, subobtusas, grosso-inciso crenadas, membranáceas, com a base íntegra e cuneada, com a face superior pilosa e a inferior com pelos somente nas nervuras, tendo 40-50x20-24 mm. Panículas terminais convexas. Capítulos sésseis aglomerados. Invólucro com brácteas lanceo-oblongas a lanceolado-lineares, de 6 mm de comprimento. Corola rósea, com 5 mm de comprimento. Aquênios aparentemente heteromórficos, cerca de 5 mm de comprimento, com "pappus" de 11-12 aristas.

Material examinado :

A espécie não foi encontrada no material de empréstimo. A descrição acima apresentada foi baseada na citação original da espécie.

Stevia gardneriana Baker

Fl. Bras. 6(2):207 - 208 (1876)

Erva ereta alcançando cerca de 100 cm de altura, com caule lenhoso griseo-pubérulo, densamente corimboso-paniculado no ápice. Folhas brevemente pecioladas, obtusas, distintamente crenadas, base deltoidea íntegra, com a face superior glabra e a inferior punteado-glandu

losa e com pelos setosos, tendo 30-35x20-24 mm. Panículas amplas e longas, com ramos griseo-pubêrulo-glandulosos, pedicelos breves. Invólucro alcançando 8 mm de comprimento, e com escamas lanceoladas subglabras. Corola com até 5 mm de comprimento, externamente glandulosa. Aquênios de 4,5 mm de comprimento com longos cílios nos vértices. "Pappus" formado de 10-16 aristas, plumoso-ciliado.

Material examinado :

GO : Mun. de Alto Paraíso, Chapada dos Viadeiros, J. Semir s/n, 18/3/1976 (UEC 758).

PR : Mun. de Piarai do Sul, Joaquim Murтинho, G. Haschbach 18804, 21/3/1968 (HH).

SP : Mun. de São Paulo, São Paulo, Bairro do Ipiranga, Usteri s/n, 23/3/1906 (17978).

Stevia involucrata Schultz-Bipontinus

ex Baker, Fl. Bras. 6(2):211 (1876)

Erva ereta alcançando cerca de 60 cm de altura, com caule simples pubescente e ramificado na parte superior. Folhas opostas, lanceoladas, de bordos crenados, em ambas as faces pubescentes, tendo 30-40x5-10 mm. Poucos capítulos, dispostos em densas cimeiras terminais, semi involuocradas pelas folhas superiores. Pedicelos bem curtos ou nulos. Invólucro de 8 mm de comprimento, com brácteas lanceoladas, agudas pubescentes no dorso. Flores longo-excertas, corola pálida, 6-7,5 mm de comprimento, com lobos piloso-ciliados. Aquênios levemente glandulosos.

"Pappus" formado por 16 cerdas ásperas.

Material examinado .

MG : Mun. de Ituiutaba, A.Macedo 2306, 15/4 /
1950 (RB); Mun. de Carandaí, A.P.Duarte ,
4310, 5/11/1952 (RB).

RS : Mun.de Gramado, Schultz D. 41/6/91/3 ,
6/12/1968 (ICM); Mun. de Guaíba, Fazenda
Matzenbacher, H.Fleig s/n, 24/3/1976 (ICM
40032).

SC : Mun. de Campo Erê, F.R.Reitz 4503, 24/1 /
1952 (HER).

Stevia lundiana DeCandolle

Prodromus 5:122 (1836)

Erva perene lenhosa, alcançando 100 cm de altura, com ramos simples, densamente pubescentes e foliosos. Folhas opostas rígidas, sésseis, oblongo-lanceoladas, agudas no ápice e atenuadas na base, serrado-crenadas na parte superior da margem, com nervuras pronunciadas, punteado-glandulosas, laxamente pubescentes sobre as nervuras, tendo 20-30x5-8 mm. Muitos capítulos dispostos em uma panícula terminal de cimeiras corimbiformes. Pedicelos de 4-10 mm de comprimento, densamente glanduloso-pubescentes e com grandes pelos pluricelulares. Invólucro de 5-6 mm de comprimento, com brácteas agudas, pubescentes e glândulas esféricas sésseis. Corola do mesmo comprimento do "pappus", lobos ovados com ápices ciliado-pilosos. Aquênios laxamente pubescentes. "Pappus" com cerca

de 16 aristas ásperas e pouco rígidas.

Material examinado :

MG : Mun. de Caldas, F.C.Hoehne s/n, 9/1/1919, (SP2725); Mun. de Carandá, km 418 da Estrada de Ferro, A.Duarte 650, 25/11/1940 (RB); Mun. de S.S.Paraíso, A.C.Brade 17619 e A.parabosa s/n, 8/4/1945 (RB); Mun. de Hermilio Alves, Cachoeira, A.Duarte 1053, 10/11/1948 (RB); Mun. de Campina Verde, A.Macedo 1093, 6/6/1949 (SP), Campo dos Pinheiros. A.Duarte 2323, 26/12/1949 (RB); Mun. de São João Del Rey: Entre Tiradentes e S.J.Del Rey, A.P.Duarte 4076, 9/11/1952 (RB), entre Piedade e S J.Del Rey, E. Pereira 3173 e Salst 4008, 26/4/1957 (HBR, RB); Mun. de Poços de Caldas, M.Emmerich 2388, 12/2/1965 (RB); Mun. de ? Serra do Curral, E.Pereira 2464 e Salst 3300, 19/3/1957 (RB); Mun. de ?, Serra do Espinhaço ca. de 27 km S de Diamantina, H.S.Irvin et al - NY21968, 14/1/1969 (RL163932), 13 km S, entre Rio Jequití e Mendanha, U.R. Anderson 8993, 15/4/1973 (RB); Mun. de Caldas ?, sem coletor identificado, sem data (SP20735); Mun. de ?, F.Krieger e P.Rorh 1243, 10/2/1949 (RB).

PR : Mun. de Guarapuava, Fazenda Capão Redondo G. Hatschbach 12529, 12/4/1965 (HBR); Mun. de Balsa Nova, Tamanduá, G.Hatschbach

18716, 14/3/1968 (HH); Mun. de Lapa, Rio Passa Dois, G.Hatschbach 14005, 17/9/1966 (HH). Mun. de Castro, Carambei, Rio São João, G.Hatschbach 14199, 14/4/1966 (HH); Mun. de Rio Negro, G.Hatschbach s/n, 1/4/1951 (R674651); Mun. de Ponta Grossa, G. Gehrt s/n, 15/1/1909 (SP3727); Mun. de Curitiba, L.T.Dombrowski 1511 e Y.Saito 1211, 12/2/1965 (RB).

RS : Mun. de Cambará, B.Rambo s/n, 2/1948 (PACA 36262); Mun. de Livramento, N.I. Matzenbacher s/n, 23/3/1976 (Rb174263).

SC : Mun. de Lajes: B.Rambo 49641, 10/1/1951 (HBR), 8 km NE de Lajes, estrada para Campos Novos, L.B.Smith e R.Klein 11217, 10/2 / 1957 (HBR, RB); Mun. de São Joaquim, Curral Falso, Bom Jardim, P.R.Reitz e R.Klein 8423, 19/2/1959 (RB); Mun. de São Francisco do Sul, Morro do Campo Alegre, P.R.Reitz e R.Klein 10960, 24/3/1961 (RB); Mun. de Irani, 14 km E de Ponte Serrada, L.B.Smith e R.Klein 11880, 20/2/1957 (HBR); Mun. de São Joaquim, Bom Jardim, P.R.Reitz e R.Klein 8423, 19/2/1959 (HBR).

SP : Mun. de São João da Boa Vista, Loefgren e Edwal 2205, 9/6/1893 (SP). Mun. de São Caetano, G.Edwall s/n, 7/1898 (SP6329); Mun. de São Paulo : São Paulo, Bairro da Mooca,

Usteri, s/n, 1/4/1906 (SP16199, ICM17983),
 Bairro do Ipiranga, H.Luederwaldt s/n,
 4/1912 (SP16203), Vila Ima, A.C.Brade 7087,
 6/1914 (SP), ídem A.C.Brade 12935, 12/1933
 (RB), ídem A.C.Brade 16662, 4/1938 (RB),
 ídem, A.C.Brade 16209, 3/1940 (RB), ídem,
 ídem, A.C.Brade 13729, 4/1942 (RB) Jardim
 Botânico de São Paulo, O.Handro s/n, 10/4/
 1940 (SP137735), ídem, B.Pickel 5290, 30/3
 1941 (SP), ídem D.Constantino 55, 5/1941
 (RB); Mun. de São José dos Campos; A.Loefgren
252, 3/1909 (RB), A.Loefgren 294, 24/
 9/1909 (RB); Mun. de Itirapina, G.Gehrt
 s/n, 28/4/1923 (SP8294); Mun. de Campos
 do Jordão: P.C.Porto 3290, 5-20/2/1937 (RB)
L.Lanstyack s/n, 4/1937 (RB33201), J.E.Rom-
bouts 2552, 15/6/1933 (SP); Mun. de Itape-
 tininga, J.I.Lima s/n, 12/4/1947 (RB60653)
 Mun. de Itararé, H.F.Leitão Fo. et al s/n,
 14/4/1977 (UEC4725); Mun. de Santo André,
G.Hashimoto 64, sem data (SP41168).

Stevia ophryophylla Robinson

Contr. Gray Herb. Harv. 90:17 (1930)

Erva perene alcançando 70 cm de altura, com cau-
 le ereto de ramos pubescentes e glândulas sésseis. Folhas
 opostas, ovadas, obtusas nos ápices e contraídas na ba-
 se pecioliforme, levemente crenadas nas margens pontea-

das em ambas as faces e com pelos rígidos. Muitos capítu-
los corimboso-paniculados, com pedicelos densamente glandu-
luloso-pubescentes. Invólucro de 5 mm, com brácteas line-
ar-oblongas, agudas, densamente cobertas de pelos glandu-
lares purpúreos. Corola com cerca de 3,5 mm de comprimen-
to, levemente ciliada na face externa. Aquênios glandulo-
sos. "Pappus" com 17-19 aristas escabradadas.

Material examinado :

- MG : Mun. de ?, Serra do Espinhaço, 6 km N de
Gouveia, W.R.Anderson 8556, 10/4/1973 (RB)
- MS : Mun. de Anastácio, G.Natschbacn 23837 ,
19/2/1970 (RB).
- PR : Mun. de Lapa, Fazenda Santa Bernadete, R.
Braga e R.Lange 262, 5/3/1960 (RB); Mun.
de Castro, Rio Pitangui, G.Natschbacn -
14219, 14/4/1966 (RB).
- SC : Mun. de Campos Novos, 19 km N de Anita Ga-
ribaldi, L.B.Smith e R.Klein 11983, 1/3 /
1957 (HBR), Mun. de Campo Erê, Fazenda Cam-
po São Vicente, R.Klein 5008, 29/2/1954
(RB).
- SP : Mun. de São Paulo: São Paulo, Vila Mariana,
Usteri 43, 3/4/1905 (SP), Bairro do Ipiran-
ga, H.Luederwaldt 744, 25/3/1908 (SP) ,
Bairro do Jabaquara, A.C.Brade 7084, 8/3/
1914 (SP), ídem, A.C.Brade s/n, 8/3/1914
(ICN17981), ídem J.Hauff 34, 20/4/1932 (SP)
Vila Ema, A.C.Brade 16210, 3/1940 (RB); Mun.

de São José dos Campos : A. Loefgren 145 ,
 17/3/1900 (RB), A. Loefgren 372, sem data
 (RB); Mun. de Campos do Jordão: F.C. Porto
 3287, 5-20/2/1937 (RB), G. Hashimoto 24, 18/
 3/1938 (RB); Mun. de Itapetininga _ J.I. Li-
ma s/n, 04/1947 (RB60669), J.I. Lima s/n
 5/3/1951 (RB 78054 e 78055), J.I. Lima s/n
 sem data (RB78053).

Stevia pohliana Baker

Fl. Bras. 6(2):211 (1876)

Erva perene, ereta, alcançando cerca de 90 cm de altura, com caule simples pubescente, e na porção superior levemente corimboso-paniculado. Folhas ascendentes agudas, na porção média superior crenuladas, e na inferior íntegras, com a base atenuada, na face superior glabra e na inferior levemente pubérula, tendo 40-50x10-12 mm. Inflorescência de panículas longas, com ramos griseo pubérulos e brácteas diminutas. Invólucro de 6 mm de comprimento com brácteas oblongo-lanceoladas, e na face dorsal distintamente pubérulas. Corola alcançando 6 mm de comprimento, com lobos externamente ciliados. Aquênios com pequenos cílios nos ângulos. "Pappus" de 6 mm de comprimento, setoso e com 10-13 aristas.

Material examinado :

MG : Mun. de Belo Horizonte, Fazenda do Pastinho, M. Magalhães 4385, 28/7/1942 (RB).

PR : Mun. de Curitiba, rodovia Castro-Piraquara.

ra, 7-9 km de Curitiba, G. Tessmann 39, 14/
3/1950 (RB, HH).

Stevia rebaudiana (Bertoni) Bertoni

An. cient. parag. 5, ser. I:1 - 14 (1905)

sin : *Eupatorium rebaudianum* Bertoni.

Bol. Esc. Agric. Assunc. 2(1):35 - 37 (1895)

Stevia rebaudiana Hamsley

Ic. Pl. 29, t. 2816 (1906)

Erva ereta alcançando até 80 cm de altura, com pilosidade esparsa. Folhas simples, opostas, sésseis, oblongo-lanceoladas a espatulada-lanceoladas, obtusas, serradas na porção média superior, inteiras na base estreitada, membranáceas ou subcoriáceas, trinervadas e inconspicuamente venadas. Folhas caulinares frequentemente proíferas nas axilas, tendo 30-50x7-15 mm.

Inflorescência levemente paniculada, capítulos em pedicelos quase sempre do mesmo tamanho do involúcro, opostos às brácteas em cimeiras simpodiais irregulares; brácteas obtusas lanceolado-lineares. Invólúcro de 8-10 mm de comprimento, com escamas densamente pilosas na face externa. Corola com limbo claro e tubo púrpura claro, com pelos glandulares.

Aquênios com cerca de 2,5 mm de comprimento, com cinco vértices, quase uniformes, com poucas setas nos vértices, intermediadas com glândulas idênticas às da corola. "Pappus" com 13-15 aristas e cerca de 3,2 mm de comprimento.

A época de floração é predominantemente entre outubro e novembro.

Material examinado :

PARAGUAI : localidade ?, col.indet., 1944 - enviado por G.A.von Schmeling em 20/11/1944. (SP 52137 e 52138).

RJ : Mun. do Rio de Janeiro : Rio de Janeiro , material cultivado no Jardim Botânico, Dionísio s/n, 5/1920 (RB11304), J.F.Kuhlmann s/n, 2/5/1947 (RB 10053), J.F.Kuhlmann s/n 26/2/1948 (RB 62077).

SP : Mun. de São Paulo : São Paulo, material cultivado no Jardim Botânico de São Paulo, W. Hoenne 6141, 6/1966 (SP), idem, Seção de Fitoecologia, L.B.Zaidan 1-17, 20/9/1978 (SP); Mun. de Campinas : Campinas, Instituto Agronômico de Campinas, material cultivado, H.F.Leitão Filho 272, 18/1/1968 (IAC), material cultivado na Unicamp, R.Monteiro, s/n, 16/7/1977 (UEC 5494).

Stevia satureiaefolia (Lam.) Schultz-Lipontinus

Linnaea 25:291 (1853)

syn : *Eupatorium satureiaefolium* Lam.

Encycl. 2:411 (1786)

Mikania satureiaefolia Willd.

Sp. Plant. 3:1747 (1804)

Nothites satureifolia (Lam.) DC.

Prodromus 5:186 (1836)

Stevia linearis Gilliesex Baker, Fl. Bras. 6(2):208 (1876)

Erva ereta alcançando cerca de 40 cm de altura, com caule lenhoso, de ramos griseo-pubérulos e foliosos desde a base. Folhas ascendentes, crassas, opostas na base da planta, íntegras, obtusas, em ambas as faces griseo-pubérulas, com margens revolutas, crenadas tendo 15-30x1-2,5 mm. Capítulos agregados no ápice, pedicelos griseo-pubérulos. Invólucro de 6,5 mm de comprimento, com as brácteas levemente pubescentes no dorso, e ápice lanceolado agudo. Corola com 6,5-9 mm de comprimento, de lobos externamente ciliado-pilosos. Aquênios com até 5mm de comprimento, glandulosos e curto-ciliados. "Pappus" com 12-16 aristas e setoso.

Material examinado :

PR : Mun. de Campo Largo, Serra São Luiz, R. Hertel 204, 6/1/1948 (RB); Mun. de Ponta Grossa, 21 km SE de Ponta Grossa, G. Tessmann 2862, 11/2/1948 (RB); Mun. de Pirai do Sul, Serra de Furnas, G. Matschbach 3730 31/3/1957 (RB, HU).

RJ : Mun. de São Leopoldo, Monte Jacaré, B. Rambo s/n, 21/11/1934 (RB 4365, SP 50370) ; Mun. de ?, Salto de Macunan, próximo à fronteira com o Uruguai, B. Rambo s/n, 10/3/1941 (PACA 4692), Mun. de ?, Morro Zimmer, perto da Estação Capela, E. Schmidt ex J.E. Leite s/n, 5/1942 (SP 49117); Mun. de

Pelotas, L.T.Laris 674, 21/3/1960 (HBR).

Stevia selloi (Sprengel) Schultz-Bipontinus

ex Baker, Fl. Bras. 6(2):209 (1876), em sinonímia.

sin : *Kleinia selloi* Sprengel

Syst.Veget. 3:438 (1826)

Stevia oxylaena DC.

Prodomus 5:123 (1836)

Erva perene alcançando cerca de 60 cm de altura com caule ereto, simples ou ramoso na parte superior, pubescente ou hirsuto e densamente folioso. Folhas opostas ou alternas na parte superior da planta, sêsseis, estreitamente lineares ou linear-lanceoladas, agudas, curto-serradas, ciliadas nos bordos e com cerdas brancas nas nervuras em ambas as faces, tendo 10-40x2-4 mm. Muitos capítulos dispostos em panículas laxas, pedicelos filiformes, hirsutos e glandulosos, com 10-20 mm de comprimento. Invólucro com 5-6 mm de tamanho, brácteas lanceoladas, agudas e pubescentes. Corola com cerca de 5 mm de comprimento, púrpura, externamente glandulosa, lobos lanceolados e ciliados. Aquênio com glândulas sêsseis nos vértices, intercaladas com pelos escuros. "Pappus" com 10-20 aristas e com cerdas ásperas.

Material examinado :

PR : Mun. de Tibagi, Fazenda Monte Alegre, Salto Conceição, G.Hatschbach 4530, 3/5/1958 (RB).

SC : Mun. de Xanxerê, 8 km W de Abelardo Luz ,

L.B.Smith e R.Klein 11461, 19/2/1957 (RB)
 Mun. de Campos Novos, P.R.Reitz e R.Klein
 14660, 11/4/1963 (RB); Mun. de Abelardo
 Luz, R.M.Klein 4883, 28/2/1964 (RB); Mun.
 de Lajes, 3 km S de Lajes, L.B.Smith e R.
Klein 11293, sem data (RB).

