

# Cultivar *Stevia rebaudiana* Bertoni em Bragança: orientações para a técnica cultural

## Guidelines to growing *Stevia rebaudiana* Bertoni in Bragança, NE Portugal

M. Ângelo Rodrigues, Isabel Q. Ferreira, Sandra Afonso, M. João Sousa e Margarida Arrobas

Centro de Investigação de Montanha – Instituto Politécnico de Bragança, Bragança, Portugal  
(\*E-mail: angelor@ipb.pt)  
<http://dx.doi.org/10.19084/RCA16186>

Recebido/received: 2016.12.22  
Recebido em versão revista/received in revised version: 2017.04.03  
Aceite/accepted: 2017.04.06

### RESUMO

A stévia [*Stevia rebaudiana* Bertoni] é uma cultura em expansão em todo o mundo devido à sua crescente utilização na indústria alimentar. Este trabalho foi iniciado com os objetivos de avaliar a adaptação da stévia às condições ecológicas do interior norte de Portugal, a resposta da planta à aplicação de diferentes doses de azoto, fósforo e potássio, bem como dois regimes de corte: simples e duplo. Os ensaios de campo decorreram em Bragança (na Terra Fria Transmontana) e no vale da Vilarica (na Terra Quente Transmontana). Foi avaliada a sobrevivência das plantas ao inverno, a produção de matéria seca, a composição elementar dos tecidos e determinados diversos índices de vegetação. Os resultados revelaram que as plantas não sobreviveram ao inverno, apresentando mortalidade superior a 95%, significando que a stévia só poderá ser cultivada como se de uma cultura anual se tratasse, com instalação de novos campos todos os anos. A produção de matéria seca aumentou significativamente com a adubação azotada. Na modalidade mais produtiva (100 kg N/ha) atingiram-se valores de matéria seca de folhas e total de 1560 e 4961 kg/ha, respetivamente. A concentração de azoto nas folhas não variou significativamente com a dose de azoto aplicada, apesar dos aumentos registados na produção de matéria seca, o que deixa antever dificuldades na monitorização do estado nutricional azotado das plantas em campo e no estabelecimento de programas de fertilização para a cultura.

**Palavras-chave:** stévia, tolerância ao frio, regime de corte, fertilização azotada, produção de matéria seca.

### ABSTRACT

*Stevia* [*Stevia rebaudiana* Bertoni] is a crop expanding worldwide due to the increasing use in the food industry. The aims of this work were to check the adaptation of *Stevia* to the ecological conditions of the northeast of Portugal and to assess the response of the plant to the application of different rates of nitrogen, phosphorus and potassium as fertilizers and two different cutting regimes, once and twice during the growing season. The field trials were carried out in Bragança and Vilarica valley, both located in NE Portugal but in very different ecological situations, respectively in one of colder and warmer places in the region. It was assessed the winter survival of *stevia* plants, as well as dry matter yield, tissue elemental concentration and several vegetation indices. The results revealed that the plants did not survive the winter, with mortality exceeding 95%, meaning that *Stevia* can only be grown as an annual crop, which requires the installation of the new fields every year. The dry matter yield significantly increased with nitrogen rate. In the most productive treatment (100 kg N/ha), 1560 kg/ha of dry leaves and 4961 kg/ha of total aboveground dry matter (leaves + stems) were reached. Leaf nitrogen concentration did not significantly varied with nitrogen rate, despite the increase observed in dry matter production, which may mean that difficulties can arise in monitoring the nitrogen nutritional status of plants in the field and in the establishment of adequate fertilization programs for this crop.

**Keywords:** frost tolerance, cutting regime, nitrogen fertilization, dry matter yield.

## INTRODUÇÃO

A stévia é um arbusto perene da família Asteraceae, originária da serra Amambai, região limítrofe entre Paraguai e Brasil, tradicionalmente cultivada pelas populações nativas da região (Brandle *et al.*, 1998). O interesse desta planta reside no facto de poder ser usada como adoçante natural, devido às suas folhas serem particularmente concentradas em glicosídeos de esteviol, com reduzido ou nulo valor calórico (Angelini e Tavarini, 2014; Morlock *et al.*, 2014).

A utilização de stévia como aditivo alimentar está autorizada nos Estados Unidos e na União Europeia apenas desde 2008 e 2011, respetivamente. Desde então, tem-se intensificado a investigação com vista ao melhor esclarecimento sobre a composição química e propriedades desta planta (Barba *et al.*, 2014; Karimi *et al.*, 2014; Lorenzo *et al.*, 2014). Estudos que incluem componentes agrónomicas têm também aumentado. Visam avaliar o efeito de fatores como a fertilização da cultura na produção e composição da planta (Kumar *et al.*, 2013; Barbet-Massim *et al.*, 2015; Pal *et al.*, 2015b), diferentes regimes de corte (Moraes *et al.*, 2013; Serfaty *et al.*, 2013; Angelini e Tavarini, 2014; Pal *et al.*, 2015a), densidades de plantação (Serfaty *et al.*, 2013; Kumar *et al.*, 2014) e tolerância ao stresse hídrico (Karimi *et al.*, 2015).

A stévia é uma planta de origem subtropical, que pode tolerar temperaturas até  $-6^{\circ}\text{C}$  (Brandle e Rosa, 1992). Contudo, em latitudes mais elevadas a planta pode morrer durante o inverno, restando a possibilidade de ser cultivada como anual (Brandle *et al.*, 1998; Lankes e Pude, 2008; Woelwer-Rieck *et al.*, 2010), o que pode retirar competitividade à cultura, devido ao aumento dos custos com a plantação e redução provável da produtividade. Em Portugal, a planta está a ser cultivada um pouco por todo o país, sem que se disponha ainda de informação sobre a melhor técnica de cultivo.

