

PAULINE ZONTA DE LIMA

ESTUDOS AGRONÔMICOS, DIVERSIDADE QUÍMICA E GENÉTICA DE *Justicia pectoralis* Jacq.

Botucatu

2021

PAULINE ZONTA DE LIMA

ESTUDOS AGRONÔMICOS, DIVERSIDADE QUÍMICA E GENÉTICA DE *Justicia pectoralis* Jacq.

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da Unesp Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Agronomia (Horticultura).

Orientadora: Dr^a Ana Maria Soares Pereira
Coorientadora: Dr^a Bianca Waléria Bertoni

Botucatu

2021

L732e

Lima, Pauline Zonta de

Estudos agronômicos, diversidade química e genética de *Justicia pectoralis* Jacq. / Pauline Zonta de Lima. -- Botucatu, 2021

70 p. : tabs., fotos, mapas

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrônomicas, Botucatu

Orientadora: Ana Maria Soares Pereira

Coorientadora: Bianca Waléria Bertoni

1. Plantas medicinais - cultivo. 2. Cumarina. 3. Umbeliferona. 4. Acanthaceae. 5. Chambá. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrônomicas, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: ESTUDOS AGRONÔMICOS, DIVERSIDADE QUÍMICA E GENÉTICA DE *Justicia pectoralis* Jacq.

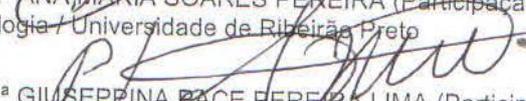
AUTORA: PAULINE ZONTA DE LIMA

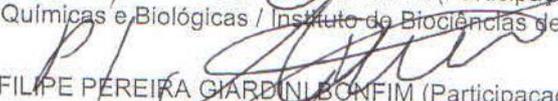
ORIENTADORA: ANA MARIA SOARES PEREIRA

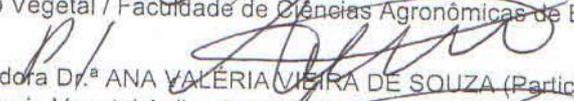
COORIENTADORA: BIANCA WALERIA BERTONI

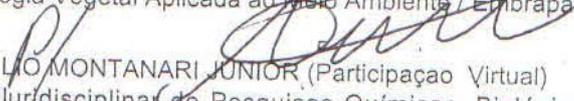
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em AGRONOMIA (HORTICULTURA), pela Comissão Examinadora:


Prof.ª Dr.ª ANA MARIA SOARES PEREIRA (Participação Virtual)
Biotecnologia / Universidade de Ribeirão Preto


Prof.ª Dr.ª GIUSEPPINA PACE FERREIRA LIMA (Participação Virtual)
Ciências Químicas e Biológicas / Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP


Prof. Dr. FILIPE PEREIRA GIARDINI BONFIM (Participação Virtual)
Produção Vegetal / Faculdade de Ciências Agronômicas de Botucatu - UNESP


Pesquisadora Dr.ª ANA VALÉRIA VIEIRA DE SOUZA (Participação Virtual)
Biotecnologia Vegetal Aplicada ao Meio Ambiente / Embrapa Semi Árido


Prof. Dr. ILHO MONTANARI JUNIOR (Participação Virtual)
Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agropecuárias / Universidade Estadual de Campinas

Botucatu, 18 de junho de 2021

AGRADECIMENTOS

A Deus pela presença constante em minha vida, por todas oportunidades que me foram concedidas e forças para minha jornada.

Aos meus pais e irmão, por me incentivarem e confiarem em minhas escolhas, encorajando-me a seguir meu caminho.

A minha companheira Joice pela compreensão, apoio nas horas mais difíceis e sobretudo pelas alegrias e amor.

A Prof^a Dr^a Ana Maria Soares Pereira pela orientação, paciência e pelo exemplo de dedicação, caráter e honestidade. Aprendi e cresci muito com suas contribuições em minha vida pessoal e profissional. Agradeço imensamente!

A professora Prof^a Dr^a Bianca Waléria Bertoni, pela coorientação, auxílio, aprendizado e assistência dispensados durante toda a realização do trabalho.

Aos professores membros da banca de defesa, Prof^a Dr^a Giuseppina Pace P. Lima, Prof^a Dr^a Ana Valéria V. Souza e Prof^a Dr. Ilio Montanari Junior, Prof^a Dr. Filipe Pereira G. Bonfim, por dedicarem seu precioso tempo na leitura deste trabalho, contribuindo com meu aprendizado.

Aos amigos de longa data e os conquistados durante a pós-graduação, em especial Gustavo, Juliana, Marielle e Lucas, pelo apoio, amizade, partilha de inúmeros momentos de alegria e trabalho, meu muito obrigada.

Aos amigos do Viveiro de mudas e funcionários da Terra de Ismael, que auxiliaram a condução do experimento em Jardinópolis, obrigada pelos infindáveis ensinamentos que me ajudaram a superar percalços ao longo de minha jornada.

A todos os professores e funcionários da UNESP, em especial o departamento de Agronomia (Horticultura) pelo auxílio e por contribuir em minha formação, além da oportunidade de executar o doutorado.

A UNAERP, representada na pessoa da Dr.^a Suzelei de Castro França, pela oportunidade e todo suporte para o desenvolvimento deste trabalho.

A todos, que direta e indiretamente, colaboraram de alguma forma com o trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

Justicia pectoralis é uma espécie medicinal nativa do Brasil, amplamente utilizada por comunidades tradicionais, conhecida como chambá, produz cumarina e umbeliferona as quais são responsáveis pelas atividades anti-inflamatórias, antiasmáticas e redução de edemas. A produção e acúmulo de cumarinas em plantas são influenciados por estágio de crescimento, fatores genéticos, ontogenéticos, sazonalidade, processo de secagem, entre outros. Considerando que a espécie *J. pectoralis* é utilizada amplamente no Brasil na produção de fitoterápicos, os objetivos deste trabalho foram: avaliar o efeito da época de colheita e rebrota quanto à produtividade de massa de parte aérea fresca e seca, teor de cumarinas nas partes aéreas, além de avaliar a variabilidade genética de indivíduos utilizados para fins medicinais. Os experimentos foram realizados em campo a partir de um único clone, o qual foi multiplicado por estacas. Os dados foram coletados a partir de plantas cultivadas por 3, 6, 9 e 12 meses e as colheitas das plantas que rebrotaram foram realizadas a cada três meses, ao longo de doze meses. As análises de quantificação e identificação das cumarinas foram realizadas utilizando CLAE (Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência) e CLUE (Cromatógrafo Líquido de Ultra Eficiência). A variabilidade genética foi avaliada por marcador molecular SCoT (Start Codon Targeted). Os resultados mostraram que a produção de cumarinas e desenvolvimento de *J. pectoralis* foi influenciada pela sazonalidade. A maior produtividade e teor de cumarina em plantas cultivadas por um ano ocorreu no verão, estação que apresentou maior índice pluviométrico. Quanto à análise genética, os 15 *primers* utilizados geraram 204 bandas, sendo 95 polimórficas. A similaridade genética entre os indivíduos foi de 75% e a análise por UPGMA agrupou os indivíduos em 3 grupos distintos. Além disto, houve a formação de três grupos gênicos. A altura da planta e o número de gemas foram as características morfométricas que mais contribuíram na diferenciação entre os genótipos avaliados. Quanto ao teor de cumarina e umbeliferona, os genótipos foram classificados em três grupos com teores alto, médio e baixo, e houve uma correlação positiva entre as cumarinas analisadas.

Palavras-chave: acanthaceae; cumarina; marcador molecular; umbeliferona.

ABSTRACT

Justicia pectoralis is a medicinal specie native from Brazil, widely used by traditional communities, known as chambá, produces coumarin and umbelliferone, that are responsible for anti-inflammatory, antiasthmatic and edema reduction activities. Coumarin production and accumulation in plants in general are influenced by growth stage, genetic, ontogenetic factors, seasonality, drying process, among others. Considering that the *J. pectoralis* species is widely used in Brazil in the production of herbal medicines, the objectives of this work were: to evaluate the effect of the harvest and regrowth time on fresh and dry aerial part mass yield, coumarins content present in the aerial parts, in addition to evaluating the genetic variability of individuals used for medicinal purposes, as well as the morphometric aspects and contents of coumarins. The experiments were carried out in the field with a single clone which was multiplied by cuttings. The data were collected from plants grown for 3, 6, 9 and 12 months and the harvesting of the plants that sprouted was carried out every three months, by twelve months. The coumarin quantification and identification analyzes were performed by using HPLC (High Performance Liquid Chromatography) and UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography). Genetic variability was assessed by a SCoT marker (Start Codon Targeted). The results showed that the coumarin production and development of *J. pectoralis* is influenced by seasonality. The highest productivity and coumarin content in plants cultivated for one year occurred in the summer, which is the season that showed the highest rainfall. As for genetic analysis, the 15 fifteen *primers* used generated 204 bands, 95 of which were polymorphic. The genetic similarity between the individuals was 75% and the UPGMA analysis grouped the individuals into 3 distinct groups. In addition, three gene groups were formed. The plant height and the budsnumber were the morphometric characteristics that most contributed to the differentiation between the evaluated genotypes. As for the content of coumarin and umbelliferone, the genotypes were classified into three groups with high, medium and low levels, and there was a positive correlation between the coumarins analyzed.

Keywords: acanthaceae; coumarin; molecular marker; umbelliferone.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Morfologia de <i>Justicia pectoralis</i> : (A) visão da planta toda; (B) folha lado abaxial; (C) folha lado adaxial; (D) flor; (E) inflorescência; (F) caule	21
Figura 2 - Dados de temperatura e precipitação na região de Jardinópolis de janeiro de 2019 a abril de 2020 e meses de colheita de <i>Justicia pectoralis</i>	28
Figura 3 - Mapa contendo os municípios onde foi coletado os materiais de <i>Justicia pectoralis</i>	31
Figura 4 - Crescimento e presença de inflorescência durante (A) 3 meses, (B) 6 meses, (C) 9 meses e (D) 12 meses de cultivo de <i>Justicia pectoralis</i>	40
Figura 5 - Clusters UPGMA (método de grupo de par não ponderado com média aritmética) gerados em <i>Justicia pectoralis</i> com base em marcadores SCoT	45
Figura 6 - Gráfico de dispersão de análise em coordenadas principais (PCoA) de 8 amostras de <i>Justicia pectoralis</i> com base no marcador SCoT.....	46
Figura 7 - Análise Bayesiana realizada com o <i>software</i> STRUCTURE de oito acessos de <i>Justicia pectoralis</i> com base em marcador SCoT.....	47
Figura 8 - Plantas de acessos <i>Justicia pectoralis</i> após a colheita do experimento	49
Figura 9 - Correlação linear entre o acúmulo de cumarina e umbeliferona (mg/g de peso seco) nos acessos de <i>Justicia pectoralis</i>	51
Figura 10 - Classificação de oito acessos de <i>Justicia pectoralis</i> , cultivados em casa de vegetação, de acordo com os níveis de cumarina e umbeliferona, compreendendo baixo, médio e alto produtores	52
Figura 11 - Curva de calibração de cumarina utilizada nos experimentos de <i>Justicia pectoralis</i>	67
Figura 12 - Curva de calibração de umbeliferona utilizada nos experimentos de <i>Justicia pectoralis</i>	67
Figura 13 - Cromatogramas obtidos por CLUE-DAD-EM dos padrões umbeliferona (a), espectro de massa e UV(a1) e cumarina (b),	

espectro de massa e UV (b1) e extratos de parte aérea do material de Feijó (c).....	68
--	-----------

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Compostos isolados de <i>Justicia pectoralis</i> e suas respectivas partes da planta utilizadas	23
Tabela 2 - Localização, coordenadas geográficas e altitudes dos acessos de <i>Justicia pectoralis</i>	30
Tabela 3 - <i>Primers</i> do marcador molecular SCOT, sequências sugeridas.....	33
Tabela 4 - Efeito da época de colheita na altura e diâmetro de crescimento da parte aérea (cm), presença de inflorescência (%), massa de parte aérea fresca e seca (g) e teor de cumarina e umbeliferona (mg/g de peso seco) em parte aérea de <i>Justicia pectoralis</i> cultivada por 3, 6, 9 e 12 meses	38
Tabela 5 - Efeito da rebrota sobre altura e diâmetro de crescimento da parte aérea (cm), presença de inflorescência (%), massa de parte aérea fresca e seca (g) e teor de cumarina e umbeliferona (mg/g de peso seco) em parte aérea de <i>Justicia pectoralis</i>	42
Tabela 6 - <i>Primers</i> do marcador molecular SCoT utilizados no presente estudo e a extensão dos polimorfismos de <i>Justicia pectoralis</i>	44
Tabela 7 - Matriz de similaridade genética entre oito acessos de <i>Justicia pectoralis</i> obtida pelo coeficiente de Jaccard com base em marcador SCoT	46
Tabela 8 - Altura da parte aérea (cm), diâmetro do caule (mm), número de folhas, gemas e ramos, massa de parte aérea fresca e seca (g), comprimento de raiz (cm), massa de raiz fresca e seca (g) e teor de cumarina e umbeliferona (mg/g de peso seco) de oito genótipos de <i>Justicia pectoralis</i> cultivados em casa de vegetação	50
Tabela 9 - Variância acumulada (%) e autovetores para o primeiro (CP1) e segundo (CP2) componente principal para seis descritores morfológicos de genótipos de <i>Justicia pectoralis</i>	52
Tabela 10 - Resumo da análise de variância para a época de cultivo na altura da parte aérea (APA), diâmetro de crescimento da parte aérea (DCPA), presença de inflorescência (PI), massa de parte aérea fresca (MPAF), massa de parte aérea seca (MPAS), teores de cumarinas (CUM) e	

umbeliferona (UMB) em *Justicia pectoralis* cultivadas por 3, 6, 9 e 12 meses..... 69