Stevia veronicae DeCandolle

Prodromus 5:123 (1836)

Erva perene alcançando 100 cm de altura, com caule lenhoso ramificado na porção superior, com ramos es parsamente pilosos. Folhas opostas, coriáceas, rombóide-
 as, de ápice agudo e base truncada atenuada, subsésseis, na face superior verdes, glabras e glandulosas, e na in ferior nitidamente glandulosas e glabras, tendo 30-50 x 3-16 mm. Capítulos dispostos em cimeiras paucifloras, a grupadas em panículas; pedicelos glanduloso-pubescentes. Invólucro de 7-8 mm de comprimento, com brácteas lanceo-
 ladas, agudas e com pelos glandulosos e/ou simples. Coro-
 la alcançando 7 mm de comprimento e com lobos ciliado-pi losos. Aquênios escuros, glabros, ou com pelos curtos nos vêrtices. "Pappus" alcançando 6,5 mm de comprimento, e com 15-20 cerdas ásperas.

Material examinado :

GO : Mun. de Niquelândia, A.Macedo 4, 93, 22/2/
 1956 (RB). Distrito Federal, Convênio Flo-
 restal de Brasília, Gomes 975, 29/5/1960
 (RB); Mun. de ?, 75 km N de Corumbá de

- Goiás, a caminho de Niquelândia, vale do Rio Maranhão, H.S.Irwin et al. - NY192212, 25/1/1968 (SP); Mun. de ?, Chapada dos Veadeiros: 12 km S de Alto do Paraíso, H.S.Irwin et al. - NY24789, 22/3/1969 (RB), 19 km N de Alto do Paraíso, H.S.Irwin et al. - NY 327785, 20/3/1971 (RB); Mun. de ?, Serra dos Pirineus, ca. de 15 km N de Corumbã de Goiás, W.R.Anderson 10413, 16/5/1973 (RB).
- MG : Mun. de Campos Altos, I.Augusto s/n, 16/2/1943 (ICN19070); Mun. de S.S.Paraiso, Bau, A.C.Brade 17618 e A.Barbosa s/n, 30/13/1947 (RB); Mun. de Campina Verde, pontal dos Rios Grande e Paranaíba, A.Macedo 1081, 27/5/1948 (SP); Mun. de Jaboticatubas : km 116 da Rodovia Lagoa Santa Conceição do Mato Dentro-Diamantina, A.B.Joly et al., Fl. Cipô 176, 6/6/1970 (UEC), Idem, A.B. Joly et al., Fl. Cipô 287, 7/6/1970 (UEC).
- PR : Mun. de Araucaria, E.Pereira 8097 e G.Hatschbach s/n, 22/11/1963 (RB); Mun. de Bituruna, Rio Iguaçu, Salto Grande, G.Hatschbach 13891 e L.Lindeman e H.Haas s/n, 14/2/1966 (HH); Mun. de Curitiba, rodovia do Xisto, Rio Barigui, G.Hatschbach 26569, 17/3/1971 (HH); Mun. de Porto Vitória, G.Hatschbach 28369, 8/12/1971 (HK); Mun. de Curitiba, Bairro Alto, G.Hatschbach 33907, 2/11/1973 (HH).

- RJ : Mun. de Lageado, Serra da Bocaina, A. P. Duarte 7678, 3/1963 (RB); Mun. de Itatiaia B.L.Robinson s/n, sem data (ICN17980).
- RS : Mun. de Porto Alegre, Vila Manresa, proximidades de Porto Alegre, B.Rambo s/n, 5/7/1948 (PACA37429); Mun. de São Leopoldo, Monte Sapucaia, B.Rambo 40790, 1/4/1949 (HBR) ídem, B.Rambo 57472, 9/10/1956 (HBR); Mun. de Osório, Fazenda do Arroio, B.Rambo 46800, 14/4/1950 (HBR).
- SC : Mun. de Campo Alegre, Morro de Iguererim, P.R.Reitz e R.Klein 6431, 5/2/1908 (HBR); Mun. de Turvo, Taimbezinho, P.R.Reitz 2171, 15/2/1946 (HBR), Mun. de Lajes, Rio Caveiras, 8 km da rodovia ao Sul de Lajes, L.B. Smith e R.Klein 11304, 11309, 12/2/1957 (HBR); Mun. de Lauro Muller, Serra do Rio Rastro, P.R.Reitz e R.Klein 8433, 19/2/1959 (HBR); Mun. de Campo Erê, R.Klein 4946, 29/2/1964 (RB).
- SO : Mun. de São Paulo, São Paulo, Pico do Jaraguá, A.C.Brade 5933, 30/3/1913 (SP); Mun. de Itapetinga, Fazenda Santa Luzia do Campo Largo, SSE de Itapetinga, S.M.Campos 199, 16/3/1960 (SP); Mun. de Campos do Jordão, ca. de 8-10 km SSE de C.do Jordão, J.R.Coleman 334, 5/3/1966 (SP); Mun. de Avaré, J. Mattos s/n, 15/3/1967 (SP118685).

Na figura 3 (A, B) encontra-se o mapeamento do material de herbário examinado. No caso de *S. dubia* Rob., como já mencionado na descrição da espécie, não foi possível o exame de material de herbário, portanto sua distribuição no mapa foi feita através das indicações na descrição original. As espécies estão agrupadas de forma a visualizar melhor a distribuição geográfica. Como pode ser visto, a série *Multiaristatae* de *Stevia* no Brasil encontra-se distribuída nas regiões sul, sudeste e centro-oeste.

2. Reprodução de *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bert.

Para o estudo da reprodução desta espécie houve necessidade, inicialmente, de se obter dados a respeito de alguns elementos da flor e do fruto. Para isto utilizou-se a técnica de diafanização.

Uma flor no estágio IV de desenvolvimento foi diafanizada e os detalhes da estrutura interna do ovário podem ser vistos na Figura 4A, com o óvulo contendo já delimitações do saco embrionário.

A Figura 4B, apresenta um fruto escuro viável, com os cotilédones bem formados ocupando toda a área do ovário e uma fina camada de endosperma envolvendo o embrião. Na Figura 4C, é mostrado um fruto escuro inviável com o embrião mal formado ou com o desenvolvimento parcial. Os dados indicam que os frutos claros são somente os vários ressecados e enrugados (Figura 4D).

A Figura 5 mostra os pormenores da estrutura ex

Figura 3A - Mapa de distribuição do material de herbário
examinado.

○ *S. catharinensis*

● *S. satureiaefolia*

▲ *S. selloi*

■ *S. cruziana*

△ *S. crenulata*

▼ *S. pohliana*

□ *S. alternifolia*

▽ *S. lundiana*

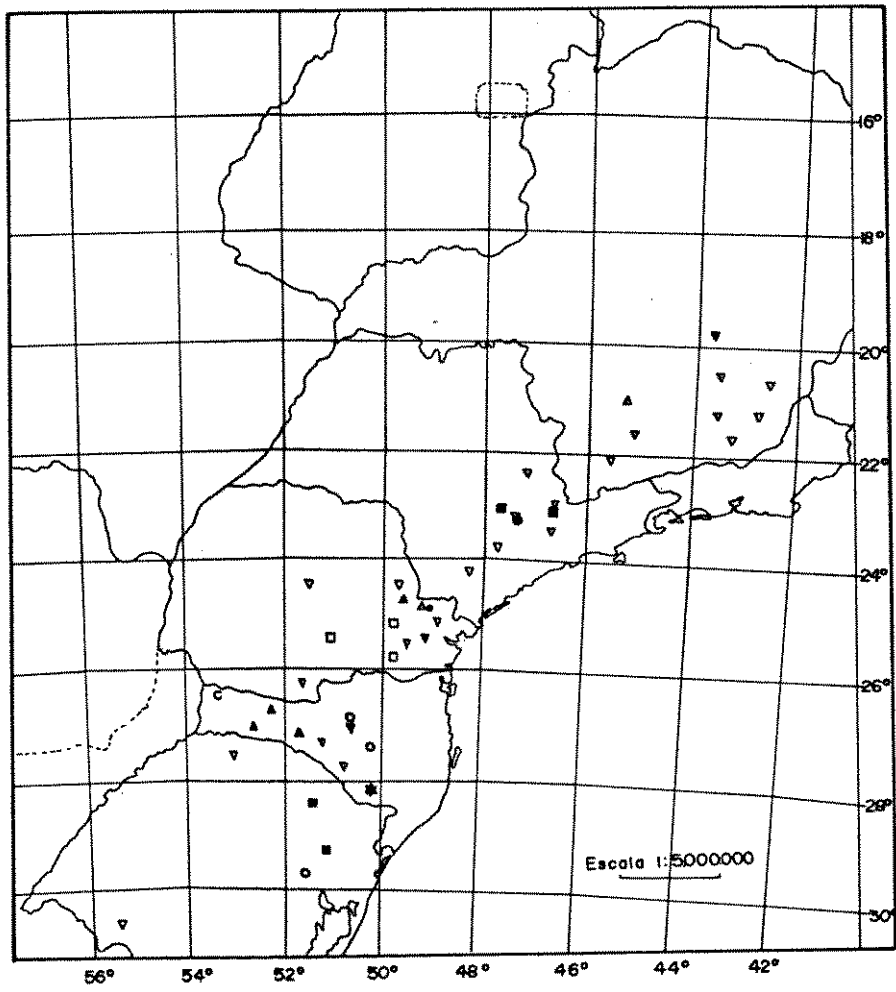


FIGURA 3B - Mapa de distribuição do material de herbário
examinado

- *S.veronicae*
- *S.dubia*
- ▲ *S.commixta*
- *S.ophryophylla*
- △ *S.cinerascens*
- ▼ *S.involucrata*
- *S.rebaudiana*
- ▽ *S.gardneriana*

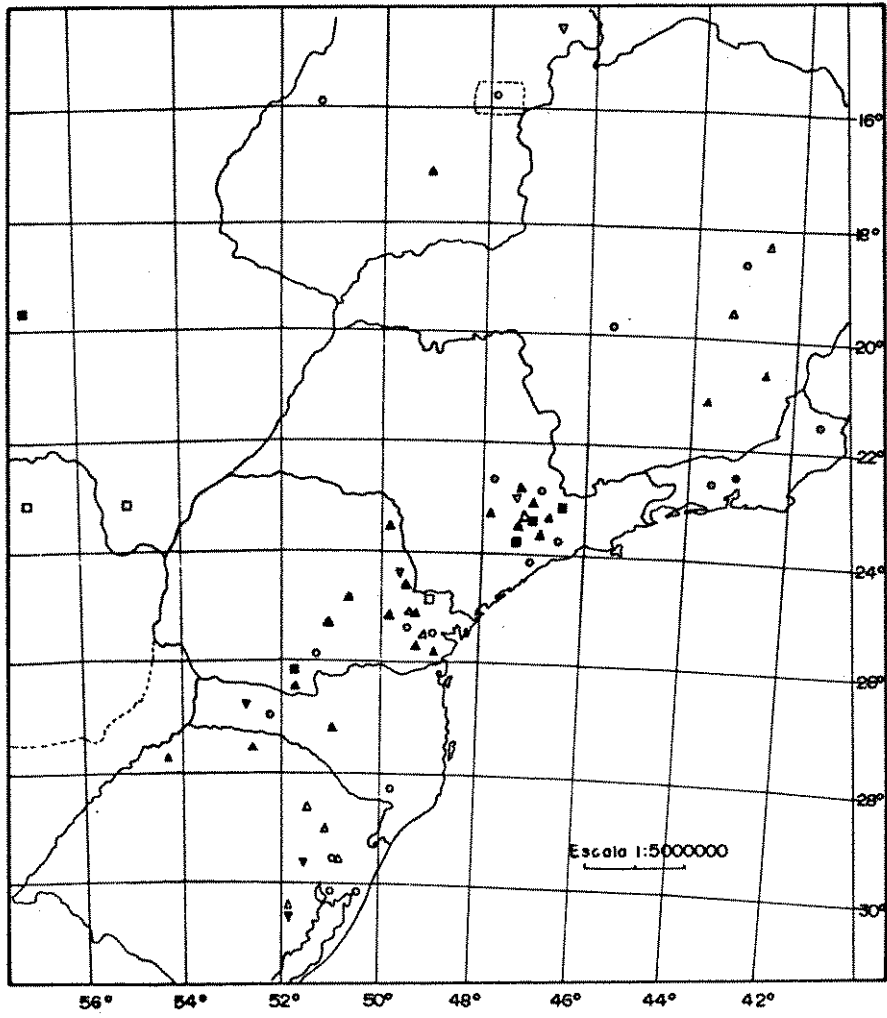


FIGURA 4 - Desenvolvimento do ovário e embrião de *S.rebau*
diana (técnica de diafanização).

A - ovário de uma flor no estágio IV

B - semente de um fruto escuro, viável.

C - Óvulo de um fruto escuro, inviável, com o
embrião mal formado.

D - ovário de um fruto claro, com óvulo atrofiado.
(aumento : 78,75 x).



A



B



C



D

terna dos ramos do estilete. Morfologicamente, o estilete das flores de *S. rebaudiana* possui a superfície receptiva do estigma localizada nas extremidades apicais dos ramos estigmáticos, que é formada por numerosas papilas unicelulares (Figuras 5A, B). Na região média do estilete encontram-se papilas em número menor e intermediadas com algumas glândulas semelhantes às da corola (Figuras 5C, D, E). Na região basal, isto é, onde os ramos estigmáticos se unem, as superfícies externas não possuem papilas, porém ainda são observadas algumas glândulas, na superfície interna dos ramos, as papilas estão presentes, porém são menores e menos densas.

A análise do estilete em material vivo (fresco) revelou que a superfície estigmática é seca, ou seja, não apresenta secreções fluidas em toda a sua extensão, entre as papilas típicas.

2.1 Palinologia

Os desenhos (palinograma) do pólen são apresentados na Figura 6. O palinograma não mostra o diagrama da estrutura da exina porque, nesta espécie, a parede do grão de pólen é, devido à complexidade das camadas, excepcionalmente, de difícil interpretação a nível de sexina. Diversos tratamentos com diferentes tempos de acetólise e técnicas de diafanização foram feitos sem resolver este problema.

Os grãos de pólen são prolato-esferoidais ($P/E = 1,02$) em vista equatorial (Figura 6A) e circular em vista polar (Figura 6B). O diâmetro polar (P), sem espis-

FIGURA 5 - Morfologia do estilete de *S.rebaudiana*.

- A - região apical de um dos ramos do estilete com as papilas estigmáticas (escala = 1 mm).
- B - ídem, com os detalhes (escala = 100 μ m).
- C e D - região média do ramo do estilete (C, escala = 100 μ m, D, escala = 100 μ m).
- E - glândulas encontradas nas regiões média e basal dos ramos do estilete (aumento de 400 x).