Foram objetivos principais deste trabalho avaliar: i) a sobrevivência da planta ao inverno e a possibilidade de ser cultivada como perene; ii) a resposta da planta à fertilização azotada, fosfatada e potássica; e iii) o regime de corte que melhor se adapta à duração da estação de crescimento

do interior Norte de Portugal. Foram instalados ensaiados de campo com diferentes doses de azoto, fósforo e potássio e testados dois regimes de corte, simples e duplo, combinados com duas datas de plantação.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios de campo decorreram no Vale da Vilariça em Moncorvo, na “Terra Quente Transmontana”, e em Bragança, na “Terra Fria Transmontana”. A temperatura média anual no Vale da Vilariça ultrapassa  $14^{\circ}\text{C}$  e a precipitação aproxima-se de 500 mm. Em Bragança, a temperatura média anual referente à norma climatológica de 1971-2000 é de  $12,3^{\circ}\text{C}$  e a precipitação total anual de 758,3 mm. Os ensaios da Vilariça foram instalados num solo de aluvião de textura franco-limosa,  $\text{pH}_{(\text{H}_2\text{O})}$  6,1, carbono orgânico (Walkley-Black)  $9,9 \text{ g kg}^{-1}$  e fósforo ( $\text{P}_2\text{O}_5$ ) e potássio ( $\text{K}_2\text{O}$ ) extraíveis (Egner-Riehm) 39,5 e  $240,0 \text{ mg kg}^{-1}$ , respetivamente. O ensaio de Bragança foi instalado num regossolo coluvial de textura franca,  $\text{pH}_{(\text{H}_2\text{O})}$  6,3, carbono orgânico  $5,6 \text{ g kg}^{-1}$  e fósforo ( $\text{P}_2\text{O}_5$ ) e potássio ( $\text{K}_2\text{O}$ ) extraíveis 30,0 e  $61,9 \text{ mg kg}^{-1}$ , respetivamente.

No Vale da Vilariça instalaram-se ensaios de resposta à aplicação de N, P e K. Foram usadas cinco doses de N orgânico (0, 25, 50, 100 e  $150 \text{ kg N ha}^{-1}$ ), na forma de um corretivo orgânico com 6% N, 3%  $\text{P}_2\text{O}_5$  e 2%  $\text{K}_2\text{O}$ , três doses de P (0, 50 e  $100 \text{ kg P}_2\text{O}_5 \text{ ha}^{-1}$ ), na forma de um fosfato natural com 26,5%  $\text{P}_2\text{O}_5$ , e três doses de K (0, 50 e  $100 \text{ kg K}_2\text{O ha}^{-1}$ ), na forma de sulfato de potássio (50%  $\text{K}_2\text{O}$ ). Os ensaios foram organizados de forma completamente casualizada com três repetições. Em Bragança instalou-se um ensaio de resposta à adubação azotada, similar ao do Vale da Vilariça mas em que se usou nitrato de amónio (34,5% N) e retirou o tratamento correspondente à aplicação de  $25 \text{ kg N/ha}$ , e a plantação ocorreu em duas datas distintas. Cada unidade experimental ocupou uma área de  $6 \text{ m}^2$  ( $2 \times 3 \text{ m}$ ). Em ambos os ensaios as plantas foram instaladas sobre tela anti infestantes, em orifícios abertos na tela com compasso  $40 \times 50 \text{ cm}$ . As plantas foram regadas através de um sistema de rega gota-a-gota instalado debaixo da tela. Na Vilariça efetuou-se a plantação em 11 de junho de 2014 e em Bragança em 13 de junho e 15 de julho. As plantas no ensaio da Vilariça foram

cortadas em 10 de outubro de 2014. Em Bragança, as plantas do ensaio instalado em 13 de junho foram cortadas em 5 de agosto e 17 de setembro de 2014. As plantas instaladas em 15 de julho foram cortadas em 17 de setembro de 2014.

Na data de corte foi estimado o teor de clorofila nas folhas com um medidor portátil SPAD-502 plus. O medidor SPAD-502 mede a transmitância da luz através da folha em dois comprimentos de onda, 650 nm (luz vermelha absorvida pela clorofila) e 940 nm (luz infravermelha praticamente não absorvida pela clorofila). O aparelho dispõe de uma pinça onde se insere o limbo da folha, sendo a luz emitida e recebida em janelas colocadas em lados opostos da pinça. Com base na diferença entre a luz emitida e recebida, o aparelho estima valores adimensionais, diretamente proporcionais à quantidade de clorofila da folha. As medições foram efetuadas em folhas jovens com o limbo completamente expandido, entre as 10 e as 11 h da manhã.

Na data de corte foi também utilizado o medidor Fieldscout CM1000 NDVI, um equipamento que avalia a luz ambiente e a luz refletida pela planta em comprimentos de onda de 660 nm e 840 nm para estimar o seu estado geral. Um sistema de raios laser auxilia a fixar o ponto na folha a partir do qual as leituras são feitas. A clorofila absorve luz a 660 nm, sendo a luz refletida neste comprimento de onda comparada com a luz refletida a 840 nm (não absorvida pela clorofila). Com base na radiação refletida pela folha nos comprimentos de onda referidos, o medidor estima um índice de vegetação muito utilizado em estudos de refletância de cobertos vegetais, o NDVI (Normalized Difference Vegetation Index). Um valor NDVI (-1 a 1) é calculado com base na luz ambiente e refletida de acordo com a expressão (% infravermelho próximo - % vermelho)/(% infravermelho - % vermelho). As medições foram feitas sobre folhas jovens com o limbo completamente expandido, entre as 10 e as 11 h da manhã.