Tabela 11 - Resumo da análise de variância para a rebrota na altura da parte aérea (APA), diâmetro de crescimento da parte aérea (DCPA), presença de inflorescência (PI), massa de parte aérea fresca (MPAF), massa de parte aérea seca (MPAS), teores de cumarinas (CUM) e umbeliferona (UMB) em *Justicia pectoralis* 69

Tabela 12 - Resumo da análise de variância para altura da parte aérea (APA), diâmetro do caule (DC), número de folhas (NF), número de gemas (NG), número de ramos (NR), massa de parte aérea fresca (MPAF), massa de parte aérea seca (MPAS), massa de raiz fresca (MRF), massa de raiz seca (MRS), comprimento de raiz (CR), teores de cumarinas (CUM) e umbeliferona (UMB) de oito genótipos de *Justicia pectoralis* cultivados em casa de vegetação 70

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1	A espécie <i>Justicia pectoralis</i>	19
2.2	Cultivo e produção de <i>Justicia pectoralis</i>	22
2.3	Compostos isolados de <i>Justicia pectoralis</i>	22
2.4	Diversidade genética de plantas medicinais.....	24
2.5	Marcador molecular.....	25
2.6	SCoT (Start Codon Targeted)	26
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1	Material vegetal.....	28
3.2	Experimento de época de colheita.....	29
3.3	Experimento de rebrota	29
3.4	Experimento de análise da diversidade genética	30
3.5	Extração do DNA	32
3.6	Análise SCoT (Star Codon Targeted).....	33
3.7	Análise de cumarina e umbeliferona em <i>Justicia pectoralis</i> por CLAE-DAD e CLUE-DLD-EM	34
3.7.1	Preparo das amostras	34
3.7.2	Quantificação de cumarina e umbeliferona por CLAE-DAD	34
3.7.3	Identificação de cumarina e umbeliferona em CLUE-DAD-EM	35
3.8	Análise estatística	36
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1	Experimento de época de colheita.....	38
4.2	Experimento de rebrota	42
4.3	Experimento de análise da diversidade genética.	43
5	CONCLUSÃO.....	54
	REFERÊNCIAS.....	55
	APÊNDICE A - Curvas de calibração	67
	APÊNDICE B - Cromatograma obtido por CLUE-DAD-EM	68
	APÊNDICE C - Resumo das análises de variância (ANOVA)	69

1 INTRODUÇÃO

Justicia pectoralis Jacq. é uma espécie medicinal nativa do Brasil, conhecida como chambá e tilo, amplamente utilizada por comunidades tradicionais da América do Sul e Ilhas Caribenhas (ZULOAGA et al., 2008; PROFICE et al., 2015).

Em estudos etnofarmacológicos destaca-se a utilização da espécie para tratamento de enfermidades como ansiedade, asma, erupções cutâneas alérgicas, hipertensão, resfriado, tosse, entre outras (AGRA et al., 2007; TENE et al., 2007). Ensaio pré-clínicos comprovaram as atividades antiasmática, anti-inflamatória e expectorante (LEAL et al., 2000; MOURA et al., 2017). No Brasil, essa espécie é utilizada principalmente na produção de xarope para tosse (MATOS, 1994, OLIVEIRA et al., 2012; PEREIRA et al., 2015; PEREIRA et al., 2020).

Essas aplicações medicinais da espécie estão relacionadas às atividades biológicas atribuídas a cumarina e umbeliferona (TOWERS, 1984; VRIES et al., 1988; MACRAE; LINO et al., 1997), sendo que, o composto cumarina é o marcador químico da espécie utilizado no controle de qualidade de fitoterápicos obtidos a partir de *Justicia pectoralis* (BRASIL, 2019).

A produção de medicamento fitoterápico de *Justicia pectoralis*, em larga escala, é limitada por várias lacunas do conhecimento a respeito da espécie. Dentre elas, o fato de não haver estudo sobre a diversidade química e genética da planta. Além disto, os teores de cumarinas podem ser influenciados pela sazonalidade, clima, intensidade luminosa, genótipo e processo de secagem (BERTOLUCCI et al., 2013; MERT et al., 2013; AGOSTINI-COSTA et al., 2016; BORGHI et al., 2019; PASSARIA et al., 2019). A consequência disso é que cada genótipo utilizado para produzir medicamento em programas de saúde no Brasil pode apresentar teores diferentes de cumarinas e, com isto, as respostas terapêuticas podem variar, comprometendo o restabelecimento da saúde de pacientes que fazem uso de medicamentos fitoterápicos produzidos a partir dessa espécie.

Uma alternativa para mudar essa realidade é o cultivo de plantas medicinais a partir de metodologia eficiente de produção, considerando fatores ambientais e genéticos que garantam a qualidade e eficácia dos fitoterápicos produzidos a partir da espécie (RUTKOWSKA et al., 2020). Ademais, a caracterização da variação genética e química de genótipos de *Justicia pectoralis* utilizados em programas de saúde é

importante para a utilização eficiente e racional desse recurso genético disponível nesses programas.

A análise da diversidade genética na atualidade é realizada principalmente por marcadores moleculares. Estes permitem ampla avaliação genética de populações naturais, sendo o Start Codon Targeted (SCoT) uma ótima opção por ser um marcador dominante, que pode ser usado na seleção de indivíduos elite em programas de melhoramento de culturas.

O marcador SCoT tem sido utilizado na análise da estrutura genética de populações em avaliações de diversidade genética, filogenética e *fingerprinting* (COLLARD; MACKILL, 2009; GORJI et al., 2011). Também tem sido útil para o manejo efetivo de recursos genéticos, rastreamento e reconstrução da história de reprodução dos genótipos domesticados, permitindo enriquecer programas de melhoramento genético com acessos que apresentem maior adaptabilidade e resistência a pragas e doenças (SATYA et al., 2015).

A associação da técnica de marcadores moleculares com técnicas analíticas de quantificação dos metabólitos secundários de interesse farmacológico tem contribuído para ampliação de programas de conservação de germoplasmas de plantas medicinais (CONDE et al., 2012; HONÓRIO et al., 2018; TAJBAKHTA et al., 2018).

Considerando que a espécie *Justicia pectoralis* é utilizada no Brasil por vários grupos étnicos na produção de fitoterápicos, os objetivos deste trabalho foram avaliar o efeito da época de colheita e rebrota quanto à produtividade de massa de parte aérea fresca e seca, teor de cumarinas presentes nas partes aéreas, além de avaliar a variabilidade genética de indivíduos utilizados para fins medicinais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A espécie *Justicia pectoralis*

Justicia pectoralis pertence à família Acanthaceae, que possui 498 espécies, agrupadas em 48 gêneros (BRAZ et al., 2020), sendo o gênero *Justicia* o que compreende o maior número de espécies dentro desta família: 154 espécies com 93 endêmicas no Brasil (CHAGAS; COSTA-LIMA, 2020). Sua distribuição abrange a América Tropical (TROPICOS, 2017) e no Brasil ocorre nos biomas Amazônia, Cerrado e Mata Atlântica, nos estados do Acre, Alagoas, Amazonas, Ceará, Goiás, Pará, Paraíba, Paraná, Pernambuco, Rio de Janeiro, Rondônia, Roraima, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Santa Catarina e Sergipe (PROFICE et al., 2015).

Espécie: *Justicia pectoralis* Jacq. var. *stenophylla* Leonar.

Sinonímia: *Dianthera pectoralis* (Jacq.) J.F. Gmel.

Dianthera pectoralis (Jacq.) Murray

Ecbolium pectorale (Jacq.) Kuntze

Psacadocalymma pectorale (Jacq.) Bremek.

Rhytiglossa pectoralis (Jacq.) Nees

Stethoma pectoralis (Jacq.) Raf.

Classe: Equisetopsida C. Agardh

Subclasse: Magnoliidae Novák ex Takht.

Superordem: Asteranae Takht.

Ordem: Lamiales Bromhead

Família: Acanthaceae Juss.

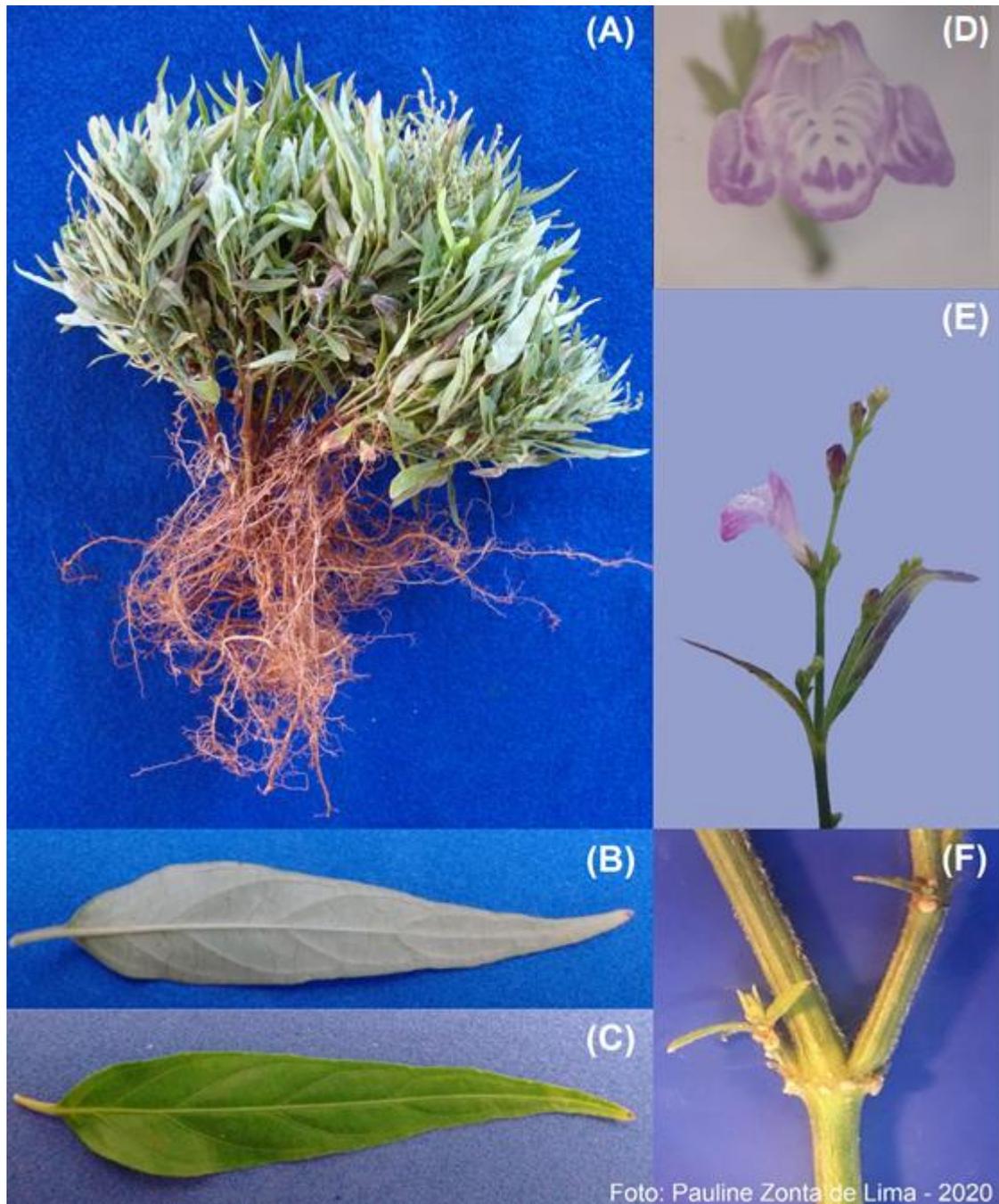
Gênero: *Justicia* L.