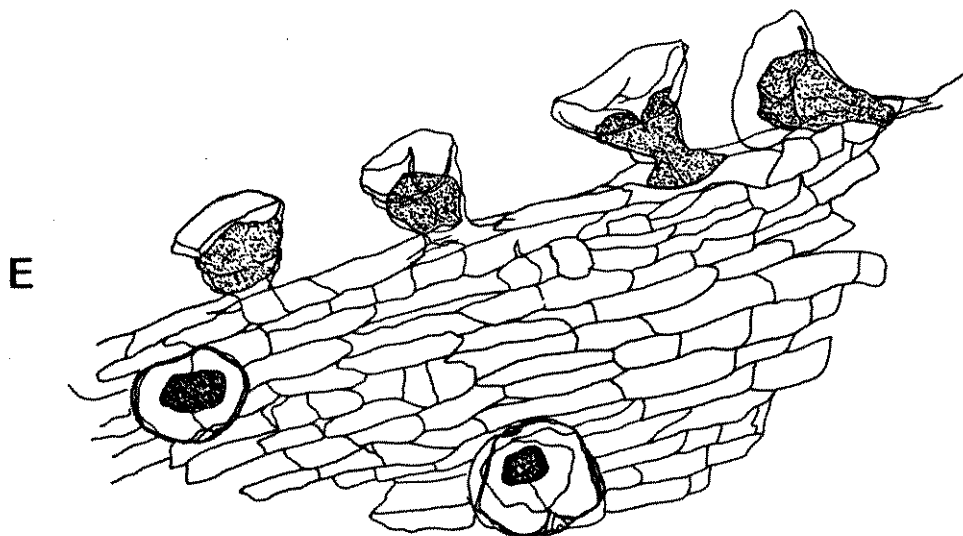
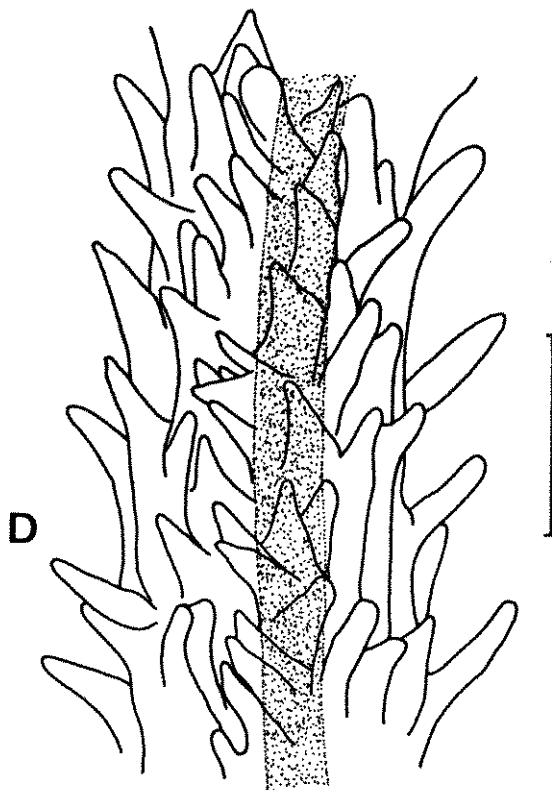
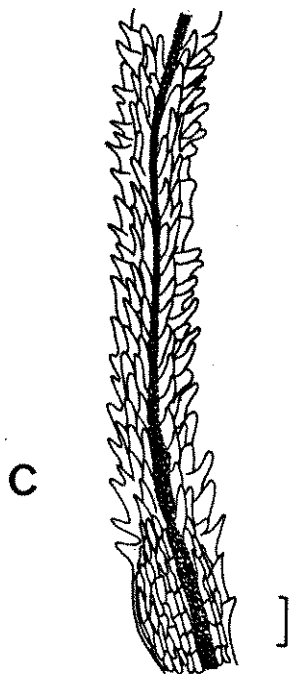
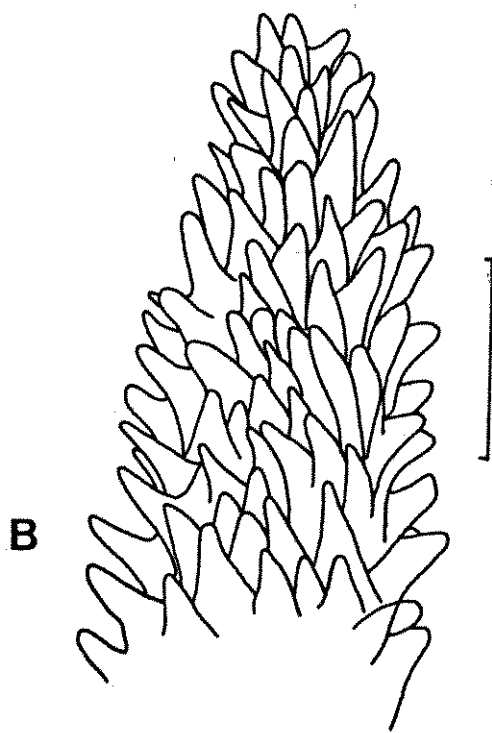
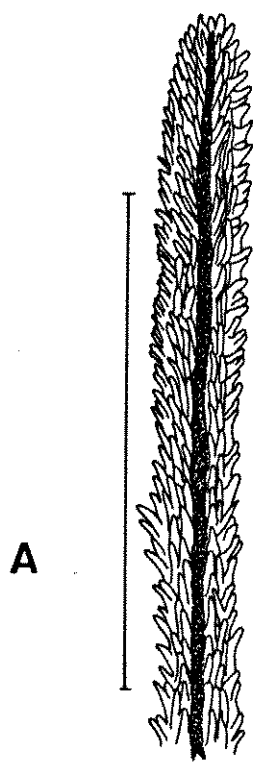
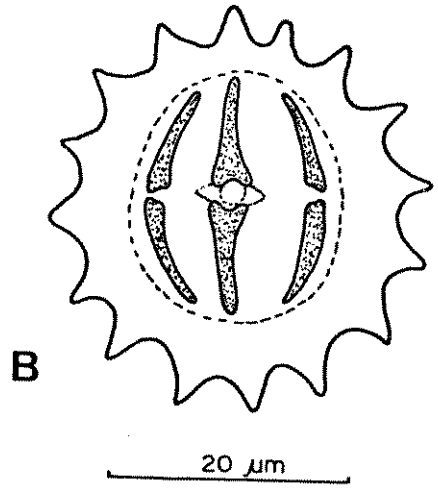
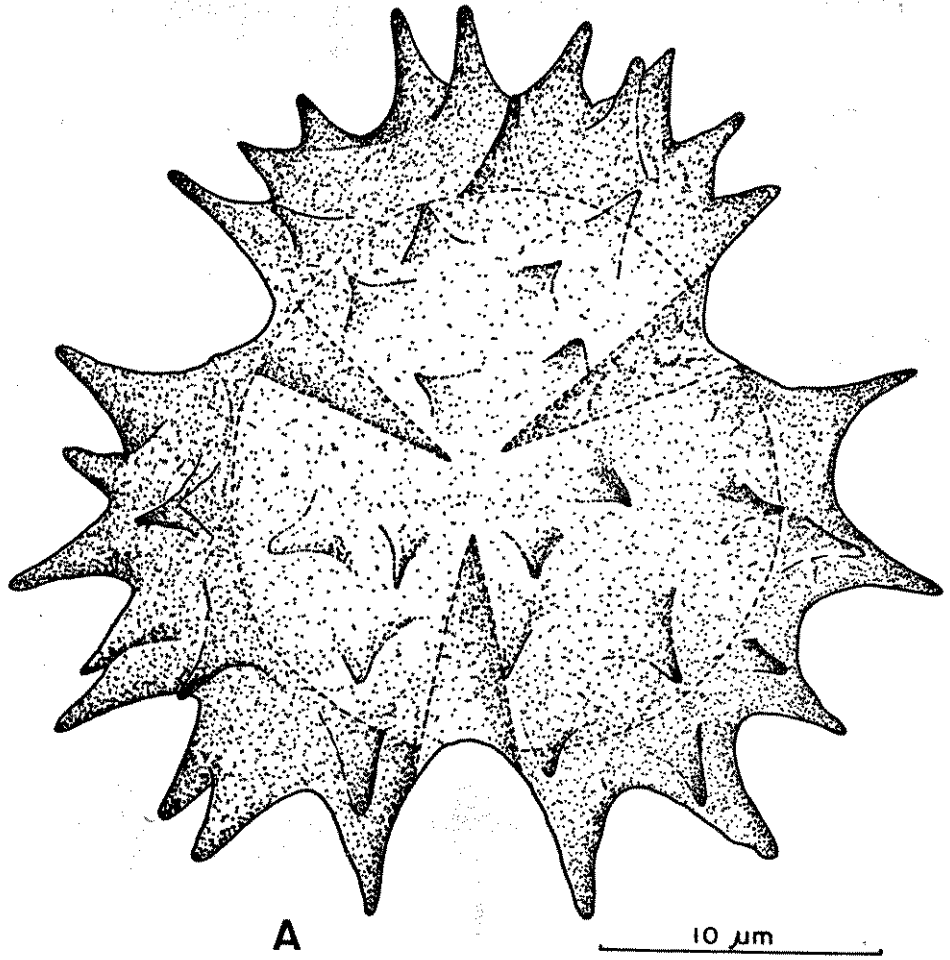


FIGURA 6 - Palinograma de *S. rebaudiana*.

- A - Vista equatorial mostrando ornamentação da exina e aberturas (colporus).
- B - Vista polar, com representação das aberturas.



nhos, mede $21,6 \pm 0,26 \mu\text{m}$. Essas medidas estão na Tabela I, onde também são mostrados os dados estatísticos da faixa de variação, média (\bar{x}), desvio padrão da média ($S_{\bar{x}}$), desvio padrão da amostra (S), coeficiente de variabilidade (V) e intervalo de confiança.

As aberturas são tricolporadas (Figura 6B). Oros é circular, com cerca de $1,1 \mu\text{m}$ de diâmetro. Os colpos possuem afinamentos nas extremidades próximas aos polos, com cerca de $14,3 \mu\text{m}$ de comprimento e $2,1 \mu\text{m}$ de largura.

A exina é ornamentada com espinhos (Figura 6A) e tem espessura total igual a $7,2 \mu\text{m}$.

As medidas citadas representam as plantas dos três lotes cultivados, pois nenhuma diferença estatística significativa foi encontrada entre elas.

A Tabela II contém os resultados da contagem do número de grãos de pólen por antera e da verificação da viabilidade dos grãos para as plantas dos três lotes cultivados. Por essa tabela pode ser observado que nos três lotes há cerca de 1400 grãos por antera e a viabilidade dos grãos de pólen é de cerca de 65, em valor angular. A análise estatística mostrou que não há diferença entre os três lotes das plantas, seja no número de grãos por antera ou na viabilidade.

Os resultados da coloração dos núcleos dos grãos de pólen de *S.rebaudiana* mostraram que estes são trinucleados. Os núcleos espermáticos (dois) são fusiformes e coram-se fortemente com carmin acético. O núcleo vegetativo é arredondado e cora-se fracamente e algumas vezes é difícil observá-lo sob estas condições de coloração.

Tabela I - Medidas e análise estatística dos diâmetros
polar (P) e equatorial (E) do pólen de *S. re*
baudiana.

TABELA I

Diâmetro	Faixa de variação	$\bar{x} \pm \frac{s}{x}$	S	V	Intervalo de confiança (95%)
P	17,4 - 24,4 µm	21,60 ± 0,26	1,3	6,2	21,60 ± 0,54
E	18,9 - 25,2 µm	21,1 ± 0,24	1,16	5,32	21,80 ± 0,49

TABELA II

Amostra	Grãos de pólen por antera			Viabilidade (arco seno V%)		
	Unicamp	Paraguai	Cotia	Unicamp	Paraguai	Cotia
1	1251 (1093-1434)	1511 (1315-1707)	1511 (1317-1705)	55,05	67,70	65,27
2	1420 (1102-1671)	1308 (912-1503)	1460 (1092-1740)	56,15	67,23	63,54
3	1470 (1115-1630)	1493 (1110-1677)	1370 (1115-1601)	55,96	66,66	64,75
4	1307 (932-1515)	1342 (993-1691)	1379 (996-1628)	55,57	66,13	67,54
5	1403 (1020-1699)	1392 (987-1672)	1392 (1104-1642)	55,14	64,09	66,11
6	1373 (1132-1625)	1378 (1120-1599)	1385 (985-1579)	55,27	65,27	65,73
7	1435 (1109-1697)	1405 (1113-1596)	1412 (1021-1663)	57,21	64,45	67,21
8	1384 (1070-1633)	1359 (1009-1510)	1401 (1002-1515)	56,42	64,01	64,38
9	1450 (1150-1696)	1427 (1215-1631)	1396 (1114-1677)	55,50	65,73	64,69
10	1529 (1097-1710)	1529 (1095-1693)	1409 (998-1693)	56,82	64,75	65,96
$\bar{x} \pm Sx$	1410 [±] 33,67	1412,1 [±] 75,91	1411,5 [±] 42,76	55,91 [±] 0,739	65,91 [±] 1,32	65,50 [±] 1,25

A Tabela III mostra os dados da germinação dos grãos de pólen, em diferentes soluções de sacarose. Observa-se que a concentração de 30% parece ser a melhor para a germinação do pólen (cerca de 80% ou 63,4 em valor angular).

Portanto, os dados obtidos na análise da viabilidade do pólen de *S.rebaudiana* estabeleceram que o corante carmin acético é bastante seguro quanto aos resultados que proporciona da viabilidade, quando se compara com os ensaios de germinação dos grãos em solução de sacarose.

Assim sendo, as taxas (em porcentagem) de viabilidade do pólen por coloração do citoplasma do grão mostraram-se semelhantes, estatisticamente, nas plantas dos três lotes. Da mesma maneira se comportam estes lotes de plantas quando se analisam os resultados da contagem dos grãos de pólen por antera: os valores de t não são significativos.

2.2 Sistema de Reprodução

Os resultados do programa de polinizações anuais controladas são representados nas Tabelas IV e V. Os códigos Co, Fr e Un à frente do tratamento IV indicam o lote que foi o doador de pólen para os cruzamentos (lotes Cotia, Paraguai e Unicamp, respectivamente).

A Tabela IV mostra o número de aquênios férteis e inférteis produzidos em cada lote nos vários tratamentos. O resultado é mais facilmente visto quando os dados em relação à produção de frutos férteis são transforma-

TABELA III - Taxas de germinação de pólen de *S.rebaudia*
na em diferentes soluções de sacarose.

TABELA III

Concentração da solução de sacarose (%)	Taxa de germinação (%) \bar{x} (mínimo e máximo)
10	0,0
15	0,0
20	43,0 (28,9 a 44,1)
25	71,2 (68,4 a 73,7)
30	80,3 (79,3 a 82,6)
35	78,0 (71,0 a 79,0)
40	74,0 (65,2 a 75,0)

TABELA IV Resultados do programa de polinizações manuais controladas em *S.rebaudiana* (lotes Unicamp, Paraguai e Cotia). Número de aquênios férteis e inférteis obtidos.

Tratamentos : I - capítulos ensacados, sem tratamentos posteriores

II - emasculação, sem tratamentos posteriores

III - emasculação + autopolinização

IV - emasculação + polinização cruzada

F = aquênio fértil

I = aquênio estéril

Co(Cotia), Pr(Paraguai), Un(Unicamp): lote doador de pólen

TABELA IV

Repetições	Tratamentos	Aquênios produzidos					
		Unicamp		Paraguai		Cotia	
		F	I	F	I	F	I
01	I	0	2800	0	2850	0	2840
	II	0	2030	0	2065	0	2345
	III	0	2090	0	2485	0	2510
	IV Co	1388	717	1539	866	1559	936
	Pr	1410	940	1616	929	1583	1012
	Un	1528	897	1625	955	1613	922
02	I	0	2855	0	2885	0	2775
	II	0	2385	0	2390	0	2385
	III	0	2510	0	2520	0	2215
	IV Co	1542	898	1523	892	1569	961
	Pr	1474	881	1522	918	1634	931
	Un	1469	901	1649	936	1533	892
03	I	0	2815	0	2785	0	2850
	II	0	2180	0	2255	0	2295
	III	0	2460	0	2940	0	2470
	IV Co	1578	942	1489	866	1512	873
	Pr	1487	843	1632	963	1563	922
	Un	1541	914	1686	944	1524	891
04	I	0	2845	0	2815	0	2785
	II	0	2395	0	2535	0	2465
	III	0	2140	0	2305	0	2505
	IV Co	1571	919	1595	885	1506	869
	Pr	1543	872	1634	986	1459	856
	Un	1584	951	1647	938	1426	844
05	I	0	2705	0	2855	0	2860
	II	0	2210	0	2495	0	2510
	III	0	2240	0	2240	0	2335
	IV Co	2561	894	1541	829	1585	930
	Pr	1579	931	1624	921	1599	851
	Un	1494	851	1659	946	1643	932

TABELA V - Resultado do programa de polinizações na
nuais controladas em *S. rebaudiana* (lotes Uni
camp, Paraguai e Cotia). Número de capítulos
perdidos e porcentagem de frutos férteis pro
duzidos.

Tratamentos: I capítulos ensacados, sem tratamentos
posteriores.

II emasculação, sem tratamentos postero
res

III emasculação + autopolinização

IV emasculação + polinização cruzada

Co (Cotia), Pr (Paraguai), Un* (Unicamp) : lote
doador de pólen

* = A análise da variância para as repetições
(e os três doadores) do tratamento IV mos
trou que F não é significativo a 5%.

TABELA V

Repetições	Tratamentos	Capítulos perdidos			Frutos férteis' (%)*		
		Unicamp	Paraguai	Cotia	Unicamp	Paraguai	Cotia
01	I	40	30	32	0,00	0,00	0,00
	II	194	187	151	0,00	0,00	0,00
	III	182	103	98	0,00	0,00	0,00
	IV Co	179	119	101	65,94	63,99	62,48
	Pr	130	91	91	60,00	63,50	61,00
	Un	115	84	93	63,01	62,98	63,63
02	I	29	23	45	0,00	0,00	0,00
	II	123	122	123	0,00	0,00	0,00
	III	98	98	157	0,00	0,00	0,00
	IV Co	112	112	94	63,20	63,06	62,02
	Pr	129	129	97	62,38	62,38	63,70
	Un	126	126	115	61,98	63,79	63,22
03	I	37	43	30	0,00	0,00	0,00
	II	164	149	141	0,00	0,00	0,00
	III	108	102	106	0,00	0,00	0,00
	IV Co	96	131	123	62,62	63,23	63,40
	Pl.	134	81	103	63,82	62,89	62,90
	Un	109	74	117	62,77	64,11	63,11
04	I	31	37	43	0,00	0,00	0,00
	II	121	93	107	0,00	0,00	0,00
	III	172	139	99	0,00	0,00	0,00
	IV Co	102	104	125	63,09	64,31	63,41
	Pr	117	76	137	63,89	62,37	63,02
	Un	93	83	146	62,49	63,71	62,82
05	I	59	29	28	0,00	0,00	0,00
	II	158	101	93	0,00	0,00	0,00
	III	152	152	133	0,00	0,00	0,00
	IV Co	100	120	97	63,59	65,62	63,02
	Pr	98	91	108	62,91	63,81	65,00
	Un	131	79	85	63,71	63,69	63,81

dos em porcentagem (Tabela V).

A Tabela V indica o número de capítulos perdidos em cada tratamento. Esta perda significa, para o tratamento I, danos causados por fungo, pulgão ou larva de insetos. Nos casos dos tratamentos II a IV, os danos além dos já citados para o tratamento I, são causados, ou por falha da técnica de emasculação (as flores emasculadas ficaram ressecadas e enrugadas e não se desenvolveram) ou por falta de cuidados no momento da regação das plantas. Em qualquer tratamento, os capítulos danificados não foram computados para os totais dos resultados; portanto, a porcentagem de frutos férteis é calculada a partir dos dados da Tabela IV (aquênios produzidos).

Dos frutos inférteis apresentados na Tabela IV, dos tratamentos I, II e III foram obtidos 40% de aquênios claros inférteis e 55% de escuros inférteis.

Os resultados do tratamento I indicam que a autofecundação automática não ocorre em *S. rebaudiana*. O tratamento II (em conjunto com o IV) mostra que a técnica de emasculação é eficiente, enquanto que a falta de frutos férteis obtida nos tratamentos I e II poderia indicar que a apomixia não ocorre nesta espécie, a menos que esta seja pelo processo de pseudogamia, isto é, apomixia estimulada pela polinização.

Neste contexto, os resultados do tratamento IV indicam que *S. rebaudiana* é uma espécie geneticamente autoincompatível e que depende de polinização cruzada.

Os resultados das análises de variância para os

diversos cruzamentos do tratamento IV mostram valores baixos de F (todos não-significativos e nível de 10% de probabilidade), indicando, assim, que não há diferenças, nos três lotes, entre as porcentagens de frutos férteis formados por diferentes cruzamentos. Ou ainda, os valores de F indicam que as plantas dos três lotes possuem uma ampla faixa de variação morfológica, mas que são compreendidas por amplo genótipo de uma só espécie, que é *S. rebaudiana*.

Observa-se também que a porcentagem de frutos férteis formados em cada polinização manual cruzada fica ao redor de 63%.

Ainda dentro do programa de investigação do sistema de reprodução de *S. rebaudiana*, as plantas cobertas com gaiolas de tela de nylon, não produziram individualmente, nenhum fruto fértil, mas somente frutos claros. Neste caso, também não ocorreu a autopolinização automática.

É de interesse mencionar aqui que nos canteiros ao ar livre foram feitas observações casuais de insetos (pequenas abelhas, moscas, vespas e borboletas), visitando as flores de *S. rebaudiana*, porém nenhuma observação mais rigorosa foi realizada para se saber o papel destes animais como prováveis vetores de polinização nesta espécie.

2.3 Germinação do pólen e formação do tubo polínico no estigma

A presença dos tubos polínicos no estigma so -

mente foi observada no tratamento do programa de polinizações controladas que envolveu polinizações cruzadas (tratamento IV).

Nos casos de autopolinização (tratamento III) nunca foi observada a germinação dos grãos de pólen a nível das papilas do estilete.

No entanto, no caso das polinizações cruzadas, a técnica da microscopia da fluorescência permitiu visualizar a germinação e a penetração do tubo polínico no tecido esporofítico do estilete da planta receptora de pólen, através os depósitos de calose formados pelo tubo em crescimento. A germinação dos grãos de pólen só ocorre na região papilosa receptiva do estigma, localizada no ápice dos ramos do estilete (ver Figuras 5A, B).

Os resultados das preparações das coletas em intervalos sucessivos de uma em uma hora após a polinização cruzada, mostraram que depois de uma hora e trinta minutos a partir da deposição do pólen deu-se a germinação deste, e no intervalo entre as duas horas seguintes (cerca de hora e meia depois das germinações) o tubo polínico alcançou cerca de dois terços da distância total entre a área de deposição e germinação do pólen e o funículo.

2.4 Número de cromossomos

Em metáfases observadas nas pontas de raiz de plântulas, o número de cromossomos determinado foi de $2n=22$. Esse número foi encontrado em descendentes dos três lotes analisados.

Foi possível observar em metáfases um par de

cromossomos de comprimento particular, mas nenhuma observação foi feita do seu significado.