Foi ainda utilizado o medidor da fluorescência das clorofilas OS-30p+. O medidor OS-30p+ é um equipamento versátil para estudar a fluorescência da clorofila, usando protocolos adaptados ao escuro,  $F_v/F_m$ ,  $F_v/F_0$  e parâmetros OJIP.  $F_m$  e  $F_0$  representam a fluorescência máxima e mínima, sendo  $F_v/F_m =$

$(F_m - F_0)/F_m$  e  $F_v/F_0 = (F_m - F_0)/F_0$ . O teste OJIP fornece a fluorescência original a 20  $\mu$ s (O), a fluorescência a 2 ms (J), a fluorescência a 30 ms (I) e a máxima fluorescência ou  $F_m$  (P). As medições com o OS-30p+ fornecem informação sobre a fluorescência do fotossistema II e indiretamente sobre stresses ambientais que o afetam, bem como a assimilação de carbono.

Em cada unidade experimental cortaram-se quatro plantas. As plantas cortadas foram separadas em folhas e caules, secas em estufa regulada a 70°C e pesadas em seco, registrando-se a produção de matéria seca de folhas e caules. Caules e folhas foram posteriormente moídas e submetidas a análise química elementar para azoto, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, cobre, zinco, ferro e manganês.

As amostras de solos foram analisadas usando os métodos em vigor na Unidade de Química Analítica da Escola Superior Agrária de Bragança – Laboratório de Solos: O pH do solo foi avaliado numa suspensão de água e numa suspensão de KCl 1 M, na proporção solo:solução de 1:2,5. O fósforo e o potássio foram avaliados de acordo com o método de Égner-Riehm. O carbono orgânico foi avaliado numa digestão húmida cromo-sulfúrica, de acordo com o método de Walkley-Black e pelo método de incineração para avaliação do teor em C total. O boro do solo foi extraído pelo método de água fervente e determinado pelo método da azometina-H. As bases de troca foram extraídas pelo método do acetato de amónio tamponizado a pH 7. A granulometria foi determinada pelo método da pipeta.

Nos tecidos vegetais o azoto foi determinado pelo método Kjeldahl. Os restantes elementos foram determinados por metodologias padrão num extracto obtido após mineralização nítrica em vaso fechado, num equipamento de micro-ondas. O boro foi determinado pelo método azometina-H após incineração da amostra.

O efeito dos diferentes tratamentos foi sujeito a análise de variância (ANOVA). Quando ocorreram diferenças significativas, as médias foram separadas pelo teste Tukey-Kramer HSD ( $\alpha=0.05$ ).

## RESULTADOS

### *Sobrevivência ao Inverno*

Os ensaios revelaram uma taxa de mortalidade das plantas superior a 95%, não sendo possível regenerar o campo de cultivo na primavera seguinte a partir das plantas do ano anterior. Este resultado determina que esta planta não poderá ser cultivada como perene nesta região. O cultivo da stévia necessitará de plantação anual, com os custos associados à obtenção das plantas e à plantação. É também expectável que o potencial produtivo fique algo comprometido, devido ao processo mais lento de estabelecimento e desenvolvimento das plantas instaladas no próprio ano.

### *Produção de matéria seca*

Os ensaios da Vilarça não mostraram diferenças significativas na produção de matéria seca entre as diferentes doses de azoto, fósforo e potássio ensaiadas (Figura 1). A produção média de matéria seca de folhas variou entre 685 e 1027 kg ha<sup>-1</sup> e a produção de caules variou entre 2813 a 3716 kg ha<sup>-1</sup>.

No ensaio de Bragança, com plantação em 15 de julho e onde se efetuou apenas um corte, a produção de matéria seca variou de forma significativa com a dose de azoto (Figura 2). A produção de folhas variou entre 461 kg ha<sup>-1</sup> no tratamento N0 e 1087 kg ha<sup>-1</sup> no tratamento N2 e a produção de caules variou entre 674 e 1631 kg ha<sup>-1</sup> também entre as modalidades N0 e N2. A produção de matéria seca total (caule + folhas) variou de 1135 a 2719 kg ha<sup>-1</sup> nas modalidades N0 e N2, respetivamente. No ensaio de Bragança, em que se plantou mais cedo e se efetuaram dois cortes a produção total dos dois cortes, envolvendo caules e folhas, diferiu significativamente em função da dose de azoto (Figura 3). Os valores da produção total acumulada variaram de 3917 a 4961 kg ha<sup>-1</sup> respetivamente nos tratamentos N0 e N2. O total de produção de folhas nos dois cortes variou entre 1256 e 1560 kg ha<sup>-1</sup> de matéria seca nos tratamentos N1 e N2 e a produção total de caules variou entre 2622 e 3400 kg ha<sup>-1</sup> nos tratamentos N0 e N2.