Fonte: TROPICOS (2017)

A espécie *Justicia pectoralis* é herbácea, perene de aproximadamente 30 cm de altura (Figura 1), com caule verde em formato subcilíndrico a subquadrangular com entrenós de 2 a 4,5 cm. O caule apresenta ainda tricomas retrorsos e esbranquiçados dispostos em linhas verticais. Possui raiz fasciculada e pode apresentar raízes adventícias em gemas axilares inferiores. As folhas são membranáceas e opostas, de

coloração verde, que podem, no entanto, apresentar pigmentação vinácea. Elas apresentam formato oval lanceolada, a lâmina foliar adulta mede em torno de 3 cm de comprimento e 0,3 mm de espessura, apresenta tricomas tectores nas nervuras e margens, além disso o pecíolo mede cerca de 5,0 mm de comprimento (DURKEE, 1986; EZCURRA, 2002; AOYAM; INDRIUNAS, 2014). A inflorescência paniculada terminal apresenta entre 6 e 15 cm de comprimento, podendo ser alternada ou oposta, com flores séssil e axial. O cálice é puberulento de coloração verde claro. A corola tem coloração que varia de lilás a violeta, personada, zigomorfa e monóica, com 6 a 7,5 mm de comprimento, tubo reto, lábio superior ereto, triangular, com o inferior 3-lobado, externamente pubérulo. Possui dois estames parcialmente adnatos ao tubo da corola. As anteras são rimosas e o ovário é bicarpelar, bilocular, supero e oblongo, contendo dois óvulos por lóculo. A floração ocorre no período seco do inverno (DURKEE, 1986; EZCURRA, 2002; WASSHAUSEN; WOOD, 2004). Não há informações quanto a reprodução sexuada da espécie, embora algumas espécies no gênero *Justicia* sejam auto compatíveis, a grande maioria é alógama devido à protandria (ENDRESS, 1994).

Figura 1 – Morfologia de *Justicia pectoralis*: (A) visão da planta toda; (B) folha lado abaxial; (C) folha lado adaxial; (D) flor; (E) inflorescência; (F) caule



2.2 Cultivo e produção de *Justicia pectoralis*

A produção de mudas de *J. pectoralis* comumente é realizada por estaca, que pode ser realizada por ramos medianos sem folhas contendo de 4 a 5 gemas, com o substrato Plantmax® em bandejas com 128 células (FERREIRA et al., 2015). Em relação à produção de mudas através de cultura de tecidos, o mais indicado é a utilização de meio MS com adição de BAP em concentração até 20 µM (FREITAS et al., 2016).

Quanto à adubação, diferentes fontes de adubos foram avaliadas no cultivo de *J. pectoralis* (orgânico, mineral e sem adubação), sendo que a adubação orgânica, com esterco de galinha, favoreceu a maior absorção de N, P, K pela planta e a adubação orgânica-mineral promoveu maior acúmulo de massa seca (VIEIRA et al., 2019). Além disso, a adubação mineral isolada não favorece o crescimento da planta (BEZERRA et al., 2006; REZENDE et al., 2020).

Experimentos realizados por Lima (2018) com diferentes doses de adubação orgânica (esterco bovino) e níveis de saturação do solo (calagem) em *J. pectoralis*, mostraram que estes tratamentos não aumentaram o teor de cumarina quando comparados à testemunha e que a espécie acumula maior teor desse metabólito quando cultivada a pleno sol.

Preparações homeopáticas com *Arnica montana* até 30CH influenciaram negativamente a produção de cumarina, e dinamizações de 60CH e 100CH favoreceram o acúmulo do composto, sendo o maior teor registrado no tratamento com 100CH (ANDRADE et al., 2012a). O uso de isoterápico de *J. pectoralis* em diluição 30CH promoveu significativo crescimento vegetativo das plantas e na dinamização 6CH aumentou o teor de cumarina (ANDRADE et al., 2012b).

2.3 Compostos isolados de *Justicia pectoralis*

Vários metabólitos secundários foram isolados de *J. pectoralis* como cumarinas, esteroides, flavonoides e lignana (Tabela 1).

Tabela 1 - Compostos isolados de *Justicia pectoralis* e suas respectivas partes da planta utilizadas

Parte da planta	Substâncias Isoladas	Referencia
Folhas	1,2-benzopirona (Cumarina)	(MACRAE; TOWERS, 1984; OLIVEIRA, 2000)
	7-hidroxycumarina (Umbeliferona)	(MACRAE; TOWERS, 1984; OLIVEIRA, 2000)
	Estigmasterol	(OLIVEIRA, 2000)
	β -sitosterol	(OLIVEIRA, 2000)
	β -amirina	(OLIVEIRA, 2000)
	Quercetina	(OLIVEIRA, 2000)
	Kaempferol	(OLIVEIRA, 2000)
Parte aérea	1,2-benzopirona (Cumarina)	(VRIES et al., 1988; LIMA et al., 2020)
	7-hidroxycumarina (Umbeliferona)	(VRIES et al., 1988; LIMA et al., 2020)
	7-metoxicumarina (Herniarina)	(VRIES et al., 1988)
	Dihidrocumarina	(VRIES et al., 1988)
	3-isocromanona	(VRIES et al., 1988)
	Ácido-3-fenilpropiónico (Ácido hidrocínâmico)	(VRIES et al., 1988)
Planta toda	Swertisina	(JOSEPH et al., 1988)
	2"-O-ramnosilswertisin	(JOSEPH et al., 1988)
	Swertiajaponia	(JOSEPH et al., 1988)
	2"-O-ramnosilswertiajaponina	(JOSEPH et al., 1988)
	Justicidina B	(JOSEPH et al., 1988)

A espécie *J. pectoralis* produz cumarina e umbeliferona, sendo esse o marcador químico da espécie e muitas das suas atividades biológicas são atribuídas à presença destes dois compostos (MACRAE; TOWERS, 1984; VRIES et al., 1988).

A cumarina e a umbeliferona são substâncias que apresentam atividades aleloquímica, antiviral, antimicrobiana e anti-inflamatória (ZOBEL; BROWN, 1990; AL-MAJEDY et al., 2017; MISHRA et al., 2020). A presença de cumarina em *J. pectoralis* confere benefício sobre o tecido conjuntivo, na modulação da inflamação e na redução de edemas. Quanto a umbeliferona os principais efeitos são: ação anti-inflamatória, antinociceptiva e hipoglicemiante, por inibir os mediadores da dor, tanto de ação

periférica quanto central (LEAL et al., 2000; VASCONCELOS et al., 2009; CAMERON et al., 2015). Ademais, estas substâncias reduzem o número de eosinófilos em lavado broncoalveolar de animais asmáticos, a produção de muco e a inflamação pulmonar em vias aéreas submetidas a modelo de inflamação induzida pela administração de ovalbumina em camundongos (RAMESH; PUGALENDI 2006; VASCONCELOS et al., 2009; RAUF et al., 2014).

As substâncias cumarina e umbeliferona, na generalidade, não apresentam toxicidade em humanos, com exceção quando ingeridas em altas doses por pessoas que apresentam baixa produção do citocromo 2A6 (CYP2A6). Nesses pacientes pode ocorrer hepatotoxicidade pela deficiência que apresentam em catalisar a oxidação da cumarina em 7-hidroxicumarina (umbeliferona), a qual é eliminada pela urina (YARNELL; ABASCAL, 2009; GARG et al., 2020).

2.4 Diversidade genética de plantas medicinais

A diversidade genética nada mais é do que a amplitude de variação gênica em determinada espécie ou população, proporcionando a identificação de características distintas presentes nestes indivíduos (SALOMÃO, 2010). Estas características contribuem para que haja respostas favoráveis às mudanças ambientais e evita deriva genética (BOREM; FRITSCHÉ-NETO, 2012).

O processo de conservação das espécies visa a preservação de indivíduos que detenham determinadas características (genes) de importância para a manutenção da diversidade e com isso possa contribuir para programas de melhoramento genético (AGUIAR et al., 2008).

Vários fatores colaboram para a perda de biodiversidade, entre eles estão a fragmentação do habitat, propagação vegetativa e polinização escassa, os quais limitam as trocas gênicas (LEE et al., 2018; CARVALHO et al., 2019). Materiais que se propagam vegetativamente, ou seja, multiplicam-se sem a necessidade do ciclo reprodutivo, diminuem a diversificação genética aumentando a homogeneização gênica ao longo do tempo (HONNAY; BOSSUYT, 2005; YUAN et al., 2010). A polinização tem influência direta na distribuição espacial dos indivíduos, dentro e entre populações, e quando esta ocorre de forma cruzada há um maior polimorfismo na espécie (FRANZON et al., 2010). Além da polinização é importante considerar a filogenia, quando o assunto é diversidade genética. Dentro desse contexto, há estudos

com algumas famílias de plantas como por exemplo *Caesalpinioideae*, que mostram a diversificação de espécies ocorrendo de modo mais recente em ambientes abertos e secos como Caatinga e Cerrado, quando comparado com habitats florestais mais densos e úmidos como as Florestas Amazônica e Atlântica (SOUZA-NETO et al., 2015; CARVALHO et al., 2019).

2.5 Marcador molecular

Bem antes da utilização dos marcadores moleculares surgirem, os marcadores morfológicos eram utilizados para diferenciar e caracterizar grupos gênicos, quanto à diversidade através de descritores quantitativos, bem como as características fenotípicas de fácil visualização como cor de pétala, morfologia foliar ou espaçamento entre nós (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Contudo, os marcadores morfológicos apresentam limitações em relação aos efeitos do ambiente, que podem provocar mudanças na estrutura da planta. De modo geral, são utilizados em plantas adultas o que torna necessário mais tempo e espaço físico para as análises, além disso, nem sempre são adequados para distinguir cultivares comerciais (SMITH; SMITH, 1992; PECCHIONI et al., 1996).

Os marcadores moleculares surgiram para diferenciar a nível genético o polimorfismo entre os indivíduos de uma mesma população ou grupo, ou seja, diferenças gênicas que podem ou não ser expressas (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; MILACH, 1998).

É importante ressaltar que a escolha do marcador molecular deve levar em conta fatores como: o objetivo do estudo a ser realizado, os recursos financeiros disponíveis, a infraestrutura do laboratório, disponibilidade de recursos humanos treinados e o nível de conhecimento da técnica e do material utilizado (GUIMARAES et al., 2009).

Os marcadores moleculares permitem gerar grande quantidade de informações sobre caracterização do germoplasma, diversidade genética, frequência gênica, identidade genética, mapeamento genético, seleção assistida, entre outras, dando aos melhoristas a possibilidade da utilização desta ferramenta a fim de auxiliar na seleção dos genótipos superiores (RAFALSKI; TINGEY, 1993; FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; MILACH, 1998).

O primeiro marcador molecular desenvolvido foi o RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), ou Polimorfismo no Comprimento dos Fragmentos de

Restrição (BOTSTEIN et al., 1980). É um marcador molecular baseado em hibridização, que utiliza enzimas que clivam o DNA em fragmentos de diversos tamanhos.

O marcador denominado SSR (Simple Sequence Repeats), ou Sequências Simples Repetidas, também conhecido como microssatélite (HAMADA et al., 1982; LITT; LUTY, 1989) é baseado em hibridização e consiste em pequenas sequências de um a cinco pares de bases (pb), que se repetem em série e em número variável (geralmente de uma dezena a uma centena de vezes).

Em meados da década de 1980, técnicas baseadas em PCR (Polymerase Chain Reaction), ou Reação em Cadeia pela Polimerase, apresentaram nova opção ao uso de marcadores moleculares (WHITE et al., 1989). Assim, surgiu o RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA), ou Polimorfismo do DNA Amplificado ao Acaso (WILLIAMS et al., 1990). Este utiliza *primers* escolhidos ao acaso nas reações de amplificação.

O marcador AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), ou Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados (ZABEAU, 1993; VOS et al., 1995), combina vantagens dos RFLP e RAPD. A técnica do AFLP consiste em clivar o DNA genômico do indivíduo, usando duas enzimas de restrição, seguido do emprego de adaptadores específicos, ligados aos terminais dos fragmentos de DNA clivado. São também realizadas amplificações via PCR dos fragmentos do DNA e o produto desta é submetido a eletroforese em gel de alta resolução para visualização dos fragmentos gerados.

Estes marcadores serviram de base para o surgimento de outros marcadores, a exemplo do SCoT (Start Codon Targeted; COLLARD; MACKILL, 2009).

2.6 SCoT (Start Codon Targeted)

O SCoT é um marcador molecular baseado em PCR e foi desenvolvido para aumentar a reprodutibilidade em comparação ao RAPD.

A técnica foi proposta utilizando *primers* únicos, *forward* e *reverse*, porém, os *primers* do SCoT são mais consistentes, com 16-18 pb. Em todos os *primers* destacam-se a predominância de bases citosina e guanina, além de alta temperatura de anelamento (50 °C), o que gera maior estabilidade durante o processo da PCR. Esses fatores somados conferem ao SCoT alta reprodutibilidade.

Collard e Mackill (2009) propuseram a utilização de 36 *primers* com o intuito de trabalhar com a região conservada que flanqueia o códon de início ATG em genes de plantas. Um fato interessante é que esse marcador possibilita a comparação dos resultados de análises entre diferentes materiais. Também é de fácil acesso para a utilização em pesquisas por apresentar custo baixo em relação a outros marcadores. Além disso, a técnica não requer qualquer informação de sequenciamento do genoma e os produtos da PCR podem ser realizados por eletroforese em gel de agarose.