2.5 Embriologia

Plantas de *S.rebaudiana* dos três lotes cultivados possuem as mesmas características em todos os pormenores essenciais no tocante ao desenvolvimento embriológico.

No estágio III, o óvulo possui somente algumas células que vão formar o saco embrionário, sendo este, então, ainda inaturo.

O saco embrionário de um botão no estágio IV está ilustrado na Figura 7 (A,B). Este estágio de desenvolvimento do saco embrionário é encontrado em cerca de 65 por cento das flores neste estágio, e ao acaso nos vários capítulos de uma mesma planta de *S.rebaudiana*.

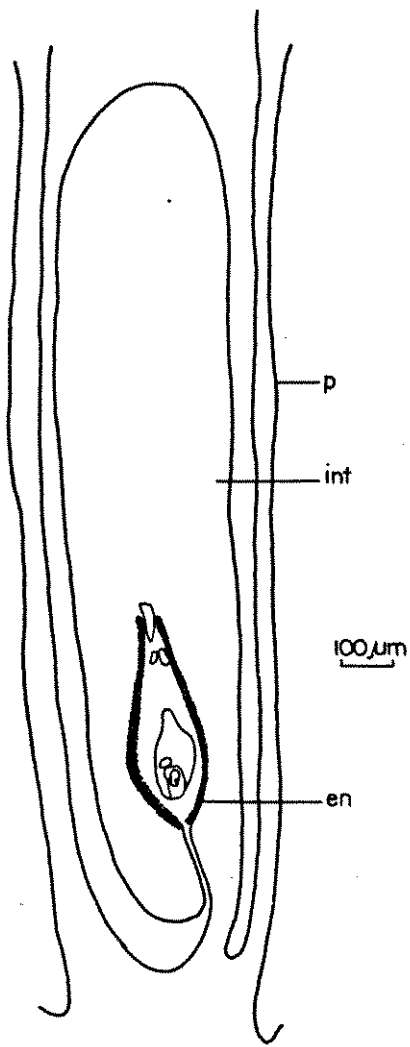
Nos botões restantes o óvulo se apresenta abortivo desde o início de sua formação. Não foi possível estabelecer a causa desta degeneração do saco embrionário; em consequência, os aquênios (frutos claros) resultantes destas flores são somente ovários ressecados e enrugados (Figura 4D).

Nas flores com o saco embrionário em desenvolvimento (Figuras 4A e 7A,B), o óvulo fica no interior do ovário que tem a parede com dupla espessura (duas camadas de células). A camada externa é rígida e pode estar recoberta de tricomas unicelulares e glândulas. A camada interna é composta de células retangulares, mais ou menos regulares. Uma observação minuciosa do óvulo revela sua natureza anátropa (Figura 7B), mas o grau de adesão

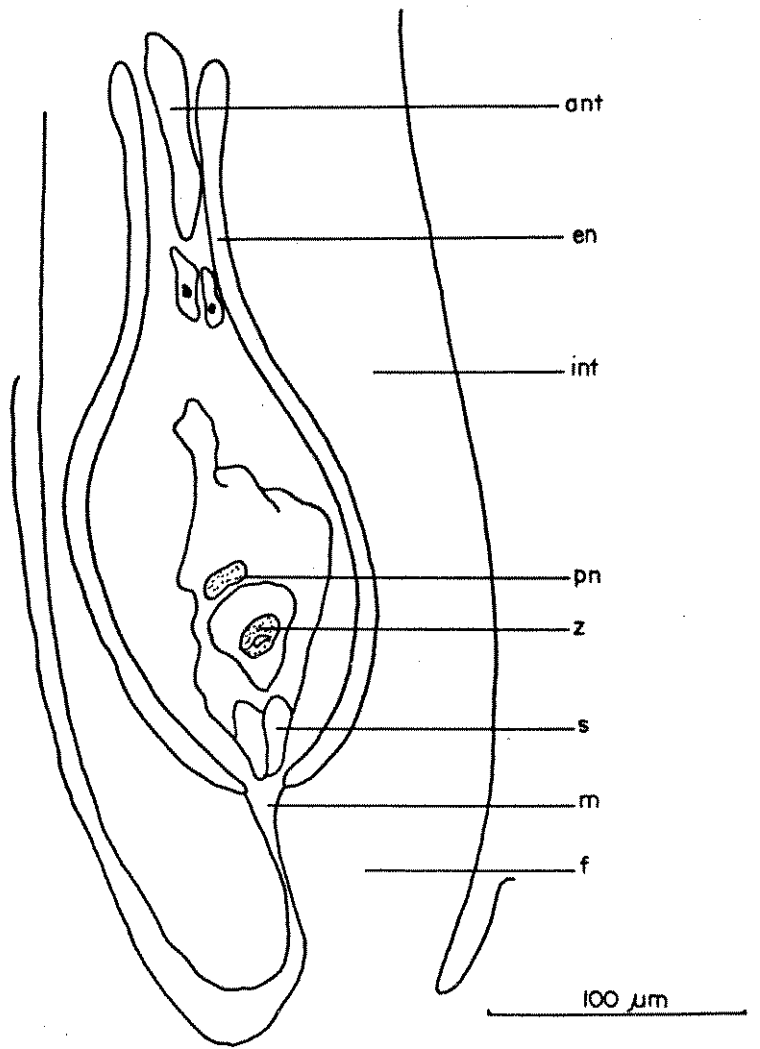
FIGURA 7 - Desenvolvimento do embrião de *S.rebaudiana*.

A e B - saco embrionário maduro de flores no
estádio VI.

p = parede do ovário; int = integumento, ant
= antípoda, en = endotélio; pn = núcleo polar
z = núcleo zigótico; s = sinérgides; m = mi
crópila; f = funículo.



A



B

do integumento com o funículo torna-se difícil de avaliar no saco embrionário.

O integumento é único, simples e massivo (típico das Compositae) e é formado por três camadas de células. A mais interna, o endotélio, é uma camada única de células uniformes, que se alongam nas extremidades da micrópila e da chalaza. A camada média é, no total, ou a maior parte, formada de células grandes regulares. É compacta e circunda o saco endotelial. Externamente a estas camadas está a terceira camada integumentar, formada de muitas células longas e finas, dispostas verticalmente.

O saco embrionário contém um núcleo polar e uma célula-ovo em degeneração, duas sinérgides e três células antípodas ainda intactas (Figura 7B). Este estágio foi observado em botões anteriormente à polinização, e cerca de 10-12 dias após o aparecimento dos escapos florais (estádio IV).

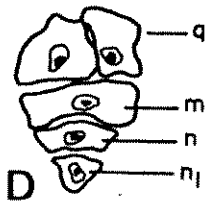
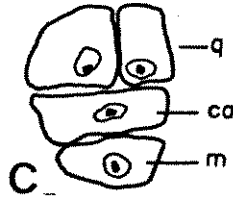
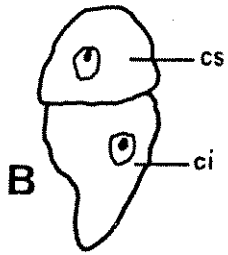
Ainda dentro do período anterior à polinização foi possível notar as divisões de uma célula após-pora do nucelo (Figura 8A). Esta célula diplóide (fora do saco embrionário) divide-se no sentido transversal para dar uma célula superior (cs) e uma inferior (ci) (Figura 8B). Posteriormente, após seis horas, o pró-embrião constitui-se de quatro células: duas delas são provenientes de uma divisão longitudinal da célula cs, para dar o suspensor q, e as duas m e ca surgiram por uma divisão transversal de ci (Figuras 8C e E).

Nesta fase, a flor se encontra no estágio VI do desenvolvimento do capítulo e, no caso de ter sido pre-

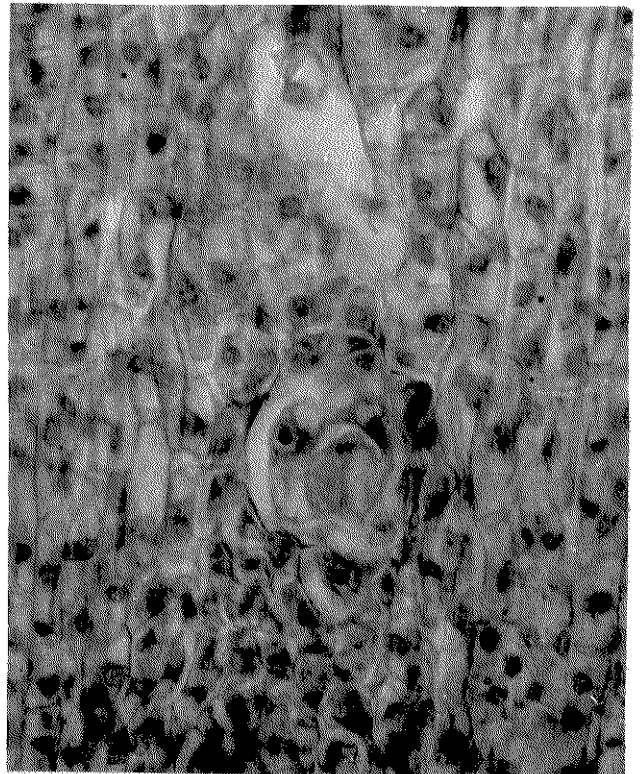
FIGURA 8 - Desenvolvimento do embrião de *S.rebaudiana*.

Células do pró-embrião apomítico.

- A - Localização (seta) das células do pró-embrião no óvulo (160 x).
- B - estágio P + 12 h : cs = célula superior; ci = célula inferior.
- C - estágio P + 18 h : q = suspensor; ca e m = células resultantes da divisão de ci
- D - estágio P + 24 h : n, n₁ = células resultantes da divisão transversal de ca.
- E - estágio P + 18 h (400 x).



100 μ m



parada para polinizações manuais com a técnica de emascu-
 lação, estaria com o estilete receptivo e, portanto, apta
 para ser polinizada. Somente havendo a polinização cr
uza da e posterior crescimento do tubo polínico, as células
 do pseudoendosperma começam a se dividir e dar origem a
 muitas células, no estágio P + 18 h (Figuras 9A, B), e em
 cerca de oitenta por cento do material examinado. Em óvu-
 los de flores não polinizadas, o desenvolvimento do saco
 embrionário acaba nesta etapa.

No estágio P + 24 h, o pró-embrião as
sexual consiste, geralmente, de cinco células (Figura 8D), na
 maior parte do material examinado. A célula cs passou
 por uma divisão transversal para dar duas células n e n₁
 e o suspensor q é agora um quadrante.

As células do saco embrionário original ficam
 comprimidas com as crescentes divisões do pseudoendosper-
 ma (Figura 10A, B). Externamente ao endotélio original,
 uma área demarcada por uma linha tracejada na Figura 11A,
 está começando a ser digerida. As células nesta região fo-
 ram lisadas, deixando um espaço na qual cresce o saco em-
 brionário em expansão.

Entre os estádios P + 12 h e P + 24 h, embora
 divisões celulares ocorram, não há aumento de tamanho do
 pró-embrião. Mas, observa-se que na fase P + 2 dias, o
 pseudo-embrião consiste de um grupo de células que podem
 ser diferenciadas em duas partes: o pseudo-embrião pro-
 priamente dito (uma massa arredondada de células) e uma
 linha de células na base (Figura 11A, B, C). O pseudoen-
 dosperma agora quase que preenche o espaço previamente o-

Figura 9 - Desenvolvimento do embrião de *S.rebaudiana*

A e B - estágio P + 13 h: e = pró-embrião apo
mítico; ens = pseudoendosperma

C - estágio P + 24 h (160 x).

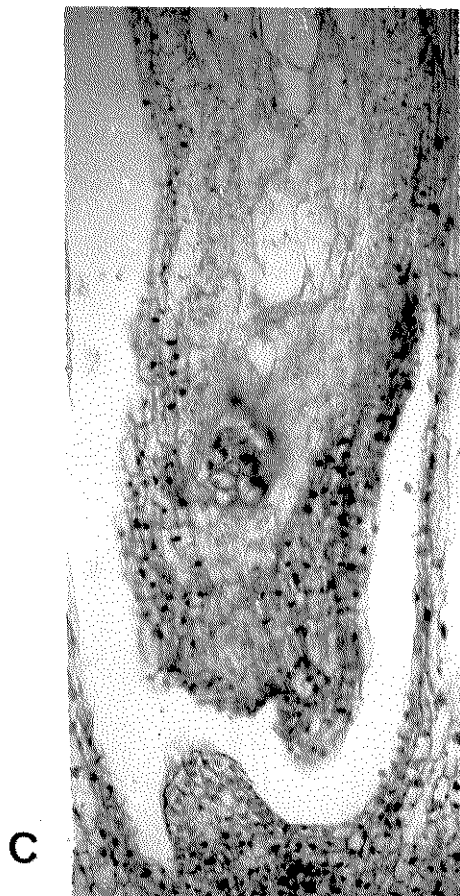
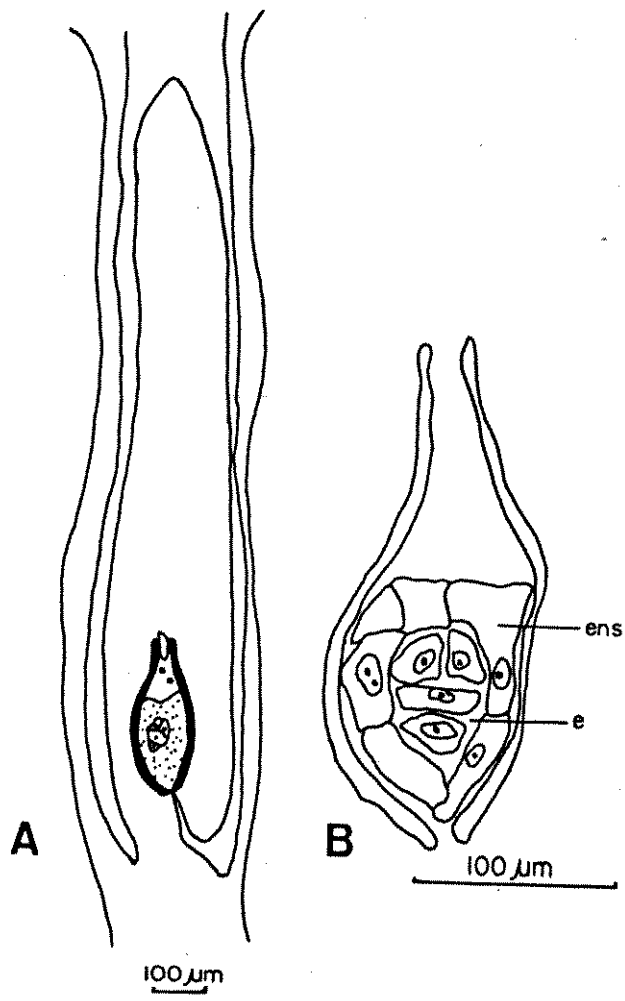


FIGURA 10 - Desenvolvimento do embrião de *S. rebaudiana*.
Estádio P + 24 h.

A - a linha pontilhada delimita a área que
está começando a ser digerida.

A e B - en = endotélio; ens = pseudo-endos-
perma; e = pró-embrião.

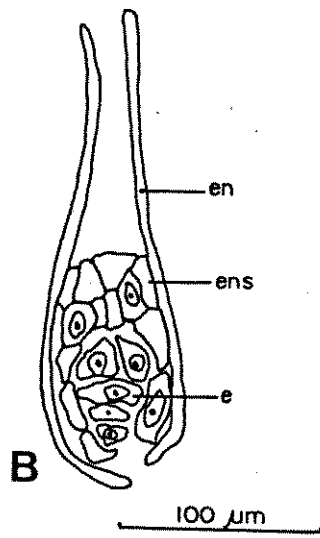
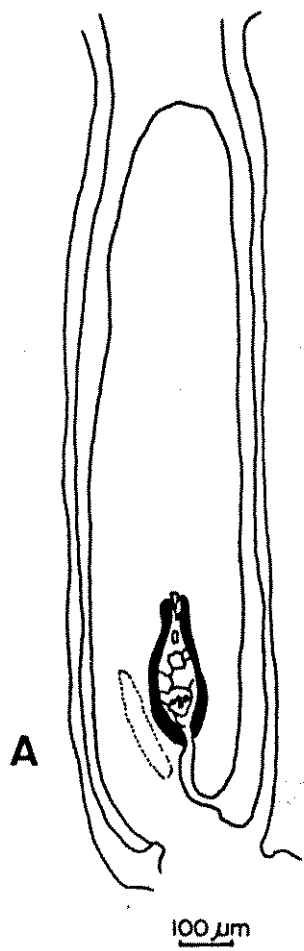
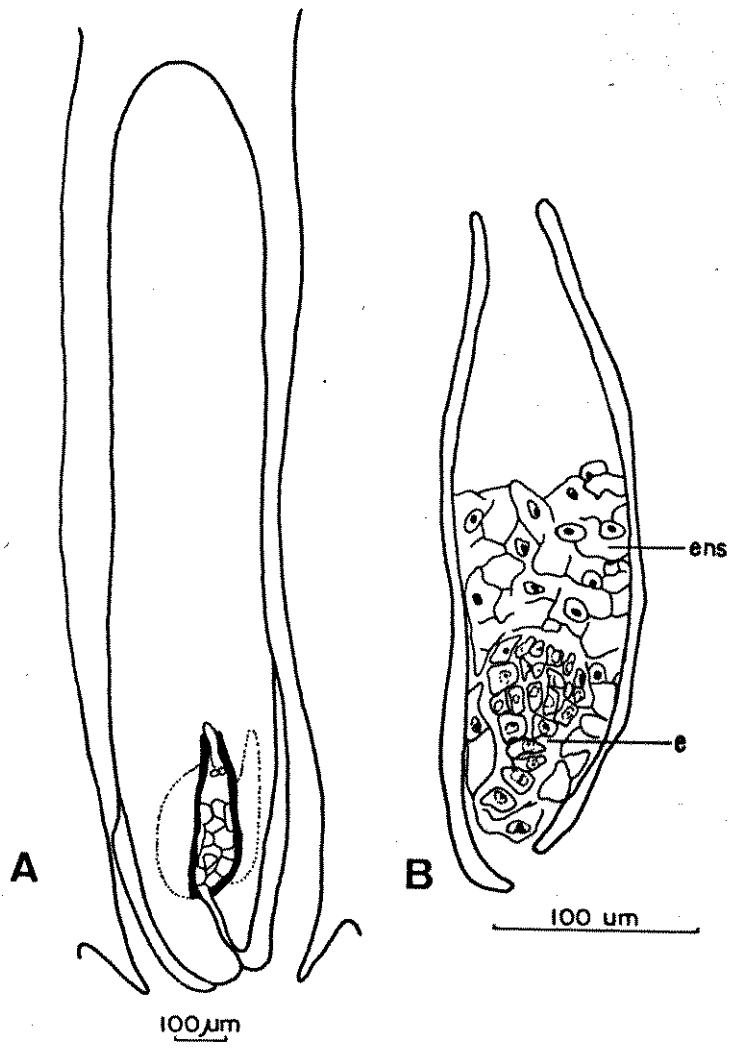


FIGURA 11 - Desenvolvimento do embrião de *S.rebaudiana*.