### *Análise química elementar*

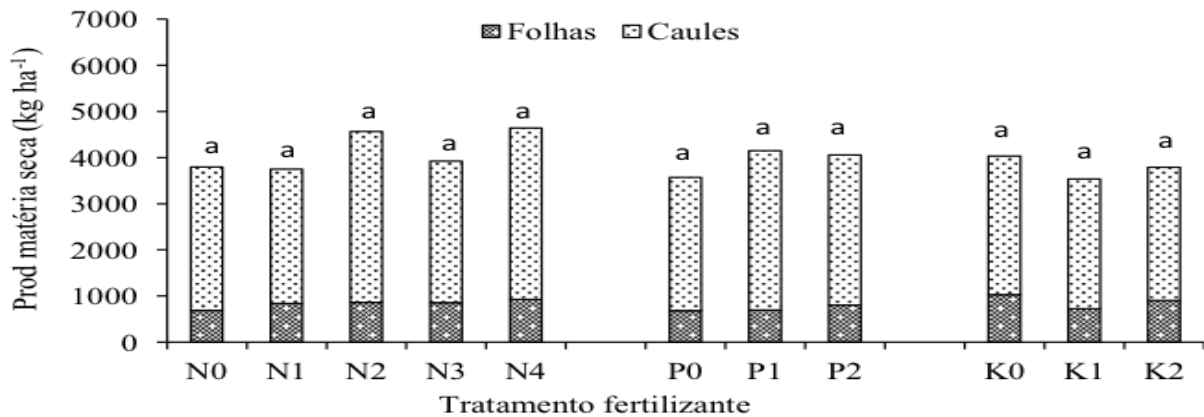
A concentração de azoto nas folhas não variou de forma significativa com a dose de azoto aplicada em qualquer um dos ensaios realizados (Quadro 1). No ensaio da Vilarça os teores médios de azoto nas folhas variaram entre 31,1 e 32,8 g kg<sup>-1</sup>. Em Bragança variaram entre 29,5 e 31,3 g kg<sup>-1</sup> na amostragem de agosto, tendo decrescido nas datas de amostragem seguintes e variando entre 23,7 e 25,3 g kg<sup>-1</sup> na data de amostragem de setembro.

**Quadro 1** - Concentração de azoto nas folhas em plantas de stévia cultivadas no Vale da Vilarça e Bragança em função da dose de azoto aplicada. A experiência de Bragança incluiu duas datas de plantação (D1, 13 de junho; e D2, 15 de julho) e duas datas de corte (C1, 5 de agosto; e C2, 17 de setembro)

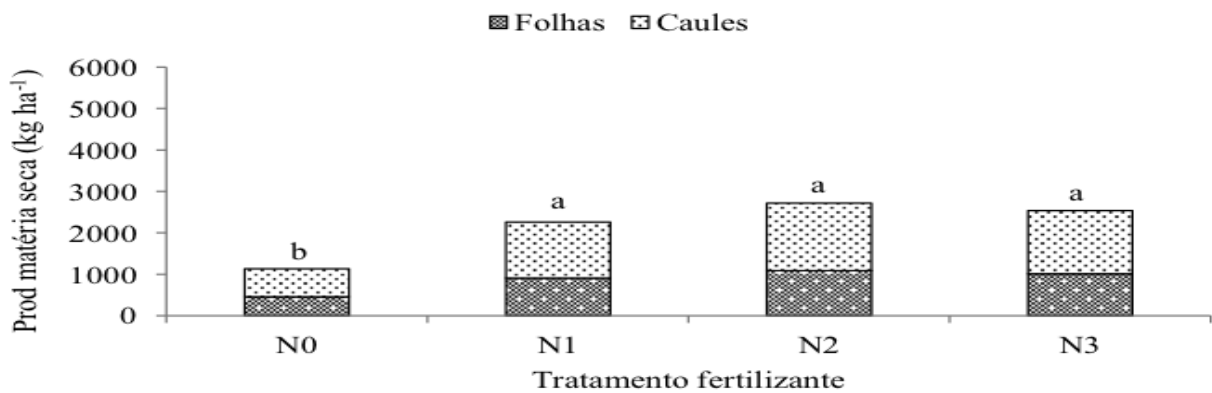
Dose de N (kg ha <sup>-1</sup> )	Vilarça g kg <sup>-1</sup>	Bragança		
		D1C1	D1C2	D2
0	31,1a <sup>†</sup>	29,6a	25,4a	25,1a
25	31,4a			
50	31,7a	29,5a	24,5a	25,3a
100	32,1a	30,5a	24,6a	24,6a
150	32,7a	31,3a	24,9a	24,1a

<sup>†</sup>Nas colunas, médias seguidas da mesma letra não são significativamente diferentes pelo teste Tukey-Kramer HSD ( $\alpha=0,05$ ).

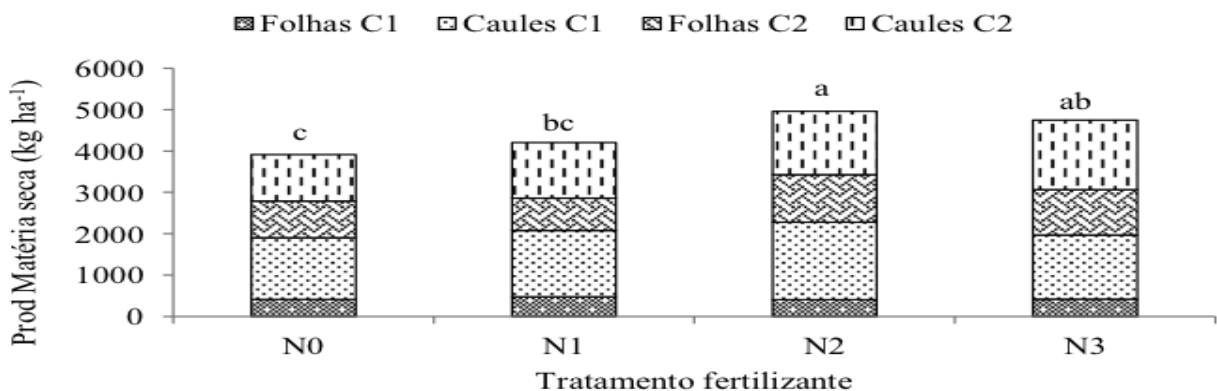
Apesar de não terem sido registadas diferenças significativas na produção de biomassa entre os diferentes tratamentos com fósforo e potássio, registaram-se diferenças significativas na concentração de fósforo e potássio nas folhas (Quadro 2). As concentrações médias de fósforo nas folhas variaram de 1,3 a 1,7 g kg<sup>-1</sup>, respetivamente nas plantas dos tratamentos P0 e P1. As concentrações médias de potássio nas folhas variaram de 14,1 g kg<sup>-1</sup> na modalidade K0 a 21,5 g kg<sup>-1</sup> na modalidade K1.