As principais aplicações do SCoT têm sido para *fingerprinting* (CABO et al., 2014), variabilidade genética (XIONG et al., 2010) e polimorfismo (GORJI et al., 2011, GORJI et al., 2012; POCZAI et al., 2013; QUE et al., 2014; SATYA, et al., 2015; ZHANG et al., 2015).

Estudos de variabilidade genética e diversidade química de plantas medicinais com alto potencial terapêutico, como é o exemplo de *J. pectoralis*, são importantes, pois permitem escolher indivíduos potencialmente mais interessantes para a produção de fitoterápicos e para a conservação em banco de germoplasma.

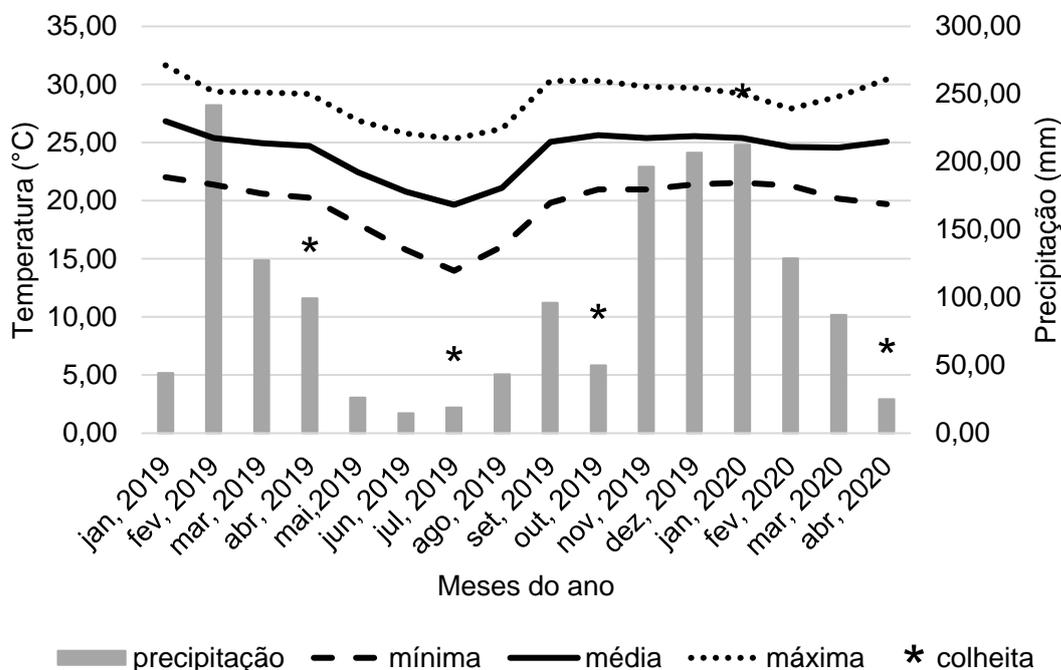
3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

A espécie *J. pectoralis* foi identificada pelo Dr. José Elvino do Nascimento Júnior, da Universidade Federal de São João del Rei, Departamento de Ciências Naturais e a exsicata foi depositada no Herbário de Plantas Medicinais do Laboratório de Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP), com o número de *voucher* HPMU-3230. A pesquisa foi autorizada pelo Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen - CGEN/MMA; protocolo nº. A40E734).

Os experimentos foram conduzidos no Jardim Botânico de Plantas Medicinais Ordem e Progresso, no município de Jardinópolis, São Paulo (latitude: 21°01'04"; longitude: 47°45'50" e altitude: 546 m), no período de janeiro de 2019 a abril de 2020 e os dados de temperatura e precipitação estão descritos na Figura 2.

Figura 2 - Dados de temperatura e precipitação na região de Jardinópolis de janeiro de 2019 a abril de 2020 e meses de colheita de *Justicia pectoralis*



Fonte: AGRITEMPO (2021).

As mudas para o experimento de campo foram produzidas por propagação vegetativa obtida pela planta matriz (RO) da coleção de plantas medicinais Prof^a. Dr^a.

Suzelei de Castro França na Universidade de Ribeirão Preto, e foram obtidas por estacas com 10 cm de comprimento contendo de 5 a 6 gemas. O substrato utilizado foi uma mistura de solo: areia: esterco bovino (1:1:1). As mudas foram mantidas por 60 dias em casa de vegetação com irrigação por microaspiração durante 5 minutos três vezes ao dia. Após esse período foi realizado o plantio no campo.

As plantas foram cultivadas a pleno sol, irrigadas diariamente com sistema de irrigação por aspersão convencional, fixo temporário de pressão de serviço baixa, ligado no período do começo da manhã e do final da tarde durante 20 minutos. O espaçamento entre elas foi de 0,50 x 0,50 m, utilizando uma área experimental de 4 x 7,5 m totalizando 30 m².

O cultivo foi realizado em Latossolo Vermelho-Amarelo com as seguintes características químicas: pH 5,9; M.O. 39 g/dm³; K 8,9 mmol_c/dm³; Ca 66 mmol_c/dm³; Mg 18 mmol_c/dm³; P_{resina} 21 mg/dm³; S 7 mg/dm³; B 0,1 mg/dm³; Cu 9 mg/dm³; Fe 19 mg/dm³; Mn 19,7 mg/dm³; Zn 1,5 mg/dm³; SB 9 mmol_c/dm³; H+Al 45 mmol_c/dm³; C.T.C. 53 mmol_c/dm³; V% 17.

O controle de plantas espontâneas foi realizado de acordo com o surgimento, através de capinas manuais e quando necessário com o auxílio de enxada.

3.2 Experimento de época de colheita

As plantas desse experimento foram colhidas aos 3, 6, 9 e 12 meses. Os cortes foram realizados 5 cm acima do nível do solo, preservando quantidade de gemas suficiente para a rebrota. As características avaliadas foram a altura de parte aérea (APA), diâmetro de crescimento da parte aérea (DCPA), presença de inflorescência (PI), massa de parte aérea fresca (MPAF), massa de parte aérea seca (MPAS), teores de cumarina (CUM) e umbeliferona (UMB). O delineamento experimental foi em blocos casualizados com 4 tratamentos, 6 blocos com 3 repetições por bloco, além da presença de bordaduras em todos os blocos, totalizando 24 parcelas.

3.3 Experimento de rebrota

As plantas deste experimento foram colhidas sucessivamente a cada três meses, utilizando a mesma área experimental do tópico 3.2, a fim de comparar aspectos morfométricos e teores de cumarinas nas rebrotas. Foram realizadas cinco coletas: primeira colheita (C1) em 20/04/19, a segunda colheita (R1) em 20/07/19, a

terceira colheita (R2) em 16/10/19, a quarta colheita (R3) em 15/01/20 e a quinta e última colheita (R4) em 15/04/20. Os cortes foram realizados 5 cm acima do nível do solo, preservando quantidade de gemas suficiente para a rebrota. As características avaliadas foram: altura de parte aérea (APA), diâmetro de crescimento da parte aérea (DCPA), presença de inflorescência (PI), massa de parte aérea fresca (MPAF), massa de parte aérea seca (MPAS), teores de cumarina (CUM) e umbeliferona (UMB). O delineamento experimental foi em blocos casualizados com 5 tratamentos, 6 blocos com 3 repetições por bloco, além da presença de bordaduras em todos os blocos, totalizando 30 parcelas.

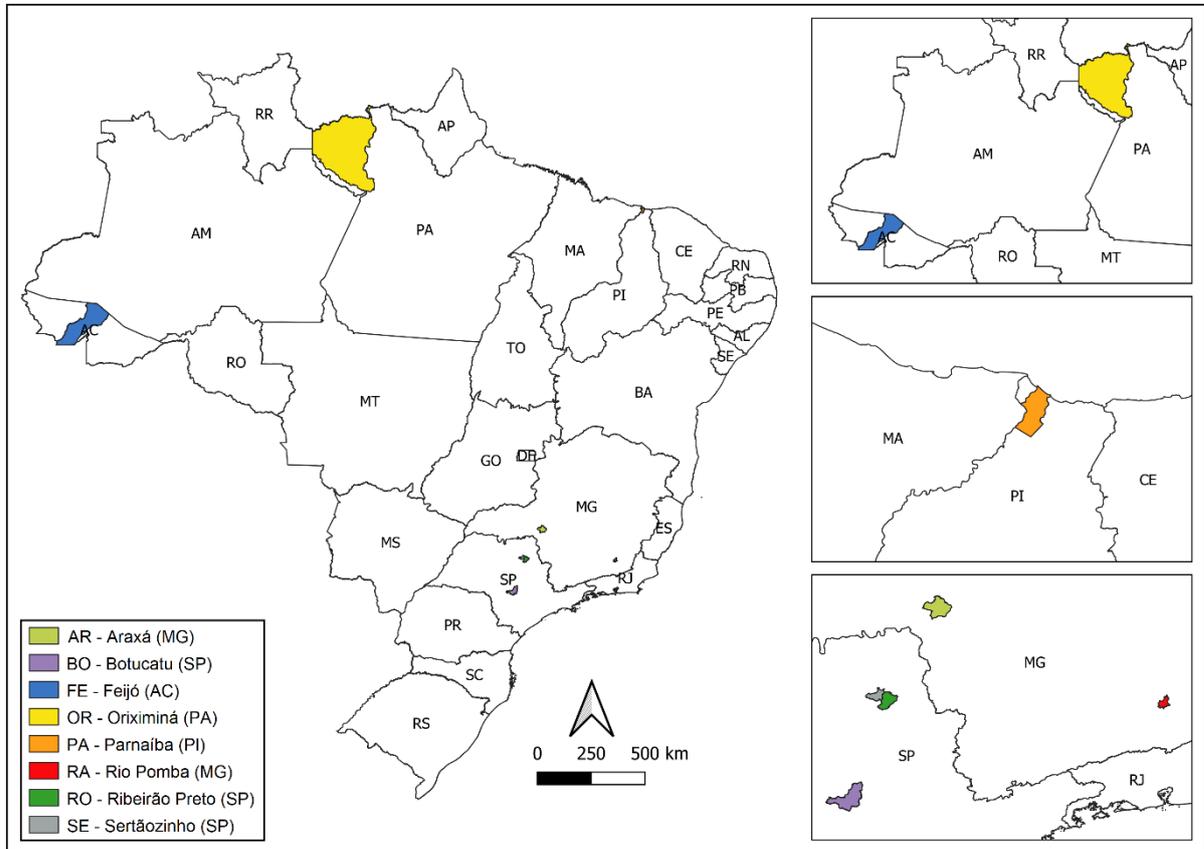
3.4 Experimento de análise da diversidade genética

O presente trabalho foi realizado com 8 genótipos de *J. pectoralis*, provenientes de 8 municípios situados em cinco estados brasileiros. Os dados de localização foram obtidos por meio de GPS (Sistema de Posicionamento Global - Tabela 2 e Figura 3). Exemplares destes materiais foram identificados pelo Dr. José Elvino do Nascimento Júnior, do Departamento de Ciências Naturais da Universidade Federal de São João del Rei, e as exsicatas foram depositadas no Herbário de Plantas Medicinais do Laboratório de Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto, recebendo os números de *vouchers* (HPMU-3230, 3231, 3232, 3233, 3234, 3235, 3236 e 3237).

Tabela 2 - Localização, coordenadas geográficas e altitudes dos acessos de *Justicia pectoralis*

Código da população	Município (Estado)	Latitude	Longitude	Altitude (m)
AR	Araxá (MG)	19°35'26``	46°56'39``	984
BO	Botucatu (SP)	22°52'24``	48°28'44``	860
FE	Feijó (AC)	08°09'55``	70°21'10``	156
OR	Oriximiná (PA)	01°45'51``	55°51'48``	46
PA	Parnaíba (PI)	02°54'18``	41°46'37``	13
RA	Rio Pomba (MG)	21°14'44``	43°08'57``	450
RO	Ribeirão Preto (SP)	21°11'57``	47°46'43``	600
SE	Sertãozinho (SP)	21°07'50``	48°00'46``	536

Figura 3 - Mapa contendo os municípios onde foi coletado os materiais de *Justicia pectoralis*



Estacas de todos os genótipos utilizados nesse trabalho foram coletadas nos locais de origem, envolvidas em papel toalha umedecido e transportadas em saco plástico até a casa de vegetação na Universidade de Ribeirão Preto. Os materiais foram propagados em vaso de 1 L com Carolina® (substrato comercial). A partir das matrizes, retirou-se estacas de aproximadamente 10 cm com 5 gemas e inseriu no substrato Carolina® e esterco bovino na proporção de 10:1. As mudas foram mantidas em casa de vegetação, com irrigação por microaspersão três vezes ao dia durante 5 minutos, por 15 dias. Após a estabilização das mudas, o experimento foi realizado com cinco repetições de cada genótipos, os quais foram mantidos na casa vegetação por 45 dias.

Decorrido o tempo de cultivo estabelecido, as plantas foram avaliadas quanto à altura de parte aérea (APA), diâmetro do caule (DC), número de folhas (NF), número de gemas (NG), número de ramos (NR), massa de parte aérea fresca (MPAF), massa

de parte aérea seca (MPAS), massa de raiz fresca (MRF), massa de raiz seca (MRS), comprimento de raiz (CR), teores de cumarina (CUM) e umbeliferona (UMB).