A, B e C, estágio P + 2 dias (ver texto)

A e B - a linha pontilhada mostra o avanço da digestão ao redor do saco embrionário original; e = embrião; ens = pseudoendosperma.

C - localização (seta) do embrião apomítico em expansão. (160 x).



cupado pelo saco embrionário original que, entretanto, se expande para acompanhar o crescimento do embrião. Surge também, neste período, uma lacuna quase que completa ao redor de todo o saco embrionário apomítico (Figura 11A).

No estágio P + 3 dias, um grupo compacto de células bem definidas aparece na periferia do embrião e forma uma camada de união, de ligamento (Figura 12A, B, C). O embrião permanece agora em um espaço cheio de fluido, mas o andosperma está na mesma situação de P + 2 dias. O endotélio original, nesta etapa, é bem longo.

No estágio P + 4 dias, o embrião cresce muito, fica cordiforme e já se nota o desenvolvimento das células iniciais cotiledonares. Neste estágio, cerca de 37% das flores que possuem o embrião apósporo em desenvolvimento sofrem um processo de degeneração do embrião a partir do polo chalazal. Inicialmente, as células basais tornam-se escuras e condensadas e o restante do pró-embrião apomítico com as iniciais cotiledonares degeneram-se por completo, primeiramente vacuolizando-se e então escurecendo (Figura 12D). Nos estádios seguintes, P + 5 dias até P + 15 dias, pouca ou nenhuma modificação surge nestes frutos inviáveis, a não ser o escurecimento da parede do ovário, o que os torna aparentemente semelhantes aos frutos férteis, quanto à morfologia externa (Figura 4C).

Seguindo com o desenvolvimento apomítico do embrião, a partir do quinto dia (no estágio P + 5 dias), as iniciais cotiledonares estão bem mais marcadas e a orga-

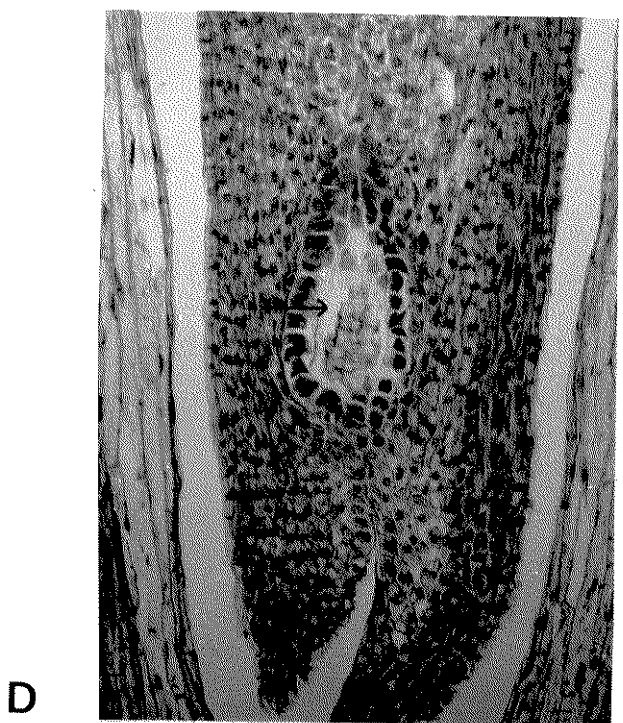
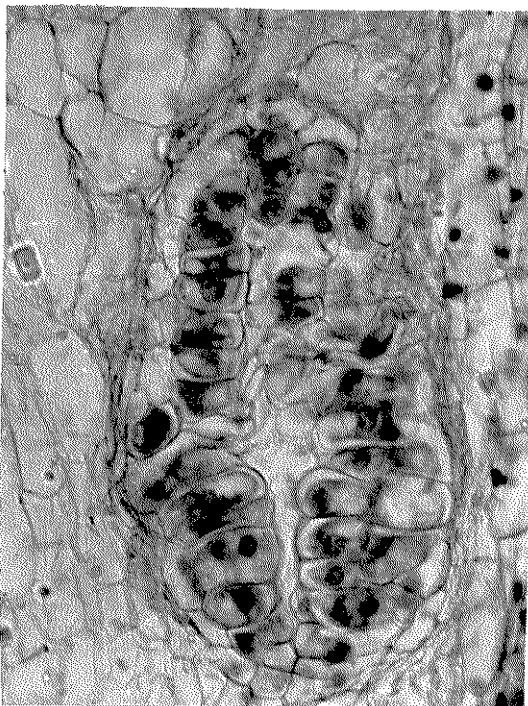
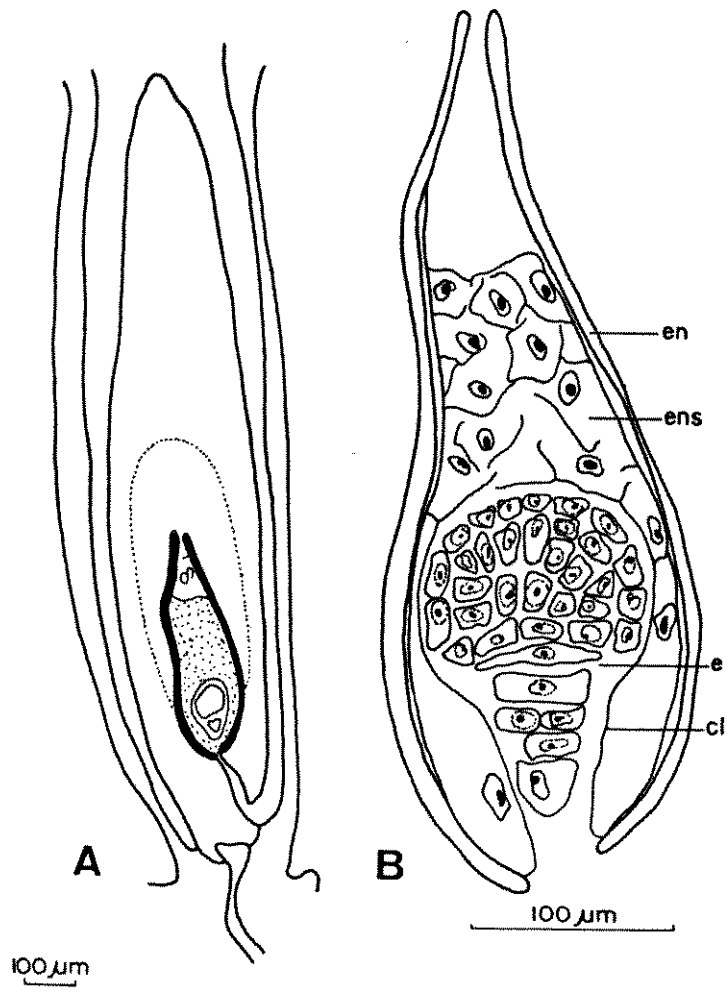
Figura 12 - Desenvolvimento do embrião de *S.rebaudiana*.

A, B, C, estágio P + 3 dias

A e B - en = endotélio, ens = pseudoendosperma, e = embrião, cl = camada de células de ligamento

C - ídem (400 x).

D - estágio P + 4 dias. Notar degeneração celular do embrião aponítico (seta). (160 x).



nização celular deu origem a várias regiões distintas no embrião (Figura 13A). O endosperma aparece como diferenciado em duas partes, a maior parte devendo compreender fonte de reserva ao redor do embrião, enquanto que a outra região tornou-se organizada numa camada simples de células uniformes. Neste estágio, esta última camada permanece dentro do endotélio que está se tornando menos distinto e, aparentemente, sendo lisado.

Em P + 6 dias, o alongamento do embrião e a diferenciação celular continuam como antes. Os cotilédones estão agora tão longos como a região do hipocótilo (Figura 13B). O endosperma está se tornando desorganizado e poucas paredes celulares ou núcleos são visíveis. Muito pouco do endotélio original permanece organizado, com exceção da extremidade final da chalaza. Uma camada fina e fortemente corada persiste em todos os pontos.

No estágio P + 7 dias, os cotilédones ficam como que fundidos ao hipocótilo e permanecem aproximadamente com o mesmo tamanho, um em relação ao outro (Figura 14A). O saco embrionário, ou o espaço que seria ocupado por ele, foi fechado em ambas as extremidades pela camada externa organizada do endosperma (Figura 14A). Ela praticamente preenche a área ocupada pelo integumento médio. Uma camada fina do endotélio original permanece em volta daquilo que foi o ponto da chalaza.

O estágio P + 8 dias é muito semelhante ao P + 7 dias (Figura 14A). A única diferença é que no ápice cotiledonar está começando a se formar uma região de células

FIGURA 13 - Desenvolvimento do embrião de *S.rebaudiana*.

A - estágio P + 5 dias

B - estágio P + 6 dias

co = cotilédones; e = embrião; en = endoté-
lio, ens = pseudoendosperma; h = hipocótilo

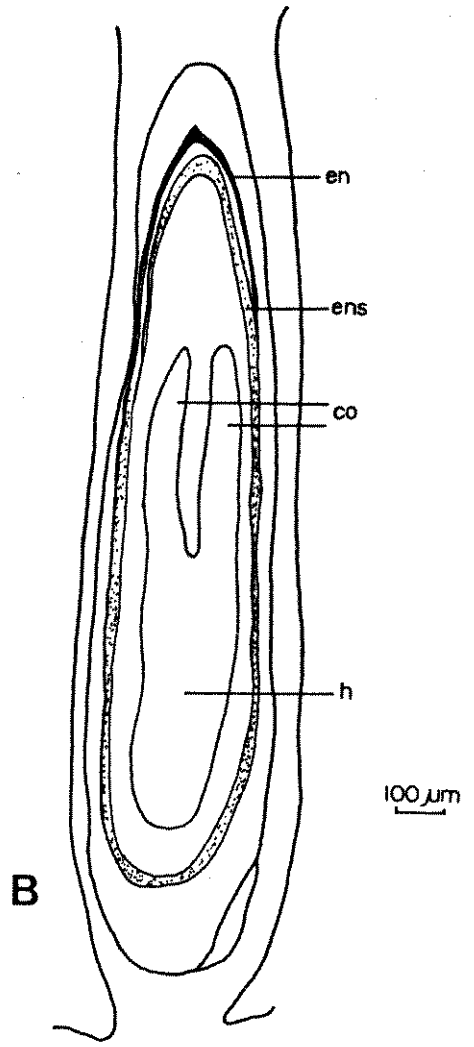
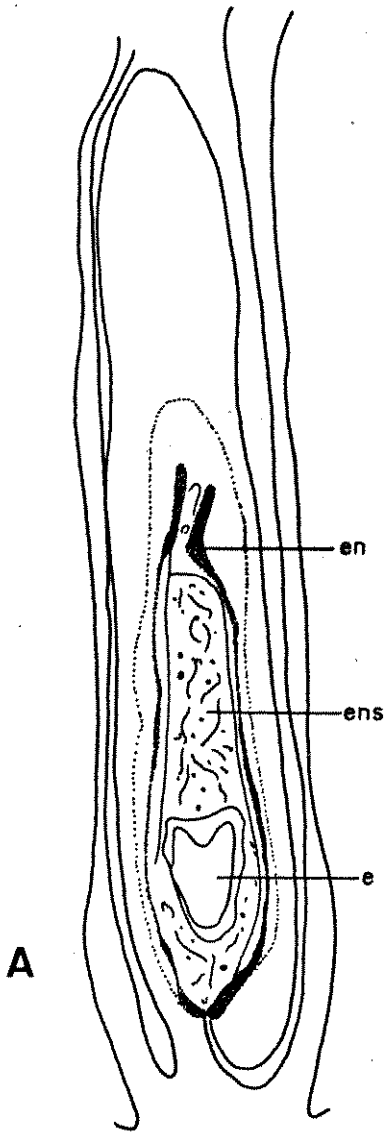


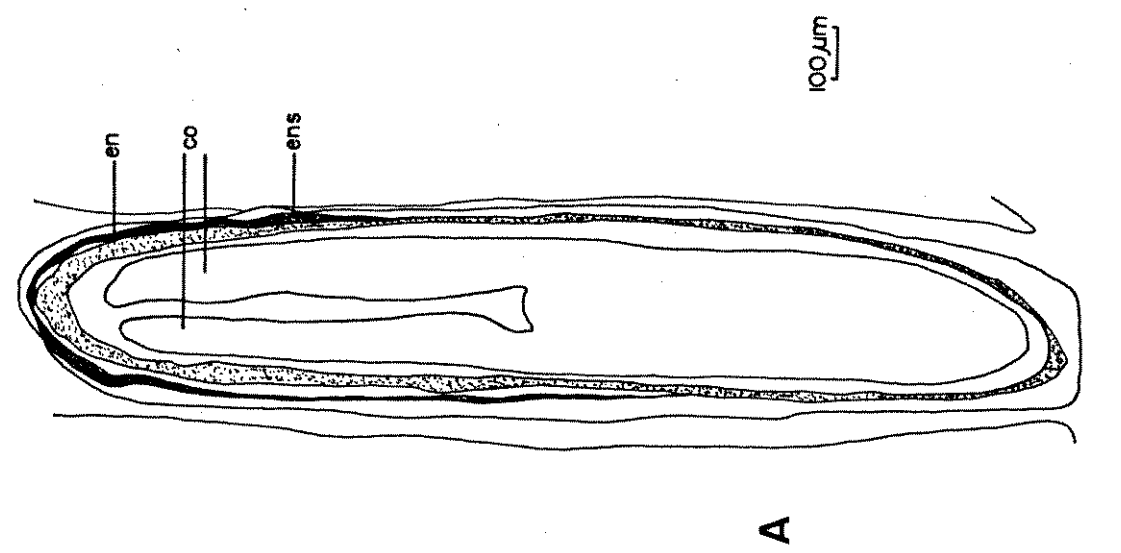
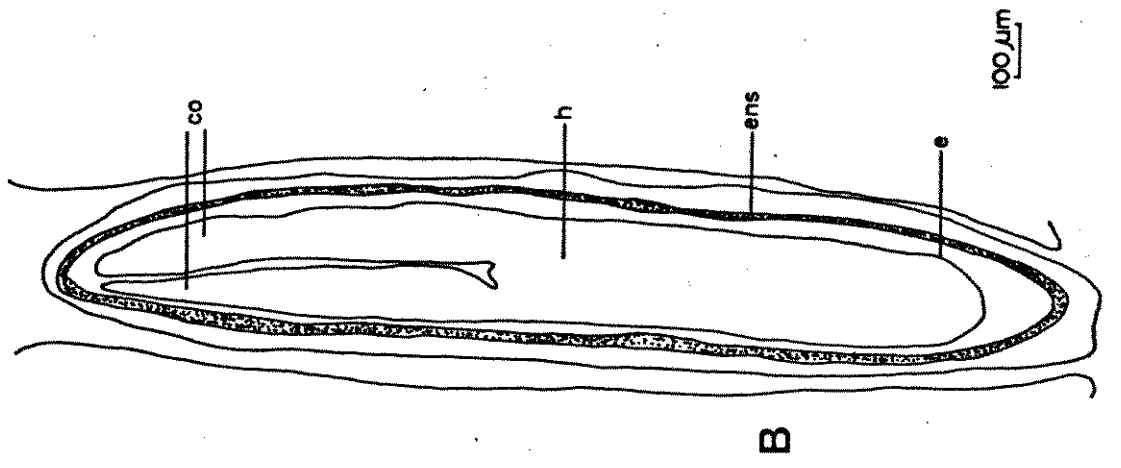
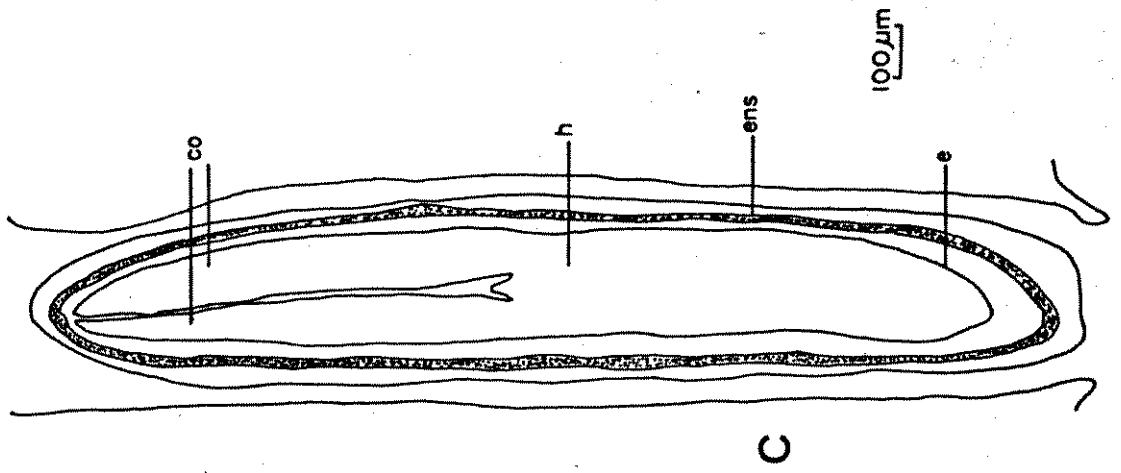
FIGURA 14 - Desenvolvimento do embrião de *S.rebaudiana*.

A - estágio P + 7 dias

B - estágio P + 9 dias

C - estágio P + 15 dias

co = cotilédones; e = embrião; ens = pseudoen-
dosperma; en = endotélio; h = hipocótilo.



las pequenas e regulares entre os cotilêdones.

No estágio P + 9 dias o ápice epicotiledonar está mais pronunciado, mas existem poucas estruturas alteradas com relação a P + 8 (Figura 14B).

Entre os estádios P + 9 dias e P + 15 dias, poucas modificações foram observadas. A parede do fruto escurece gradualmente. O embrião apomítico já está maduro, o que pode ser visto na Figura 14C, que é o estágio P + 15 dias, no qual o fruto está quase maduro. A parede do ovário forma a parede do fruto. Os restos do integumento ficam estreitamente unidos a esta parede (do fruto), e a parede da semente é praticamente inseparável da parede do fruto. O embrião fica rodeado por uma camada de endosperma de origem pseudogâmica bem densa.

O fruto está maduro quando a parede fica completamente escurecida e o "pappus" o coloca em exposição, em forma de taça, ao agente de dispersão (o mesmo ocorrendo para os frutos escuros inférteis). As aristas do "pappus" dos frutos claros não chegam a se abrir completamente e não são rígidas. Neste estágio, portanto, nota-se uma aparente heterocarpia que, na verdade não é real, porque somente são frutos férteis os que formam o ciclo completo da frutificação através da pseudogamia.

IV - DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A tribo Eupatorieae (Compositae) teve a sua mais recente revisão taxonômica no trabalho de Robinson e King (1977), onde os autores destacam as principais características dos gêneros pertencentes a esta tribo e suas interrelações fenéticas e filogenéticas.

Esta tribo de Compositae é caracterizada por possuir plantas na maioria herbáceas ou arbustivas. A anatomia caulinar, revista por Carlquist (1965, 1966) não apresenta características típicas nos tecidos vasculares das plantas da tribo, a não ser pela presença de dutos resiníferos entre os feixes vasculares, e não fora destes, como normalmente ocorre nas outras tribos de Compositae (Robinson e King, 1977).