**Figura 1** - Produção de matéria seca separada entre folhas e caules em resposta à aplicação de diferentes doses de azoto [0 (N0), 25 (N1), 50 (N2), 100 (N3) e 150 (N4) kg N ha<sup>-1</sup>], fósforo [0 (P0), 50 (P1) e 100 (P2) kg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> ha<sup>-1</sup>] e potássio [0 (K0), 50 (K1) e 100 (K2) kg K<sub>2</sub>O ha<sup>-1</sup>] nos ensaios de campo do Vale da Vilaríça. As letras sobre as colunas representam os resultados do teste de comparação de médias (Tukey-Kramer HSD,  $\alpha=0,05$ ) para a matéria seca total (folhas + caules) em análise separada para cada um dos ensaios de azoto, fósforo e potássio.



**Figura 2** - Produção de matéria seca separada entre folhas e caules em resposta à aplicação de diferentes doses de azoto [0 (N0), 50 (N1), 100 (N2) e 150 (N3) kg N ha<sup>-1</sup>] no ensaio de Bragança instalado em 15 de julho e onde se procedeu a apenas um corte em 17 de setembro. As letras sobre as colunas representam os resultados do teste de comparação de médias (Tukey-Kramer HSD,  $\alpha=0,05$ ) para a matéria seca total (folhas + caules).



**Figura 3** - Produção de matéria seca separada entre folhas e caules em resposta à aplicação de diferentes doses de azoto [0 (N0), 50 (N1), 100 (N2) e 150 (N3) kg N ha<sup>-1</sup>] no ensaio de Bragança instalado em 13 de junho e onde se procedeu a dois cortes em 5 de agosto (C1) e 17 de setembro (C2). As letras sobre as colunas representam os resultados do teste de comparação de médias (Tukey-Kramer HSD,  $\alpha=0,05$ ) para a matéria seca total (folhas + caules) dos dois cortes.

**Quadro 2** - Concentração de fósforo e potássio nas folhas em função das doses dos nutrientes aplicados ao solo no ensaio da Vilariça

Dose de P (kg P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ha <sup>-1</sup> )	P nas folhas g kg <sup>-1</sup>	Dose de K (kg K <sub>2</sub> O ha <sup>-1</sup> )	K nas folhas g kg <sup>-1</sup>
0	1,3b <sup>†</sup>	0	14,1b
50	1,7a	50	21,5a
100	1,6a	100	19,8a

<sup>†</sup>Nas colunas, médias seguidas da mesma letra não são significativamente diferentes pelo teste Tukey-Kramer HSD ( $\alpha=0,05$ ).

### Clorofila SPAD, NDVI e fluorescência da clorofila

Não se registraram diferenças significativas nos valores SPAD e NDVI no ensaio de fertilização azotada da Vilariça (Quadro 3). Em Bragança ocorreram diferenças significativas nos valores SPAD entre os tratamentos de fertilização azotada nas duas datas de amostragem. No caso do NDVI, as diferenças só foram significativas nas determinações de 5 de agosto. No ensaio da Vilariça, os valores médios de SPAD variaram entre 56,6 e 60,0. No ensaio de Bragança os valores SPAD variaram entre 46,0 e 52,8 se forem consideradas as duas datas de amostragem. O NDVI variou entre 0,85 e 0,86 no ensaio da Vilariça. Em Bragança registaram-se valores particularmente mais baixos na data de amostragem de 5 de agosto com valores entre 0,77 e 0,81.

**Quadro 3** - Leituras SPAD e NDVI a partir dos ensaios de fertilização azotada do vale da Vilariça e Bragança

N rate (kg ha <sup>-1</sup> )	Vilariça 2014 7 de outubro		Bragança 2014			
	SPAD	NDVI	5 de agosto		13 de setembro	
	SPAD	NDVI	SPAD	NDVI	SPAD	NDVI
0	57.4a <sup>†</sup>	0.85a	45.6c	0.77b	49.1b	0.83a
25	56.6a	0.86a				
50	59.7a	0.86a	47.7b	0.81a	52.7a	0.83a
100	56.6a	0.86 a	47.8b	0.80a	52.7a	0.83a
150	56.9a	0.85a	50.0a	0.81a	52.8a	0.83a