O experimento foi realizado com delineamento inteiramente casualizados totalizando 8 tratamentos, 5 repetições e 40 parcelas.

3.5 Extração do DNA

O DNA genômico foi extraído das folhas de *J. pectoralis* cultivadas em casa de vegetação, seguindo o método adaptado de Doyle (1991).

Os tecidos vegetais frescos foram coletados no período da manhã, entre 8:00 e 8:30, pesados 100 mg, acondicionados em microtubos pré-identificados e inseridos em gelo. Em bancada, foi adicionado sílica no microtubo com o material vegetal e nitrogênio líquido para a pulverização do material com bastão de vidro previamente autoclavado.

Depois do material pulverizado, adicionou-se 1000 µL de tampão de extração e homogeneizou-se. Em seguida, o microtubo com o material foi inserido em banho maria à 65 °C durante 30 minutos. Decorrido o período de incubação, o microtubo foi retirado do banho-maria e colocado sobre a bancada limpa para que esfriasse em temperatura ambiente. Com o microtubo à temperatura ambiente, adicionou-se 200 µL de clorofil (clorofórmio-álcool isoamílico 24:1 v/v), homogeneizou-se novamente o conteúdo do *ependorf* e este foi alocado em centrífuga, a 4 °C em 12000 rpm por 10 minutos.

Em seguida, transferiu-se 700 µL do sobrenadante para outro microtubo previamente identificado, adicionando-se 600 µL de isopropanol (-20 °C), onde foi homogeneizado e armazenado no freezer *overnight*.

Transcorrido o tempo do *overnight*, o microtubo foi submetido a centrifugação a 4 °C em 12000 rpm por 10 minutos. Após a retirada do microtubo, descartou-se o sobrenadante com cuidado para que o *pellet* não fosse descartado. Adicionou-se 1000 µL de tampão de lavagem (etanol à 70%, acetato de amônia 7,5 mM), agitou-se a fim de descolar o *pellet* da parede do microtubo, reservando o conteúdo por 20 minutos em bancada à temperatura ambiente. Decorrido o tempo de incubação, os microtubos foram centrifugados a 4°C em 12000 rpm por 5 min e, posteriormente, descartou-se o sobrenadante, lavando-se o *pellet* com 500 µL de álcool 70%, centrifugando novamente a 4 °C em 12000 rpm por 5 min e descartando o álcool. Lavou-se

novamente o *pellet* com 500 μ L de álcool 70% e centrifugou-se a 4 °C em 12000 rpm por 5 min, descartando o álcool após transcorrido o tempo de centrifuga e aguardando o *pellet* secar em temperatura ambiente, na bancada.

Após a secagem do *pellet*, este foi ressuspenso com a adição de 50 μ L de água Milli-Q e a solução contendo o material genético foi armazenada em congelador - 20 °C até o momento de utilização.

A integridade do DNA extraído foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TEB (Tris base, ácido bórico, EDTA, pH 8) a 100 V por 60 min, seguido de coloração com brometo de etídio (0,001%) e análise em transiluminador UV.

A concentração de DNA foi determinada espectrofotometricamente, usando o equipamento NanoPhotometer® P-360 (Implen, Munich, Germany).

3.6 Análise SCoT (Star Codon Targeted)

Todos os 36 SCoT *primers* (Tabela 3) sugeridos por Collard e Mackill (2009) foram utilizados, inicialmente, para amplificação de DNA. Destes, foram selecionados quinze que geraram amplificações claras e inequívocas para serem utilizados nas análises subsequentes.

Tabela 3 - *Primers* do marcador molecular SCOT, seqüências sugeridas

1-CAACAATGGCTACCACCA	19-ACCATGGCTACCACCGGC
2-CAACAATGGCTACCACCC	20-ACCATGGCTACCACCGCG
3-CAACAATGGCTACCACCG	21-ACGACATGGCGACCCACA
4-CAACAATGGCTACCACCT	22-AACCATGGCTACCACCAC
5-CAACAATGGCTACCACGA	23-CACCATGGCTACCACCAG
6-CAACAATGGCTACCACGC	24-CACCATGGCTACCACCAT
7-CAACAATGGCTACCACGG	25-ACCATGGCTACCACCGGG
8-CAACAATGGCTACCACGT	26-ACCATGGCTACCACCGTC
9-CAACAATGGCTACCAGCA	27-ACCATGGCTACCACCGTG
10-CAACAATGGCTACCAGCC	28-CCATGGCTACCACCGCCA
11-AAGCAATGGCTACCACCA	29-CCATGGCTACCACCGGCC
12-ACGACATGGCGACCAACG	30-CCATGGCTACCACCGGCG
13-ACGACATGGCGACCATCG	31-CCATGGCTACCACCGCCT
14-ACGACATGGCGACCCACGC	32-CCATGGCTACCACCGCAC
15-ACGACATGGCGACCGCGA	33-CCATGGCTACCACCGCAG
16-ACCATGGCTACCACCGAC	34-ACCATGGCTACCACCGCA
17-ACCATGGCTACCACCGAG	35-CATGGCTACCACCGGCC
18-ACCATGGCTACCACCGCC	36-GCAACAATGGCTACCACC

A mistura de reação em cadeia da polimerase (PCR) continha 1 µL de tampão Taq 10X, 0,3 µL de MgCl₂ (25 mM), 1 µL de dNTPs (2,5 mM), 1 µL de cada iniciador (5 µM), 0,1 µL de Taq DNA polimerase (5 U/µL), 1 µL de molde de DNA (10 ng/µL) e água destilada ultrapura, para ajuste do volume final em 10 µL.

As reações de amplificação foram realizadas em ThermalCycler (Jingle Scientific, Shanghai, China) nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 3 min, seguida de 35 ciclos, compreendendo os passos de desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento a 50 °C por 1 min, extensão a 72 °C por 2 min e uma extensão final por 5 min a 72 °C.

Os produtos da PCR, juntamente com um padrão de 100 bp, foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,2% por 6 h a 60 V, corados com brometo de etídio a 0,001%, visualizados em sistema de imagem digital Gel Logic 112 (BrukerBioSpin, Billerica, MA, EUA) e analisados usando o software Carestream Molecular Imaging (Rochester, NY, EUA).

3.7 Análise de cumarina e umbeliferona em *Justicia pectoralis* por CLAE-DAD e CLUE-DLD-EM

3.7.1 Preparo das amostras

Para a quantificação das cumarinas nos acessos de *J. pectoralis*, partes aéreas dos oito genótipos foram secas separadamente em estufa de ar forçado a 45 °C por 48 horas.

Quanto ao material vegetal do experimento época de colheita e rebrota, após a secagem e pesagem do material, utilizou-se uma amostra composta com as três repetições de cada bloco, totalizando seis amostras por tratamento.

Após a secagem, as plantas foram moídas em moinho de facas (Marconi MA048) até a granulometria de 40 mesh.

Para cada amostra, uma alíquota de 200 mg do pó seco foi extraída com 4 mL de etanol P.A./H₂O (7:3) (Labsynth, Diadema, SP, Brasil) sob sonicação por 30 min em banho ultrassônico modelo Eco-sonics Q5.9/37 (Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil).

Os extratos obtidos foram filtrados e secos em capela de ar circulante.

As extrações foram realizadas em triplicata para cada uma das amostras estudadas.

3.7.2 Quantificação de cumarina e umbeliferona por CLAE-DAD

Os extratos secos foram redissolvidos na concentração de 10 mg/mL em metanol/H₂O (8:2) (Labsynth, Diadema, SP, Brasil) e aplicados em colunas de extração em fase sólida Supelco LC-18 (Sigma, St. Louis, MO, EUA) previamente preparada com 1 mL de metanol, subsequentemente eluídos com 3 mL de solução 8:2 (v/v) de metanol de grau de CLAE (J.T. Baker, Avantor Performance Materials, Center Valley, PA, EUA) e água Milli-Q Ultrapure (Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha). As soluções resultantes foram secas, os extratos secos pesados, redissolvidos em metanol:água (8:2, v/v) na concentração de 10 mg/mL e transferidos para *vials* adequados ao equipamento de CLAE utilizado para análise.

Os eluentes foram analisados em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Shimadzu (Kyoto, Japão), modelo LC-10ADvp, acoplado a um detector de fotodiodo (PDA) SPD-M10Avp.

As separações foram realizadas à temperatura ambiente (22 ± 1 °C) em coluna Luna C18(2) (250mm x 4,6 mm, 5 μ , Phenomenex). A fase móvel compreendia água + ácido acético 0,1% (solvente A; J.T. Baker, Center Valley, PA, EUA) e metanol (solvente B; Xalostoc, Estado do México, México) de acordo com o seguinte gradiente de eluição: inicialmente 30% B (0 até 10 min); 30–40% B (10 à 20 min); 40% B (20 à 30 min); 40–70% B (30 à 35 min); 70–100% B (35 à 37 min); 100% B (37 à 40 min) e 100–30% B (40 à 45 min), totalizando 45 min de corrida.

O volume de injeção foi de 20 μ L, com taxa de fluxo da fase móvel de 1 mL/min. A absorbância do efluente da coluna foi medida a 280 e 330 nm para cumarina e umbeliferona, respectivamente, e os dados adquiridos foram processados usando ShimadzuClass-VP.

As curvas de calibração foram construídas usando soluções contendo padrões de referência de cumarina (C4261 Sigma-Aldrich 99%) e umbeliferona (H 24003 Sigma-Aldrich 99% - CLAE) em concentrações de 150 - 1 μ g/mL (Figura 11) e 100 - 1 μ g/mL. (Figura 12), respectivamente, cada um dos quais foi analisado por CLAE em triplicata. Os respectivos limites de quantificação (LoQ) e detecção (LoD) da cumarina foram 0,43 e 0,14 μ g/mL, enquanto os da umbeliferona foram 2,24 e 0,74 μ g/mL.

3.7.3 Identificação de cumarina e umbeliferona em CLUE-DAD-EM

O extrato do material de Feijó (FE) foi analisado em CLUE-DAD-EM para a confirmação das moléculas referências cumarina e umbeliferona. A análise foi

realizada usando o sistema ACQUITY UPLC H-Class acoplado ao detector de arranjo de diodos e ao espectrômetro de massas quadrupolo tandem Xevo® TQ-S (Waters® Corporation, Milford, MS, USA), equipado com fonte de ionização ESI operando em modo negativo de análise.

Os padrões autênticos (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) de cumarina e umbeliferona, bem como a amostra de extrato de acesso FE, foram solubilizados em metanol (1,0 mg/mL) e injetados em alíquotas de 5 µL. A coluna utilizada foi Sigma-Aldrich Ascentis Express C18 (100 x 4,6 mm id, 2,7 µm tamanho de partícula).

Foi utilizada como fase móvel a solução aquosa de ácido fórmico 0,1% (solvente A) e solução de metanol com 0,1% de ácido fórmico (solvente B), em modo gradiente linear, com o solvente B variando de 30 para 90% (v/v) em 30 min, mantendo isocraticamente o solvente B 90% por 5 min, vazão de 0,5 mL/min, com volume de injeção de 5 µL.

Os parâmetros de operação utilizados na fonte de ionização foram: voltagem do capilar: 3,2 kV, temperatura da fonte 150 °C, temperatura de dessolvatação do gás N₂: 350 °C, fluxo de dessolvatação do gás: 600 L/h e escala de varredura de massa de: 200 a 1000 m/z no modo de varredura total.

Estas análises foram realizadas no Departamento de Química Orgânica da Universidade de São Paulo, com a colaboração do Dr. Eduardo José Crevelin.

3.8 Análise estatística

Tanto os dados agronômicos quanto o acúmulo de cumarina e umbeliferona foram submetidos à análise de variância (ANOVA), tendo os valores médios comparados por meio do teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Todas as análises foram realizadas no software SISVAR versão 5.1 (FERREIRA, 2011).

Uma matriz de variáveis quantitativas foi gerada com base na distância euclidiana e a partir desta matriz foi realizado o agrupamento pelo método UPGMA (Grupos de Pares não Ponderados com Média Aritmética) para classificar os diferentes acessos de *J. pectoralis* quanto as concentrações de cumarina (alto > 1,12 mg/g peso seco, médio entre 0,92 - 0,23 mg/g peso seco e baixo <0,2 mg/g peso seco) e umbeliferona (alto > 1,2 mg/g peso seco, médio entre 0,07 - 0,10 mg/g peso seco e baixo <0,04 mg/g peso seco), através do software RStudio versão 1.2.5019 (RStudio, Inc., Boston, MA, EUA).

Similaridades genéticas entre os oito acessos foram determinadas usando o coeficiente de similaridade de Jaccard, enquanto o agrupamento de acessos foi baseado no método de grupos de pares não ponderados com média aritmética (UPGMA) e análise de coordenadas principais (PCoA).

A diversidade populacional foi estabelecida com auxílio do pacote GenAlex 6, utilizado no Microsoft Excel (PEAKALL; SMOUSE, 2006).