A tribo é uma das poucas nas Compositae que tem folhas basicamente opostas e simples e do tipo ovada ou elípticas.

A inflorescência é geralmente uma panícula corimbosa; o involúcro dos capítulos é tradicionalmente caracterizado como imbricado, subimbricado ou eximbricado (Robinson e King, 1977); os capítulos podem conter de uma a muitas flores, havendo gêneros com baixos números de flores por capítulo, e tendo estes, número fixos, como *Stevia* Cav. com cinco e *Mikania* Hilld. com quatro (com números idênticos de brácteas involucrais).

A corola pode ser branca, avermelhada ou leve

mente azulada em Eupatorieae, é afunilada e tubular, com ou sem um tubo basal distinto e geralmente com cinco lobos. A superfície interna da corola é usualmente glabra, mas *Stevia*, *Neocabreria*, algumas espécies de *Neomirandea* e outros pequenos gêneros tem esta superfície pilosa (Robinson e King, 1977).

O colar de anteras apresenta grande variação dentro da tribo, tanto na maneira de apresentação (inserido ou excerto no tubo da corola), como nos apêndices apicais e basais das anteras. O nectário é totalmente imerso na flor.

O estilete fornece os mais distintivos caracteres da tribo (Robinson e King, 1977). As linhas estigmáticas são em duas séries e restritas à metade inferior dos dois ramos e, em muitos gêneros de Eupatorieae existe glândulas na superfície interna entre estas linhas, ou acima, característica que não está presente em qualquer outra tribo de Compositae (Robinson e King, 1977).

Os aquênios de Eupatorieae são usualmente prismáticos com cinco vértices. A superfície dos aquênios pode ter pelos bisseriados, glândulas capitadas, várias combinações destas estruturas, como em *Stevia*, ou podem ser glabros. As paredes tem depósitos carbonizados do tipo resina no estágio maduro na maioria dos gêneros de Eupatorieae e os depósitos são formados em volta de pequenas projeções que se parecem com poros (King e Robinson, 1968).

O "pappus" de espécies de Eupatorieae é geralmente formado por muitas setas capilares em uma série ,

nas pode sofrer modificações em número e forma, como pode ser visto no gênero *Stevia* (Robinson, 1930; Robinson e King, 1977). A constância dos caracteres florais neste gênero faz com que seja um grupo bastante natural e, talvez, por esta razão de muitas complexidades para estudos taxonômicos.

A base deste trabalho nos aspectos taxonômicos foi a publicação de Baker (1876) como contribuição à *Flora Brasiliensis* de Martius. Mesmo com a inclusão de material aparentemente estranho à flora do Brasil, Baker apresentou uma chave de identificação para as vinte e oito espécies de seu trabalho. As determinações estão baseadas, primeiramente, nas formas como o "pappus" se apresenta. Em um grupo de espécies (série *Paleaceoaristatae*) este é constituído de páleas curtas e largas, com ou sem cerdas longas. Em um outro grupo (série *Pauciaristatae*) é constituído de cerdas paleáceas soldadas na base, podendo ainda haver páleas curtas e mais largas que a da série anterior. Em um terceiro grupo (série *Multiaristatae*), são grupadas as espécies que possuem o "pappus" cerdoso, livre na base, tendo as cerdas estreitas e as páleas ausentes.

Em cada uma dessas séries a identificação específica é feita segundo: a) tamanho de flores e involuço, ou seja, flores inclusas, curto ou longamente exsertas; b) características foliares, como presença de pecíolo, forma, textura, dimensão e filotaxia; c) tipo de inflorescência.

Os critérios de Baker (1876) aparentemente são bons, mas na prática apresentam dificuldades para separação das espécies, em parte, talvez, devido ao uso de pequenas amostras para as diagnoses dos materiais, e também, pela uniformidade dos caracteres dentro do gênero, o que levou Baker a utilizar unicamente características de elementos vegetativos (dimensões e formas foliares, por exemplo) que podem sofrer modificações conforme o ambiente. Desta forma, os limites das variações específicas na chave de Baker (1876) são confusos ou mesmo errôneos, e levam, com frequência a muitas dúvidas de identificação.

Ao lado destas inconveniências, tem-se as citações de espécies que não ocorrem no Brasil, como é o caso por exemplo de *Stevia aristata* D. Don., *S. breviaristata* Hook. et Arn.. De acordo com o material examinado e os trabalhos de Robison (1930), estas espécies só ocorrem no território argentino.

Com relação a *Stevia polycephala* (Sch. Bip.) Baker, espécie relacionada por Baker (1876) na série *Multiaristatae*, o epíteto específico não pode ser considerado válido, pois Bertolini já havia criado o homônimo válido *S. polycephala* para a América Central (Robinson, 1930; Grashoff, 1976). Devido ao escasso material utilizado na descrição dada por Baker para esta espécie, não é possível, no momento, resolver, taxonomicamente, o problema que envolve este caso o que será assunto para um trabalho futuro.

Os resultados do presente trabalho na área de

revisão taxonômica do tipo morfogeográfica (Davis e Heywood, 1973), vêm confirmar as observações de Löefgren (1897) a respeito da área de distribuição da série *Multiaristatae* do gênero *Stevia* no Brasil, ou seja, nas regiões sul, sudeste e centro-oeste. Estes dados também confirmam as observações de Robinson (1930) com relação ao acentuado endemismo de algumas espécies de *Stevia* no Brasil central.

O levantamento efetuado mostra também que *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bert. enquadra-se na área de distribuição natural da série *Multiaristatae* no Brasil. Isto permite, juntamente com a análise morfológica desta espécie, colocá-la no contexto da flora brasileira de *Compositae*.

Pode ser observado, entretanto, que os mapas apresentados mostram evidências de que o gênero *Stevia* foi pouco coletado até o momento e, portanto, mal representado na sua totalidade, nos herbários do Brasil.

Morfologicamente, *S. rebaudiana* mostra uma série de aspectos que normalmente caracterizam espécies do tipo erva daninha ou planta invasora, isto é, baixa e de hábito laxo, crescimento vegetativo prolixo e capítulos com poucas flores e estas com pequenas dimensões.

A flor de *S. rebaudiana* possui um estilete cuja morfologia geral e modo de apresentação seguem o estabelecido para os gêneros da tribo Eupatorieae, (Robinson, 1913; Small, 1915; Cassini, in King e Dawson, 1975; Bolick, 1977): os ramos do estilete emergem da corola e

alongam-se com as superfícies internas aderentes. Com o amadurecimento do estigma, cada ramo então se separa, expondo a superfície estigmática interna receptiva, livre do pólen. Neste estágio, quando grãos de pólen são depositados podem germinar, pois o estigma está receptivo.

A morfologia do estilete de *S. rebaudiana* está de acordo com a classificação proposta por Heslop-Harrison e Shivanna (1977) para a superfície estigmática de Compositae: estigma com a superfície seca, sem secreções fluidas copiosas e células receptivas típicas (papilas unicelulares) concentradas em regiões distintas.

Heslop-Harrison e Shivanna (1977) mostram também que esta forma de superfície estigmática está associada com o sistema de autoincompatibilidade do tipo homomórfico esporofítico, sistema este que é comum em Compositae (Heslop-Harrison, 1975). Neste caso, onde o comportamento do pólen é determinado pelo genótipo da planta que o produziu, a resposta de incompatibilidade ocorre ao nível de uma interação individual com as papilas estigmáticas. Um sistema deste tipo, concluem Heslop-Harrison e Shivanna (1977), envolvendo uma interação célula a célula, com respostas de rejeição de ambos os lados - pólen e estigma - só poderia ser funcional com um estigma tipo seco, onde as células estigmáticas únicas tendem a entrar em contato com grãos de pólen isolados, ou pelo menos com número bem pequeno de grãos. Em contraposição, um estigma do tipo úmido que possui secreções fluidas na região receptiva, dificultaria esta interação célula a

célula.

Além da morfologia do estilete, também o número de núcleos de grão do pólen está associada ao sistema de autoincompatibilidade presente em um determinado taxon (Solbrig, 1971; Heslop-Harrison, 1975; Heslop-Harrison e Shivanna, 1977). Grãos de pólen trinucleados são mais frequentes em plantas que possuem o sistema homomórfico esporofítico, enquanto que os grãos binucleados estão associados ao sistema gametofítico (Brewbaker, 1959; Arasu, 1968; Nettancourt, 1977).

Em *Stevia rebaudiana*, o pólen trinucleado e a ausência da germinação deste após autopolinização natural ou artificial (esta última tentada também por Bräucher, 1974), mostram que existem, nesta espécie, evidências de reprodução sexuada com a presença do sistema de autoincompatibilidade do tipo homomórfico esporofítico. A morfologia do pólen da tribo Eupatorieae é a que menos tem sido estudada em Compositae (Skvarla *et al.*, 1977). Enquanto muitos trabalhos tem sido feitos com outros gêneros, o que melhor se conhece na tribo Eupatorieae são os estudos de King e Robinson (1967, 1968, 1970) a respeito do polimorfismo polínico de *Stevia*.

King e Robinson (1967) estabeleceram quatro formas (ou estados) de grãos de pólen nas espécies *Stevia pilosa* Lag. e *S. purpurea* Pers., concluindo que tal fenômeno poderia indicar prováveis raças citológicas no material estudado. Ficou estabelecido também que o tipo I dos quatro tipos determinados (grãos esféricos, ca. de

25 µm de diâmetro, tricolpado e com as faces espinhosas) seria o tipo polínico básico do gênero (King e Robinson, 1967) e observado em todas as espécies restritas à América do Sul, incluindo *Stevia rebaudiana* (King e Robinson, 1968).

A análise morfológica do pólen de *S. rebaudiana* mostrou que este é, no entanto, tricolporado, mas com relação à ornamentação da exina e medidas de diâmetros, esta relação possui o tipo polínico básico do gênero *Stevia*, segundo os critérios de King e Robinson (1967, 1968).

Apesar da variação do pólen poder estar provavelmente ligada à poliploidia (Stebbins, 1950), o comportamento reprodutivo das espécies de *Stevia* pode ser determinado com um alto grau de segurança a partir da morfologia dos grãos de pólen (Grashoff, 1974). As plantas sexuais produzem grãos normais, uniformes e tricolporados; as apomíticas produzem grãos mal formados. De acordo com este critério, muitas espécies deste gênero têm plantas apomíticas que são em maior número que plantas sexuais, o que dificulta muito a delimitação destas espécies (Grashoff, 1974).

Os grãos de pólen normais, uniformes e tricolporados de *Stevia rebaudiana* dão indicação da morfologia polínica geral enfatizada para a tribo Eupatorieae (padrão "Helianthoide", segundo Skvarla *et al.*, 1977) e também da presença de mecanismos utilizados na reprodução sexuada segundo o estabelecido por Grashoff (1974).

De uma maneira geral, tem sido demonstrado que

os componentes da biologia reprodutiva de uma espécie são modificados em função do mecanismo de reprodução (Ornduff, 1969; Baker, 1965; Gibbs, Milne e Vargas Carrillo, 1975; Cruden, 1977). Dentro desta tema, o número de grãos de pólen por flor tem sido usado como um indicador do sistema de reprodução. As flores de espécies autoincompatíveis e/ou xenógamas produzem mais grãos de pólen do que as espécies autocompatíveis e/ou autóginas estreitamente relacionadas. Estes relacionamentos já foram demonstrados em Compositae, com o trabalho de Gibbs *et al.* (1975) em *Senecio*.

Os valores obtidos nas contagens de grãos de pólen por antera nas flores de *S. rebaudiana* podem ser considerados altos, quando comparados com dados semelhantes para outras Compositae - *Senecio*, por exemplo (Gibbs *et al.*, 1975). Isto indicaria a autoincompatibilidade e/ou xenogamia para *S. rebaudiana*, porém deve ser lembrado que este é somente um dos componentes da biologia da reprodução de uma determinada espécie.

O pólen das angiospermas é bi ou trinucleado quando se encontra na fase de deiscência das anteras (Brewbaker, 1957; Pandey, 1960; Solbrig, 1971). Os grãos binucleados contêm um núcleo espermático e um núcleo vegetativo; o espermático sofre uma segunda mitose somente durante o crescimento do tubo polínico. O tipo trinucleado, ao contrário, contém um núcleo vegetativo e dois espermáticos, e a segunda mitose ocorre antes da antese floral (Brewbaker, 1957; Hoekstra e Bruinsma, 1975a).

Brewbaker (1957, 1967) investigou cento e noventa e nove famílias de plantas, cento e trinta das quais tinham grãos de pólen binucleados, enquanto que quarenta e oito os possuíam trinucleados (destaca-se aqui as Compositae); em vinte e uma famílias ambos os tipos foram encontrados. A presença de grãos trinucleados em *S.rebaudiana* faz com que esta espécie seja incluída na regra geral para a família a qual pertence e auxilia a entender a conexão que é feita entre muitas características fisiológicas e o número de núcleos dos grãos de pólen (Brewbaker, 1959; Townsend, 1971; Hoekstra e Bruinsma, 1975b; Heslop-Harrison e Shivanna, 1977). A germinação *in vitro* do tipo trinucleado foi estabelecida como difícil e irregular, os tubos polínicos formados eram curtos e altas concentrações de açúcares deveriam estar presentes no meio de germinação. O pólen binucleado, ao contrário, germinava rapidamente e produzia tubos polínicos longos em meio contendo baixas concentrações de açúcares (Hoekstra e Bruinsma, 1975b).

Hoekstra e Bruinsma (1975a) citam que a germinação do pólen trinucleado das Compositae é difícil, requerendo alta porcentagem de açúcar (trinta a quarenta por cento) e condições especiais de restrição de água no ar. Utilizando várias espécies de Compositae, estes autores observaram que quando o pólen foi colocado para germinar *in vitro*, os tubos polínicos observados foram curtos e foi notada uma pequena longevidade do pólen. Os resultados dos experimentos, aqui apresentados, da germinação do

polen trinucleado de *S. rebaudiana* mostram que as faixas de concentração de açúcar consideradas adequadas para a germinação do polen no meio *in vitro* estão nos padrões normais já obtidos para outras espécies de Compositae (Hoekstra e Bruinsma, 1975a).

A citologia em Compositae é, no momento, bastante conhecida. Cerca de sete mil e quinhentas de aproximadamente vinte mil espécies da família são conhecidas em termos numéricos de cromossomos (King *et al.*, 1976; Solbrig, 1977). Já a morfologia dos cromossomos é bem menos conhecida e, por fim, sabe-se muito pouco a respeito do comportamento meiótico e embriogênese.

As informações mais recentes sugerem que $x = 9$ é o número básico para a família (Solbrig, 1977), enquanto que o número $x = 10$ é considerado como básico para a tribo Eupatorieae (King *et al.*, 1976). Turner (1959) e King *et al.* (1976) consideram os gêneros *Stevia* ($n = 11$) e *Carpochaete* ($n = 12$) estreitamente relacionados. De acordo com esses autores as relações são somente citológicas, sem haver outras fortes evidências morfológicas.

O gênero *Stevia* foi estudado citologicamente de forma ampla por Grashoff *et al.* (1972) e Grashoff (*in* King *et al.* 1976), com a conclusão de que as espécies arbustivas possuem $n = 12$; as herbáceas com a disposição dos capítulos numa panícula laxa têm $n = 11$, sem a presença de aneuploidia; as espécies herbáceas com o arranjo dos capítulos na forma de um corimbo compacto possuem $2n = 34$ e formam univalentes com aneuploidia considerável.

Os estudos de Grashoff, entretanto, referem-se a espécies de *Stevia* das Américas Central e Norte e, frequentemente, nesta porção do gênero a agasmopermia é obrigatória (Grashoff, 1974), fenômeno que foi analisado pelos critérios da morfologia polínica, conforme foi discutido anteriormente.

Estudos citológicos em ponta de raiz de *S. rebaudiana* mostraram que esta espécie possui $2n = 22$. Os dados do presente trabalho confirmam os resultados obtidos por Brücher (1974) para a análise cromossômica desta espécie, que pelo seu hábito e disposição dos capítulos, fica incluída perfeitamente dentro dos padrões estabelecidos por Grashoff *et al.* (1972) e Grashoff (*in King et al.*, 1976).

King *et al.* (1976) mostraram em *Eupatorium* e *Ageratina*, que há espécies apomíticas e sexuais que são diferenciadas pela meiose irregular e variação polínica e, em *Stevia*, a variação polínica torna-se mais notável, como já foi visto anteriormente. Associada a esta variação morfológica encontram-se irregularidades na meiose das espécies de *Stevia* estudadas por Grashoff (*in King et al.*, 1976) que, ao contrário de *Ageratina*, inclui muitas populações de reprodução sexuada dentre as suas espécies apomíticas, e a hibridação natural é frequente entre algumas espécies (Grashoff, 1974).

No momento sabe-se que existe uma forte correlação entre o número cromossômico e o hábito das espécies de Compositae. Diminuição do número cromossômico é

mais frequente nas espécies anuais, enquanto que os altos números são encontrados em ervas perenes (Stebbins, 1950; Solbrig, 1977). Stebbins (1958), numa análise detalhada das relações entre longevidade, hábito e variabilidade genética na tribo Lactuceae, mostrou que as espécies de ambientes instáveis tendiam a possuir baixo número cromossômico e/ou baixo índice de recombinação, e/ou um sistema de reprodução favorecendo "inbreeding", seja por autofertilização ou por apomixia.

Nota-se, no entanto, que *S. rebaudiana* deve possuir a microsporogênese normal (ver taxas de viabilidade e de germinação do pólen), enquanto que na literatura consultada não é possível encontrar observações a respeito de modificações bruscas ou periódicas do ambiente natural de ocorrência desta espécie. Estes dois fatos levam a crer que a presença da apomixia nesta espécie constatada pelos estudos embriológicos deve estar ligada a algum fator fisiológico e/ou ecológico.

As angiospermas podem se reproduzir de duas maneiras básicas. Muitas espécies têm capacidade de produzir novos indivíduos por meios vegetativos, tais como estolões, rizomas, bulbos, etc. Por outro lado, a maioria das espécies tem potencialidade ou se reproduzem por sementes. Estas sementes no entanto, podem ser produzidas apomiticamente, sem o recurso do ciclo completo da fertilização.

O termo apomixia é bastante geral, cobrindo todos os tipos de reprodução assexuada que tendem a substi-

tuir ou atuar como substitutos do método sexual. Análises cuidadosas e extensas dos fenômenos apomíticos num grande número de gêneros de plantas, e descobertas mais ou menos casuais de apomixia em muitos outros, têm mostrado que vários tipos de apomixia existem no reino vegetal e que sua natureza genética e origem evolutiva são, ambas, multiformes e complexas (Stebbins, 1950).

Para a discussão do presente trabalho, foram utilizadas as revisões realizadas por Stebbins sobre apomixia, onde o autor analisa os outros trabalhos realizados nesta área (Stebbins, 1941, 1950).