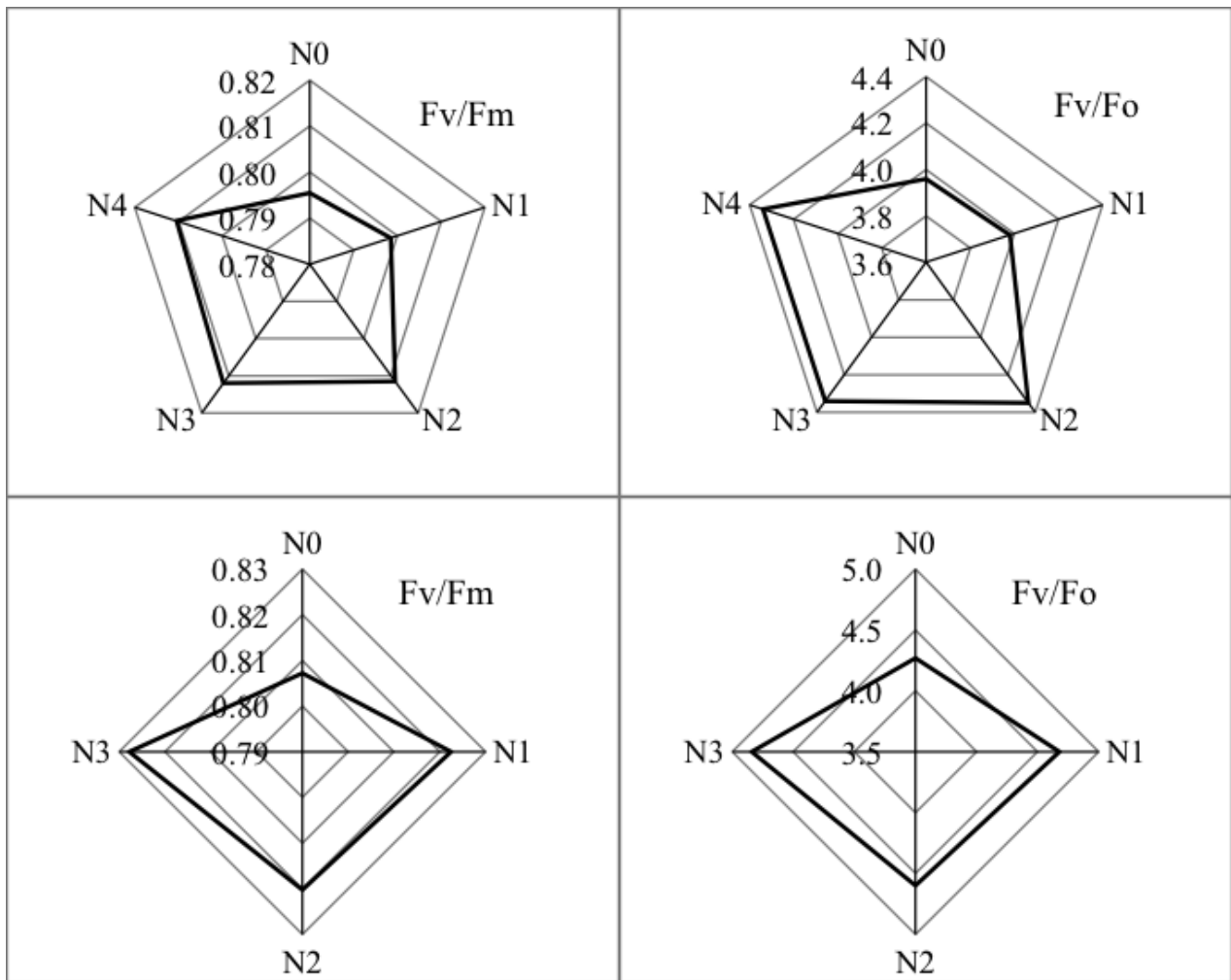
<sup>†</sup>Nas colunas, médias seguidas da mesma letra não são significativamente diferentes pelo teste Tukey-Kramer HSD ( $\alpha=0,05$ ).

Os resultados da fluorescência da clorofila forneceram evidência de redução da máxima eficiência quântica potencial ( $F_v/F_m$ ) e da fluorescência variável normalizada à fluorescência mínima ( $F_v/F_0$ ) nos tratamentos com menor aplicação de azoto relativamente aos correspondentes a doses moderadas e mais elevadas do nutriente (Figura 4).

## DISCUSSÃO

O efeito da fertilização azotada na produção de matéria seca foi apenas significativo nos ensaios de Bragança, tendo a modalidade N0 registado menor produção de matéria seca que as modalidades fertilizadas. Nos ensaios da Vilariça não ocorreu aumento significativo de produção em resposta à aplicação de azoto, fósforo e potássio como fertilizantes. Em estudos anteriores realizados na Índia, Kumar *et al.* (2013) registaram aumentos de produção em modalidades de fertilização orgânica em relação à modalidade testemunha não fertilizada. Pal *et al.* (2015b), em estudos de fertilização realizados também na Índia e envolvendo três localidades, registaram aumentos de produção em resposta à aplicação de doses moderadas de N, P e K. A falta de resposta à aplicação de fertilizantes no ensaio da Vilariça, deve ter-se devido ao facto de se tratar de um solo de aluvião, com boa fertilidade natural, sujeito a alagamento frequente durante o inverno pela subida das águas da ribeira da Vilariça.