A análise bayesiana (modelo de mistura) foi empregada para discriminar grupos de genes dentro de *J. pectoralis* usando o software STRUCTURE versão 2.1 (PRITHARD et al., 2000). As análises foram realizadas três vezes para cada número hipotético de subpopulações ($K = 1$ a 10) com 500.000 interações na cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC) e 1.000.000 fases de burn-in para cada valor de K . O número mais provável de grupos (K) foi estimado pelo método delta K (EVANNO et al., 2005). Realizou-se então a análise multivariada utilizando-se o método de componentes principais a partir dos atributos morfológicos: altura de parte aérea, diâmetro do caule principal e números de folhas, gemas e ramos, comprimento de raiz.

A análise dos componentes principais foi obtida a partir da matriz de variação e covariância que foi realizada no Programa GENES (CRUZ, 2001).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Experimento de época de colheita

A época de colheita influenciou no desenvolvimento das plantas e no teor de cumarinas. Plantas com 6 meses de cultivo apresentaram maior altura da parte aérea (22,86 cm), seguida por plantas de 9 meses (19,74 cm). Nestes períodos a altura das plantas é maior, porque os pendões florais se alongam e quando o período de floração fica menos intenso os pendões secam e as plantas passam a apresentar altura de parte aérea menor. Assim, os meses em que as plantas apresentaram menor altura foram com 3 e 12 meses, não havendo diferença estatística entre esses períodos (15,00 cm e 14,78 cm, respectivamente – Tabela 4).

Tabela 4 - Efeito da época de colheita na altura e diâmetro de crescimento da parte aérea (cm), presença de inflorescência (%), massa de parte aérea fresca e seca (g) e teor de cumarina e umbeliferona (mg/g de peso seco) em parte aérea de *Justicia pectoralis* cultivada por 3, 6, 9 e 12 meses

Descritores	Época de colheita (meses)			
	3	6	9	12
	Abril Outono	Julho Inverno	Outubro Primavera	Janeiro Verão
APA	15,00 ^c	22,86 ^a	19,74 ^b	14,78 ^c
D CPA	15,63 ^b	22,95 ^a	22,85 ^a	22,86 ^a
PI	5 ^c	100 ^a	100 ^a	67 ^b
MPAF	20,58 ^c	58,44 ^b	55,40 ^b	112,13 ^a
MPAS	5,25 ^c	18,27 ^b	19,99 ^b	30,71 ^a
CUM	0,29 ^c	0,04 ^c	0,75 ^b	3,02 ^a
UMB	0,01 ^c	0,57 ^a	0,12 ^b	0,08 ^b

Médias seguidas de mesma letra na linha (minúscula) não diferiram significativamente entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Scott-Knott.

Legenda: APA = altura de parte aérea (cm); D CPA = diâmetro de crescimento da parte aérea (cm); PI = presença de inflorescência; MPAF = massa de parte aérea fresca (g); MPAS = massa de parte aérea seca (g); CUM = teores de cumarinas (mg/g de peso seco); UMB = umbeliferona (mg/g de peso seco).

A partir do sexto mês as plantas mantiveram o diâmetro de crescimento da parte aérea constante, mantendo em média 22,8 cm. Esse resultado valida dados de literatura quanto ao espaçamento utilizado no plantio da espécie que é de 25 à 30 cm entre plantas (PEREIRA et al., 2011).

As inflorescências surgiram a partir do terceiro mês de cultivo (março) e 100% das plantas floresceram nos meses entre junho e setembro, ou seja, entre o sexto e o nono mês após o plantio (Figura 4).

A massa de parte aérea fresca e seca de plantas colhidas aos 6 e 9 meses não diferiram entre si. Os meses referentes a estes períodos apresentaram temperaturas que variaram de 19,6 °C a 25,6 °C e índice pluviométrico entre 19 mm a 96 mm, enquanto as plantas colhidas com 12 meses (em janeiro) apresentam maior massa de parte aérea fresca e seca, sendo o período caracterizado por temperatura média de 25,5 °C e índice pluviométrico entre 196 a 213 mm (Figura 2), o que favoreceu o crescimento das plantas. Esse acúmulo acentuado de biomassa no período úmido é resultado da maior produção de fotoassimilados devido à alta incidência solar e índices pluviométricos (CASTRO et al., 2005).

As plantas colhidas no verão, com 12 meses de cultivo, apresentaram maior teor de cumarina (3,02 mg/g de peso seco). Nesse período a temperatura média (25,6 °C) e o índice pluviométrico (213 mm) foram elevados e as plantas apresentaram reduzida incidência de inflorescência quando comparadas aos dois períodos anteriores (Tabela 4; Figura 4)

É possível que haja uma correlação entre a presença de inflorescência e baixo teor de cumarina, considerando o trabalho realizado por Macrae e Tower em 1984 foi demonstrado que as flores de *J. pectoralis* não produzem esse metabólito. Ademais, foi constatado em espécies de *Mikania* cultivadas no Brasil que temperaturas médias entre 22 à 24 °C e precipitação entre 220 à 240 mm favorecem a produção de cumarina (PEREIRA et al., 2000; BERTOLUCCI et al., 2013). Da mesma forma, precipitação e temperatura também interferem na produção de cumarinas em espécies de *Pilocarpus* (ALLEVATO et al., 2019) e em *Artemisia tridentata* (WILT; MILLER, 1992).

Figura 4 - Crescimento e presença de inflorescência durante (A) 3 meses, (B) 6 meses, (C) 9 meses e (D) 12 meses de cultivo de *Justicia pectoralis*



Outros fatores além da precipitação, como a radiação UV (ultravioleta), também têm relevância no aumento do teor de cumarinas (KUNIGA; NESUNI, 2011; CARBONELL-BEJERANO et al., 2014; ALVES; DESCHAMPS, 2019). Em estudo realizado na região de Ribeirão Preto, distante 20 km da área onde foi realizado o presente estudo com *J. pectoralis*, os autores demonstraram que no verão houve maior incidência de radiação ultravioleta (KIRCHHOFF et al., 2000), o que pode explicar, o maior teor de cumarina registrado nessa estação.

Experimentos realizados com citrus mostraram que elevada incidência de UV aumenta o teor de cumarina e que essa substância protege a planta de ataques contra microrganismo patogênico (BALLESTER et al., 2013).

De modo geral, plantas cultivadas nas regiões equatoriais recebem maiores níveis de radiação solar e ultravioleta, conseqüentemente, apresentam maior teor de

cumarina. Isso tem sido comprovado pelo aumento no teor de ácido-cumárico, o qual é o precursor da cumarina (AGOSTINI-COSTA et al., 2016). Além disto, também foi demonstrado que em *Mikania laevigata* cultivada em ambientes com temperaturas e altitudes elevadas, apresentam aumento no teor de cumarina (AGOSTINI-COSTA et al., 2016).

Foi relatado anteriormente que a folha madura de *J. pectoralis* produz pelo menos duas vezes mais cumarina do que folhas jovens (MACRAE; TOWER, 1984). Este fato pode explicar, pelo menos em parte, porque as plantas com seis meses colhidas em julho (inverno) apresentaram elevada incidência de pendão floral (Figura 4) enquanto as folhas mais jovens foram as que produziram menor teor de cumarina. A influência da estação do ano e da maturidade da folha sobre a produção de cumarina também foi demonstrada em *Hera cleumlanatum* (ZOBEL; BROWN, 1990).

O maior teor de umbeliferona (0,57 mg/g peso seco) foi obtido em plantas colhidas no mês de julho, no inverno. Momento em que 100% das plantas estavam floridas. A temperatura média (19,6 °C) e o índice pluviométrico (19 mm) também foram os mais baixos.

Umbeliferona é uma substância que apresenta atividade alelopática e exerce importante papel no combate a microrganismos fitopatogênicos (MORIKAWA et al., 2011; DROBY et al., 2002). Assim, os resultados obtidos com *J. pectoralis* reforçam a importância do papel ecológico dessa substância, sobretudo na sobrevivência da planta, pois no inverno a mesma está submetida a maior estresse pela seca e, portanto, mais vulnerável.

Em estudo realizado com *Convolvulus althaeoides* foi demonstrado que a produção de umbeliferona só ocorre no inverno (HRICHI et al., 2020). Com plantas de *Camomilla recutita* submetidas a estresse biótico (*Erysiphe cichoracearum*) e abiótico, houve um aumento no teor de umbeliferona, mais de 10 vezes, em relação ao controle (REPECAK et al., 2001). Deste modo, apesar de ser bem conhecido que a sazonalidade interfere não apenas quantitativamente, mas também na presença ou ausências de metabólitos secundários, é sempre relevante estudar pontualmente como cada espécie medicinal responde às alterações ambientais para assegurar qualidade e eficácia do fitoterápico.

Trabalho realizado com secagem de folhas de *Mikania laevigata* e *M. glomerata* por 14 dias na sombra mostrou que o teor de umbeliferona aumentou, enquanto o teor de cumarina foi diminuindo e os autores sugeriram que isso ocorreu em função da oxidação da cumarina (BORGHI et al., 2019).

4.2 Experimento de rebrota

No experimento de rebrota, tanto a altura quanto o diâmetro de crescimento da parte aérea foram comprometidos com as colheitas sucessivas.

A rebrota colhida no verão (R3), no mês de janeiro, apresentou maior massa de parte aérea fresca e seca (Tabela 5), seguida da primeira colheita (C1). Isso mostra que colheitas sucessivas comprometeram o crescimento vegetativo da espécie, com exceção do período do verão, onde há maior produção de fotoassimilados. Fato semelhante foi registrado com *Mentha x villosa* Huds, onde colheita sucessiva a cada 75 dias promoveu uma redução drástica da biomassa (INNECCO et al., 2003).

Tabela 5 - Efeito da rebrota sobre altura e diâmetro de crescimento da parte aérea (cm), presença de inflorescência (%), massa de parte aérea fresca e seca (g) e teor de cumarina e umbeliferona (mg/g de peso seco) em parte aérea de *Justicia pectoralis*

Descritores	C1	R1	R2	R3	R4
	Abril Outono	Julho Inverno	Outubro Primavera	Janeiro Verão	Abril Outono
APA	14,97 ^a	11,50 ^b	9,39 ^c	12,47 ^b	6,01 ^d
DCPA	15,61 ^a	12,60 ^b	11,13 ^c	12,87 ^b	8,47 ^d
PI	5,5 ^b	100 ^a	0 ^b	0 ^b	0 ^b
MPAF	20,58 ^b	12,40 ^c	17,31 ^b	42,45 ^a	5,90 ^c
MPAS	5,25 ^b	3,10 ^c	4,13 ^b	9,95 ^a	1,37 ^c
CUM	0,27 ^c	0,01 ^c	1,72 ^b	1,56 ^b	3,32 ^a
UMB	0,01 ^d	0,18 ^c	0,45 ^a	0,30 ^b	0,34 ^b

Médias seguidas de mesma letra na linha (minúscula) não diferiram significativamente entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Scott-Knott.

Legenda: C1 = primeira colheita; R1 = colheita da primeira rebrota; R2 = colheita da segunda rebrota; R3 = colheita da terceira rebrota; R4 = colheita da quarta rebrota; APA = altura da parte aérea (cm); DCPA = diâmetro de crescimento da parte aérea (cm); PI = presença de inflorescência; MPAF = massa de parte aérea fresca (g); MPAS = massa de parte aérea seca (g); CUM = teores de cumarinas (mg/g de peso seco); UMB = umbeliferona (mg/g de peso seco).

O florescimento das plantas ocorreu apenas na primeira rebrota (R1) (Tabela 5), o que demonstra que colheitas sucessivas, de 3 em 3 meses, também comprometeram o aspecto reprodutivo.

O maior acúmulo de cumarina ocorreu em abril, logo após o verão e início do outono. Já a umbeliferona teve seu maior teor registrado em outubro, na primavera (Tabela 5). Esse experimento demonstra que, quando as plantas são submetidas ao estresse de cortes sucessivos, o acúmulo de cumarinas ocorre em épocas do ano diferentes de plantas que não são podadas com essa frequência.

Embora não haja dados com outras plantas sobre a influência do número de colheitas quanto a produção de cumarina, é bem conhecido que o estágio de desenvolvimento de planta e o número de colheitas influenciam diretamente na concentração de metabólitos secundário nas espécies vegetais.

Este fato tem sido relatado para várias espécies, como a *Bacopa monnieri*, cujas plantas colhidas por quatro meses consecutivos apresentaram maior teor de saponinas no quarto mês de colheita, além de que plantas colhidas no verão apresentaram maior teor de bacosídeo (PHROMPITTAYARAT et al., 2011; BANSAL et al., 2016).

Ademais, o efeito da rebrota pode igualmente interferir na produção de outros compostos de interesse, como foi mostrado em estudo realizado com *Hypericum perforatum*, cujo teor de rutina foi maior em plantas no estágio de brotação, enquanto outros flavonoides, como quercitrina, quercetina e 3,8-biapigenina, predominaram no estágio de floração plena (SOUTHWELL et al., 2001). O conteúdo de hiperosídeo se manteve constante em todos os estádios de desenvolvimento das plantas de *Hypericum perforatum*. De modo geral, essa espécie produz mais hipericina no verão do que no inverno, embora exista exceção para alguns genótipos que produzem quantidades iguais em ambas as estações do ano (SOUTHWELL et al., 2001; BAGDONAITE et al., 2012).