A agamospermaia inclui os tipos de reprodução apomítica nos quais embriões e sementes são formados de forma assexuada. A principal característica de todos os tipos de agamospermaia é que a meiose e a fertilização são evitadas ou encobertas, de tal modo que o embrião (ou embriões) que se desenvolve nas sementes é geralmente idêntico à planta mãe no número cromossômico e conteúdo gênico.

Existem duas maneiras principais de se evitar a meiose (Stebbins, 1950): aposporia, na qual um saco embrionário diplóide é formado diretamente de uma célula do nucelo ou do integumento interno por uma série de divisões somáticas; e diplosporia, em que o saco embrionário surge de uma célula do arquêsporo, mas na qual as divisões meióticas são mesmo inteiramente omitidas ou tão modificadas que o pareamento e a redução dos cromossomos não ocorrem.

Os gametófitos diplóides formados por aposporia ou por diplosporia podem dar origem a embriões através da multiplicação da célula-ovo (partenogênese) ou de alguma outra célula (apogametia). O primeiro fenômeno é o mais comum nas gimnospermas e angiospermas, mas a apogametia é mais frequente nas pteridófitas (Stebbins, 1950). Ambos os processos são autônomos em algumas plantas, mas em outras requerem a polinização e o desenvolvimento dos tubos polínicos. Tais aponíticos são denominados pseudogâmicos.

A pseudogamia é um tipo de reprodução aganospérmica na qual o desenvolvimento da semente é estimulado pela polinização, embora o núcleo masculino não se funda com a célula-ovo. Este tipo de reprodução foi primeira e profundamente estudado em espécies de *Potentilla*, *Rubus* (Rosaceae), *Poa* (Gramineae), *Allium odorum* (Alliaceae) e *Parthenium* (Compositae) (Stebbins, 1941, 1950; Esau, 1944, 1946).

O efeito da polinização parece variar de acordo com a espécie em estudo. Na maioria das espécies pseudogâmicas, o embrião inicia seu desenvolvimento de forma autônoma e mesmo precocemente, mas o endosperma não se desenvolverá a menos que seja fertilizado. A polinização e parcial fertilização são, portanto, essenciais para a continuação do crescimento do embrião (Stebbins, 1950).

Por outro lado, em plantas que possuem aposporia, a meiose é mesmo normal ou caracterizada por pequenas anormalidades, tal como um pequeno número de univalentes e multivalentes, mesmo na microsporogênese e na forma

ção das tétrades do megásporo e, os sacos embrionários que surgem são substituídos pelos produtos da aposporia (Stebbins, 1950). Esta regularidade comparativa pode estar ligada ao fato de que a maioria das apomíticas após poras tem desenvolvimento de embriões pseudogâmicos.

A origem do grão de pólen para o estímulo da pseudogamia geralmente é de autopolinização. Entretanto, Acharya-Goswami e Matfield (1974), realizando estudos biosistemáticos no gênero *Potentilla*, mostraram que três espécies pseudogâmicas estreitamente relacionadas, estimularam formação de sementes entre si, mas nenhuma semente foi obtida após a polinização por dez outras espécies, embora tubos polínicos bem desenvolvidos em alguns poucos casos foram observados.

Desta forma, baseados também em dados de literatura, Acharya-Goswami e Matfield (1974) concluem que o desenvolvimento de sementes pseudogâmicas em *Potentilla* parece ser somente estimulado por pólen compatível, de espécies próximas. Estes autores mostraram que a geração derivada de polinizações compatíveis foram principalmente de origem maternal na morfologia, mas indivíduos desviantes desta forma geral foram também produzidos.

Preliminarmente aos estudos embriológicos, os dados dos programas de polinizações manuais controladas e a falta de frutos férteis nas plantas isoladas em gaiolas de tela de nylon indicam a necessidade da polinização cruzada para a formação de frutos em *S. rebaudiana*. Entretanto, somente o estudo do desenvolvimento do

embrião e do crescimento do tubo polínico puderam dar segurança ao fato de que existe a presença da pseudogamia nesta espécie, apesar das indicações da existência de caracteres de reprodução sexual associada a um forte sistema de autoincompatibilidade.

Outras Compositae apresentam apomixia - *Crepis*, *Taraxacum* e *Hieracium*, por exemplo - e foram denominadas por Stebbins (1950) como complexos agâmicos, tendo como ponto máximo o gênero *Parthenium*, onde as espécies apomíticas (associadas à poliploidia) são pseudogâmicas (Esau, 1946; Stebbins, 1950), e o tipo de apomixia é diplosporia seguida de partenogênese pseudogâmica, e quase todos os apomíticos são facultativos.

Do ponto de vista genecológico, a apomixia tem três principais efeitos nos grupos onde ocorre. Inicialmente, ela torna possível a sobrevivência de muitos genótipos que são vigorosos e bem adaptados ao ambiente, mas devido à sua esterilidade citológica talvez não pudessem sobreviver. Stebbins (1950) considera que, com a apomixia as possibilidades de exploração de recursos genéticos, de vários genótipos distintos são aumentados, de maneira que os complexos agâmicos são mesmo melhor equipados (ou adaptados) que os complexos poliplóides sexuais para a rápida evolução de novos genótipos adaptados a novos ambientes, repentinamente desocupados e viáveis. Não é por acidente, portanto, que espécies apomíticas dos gêneros *Taraxacum*, *Hieracium* e também *S. rebaudiana* têm características de espécies invasoras.

O segundo efeito da apomixia é similar aos efeitos surgidos da autofertilização. Ela permite a construção de extensas populações de indivíduos geneticamente similares para a rápida colonização de novos ambientes. No entanto, apomixia e autofertilização aparecem como sistemas genéticos mutuamente exclusivos. Stebbins (1950) e Solbrig (1971) consideram que os ancestrais sexuais de todos os complexos agâmicos são autoincompatíveis, dióicos, ou possuem outros mecanismos que promovem a alogamia, com a apomixia não se originando de plantas com autofertilização. O tipo de agamosperma encontrado em *S. rebaudiana* é derivado de populações com características de reprodução sexuada e geneticamente autoincompatíveis como foi mostrado. A apomixia encontrada nesta espécie é, portanto, só levemente renovada do mecanismo de reprodução sexuada do qual ela evoluiu, como em *Potentilla* (Acharya-Goswami e Matfield, 1974), talvez pela supressão da sexualidade através dos altos níveis de precursores hormonais, como já foi analisado por Rocha (1979).

O terceiro efeito da apomixia é a limitação da variabilidade genética imposta nas plantas que adotam este método de reprodução. Uma vez que o complexo agâmico consiste principalmente de apomixia numa determinada espécie, seu futuro evolutivo fica decididamente limitado. Se apomixia obrigatória torna-se predominante, novos progressos evolutivos são construídos sobre a distribuição e potencialidade das espécies sexuais remanescentes no mesmo ambiente (Stebbins, 1950). O endemismo primeiramen

te observado em *S. rebaudiana* para determinadas regiões do Paraguai (Bertoni, 1905; Robinson, 1930) pode ser explicado talvez pelo tipo de sistema de reprodução encontrado nesta espécie.

A restrição de complexos agânicos a determinadas áreas geográficas é um fato comum, como foi analisado em *Crepis*, *Taraxacum* e *Hieracium* (Stebbins, 1950). Grashoff (1974), entretanto, cita que espécies de *Stevia* apomíticas, facultativas ou obrigatórias, são distribuídas e espalhadas entre os indivíduos de reprodução sexuada destas espécies, o que aparentemente elimina o fator de distribuição limitada de complexos agânicos para este gênero, uma vez que pode haver ampla dispersão dos componentes da espécie *via* sexual ou assexuado.

No entanto, a plasticidade fenotípica observada durante o cultivo de *S. rebaudiana* nos diversos experimentos, conduzidos no Estado de São Paulo, mostra que esta espécie, de larga tolerância ecológica nas regiões tropicais, deve possuir um amplo genoma pré-adaptado às diferenças ambientais surgidas no decorrer do tempo. Isto confirma as idéias de Stebbins (1941, 1950) a respeito do "oportunismo" dos complexos agânicos, que resulta do aumento do número de genótipos adaptativos viáveis, e da facilidade com a qual estes genótipos podem ser perpetuados. Entretanto, devido à falta de amplos estudos biosistemáticos das espécies brasileiras de *Stevia*, principalmente as mais próximas de *S. rebaudiana*,

diana, não é possível analisar todo o espectro de variação de alguns componentes do sistema genético dentro deste gênero nos diferentes ambientes que ocupa.

O "oportunismo" de *S. rebaudiana* torna-se mais evidente ainda quando se considera que, não eliminando completamente a possibilidade do esteviol ser o precursor de giberelinas (Rocha, 1975; Felipe, 1977b) ou do esteviosídeo ser uma forma de armazenamento de hormônios nesta espécie (Viana, 1979) pode ser proposto um modelo para a função e síntese de esteviosídeo em *S. rebaudiana*: proteção desta espécie contra ataque de herbívoros, provavelmente insetos, por ser tóxico ou repelente em altas concentrações (Viana, 1979). A exploração de ambientes desfavoráveis para outras espécies sem esta defesa química e, a presença da apomixia, tornam *S. rebaudiana* uma espécie potencialmente útil na exploração de praticamente todos os ambientes tropicais, com exceção daqueles que não ofereçam condições de umidade e temperatura adequadas.

O fato da apomixia ocorrer em muitas espécies de importância econômica, tem levado a um interesse mais que acadêmico para o estudo deste fenômeno. Um grande número de culturas é conhecido como sendo de reprodução assexuada (Stebbins, 1950; Allard, 1971) e a maioria constitui-se de apomíticos facultativos, podendo, então, serem obtidos híbridos interespecíficos. Se, no entanto, uma espécie de valor econômico for encontrada como sendo apomítica obrigatória, como *S. rebaudiana*, o gênero deve

ser explorado em termos de espécies sexuais, e pólen destas podem ser empregados para possíveis cruzamentos e melhoramento da espécie apomítica. Estas espécies de reprodução sexuada podem conter genes para resistência de pragas e outras propriedades valiosas que não devem ser ignoradas.

No caso de *S. rebaudiana*, o que se procura é a exploração do esteviosídeo, que pode ser retirado da planta toda, com exceção das raízes mas, em maior quantidade, das folhas (Zaidan *et al.*, 1980). Embora o conteúdo do esteviosídeo seja determinado geneticamente, as diferenças absolutas e variação interespecífica ocorrem em termos de produção desta substância. Zaidan *et al.* (1980) estabeleceram que tipos morfológicos mostram diferentes respostas ao fotoperíodo no que se refere à floração, não havendo, entretanto, relação entre o fotoperíodo crítico e o conteúdo de esteviosídeo, nestes casos.

Desta forma, para produção comercial do esteviosídeo, poderia ser possível aumentar o nível deste composto através de seleção de indivíduos (Allard, 1971), neste caso adaptados a fotoperíodos que não induziram a floração, isto é, a planta estaria sempre em estado vegetativo, tornando-se máxima a expressão genética para a produção do esteviosídeo. A multiplicação destes indivíduos tem de ser, para maior facilidade e menores custos e tempo, pela estaquia, devido ao alto grau de infertilidade dos frutos e à dificuldade de reprodução por sementes, como mostram os resultados do presente trabalho.

A estaquia já foi sugerida anteriormente (Anônimo, 1911, 1913; Bertoni, 1916; Khulmann, 1927; Brücher, 1974; Rocha, 1975) como o melhor meio de propagação da espécie e, até o momento nada foi feito a respeito da tentativa de cruzamento de *S. rebaudiana* com outra espécie próxima para verificação de seu isolamento reprodutivo.

Como a função do esteviosídeo pode ser encarada em termos fisio-ecológicos como repelente de herbívoros, protegendo a planta através da conservação de sua área foliar máxima (Viana, 1979), o melhoramento de indivíduos de *S. rebaudiana* para o aproveitamento econômico deste açúcar pode ser feito também através da poliploidização. Este fenômeno é de grande interesse e já foi tentado por Brücher (1974), com certo êxito. Um dos efeitos da poliploidização é aumentar a dimensão das células de determinadas partes da planta, assim como folhas, palem, etc. (Stebbins, 1950, 1973).

Concluindo, sabe-se de muitas espécies de Compositae que possuem apomixia, seja facultativa ou obrigatória, e que podem se apresentar ainda como pseudogâmicas (Stebbins, 1950; Fryxell, 1957). Nestes casos, o papel da polinização como estímulo da formação de frutos não é bem conhecido, mas supõe-se que sejam os fatos da germinação do palem e a formação do tubo polínico os responsáveis por muitas reações químicas de síntese e liberação de substâncias envolvidas na indução hormonal para o desenvolvimento dos frutos (Válio, 1979 a, b).

Além do fato da indução, existem outras comple

as interações metabólicas para o crescimento do tubo polínico nos tecidos do estigma e estilete que, provavelmente, devem funcionar como catalisadores de reações para o desenvolvimento normal do óvulo (Stanley, 1971; Vasil, 1974; Kroh e Helsper, 1974).

No presente trabalho, apesar de não ter sido observado em *S. rebaudiana* o crescimento completo do tubo polínico até o óvulo após a polinização cruzada, não existem evidências de que o seu desenvolvimento seja somente até a etapa observada. No entanto, isto não invalida a necessidade da polinização para a formação do embrião apomítico (como é normal em espécies pseudogâmicas) e também o reconhecimento dos caracteres morfológicos indicativos de reações de autoincompatibilidade na espécie.

O saco embrionário normal que se desenvolve até o estágio V das flores de *S. rebaudiana* tem a estrutura normal caracterizada para as Compositae: sacos monospóricos 8-nucleados, do tipo Polygonum (Maheshwari, 1950). A presença de óvulos abortivos que formam os frutos claros, inférteis, pode ser explicada por um fenômeno fisiológico de desequilíbrio hormonal que leva à má formação e desenvolvimento do óvulo. Provavelmente a presença de possíveis substâncias precursoras de hormônios, como o esteviol (Rocha, 1975; Viana, 1979) possa causar esta anormalidade.

Já no caso dos frutos escuros, inférteis, a sua degeneração após um relativo desenvolvimento do embrião apomítico, com cerca de quatro dias após a poliniza -

ção cruzada, pode ter a sua causa na possível descontinuidade do crescimento do tubo polínico, o que levaria a uma degeneração de endosperma e, conseqüentemente, haveria falta de estímulo para o crescimento do embrião. Se, no entanto, o estímulo da polinização cruzada for suficiente para a formação do pseudo-endosperma, a degeneração do embrião após a formação do tubo polínico se deve, ao que parece, à anormalidades citológicas das células que o compõem, devido à condensação e escurecimento observados nas mesmas.

Portanto, a presença de frutos estéreis em *Ste*v*ia rebaudiana* está associada a fatores fisiológicos ou genéticos, e salvo melhores estudos citológicos e de mecanismos de reprodução comparados com espécies próximas pode-se descartar a hipótese acima afirmada.

V. RESUMO

Esta tese trata do levantamento das espécies nativas da série *Multiaristatae* do gênero *Stevia* Cav. O estudo taxonômico foi realizado de forma a determinar os mapas de distribuição do material examinado destas espécies no Brasil, a obter as características particulares de cada espécie e elaborar uma chave de identificação com o propósito de mostrar as interrelações de *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bert. com as espécies brasileiras deste gênero.

Paralelamente a esta revisão morfogeográfica, foi estudada a biologia da reprodução de *S. rebaudiana* e os resultados obtidos com três lotes de diferentes estoques foram comparados. Este estudo mostrou que:

- 1) plantas dos três lotes são similares nas características morfológicas e reprodutivas;
- 2) a técnica de diafanização permitiu acompanhar o desenvolvimento da flor e formação do fruto;
- 3) as flores apresentam-se protândricas e com as características típicas da tribo Eupatorieae;
- 4) os grãos de pólen são normais, uniformes, tricolporados, trinucleados e com taxas de viabilidade ao redor de 80%, germinando "*in vitro*" em soluções de sacarose;
- 5) a técnica de emasculação, junto com o programa de polinizações manuais controladas mostram que a espécie é alógama e incapaz de autofertilização após autopolição manual.

- 6) a observação da presença de tubos polínicos no estigma, ao lado das polinizações cruzadas e alguns caracteres morfológicos indicam a presença de autoincompatibilidade do tipo esporofítico em *S.rebaudiana*;
- 7) a espécie possui $2n = 22$
- 8) somente os estudos embriológicos puderam mostrar a formação de embriões pseudogâmicos com a necessidade de polinizações cruzadas ;
- 9) os frutos claros inviáveis são provenientes de flores com óvulos mal formados desde o início de seu desenvolvimento, os frutos escuros inférteis são resultados, provavelmente, de anomalias do crescimento do embrião apomítico; e, que os frutos escuros viáveis são originados de apomixia do tipo pseudogâmica.
- 10) a espécie é um apomítico obrigatório.

Foi também discutida a possibilidade dos altos níveis de substâncias precursoras de hormônios influenciarem a formação de frutos inviáveis em *S.rebaudiana*.

É apresentada a forma mais viável de melhoramento genético desta espécie para obtenção de plantas com altos níveis de esteviosídeo.

IV - SUMMARY

This thesis deals with a survey of the native species of *Stevia* Cav., series *Multiaristatae*. The taxonomic study was done in order to estimate species distributions within Brazil, based on herbarium material, to show the particular characteristics of each species, and to elaborate an identification key with the purpose of showing relationships between *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bert. with the Brazilian species of the genus.

In addition to this morphogeographical review, the reproductive biology of *S. rebaudiana* was studied and the results obtained with three groups of plants from different stocks were compared. This study showed this:

- 1) plants from the three groups are similar in morphological and reproductive characteristics,
- 2) the clearing-squash technique used here allows one to follow the development of flower and fruit,
- 3) the flowers are protandrous and with typical Eupatorieae features;
- 4) the pollen grains are normal, uniform, tricolporate, trinucleate and with 80% viability, germinating "in vitro" in sucrose solutions;
- 5) the emasculation technique, as well as manual controlled pollinations show that the species has allogamy and inability of self-fertilization after self-pollination;

- 6) the sporophytic self-incompatibility system is indicated by the lack of pollen tube formation on the stigma, the results of the pollinations and some morphological features.
- 7) the species has $2n = 22$;
- 8) only the embryological studies could show the pseudogamic embryo development after cross-pollination;
- 9) the inviable white-coloured fruits are flowers with undeveloped ovules, the inviable dark-coloured fruits result from abnormalities in the apomictic embryo growth; and that the fertile dark-coloured fruits result from apomixis (pseudogamy),
- 10) the species is an obligate apomictic.

The role of high levels of hormone precursor substances in the formation of the fruits in *S. rebaudiana* is discussed.

A suitable model of a breeding program for this species for obtaining plants with high levels of steviol side, is presented.