Nos ensaios de Bragança ocorreu aumento de produção de matéria seca de folhas e total no regime de dois cortes em comparação com corte único. A produção de folhas ultrapassou 1500 kg ha<sup>-1</sup> quando se fizeram dois cortes e 1000 kg ha<sup>-1</sup> quando se fez apenas um corte. Nas condições referidas a matéria seca total foi respetivamente de ~5000 e 2700 kg ha<sup>-1</sup>. Os resultados encontrados por outros investigadores podem, contudo, ser contraditórios. Na região do Mississipi, Moraes *et al.* (2013) registaram produções mais elevadas em regime de corte simples em comparação com cortes duplo e triplo. No terceiro ano a seguir à plantação, em corte simples registaram 13896 kg ha<sup>-1</sup> de matéria seca total, enquanto com cortes duplos e triplos originaram respetivamente 5385 e 4790 kg ha<sup>-1</sup> de matéria seca total. Em sentido contrário, outros investigadores verificaram que, em regime de



**Figura 4** - Razão da fluorescência variável e máxima fluorescência ( $F_v/F_m$ ) e fluorescência variável normalizada à fluorescência mínima ( $F_v/F_o$ ) em plantas dos diferentes tratamentos fertilizantes (N1, ..., N4) dos ensaios do Vale da Vilariça (radares superiores; registos em 7 de outubro) e Bragança (radares inferiores; registos em 13 de setembro).

corte único, períodos mais longos de crescimento aumentaram a produção de biomassa das folhas e totais (Serfaty *et al.*, 2013; Angelini e Tavarini, 2014). Em concordância com os nossos resultados, Andolfi *et al.* (2006) e Pal *et al.* (2015a) verificaram que regimes de cortes múltiplos originaram maior produção de biomassa comparativamente a corte único. Neste sentido, para Bragança parece ser recomendável alargar a estação de crescimento plantando mais cedo e fazendo dois cortes.

A fertilização azotada não originou aumento na concentração de azoto nas folhas. Este resultado é surpreendente, porque normalmente as plantas

respondem ao aumento da disponibilidade de azoto no solo com aumento da concentração de azoto nos tecidos. Alguns resultados publicados para esta cultura revelam aumento da concentração de azoto nos tecidos em função do azoto aplicado como fertilizante (Barbet-Massim *et al.*, 2015), embora outros investigadores não tenham encontrado diferenças significativas na composição das folhas em resposta à aplicação de azoto (Kumar *et al.*, 2013; Pal *et al.*, 2015a). A concentração de azoto nos tecidos variou entre 31,1 e 32,8 g kg<sup>-1</sup> no ensaio da Vilariça e entre 23,8 e 31,3 g kg<sup>-1</sup> em Bragança, considerando as diferentes datas de corte e modalidades de fertilização. Estes

valores de concentração de azoto nas folhas podem ser considerados elevados em comparação com os que foram registados em outros estudos (Kumar *et al.*, 2013; Barbet-Massim *et al.*, 2015; Pal *et al.*, 2015b), revelando plantas em bom estado nutritivo azotado mesmo na modalidade testemunha, o que pode ajudar a explicar a falta de resposta à fertilização azotada.

Os indicadores SPAD e NDVI foram também pouco sensíveis à variação na aplicação de azoto como fertilizante. Ainda assim a sua sensibilidade à adubação azotada foi superior à análise de tecidos vegetais, já que em algumas situações foram identificadas diferenças significativas entre tratamentos. Sem outros trabalhos publicados sobre o tópico que permitam algum tipo de comparação, parece que estes aspetos devem merecer a melhor atenção em estudos posteriores para se conseguir algum esclarecimento sobre a resposta desta planta à fertilização azotada.

A fluorescência das clorofilas avaliada pelos protocolos  $F_v/F_m$  e  $F_v/F_0$  adaptados ao escuro identificaram uma quebra associada ao tratamento N0. Este resultado parece indicar que a fluorescência das clorofilas foi mais sensível à disponibilidade de azoto no solo ao que a análise química elementar dos tecidos vegetais. Também este aspeto deverá merecer atenção em trabalhos futuros na medida em que estes indicadores não se considerem particularmente sensíveis a carências nutricionais ligeiras ou moderadas em azoto (Baker, 2008).

## CONCLUSÕES

A stévia não suportou o inverno do interior norte de Portugal, apresentando uma mortalidade das plantas muito elevada. Os produtores locais interessados em cultivar esta espécie deverão pensar que terão de a instalar todos os anos como se de uma cultura anual se tratasse. Isto significa que todos os anos terão de preparar novas plantas para a instalação dos campos. Contudo, a produção de biomassa foi bastante aceitável quando comparada com os registos publicados para outras partes do globo. Foi possível obter 4961 kg ha<sup>-1</sup> de matéria seca total, sendo que 1560 kg ha<sup>-1</sup> foram folhas. A stévia apresentou uma resposta fraca à fertilização azotada. Este resultado pode sugerir que boas produções podem ser obtidas com doses baixas ou moderadas de azoto. Contudo, a dificuldade em relacionar a concentração de azoto nas folhas com a performance das plantas vai levantar dificuldades ao nível do estabelecimento dos programas de fertilização para a cultura. Estes aspetos deverão merecer atenção em trabalhos futuros com esta espécie.

## AGRADECIMENTO

Os autores agradecem à Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT, Portugal) e ao FEDER no âmbito do programa PT2020 pelo apoio financeiro ao CIMO (UID/AGR/00690/2013)

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andolfi, L.; Macchia, M. & Ceccarini, L. (2006) – Agronomic productive characteristics of two genotype of *Stevia rebaudiana* in central Italy. *Italia Journal of Agronomy*, vol. 1, n. 2, p. 257-262. <http://dx.doi.org/10.4081/ija.2006.257>
- Angelini, L.G. & Tavarini, S. (2014) – Crop productivity, steviol glycoside yield, nutrient concentration and uptake of *Stevia rebaudiana* Bert. under Mediterranean field conditions. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, vol. 45, n. 19, p. 2577-2592. <http://dx.doi.org/10.1080/00103624.2014.919313>
- Baker, N.R. (2008) – Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. *Annual Review of Plant Biology*, vol. 59, p. 89-113. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092759>
- Barba, F.J.; Criado, M.N.; Belda-Galbis, C.M.; Esteve, M.J. & Rodrigo, D. (2014) – *Stevia rebaudiana* Bertoni as a natural antioxidant/antimicrobial for high pressure processed fruit extract: Processing parameter optimization. *Food Chemistry*, vol. 148, p. 261-267. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.048>