4.3 Experimento de análise da diversidade genética.

A extração de DNA foi eficiente para todos os indivíduos de *J. pectoralis*. Dentre os 36 *primers* utilizados foram selecionados 15 que amplificaram de 5 a 20 bandas, totalizando 204 bandas amplificadas, apresentando um polimorfismo médio de 47% (Tabela 6).

Tabela 6 - Primers do marcador molecular SCoT utilizados no presente estudo e a extensão dos polimorfismos de *Justicia pectoralis*

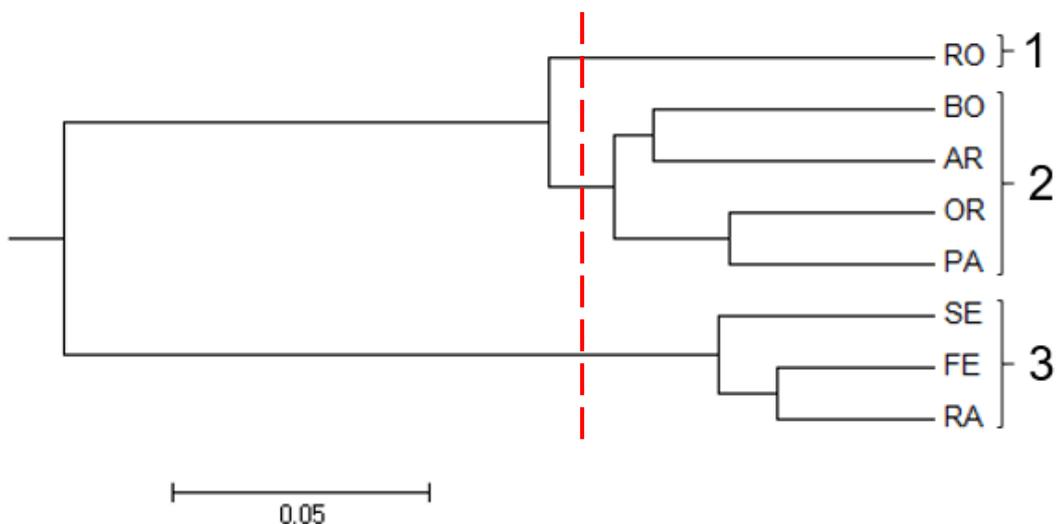
<i>Primers</i>	n° bandas	n° de bandas polimórficas	Polimorfismo (%)
1 CAACAATGGCTACCACCA	17	7	41,18
3 CAACAATGGCTACCACCG	10	6	60,00
12 ACGACATGGCGACCAACG	15	7	46,67
13 ACGACATGGCGACCATCG	17	6	35,29
14 ACGACATGGCGACCACGC	9	6	66,67
15 ACGACATGGCGACCGCGA	12	4	33,33
20 ACCATGGCTACCACCGCG	9	4	44,44
21 ACGACATGGCGACCCACA	17	8	47,06
22 AACCATGGCTACCACCAC	20	13	65,00
23 CACCATGGCTACCACCAG	5	3	60,00
26 ACCATGGCTACCACCGTC	14	7	50,00
29 CCATGGCTACCACCGGCC	14	5	35,71
30 CCATGGCTACCACCGGCG	19	4	21,05
32 CCATGGCTACCACCGCAC	9	3	33,33
33 CCATGGCTACCACCGCAG	17	12	70,59
TOTAL	204	95	46,57

O marcador molecular SCoT foi eficiente para analisar a variabilidade genética em indivíduos de *J. pectoralis* coletados em cinco estados brasileiros, sendo está a primeira vez que foi utilizado esse marcador para avaliar diversidade genética na espécie. A eficiência da utilização deste marcador para o estudo da diversidade genética de outras espécies de plantas medicinais foi descrita em trabalhos anteriores com *Ferula asafoetida*, *Luffa cylindrica* e *Moringa oleifera*, (TAJBAKHT et al., 2018; HASSANA et al., 2020; TYAGI et al., 2020).

Os indivíduos avaliados neste trabalho se dividiram em três grupos, como foi apresentado no dendrograma e análise em coordenadas principais (Figuras 5 e 6).

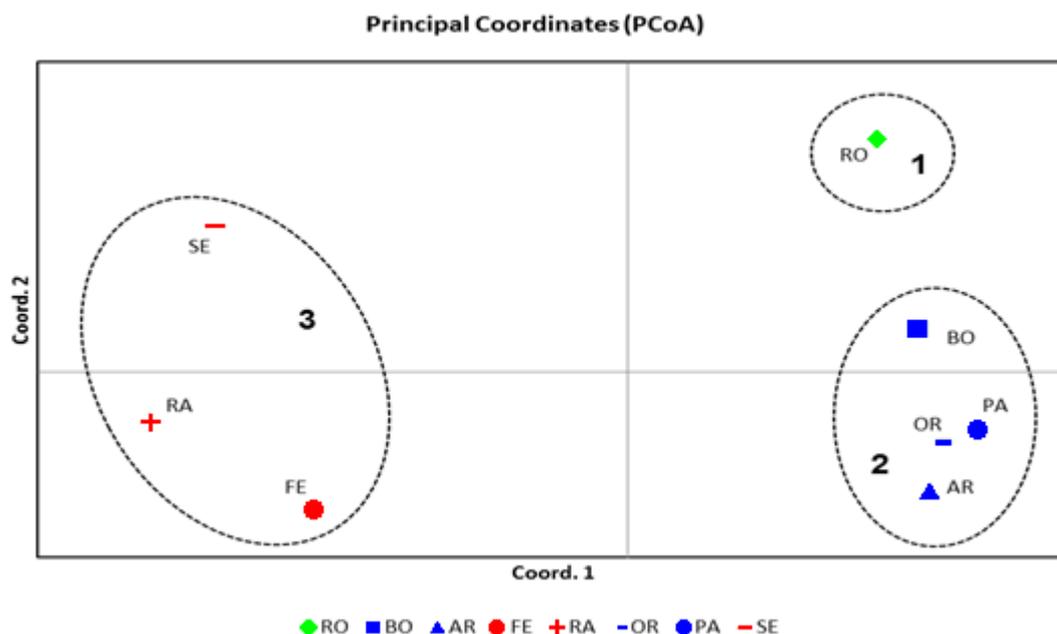
A matriz de similaridade genética obtida com os indivíduos de *J. pectoralis* coletados em cinco estados brasileiros mostrou similaridade que variou entre 60 a 90% (Tabela 7), com média de 75%. O indivíduo de Ribeirão Preto (RO) ficou isolado em um único grupo, diferenciando-se de todos os outros indivíduos, apresentando maior semelhança com o grupo 2 do que com o grupo 3. O grupo 2 foi formado pelos indivíduos de Araxá (AR), Botucatu (BO), Oriximiná (OR) e Parnaíba (PA), os quais apresentaram uma similaridade genética entre si que variou de 84% a 90%, sendo que os indivíduos de Botucatu (BO) e Parnaíba (PA) foram os que apresentaram menor similaridade genética entre si. Em relação ao grupo 3, formado por Feijó (FE), Rio Pomba (RA) e Sertãozinho (SE), a similaridade variou de 87% a 90%, sendo os indivíduos de Feijó (FE) e Rio Pomba (RA) os mais semelhantes (Figura 5 e 6, Tabela 7).

Figura 5 - Clusters UPGMA (método de grupo de par não ponderado com média aritmética) gerados em *Justicia pectoralis* com base em marcadores SCoT



Legenda: RO - Ribeirão Preto (SP); BO - Botucatu (SP); AR - Araxá (MG); OR - Oriximiná (PA); PA - Parnaíba (PI); SE - Sertãozinho (SP); FE - Feijó (AC); RA - Rio Pomba (MG).

Figura 6 - Gráfico de dispersão de análise em coordenadas principais (PCoA) de 8 amostras de *Justicia pectoralis* com base no marcador SCoT



Legenda: AR - Araxá (MG); BO - Botucatu (SP); FE - Feijó (AC); OR - Oriximiná (PA); PA - Parnaíba (PI); RA - Rio Pomba (MG); RO - Ribeirão Preto (SP); SE - Sertãozinho (SP).

Tabela 7 - Matriz de similaridade genética entre oito acessos de *Justicia pectoralis* obtida pelo coeficiente de Jaccard com base em marcador SCoT

Genótipo	RO	BO	AR	FE	RA	OR	PA	SE
RO	-							
BO	0,83	-						
AR	0,81	0,87	-					
FE	0,67	0,67	0,69	-				
RA	0,63	0,63	0,63	0,90	-			
OR	0,84	0,87	0,90	0,69	0,63	-		
PA	0,81	0,84	0,89	0,65	0,60	0,90	-	
SE	0,68	0,65	0,63	0,87	0,88	0,63	0,62	-

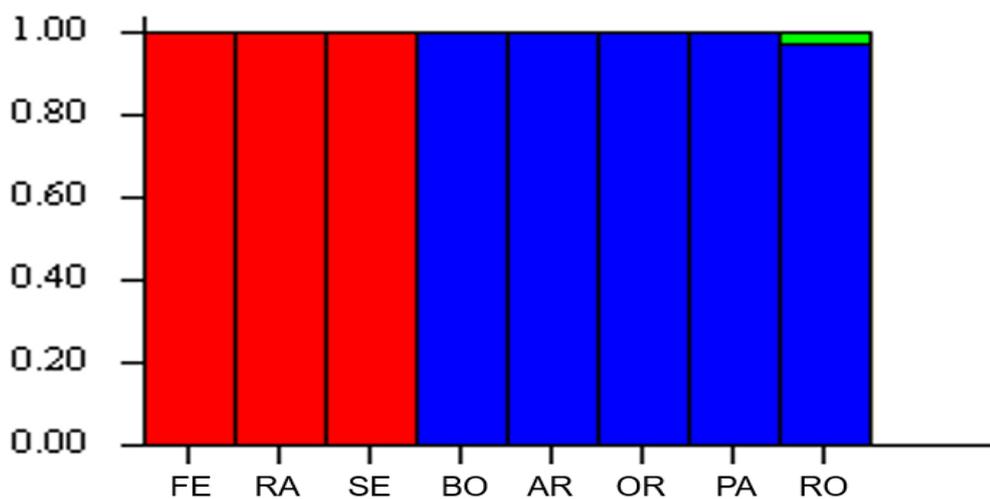
Legenda: RO - Ribeirão Preto (SP); BO - Botucatu (SP); AR - Araxá (MG); FE - Feijó (AC); RA - Rio Pomba (MG); OR - Oriximiná (PA); PA - Parnaíba (PI); SE - Sertãozinho (SP).

A polinização de *J. pectoralis* é realizada por abelhas e a planta produz sementes do tipo tuberculada (EZCURRA, 2002). Entretanto, considerando que

tradicionalmente a multiplicação de mudas dessa espécie é essencialmente realizada por estaca (PEREIRA, 2011), a diversidade encontrada nos genótipos analisados pelo SCoT foi expressiva. Este marcador molecular tem sido utilizado também com sucesso para distinguir materiais propagados vegetativamente de outras espécies com alta similaridade genética, o que demonstra a robustez da técnica (LUO et al., 2012; YUE et al., 2019; SRIVASTAVA et al., 2020).

A análise bayesiana realizada no programa STRUCTURE mostrou a formação de três grupos gênicos (K3), sendo que os indivíduos Feijó (FE), Rio Pomba (RA) e Sertãozinho (SE) pertencem ao mesmo grupo gênico indicado pela cor vermelha. Os indivíduos de Araxá (AR), Botucatu (BO), Oriximiná (OR) e Parnaíba (PA) foram agrupados na cor azul, compondo outro grupo gênico. Por último, o indivíduo de Ribeirão Preto, embora tenha apresentado uma grande proporção do grupo gênico representado pela cor azul, se diferenciou por apresentar também o grupo gênico verde (Figura 7).

Figura 7 - Análise Bayesiana realizada com o software STRUCTURE de oito acessos de *Justicia pectoralis* com base em marcador SCoT



Legenda: FE - Feijó (AC); RA - Rio Pomba (MG); SE - Sertãozinho (SP); BO - Botucatu (SP); AR - Araxá (MG); OR - Oriximiná (PA); PA - Parnaíba (PI); RO - Ribeirão Preto (SP).

A formação de três grupos gênicos mostra que existe diversidade genética entre os genótipos de *J. pectoralis* analisados nesse trabalho, o que pode favorecer o uso dos mesmos em programas de melhoramento e de conservação de germoplasma.

Esses resultados confirmam os que foram obtidos por outros autores que demonstraram ser o SCoT um marcador muito eficiente para detectar a estrutura e a diversidade genética quando os acessos a serem analisados são em número reduzido e provenientes de regiões distantes (RAJESH et al., 2015; POUR-ABOUGHADAREH et al., 2017; ETMINAN et al., 2018).