VII. BIBLIOGRAFIA

- ACHARYA GOSWAMI, D. e MATFIELD, B. 1974. Pseudogamy in the genus *Potentilla* L. New Phytol. 73: 1243-1247.
- ALLARD, R.E. 1971. Princípios do melhoramento genético das plantas, Ed. Edgard Blücher Ltda (São Paulo).
- ANÔNIMO, 1911. Resumen y conclusiones de experimentos realizados en la Escuela de Agricultura de La Assunción : Cañheẽ. Bol. Esc. Agron. de Puerto Bertoni 5: 54.
- ANÔNIMO, 1918. *Stevia rebaudiana*. Index Kewensis 18: 343-345.
- ANÔNIMO, 1920. The Caa-che plant as a sweetening agent. Bull. of The Imperial Institute 18: 123-125.
- ANÔNIMO, 1956. Sweetest of all. Chem. Engng News 34: 124-126.
- ARASU, N.N. 1968. Self-incompatibility in angiosperms: a review. Genetica 39: 1-24.
- ARISTEGUIETA, L. 1964. Compositae, in T. Lasser, ed., Flora of Venezuela. V. 5, parte primera. Caracas, editado pelo Instituto Botânico de Venezuela.
- ASSUMPÇÃO, R.M.V. e MORITA, T. 1968. Manual de soluções ,

- reagentes e solventes. Ed. Edgard Blücher e Ed. da USP. (São Paulo).
- BAKER, H.G. 1965. Characteristics and models of origins of weeds, *in* G.L. Stebbins e H.G. Baker, eds, The genetics of colonizing species. p. 147-168. Academic Press (Nova Iorque).
- BAKER, H.G. 1976. Compositae (Vernoniaceae, Eupatoriaceae), *in* C.F. Ph. von Martius, ed. Flora Brasiliensis. V. 6, Parte II. . (Munique).
- BARROSO, G.M. 1957. Flora de Itatiaia - Compositae. Rodriguesia, ano XX, nº 32: 175-241.
- BELL, R. 1974. Reproductive biology and systematics, *in* A.E. Radford *et al.*, eds, Vascular Plant Systematics. Harper & Row (Nova Iorque).
- BERTONI, M. 1899. El caã-êhê. Rev. Agron. (Asunción) 2:35.
- BERTONI, M. 1905. Le Kaã-hê-ê: sa nature et ses propriétés. An. cient. paraq. série I 1: 1-14.
- BERTONI, M. 1918. La *Stevia rebaudiana* Bert. La estevina y la rebaudina: nuevas substancias edulcorantes. An. cient. paraq. série II 2: 129-134.
- BOHLMAN, F., SUWITA, A.; NATU, A.A.; CZERSON, H. e SUWITA, A. 1977. Naturally occurring terpene derivatives 106. On further α - longipinene derivatives from composites. Chem Ber. 110: 3572-3581.

- BOLICK, M.R. 1977. Observations on the style branches exposure in *Eupatorium havanense* H.B.K. (Compositae : Eupatorieae). Taxon 26: 239-240.
- BREWBAKER, J.L. 1957. Pollen cytology and incompatibility systems in plants. J. Hered. 48: 217-277.
- BREWBAKER, J.L. 1959. Biology of the Angiosperm pollen grain. Indian J. Genet. Plant. Breed. 19: 121-133.
- BREWBAKER, J.L. 1967. The distribution and phylogenetic significance of binucleate and trinucleate pollen grains in the Angiosperms. Am. J. Bot. 54:1069-1083.
- BRIDEL, M, e LAVIEILLE, R. 1931a. Sur le principe sucré des feuilles de Kaã-hê-ê (*Stevia rebaudiana* Bert.) . Compt. Rend. 192: 1123-1125.
- _____, _____ 1931b. Le principe à saveur sucrée du Kaã-hê-ê (*Stevia rebaudiana* Bert.). Bull. Ass. Chim. Biol. 13: 636-655.
- _____, _____ 1931c. Le principe à saveur sucrée du Kaã-hê-ê (*Stevia rebaudiana* Bert.). J. Pharm. Chim., Paris 14: 99-113, 154-163.
- BRUCHER, H. 1974. Paraguays "Susstoff"-pflanze *Stevia rebaudiana*. Nature. Rdsch, Stuttg. 27: 231-233.
- BURTT, B.L. 1977. Aspects of diversification in the capitulum, *in* Keywood, J.B. Harborne e B.L. Turner, eds, The Biology and Chemistry of the Compositae. V.1.

Academic Press (Londres).

CABRERA, A.L. e VITTEZ, N. 1963. *Compositae Catharinensis*.

II. Eupatorieae. Sellowia 15: 149-256.

CARLQUIST, S. 1965. Wood anatomy of Eupatorieae (Compositae). Aliso 6: 89-103.

_____, ____ 1966. Wood anatomy of Compositae: a summary with comments on factors controlling wood evolution. Aliso 6: 25-44.

CAVANILLES, A.J. 1797. Icones et descriptiones plantarum.

V. 4, . . . 32-33.

CRUDEN, W.R. 1977. Pollen-ovule ratios: a conservative indicator of breeding systems in flowering plants. Evolution 31: 32-46.

DAVIS, P.H. e HEYWOOD, V.H. 1973. Principles of angiosperm taxonomy. R.E. Krieger Publis. Co. (Nova Iorque), 2a. ed.

DECANDOLLE, A.P. 1836. Prodromus systematis naturalis regni vegetabilis. V.5. (Paris).

DICKISON, W.C. 1974. Palinological evidence, in A.E. Radford *et al.* eds, Vascular Plant Systematics. Harper & Row (Nova Iorque).

DOMÍNGUEZ, X.A. 1977. Eupatorieae-chemical review, in V. H. Heywood; J.B. Harborne e B.L. Turner, eds, The Biology and Chemistry of the Compositae. V.1. Academic

Press. (Londres).

ERDTMAN, G. 1971. Pollen morphology and plant taxonomy -
Hafner Publis. Co. (Nova Iorque). 2a. ed.

ESAU, K. 1944. Apomixis in guayule. Proc. Nat. Acad. Sci.
30: 352-355.

_____ 1946. Morphology of reproduction in guayule and
certain other species of *Parthenium*, Hilgardia 17:61--
120.

FAEGRI, K. e PIJL, L. van der, 1971. The Principles of
Pollination Ecology. Pergamon Press (Oxford), 2a. ed.

FELIPPE, G.M. 1977a. "*Stevia*" uma nova fonte de adoçante.
Supl. Cult. de "O Estado de São Paulo" nº 15, p. 14,15.

_____, _____ 1977b. *Stevia rebaudiana* Bert.: uma revisão.
Ciênc. e Cult., São Paulo 29: 1240-1248.

_____, _____, e LUCAS, N.M.C. 1971. Estudo da viabili-
dade dos frutos de *Stevia rebaudiana* Bert. Hoehnea 1:
95-105.

_____, _____, e LUCAS, N.M.C.; BEHAR, L. e OLIVEIRA, M.
A.C. 1971. Observações a respeito da germinação de
Stevia rebaudiana Bert. Hoehnea 1: 81-93.

FLETCHER, H.G. Jr. 1955. The sweet herb of Paraguay. Che-
murg. Dig. 14: 7-18.

FRYXELL, P.A. 1957. Mode of reproduction of higher plants.

Bot. Rev. 23: 135-233.

GIBBS, P.E. 1971. Studies on synthetic hybrids of british species of *Senecio* : *Senecio viscosus* L x *Senecio vulgari*s Trans. Proc. bot. Soc. Edinb. 41: 213-218.

_____, _____ ; MILNE, C. e VARGAS CARRILLO, M. 1975. Correlation between the breeding system and recombination index in five species of *Senecio*. New Phytol. 75: 619-626.

GRASHOFF, J.L. 1969. Reproductive processes affecting the taxonomy of some Mexican and Central American species of Eupatorium. Diss. de Mestrado. Michigan State University. 101 p.

_____, _____ 1972. A systematic study of the North and Central American species of Stevia. Tese de Ph.D. University of Texas. 608 p.

_____, _____ 1974. Novelties in *Stevia* (Compositae: Eupatorieae). Brittonia 26: 347-384.

_____, _____ 1976. *Stevia* Cavanilles, in D.L. Nash e L. D. Williams eds, Flora of Guatemala. Fieldiana ; Botany 24: 115-128.

_____, _____ e BEAMAN, J.H. 1970. Studies in *Eupatorium* (Compositae), III. Apparent wind pollination. Brittonia 22: 77-84.

- _____ ; BIERNER, M.W. e NORTHINGTON, D.K. 1972
Chromosome numbers in North and Central American Com-
positae. Brittonia 24:379-394.
- HERR , J.M., Jr. 1971. A new clearing-squash technique for
study of ovule development in angiosperms. Am. J.Bot.
58:785-790.
- HESLOP-HARRISON , J. 1975. Incompatibility and the pollen
stigma interaction. An. Rev. Pl. Physiol. 26:403-425.
- HESLOP-HARRISON, Y e SHIVANNA, K.R. 1977. Receptive sur-
face of the Angiosperm stigma. Ann. Bot. 41:1233-1258.
- HOAGLAND , D.R. e ARNON, D.I. 1938. The water culture me-
thod for growing plants without soil. Univ. Calif. Publ.
agric. Sci. 347.
- HOEKSTRA , F.A. e BRUINSMA, J. 1975a. Viability of Composi-
tae pollen : germination *in vitro* and influences of
climatic conditions during dehiscence. Z. Pflanzanphy-
siol. Bd 76 S. 36-43.
- _____ 1975b. Respiration and vita-
lity of binucleate and trinucleate pollen. Physiol.
Plant. 34:221-225.
- IBGE, 1972. Carta do Brasil ao Milionésimo. IBGE (rio de
Janeiro)
- JOHANSEN, D.A. 1940. Plant microtechnique. McGraw-Hill
Book Co. (Nova Iorque).
- KAWATANI, T.; KANEKI, R. e TANABE, T. 1973. On the culti-

- vation of *Stevia rebaudiana* Bert. Jap. Jour. Trop. Agr. 17:125.
- KING, R.M. e DAWSON, H.W. 1975. Cassini on Compositae. Oriole Editions (Nova Iorque), 2v.
- KING, R.M. e ROBINSON, H. 1967. Multiple pollen forms in two species of the genus *Stevia* (Compositae). Sida 3: 165-169.
- _____ e _____ 1968. Studies in the Compositae Eupatorieae VIII. Observations on the microstructure of *Stevia*. Sida 3: 257-269.
- _____, _____ 1970. Studies in Eupatorieae (Compositae) XIV. Another example of dimorphic pollen. Phytologia 19: 301-302.
- _____, _____ 1975. Eupatorieae, in R. E. Woodson e R.W. Schery, eds, Flora of Panama. Ann. Mo. bot. Gdn. 12: 888-1004.
- _____; KYHOS, D.W.; POWELL, A.M.; RAVEN, P.H. e ROBINSON, H. 1976. Chromosome numbers in Compositae XIII. Eupatorieae. Ann. Mo. bot. Gdn. 63: 862-888.
- KOBAYASHI, M.; HORIKAWA, S.; DEGRANDI, J.H.; VENO, J. e MITSUHASHI, H. 1977. Dulcosides A and B, new diterpenes glycosides from *Stevia rebaudiana*. Phytochemistry 16: 1405-1408.
- KOHDA, H.; YAMASAKI, K.; TANAKA, O. e NISHI, K. 1976. Me

- thyl-ripariochromene A from *Stevia serrata*. Phytochem. Newsl. 15: 846-847.
- KROH, M. e HELSPER, J.P.F.G. 1974. Transmitting tissue and pollen tube growth, in H.F. Linskens, ed. Fertilization in Higher Plants. North-Holland publ. Co. (Amsterdam).
- KUHLMAN, J.G. 1927. A planta mais doce do mundo - *Stevia rebaudiana* Hemsl. Chácaras Quint. 35: 307-308.
- LEENHOUTS, P.W. 1968. A guide to the practice of herbarium taxonomy. Regnum veg. 58: 1-60.
- LOEFGREN, A. 1897. Flora Paulista, Família Compositae . Bol. Comm. Geogr. São Paulo nº 12: 144-153.
- MAHESHWARI, P. 1950. An introduction to the embryology of angiosperms. McGraw-Hill Book Co. (Londres).
- MARTIN, P.W. 1959. Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. Stain Tech. 34:125.
- MIYAZAKI, Y. e WATANABE, H. 1974. Studies on the cultivation of *Stevia rebaudiana* Bert. I. On the propagation of the plant. Jap. Jour. Trop. Agr. 17: 154.
- MORS, W.B. e RIZZINI, C.T. 1966. Useful plants of Brazil. Holden-Day, Inc. (São Francisco, USA).
- NETTANCOURT, D. 1977. Sexual incompatibility in angiosperms. Springer-Verlag (Nova Iorque).

- ORNDUFF, R. 1969. Reproductive biology in relation to systematics. Taxon 18: 121-133.
- PANDEY, K.K. 1970. Time and site of the S-gene action , breeding systems and relationships in incompatibility. Enphytica. 19: 364-470.
- PIMENTEL GOMES, F. 1976. Curso de estatística experimental. Ed. da ESALQ (Piracicaba).
- RADFORD, A.E.; DICKISON, W.C.; MASSEY, J.R. e BELL, C. R. 1974. Vascular plant systematics. Harper & Row (Nova Iorque).
- RANDI, A.M. 1980. Germinação de *Stevia rebaudiana*. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas (Campinas, SP).
- ROBINSON, B.L. 1913. A generic key to the Compositae -Eupatorieae. Contr. Gray Herb. Harv. 42: 429-437.
- _____ 1930. Record preliminary to a general treatment of the Eupatorieae. VIII. Observation on the genus *Stevia*. The *Stevias* of the Argentina Republic. The *Stevias* of Paraguay. The *Stevias* of North America. Contr. Gray Herb. Harv. 90: 3-161.
- _____ 1931. The *Stevias* of Ecuador. Contr. Gray Herb. Harv. 96: 43-49.
- _____ 1932. The *Stevias* of Peru. The *Stevias* of Bolivia. Contr. Gray Herb. Harv. 100: 20-69.

- ROBINSON, H. e KING, R.M. 1977. Eupatorieae - Systematic review, *in* V.H. Heywood, J.B. Harborne e B.L. Turner, eds, The Biology and Chemistry of the Compositae. V.1. Academic Press (Londres).
- ROCHA, R.F. 1975. Estudos em *Stevia rebaudiana* Bert.. Fotoperiodismo, esteviosídeo e substâncias giberelínicas. Dissertação de Mestrado. Escola Paulista de Medicina. 120 p. (São Paulo).
- SCHEMELING, G.A. von 1967. Caá-heê: edulcorante não calórico (*Stevia rebaudiana* Bert.). Bolm Sanat S. Lucas 29: 67-78.
- SKVARLA, J.P.; TURNER, B.L.; PATEL, V.C. e TOMB, A.S. 1977. Pollen morphology in the Compositae and in morphologically related families, *in* V.H. Heywood, J.B. Harborne e B.L. Turner, eds, The Biology and Chemistry of the Compositae. V.1. Academic Press (Londres).
- SMALL, J. 1915. The pollen presentation mechanism in the Compositae. Ann. Bot. 115: 457-470.
- SMITH, B.W. 1974. Cytological evidence, *in* A. E. Radford *et al*, eds, Vascular Plants Systematics. Harper & Row (Nova Iorque).
- SNEDECOR, G.W. e COCHRAN, W.G. 1967. Statistical methods. The Iowa State Univ. Press (Ames), 6a. ed.
- SOKAL, R.R. e ROHLF, J. 1969. Biometry. W.H. Freeman & Co.

(São Francisco, USA).

SOLBRIG, O.T. 1971. Principles and methods of plant bio-systematics. MacMillan Co. (Londres) 2a. ed.

_____. 1977. Chromosomal cytology and evolution in the family Compositae, *in* V.H. Heywood, J.B. Harborne e B.L. Turner, eds, The Biology and Chemistry of Compositae. V.1. Academic Press (Londres).

STAFLEU, F.A.; BONNER, C.E.B.; McVAUGH, R.; MEIKLE, R.D.; ROLLINS, R.C.; ROSS, R.; SCOPE, J.M.; SHUZE, G.M.; VILMORIN, R. de e VOSS, E.G. 1972. International Code of Botanical Nomenclature, The International Bureau of Plant Taxonomy and Nomenclature. (Utrecht).

STANLEY, R.G. 1971. Pollen chemistry and tube growth, *in* J. Heslop-Harrison, ed. Pollen: development and physiology. Butterworth & Co. (Londres).

STEBBINS, G.L. 1941. Apomixis in the Angiosperms. Bot. Rev. 7: 507-542.

_____. 1950. Variation and evolution in plants. Columbia Univ. Press (Nova Iorque).

_____. 1958. Longevity, habitat, and the release of genetic variability in the higher plants. Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol. 23: 365-378.

_____. 1973. Chromosomal evolution in higher plants. Academic Press (Londres).

- SUMIDA, T. 1973. Reports on *Stevia rebaudiana* Bert. Introduced from Brazil as a new sweetness resource. Misc. Publs Hokkaido Univ. Coll. Exp. Forests 2:69-83.
- THOMAS, E. 1937. *Stevia rebaudiana*. Bull. Assoc. Chim., Paris 54: 844-847.
- TOWNSEND, C.E. 1971. Advances in the study of incompatibility, in J. Heslop-Harrison, ed., Pollen: development and physiology. Butterworth & Co. (Londres).
- TURNER, B.L. 1959. Meiotic chromosomes counts for 12 species of Texas Compositae. Brittonia 11: 173-177.
- VALIO, I.F.M. 1979a. Auxinas, in M.G. Ferri, coord., Fisiologia Vegetal. V.2. Ed. Pedagógica e Universitária Ltda e Ed. da USP (São Paulo).
- _____ 1979b. Frutificação, in M.G. Ferri, coord., Fisiologia Vegetal. V.2. Ed. Pedagógica e Universitária Ltda. e Ed. da USP (São Paulo).
- VANZOLINI, P.E. e PAPAVERO, N. 1968. Índice dos topônimos contidos na Carta do Brasil ao Milionésimo. FAPESP (São Paulo).
- VASIL, I.K. 1974. The histology and physiology of pollen germination and pollen tube growth on the stigma and in the style, in H.F. Linskens, ed., Fertilization in Higher Plants. North-Holland Publ. Co. (Amsterdam).
- VIANA, A.M. 1979. Estudos sobre crescimento e conteúdo

de esteviosídeo, açucares solúveis totais e proteínas de folhas de *Stevia rebaudiana* Bert. em dois fotoperíodos. Diss. de Mestrado. Univ. Est. de Campinas (Campinas).

Wagner, H. 1977. Pharmaceutical and economic uses of the Compositae, in V.H. Heywood, J.B. Harborne e B.L. Turner. eds, The Biology and Chemistry of the Compositae V.1. Academic Press (Londres).

WELLER, S.G. e ORNDUFF, R. 1977. Cryptic self-incompatibility in *Amsinckia grandiflora*. Evolution 31: 47-51.

WILLIS, J.C., 1973. A Dictionary of the Flowering Plants and Ferns. Cambridge Univ. Press. (Cambridge). 8a. ed., rev. por H.K. Airy Shaw.

YAMAZAKI, K.; KOHDA, H.; KOBAYASHI, T.; KASAI, R. e TANAKA, O. 1976. Structures of *Stevia* diterpeneglucosides. Application of ¹³C NMR. Tetrahedron Lett. 13: 1005-1008.

ZAIDAN, L.B.; DIETRICH, S.N.C. e FELIPPE, G.M. 1980. Effect of photoperiod on flowering and stevioside content in plants of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Japan Jour. Crop. Sci. (no prelo).