- Barbet-Massin, C.; Giuliano, S.; Alletto, L.; Daydé, J. & Berger, M. (2015) – Nitrogen limitation alters biomass production but enhances steviol glycoside concentration in *Stevia rebaudiana* Bertoni. *PLoS ONE*, vol. 10, n. 77, art. e0133067. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0133067>
- Brandle, J.E.; Starratt, A.N. & Gijzen, M. (1998) – *Stevia rebaudiana*: its agricultural, biological, and chemical properties. *Canadian Journal of Plant Science*, vol. 78, n. 4, p. 527–536. <http://dx.doi.org/10.4141/P97-114>
- Brandle, J.E. & Rosa, N. (1992) – Heritability for yield, leaf:stem ratio and stevioside content estimated from a landrace cultivar of *Stevia rebaudiana*. *Canadian Journal of Plant Science*, vol. 72, n. 4, p. 1263-1266. <http://dx.doi.org/10.4141/cjps92-159>
- Karimi, M.; Ahmadi, A.; Hashemi, J.; Abbasi, A.; Tavarini, S. & Guglielminetti, L. (2015) – The effect of soil moisture depletion on stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) grown in greenhouse conditions: Growth, steviol glycosides content, soluble sugars and total antioxidant capacity. *Scientia Horticulturae*, vol. 183, p. 93-99. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2014.11.001>
- Karimi, M.; Hashemi, J.; Ahmadi, A.; Abbasi, A. & Esfahani, M. (2014) – Study on the bioactivity of steviol and isosteviol in stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni). *Acta Physiologiae Plantarum*, vol. 36, n. 12, p. 3243-3248. <http://dx.doi.org/10.1007/s11738-014-1690-x>
- Kumar, R.; Sharma, S. & Prasad, R. (2013) – Yield, nutrient uptake, and quality of stevia as affected by organic sources of nutrient. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, vol. 44, n. 21, p. 3137-3149. <http://dx.doi.org/10.1080/00103624.2013.832285>
- Kumar, R.; Sharma, S. & Sood, S. (2014) – Yield components, light interception and marker compound accumulation of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) affected by planting material and plant density under western Himalayan conditions. *Archives of Agronomy and Soil Science*, vol. 60, n. 12, p. 1731-1744. <http://dx.doi.org/10.1080/03650340.2014.909029>
- Lankes, C. & Pude, R. (2008) – Possibilities for growth of Stevia in European temperate zones. In: Geuns, J.M.C. (Ed.) – *Steviol glycosides: technical and pharmacological aspects – Proceedings of the 2<sup>nd</sup> Stevia symposium*. p. 103-116. Leuven, Belgium.
- Lorenzo, C.; Serrano-Diaz, J.; Plaza, M.; Quintanilla, C. & Alonso, G.L. (2014) – Fast methodology of analysing major steviol glycosides from *Stevia rebaudiana* leaves. *Food Chemistry*, vol. 157, p. 518-523. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.088>
- Moraes, R.M.; Donega, M.A.; Cantrell, C.L.; Mello, S.C. & McChesney, J.D. (2013) – Effect of harvest timing on leaf production and yield of diterpene glycosides in *Stevia rebaudiana* Bert: a specialty perennial crop for Mississippi. *Industrial Crops and Products*, vol. 51, p. 385-389. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.09.025>
- Morlock, G.E.; Meyer, S.; Zimmermann, B.F. & Roussel, J.-M. (2014) – High-performance thin-layer chromatography analysis of steviol glycosides in Stevia formulations and sugar-free food products, and benchmarking with (ultra) high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, vol. 1350, p. 102-111. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2014.05.016>
- Pal, P.K.; Mahajan, M.; Prasad, R.; Pathania, V.; Singh, K. & Ahuja, P.S. (2015a) – Harvesting regimes to optimize yield and quality in annual and perennial *Stevia rebaudiana* under sub-temperate conditions. *Industrial Crops and Products*, vol. 65, p. 556-564. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.09.060>
- Pal, P.K.; Kumar, R.; Gulerias, V.; Mahajan, M.; Prasad, R.; Pathania, V.; Gill, B.S.; Singh, D.; Chand, G.; Singh, B.; Singh, R.D. & Ahuja, P.S. (2015b) – Crop-ecology and nutritional variability influence growth and secondary metabolites of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *BMC Plant Biology*, vol. 15, art. 67. <http://dx.doi.org/10.1186/s12870-015-0457-x>
- Serfaty, M.; Ibdah, M.; Fischer, R.; Chaimovitch, D.; Saranga, Y. & Dudai, N. (2013) – Dynamics of yield components and stevioside production in *Stevia rebaudiana* grown under different planting times, plant strands and harvest regime. *Industrial Crops and Products*, vol. 50, p. 731-736. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.08.063>
- Woelwer-Rieck, U.; Lankes, C.; Wawrzun, A. & Wüst, M. (2010) – Improved HPLC method for the evaluation of the major steviol glycosides in leaves of *Stevia rebaudiana*. *European Food Research and Technology*, vol. 231, n. 4, p. 581-588. <http://dx.doi.org/10.1007/s00217-010-1309-4>