Além da avaliação da diversidade por marcador molecular, caracteres botânicos ou dados morfométricos também contribuem na identificação da diversidade genética de acessos não domesticados (OZORIO et al., 2019). Entre as características morfométricas avaliadas nos genótipos de *J. pectoralis*, a altura de parte aérea foi um aspecto importante, com destaque para os genótipos SE e FE (Tabela 8). As plantas mais altas são interessantes pois na colheita o corte pode ser realizado a uma distância do solo em que as folhas estejam menos expostas à poeira e a contaminantes advindo do esterco (*Coliformes fecais*), portanto, em melhor condição fitossanitária.

Quanto ao diâmetro de caule, não houve diferença estatística entre os indivíduos. Já em relação ao número de folhas, os indivíduos de RO e OR foram superiores e o pior resultado foi obtido com o indivíduo de AR. Quanto ao número de gemas, os indivíduos PA, BO, RO, OR e FE se destacaram como superiores. Os indivíduos BO, RO, OR, FE e SE apresentaram maior número de ramos. Apenas os indivíduos AR e RA mostraram massa de parte aérea fresca inferior aos demais e quanto à massa de parte aérea seca, apenas FE se destacou como superior aos demais indivíduos. Em relação à raiz, BO, RO, OR e FE apresentaram maior comprimento e maior massa fresca e seca (Tabela 8 e Figura 8).

Figura 8 - Plantas de acessos *Justicia pectoralis* após a colheita do experimento



Legenda: RA - Rio Pomba (MG); OR - Oriximiná (PA); PA - Parnaíba (PI); FE - Feijó (AC); RO - Ribeirão Preto (SP); BO - Botucatu (SP); AR - Araxá (MG); SE - Sertãozinho (SP).

Além da análise morfométrica, a identificação de marcadores químicos é fundamental em trabalhos que visam avaliar diversidade genética de plantas medicinais. Assim, foi realizada análise em CLUE-DAD-EM e confirmado a presença de cumarina e umbeliferona no extrato de FE (Figura 13).

Tabela 8 - Altura da parte aérea (cm), diâmetro do caule (mm), número de folhas, gemas e ramos, massa de parte aérea fresca e seca (g), comprimento de raiz (cm), massa de raiz fresca e seca (g) e teor de cumarina e umbeliferona (mg/g de peso seco) de oito genótipos de *Justicia pectoralis* cultivados em casa de vegetação

Descritores	Genótipos							
	AR	PA	BO	RO	RA	OR	FE	SE
APA	6,57 ^c	7,03 ^c	7,17 ^c	7,57 ^c	8,37 ^c	8,87 ^c	10,47 ^b	13,43 ^a
DC	1,68 ^a	1,80 ^a	1,97 ^a	1,90 ^a	1,47 ^a	1,97 ^a	1,85 ^a	1,67 ^a
NF	41,01 ^d	73,33 ^c	97,33 ^b	116,00 ^a	65,00 ^c	113,67 ^a	88,00 ^b	90,00 ^b
NG	21,67 ^b	42,33 ^a	50,33 ^a	56,67 ^a	31,00 ^b	57,00 ^a	51,33 ^a	46,67 ^b
NR	5,33 ^b	8,67 ^b	13,67 ^a	15,67 ^a	9,00 ^b	17,33 ^a	13,67 ^a	16,00 ^a
MPAF	0,96 ^c	2,35 ^a	2,97 ^a	2,73 ^a	1,80 ^b	3,08 ^a	3,27 ^a	2,71 ^a
MPAS	0,20 ^d	0,46 ^c	0,58 ^b	0,54 ^b	0,44 ^c	0,62 ^b	0,93 ^a	0,66 ^b
CR	13,33 ^b	17,50 ^b	24,00 ^a	22,83 ^a	15,17 ^b	21,67 ^a	20,00 ^a	23,53 ^a
MRF	0,84 ^b	0,78 ^b	1,58 ^a	1,88 ^a	0,95 ^b	2,47 ^a	2,16 ^a	1,60 ^a
MRS	0,15 ^b	0,25 ^a	0,33 ^a	0,32 ^a	0,20 ^b	0,33 ^a	0,27 ^a	0,23 ^b
CUM	0,835 ^c	0,703 ^d	0,920 ^b	0,854 ^c	0,201 ^e	0,150 ^e	1,128 ^a	0,966 ^b
UMB	0,102 ^b	0,134 ^a	0,083 ^c	0,103 ^b	0,074 ^c	0,043 ^d	0,140 ^a	0,102 ^b

Médias seguidas por letras diferentes na linha diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott Knott a 5% de probabilidade.

Legenda: AR - Araxá (MG); PA - Parnaíba (PI); BO - Botucatu (SP); RO - Ribeirão Preto (SP); RA - Rio Pomba (MG); OR - Oriximiná (PA); FE - Feijó (AC); SE - Sertãozinho (SP); APA = altura da parte aérea (cm); DC = diâmetro do caule (mm); NF = número de folhas; NG = número de gemas; NR = número de ramos; MPAF = massa de parte aérea fresca (g); MPAS = massa de parte aérea seca (g); MRF = massa de raiz fresca (g); MRS = massa de raiz seca (g); CR = comprimento de raiz (cm); CUM = teores de cumarinas (mg/g de peso seco); UMB = umbeliferona (mg/g de peso seco).

Em relação à quantificação das cumarinas, o genótipo de Feijó (FE) destacou-se tanto na produção de cumarina quanto de umbeliferona. Além deste, o indivíduo de Parnaíba também se destacou pelo elevado teor de umbeliferona. Os dois genótipos que menos produziram cumarina foram os provenientes de Oriximiná (OR) e Rio Pomba (RA).

Analisando todas as variáveis estudadas, o genótipo de Feijó (FE) foi superior aos demais (Tabela 8), sendo indicado o plantio em várias regiões do Brasil para averiguar o efeito do ambiente na resposta morfometria e teor de cumarinas.

Foi constatada uma correlação positiva entre os teores de cumarina e umbeliferona (Figura 9). A análise de componentes principais (Tabela 9) demonstrou que o número de gemas no primeiro componente (CP1) e a altura de parte aérea no segundo componente (CP2) explicam praticamente toda a variabilidade encontrada (93,89%) nos genótipos de *J. pectoralis* avaliados. O CP1 foi responsável por 73,33%, e o CP2 por 20,55%, das variações dos dados, sendo que estes dois primeiros componentes principais resumem efetivamente a variação amostral total, sendo, portanto, recomendado avaliar principalmente número de gemas e altura da planta como critérios de seleção de indivíduos elites de *J. pectoralis*, além, evidentemente, do teor de cumarina.

Figura 9 - Correlação linear entre o acúmulo de cumarina e umbeliferona (mg/g de peso seco) nos acessos de *Justicia pectoralis*

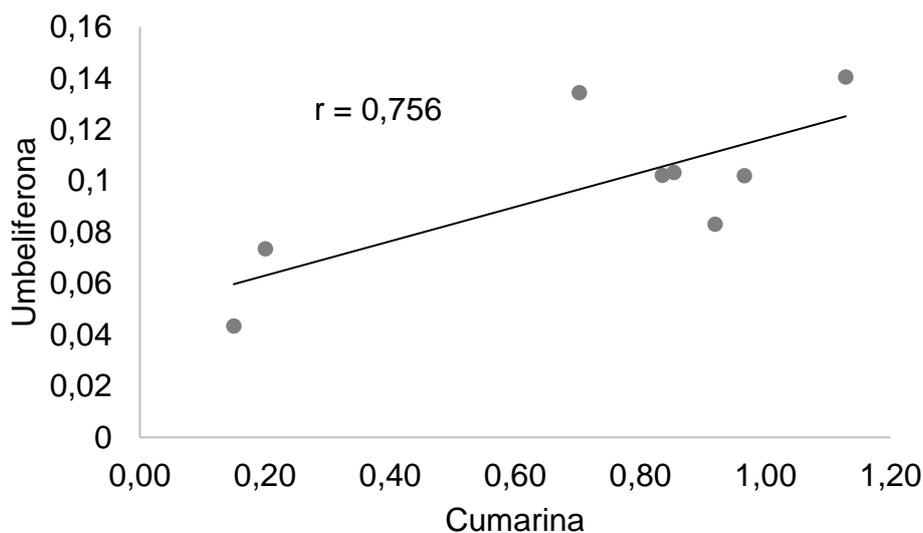


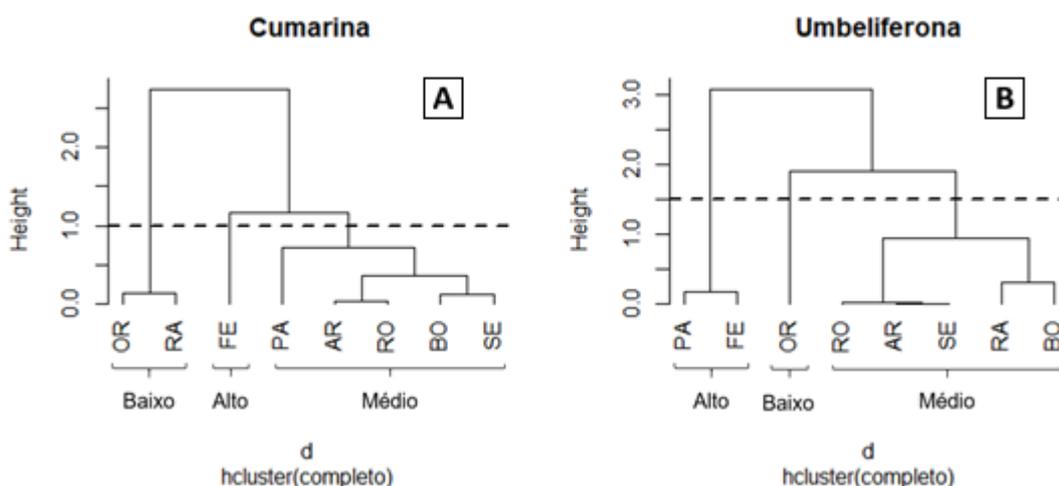
Tabela 9 - Variância acumulada (%) e autovetores para o primeiro (CP1) e segundo (CP2) componente principal para seis descritores morfológicos de *Justicia pectoralis*

Descritores	Componentes Principais	
	CP1	CP2
Altura de parte aérea	0.1842	0.8089
Circunferência caule	0.3496	-0.5393
Número de folhas	0.4611	-0.0855
Número de gemas	0.4653	-0.0866
Número de ramos	0.4595	-0.1853
Comprimento da raiz	0.4512	0.0755
Variância acumulada (%)	73.33	20.56

Os indivíduos foram agrupados em alto, médio e baixo teor de cumarinas (Figura 10). A separação dos indivíduos por teor de cumarinas é importante para destacar os genótipos mais produtores em metabólitos secundários de interesse farmacológico.

O fato de os indivíduos terem sido cultivados sob condição de casa de vegetação com temperatura e umidade controladas nos permite afirmar que a diferença no teor de cumarinas se deve a fatores genético e não ambientais.

Figura 10 - Classificação de oito acessos de *Justicia pectoralis*, cultivados em casa de vegetação, de acordo com os níveis de cumarina e umbeliferona, compreendendo baixo, médio e alto produtores



Legenda: AR - Araxá (MG); BO - Botucatu (SP); FE - Feijó (AC); OR - Oriximiná (PA); PA - Parnaíba (PI); RA - Rio Pomba (MG); RO - Ribeirão Preto (SP); SE - Sertãozinho (SP).

Tem sido reportado que plantas de *J. pectoralis* apresentam menor teor de cumarinas quando mantidas em casa de vegetação, do que quando cultivada no campo (CASSOLA et al.,2019). Dessa forma, seria importante realizar no futuro o cultivo em várias regiões do Brasil com os genótipos de FE (elevado teor de cumarinas), RO (médio teor) e OR (baixo teor), para avaliar o efeito do ambiente sobre esses genótipos. Além disso, definir quais indivíduos apresentam melhores características agrônômicas e químicas e se essas características se mantêm em diferentes municípios é importante para assegurar qualidade e eficácia na produção de fitoterápicos a partir dessa espécie.

É relevante encontrar genótipos de *J. pectoralis* superiores em produção de cumarinas, considerando que está bem estabelecido que essas substâncias modulam a inflamação e reduzem edema (YARNELL; ABASCAL, 2009). O mecanismo de ação das cumarinas, via de regra, está relacionado à eliminação de radicais livres (GARG et al., 2020). No entanto, em altas doses pode promover hepatotoxicidade (IWATA et al.,2016) sendo, portanto, importante determinar com precisão o teor de cumarinas nas espécies produtoras desses metabólitos que são utilizados para a produção de fitoterápicos. Embora já tenha sido relatado anteriormente que essa classe de metabólito é influenciada pela sazonalidade, época de colheita e estágio fenológico (PASSARI et al., 2019; PEREIRA et al., 2000; MARRELLI et al., 2014), essa é a primeira vez que está sendo demonstrado que genótipos de *J. pectoralis* utilizados para a produção de medicamentos apresentam expressiva diferença entre si quanto ao teor de cumarina e umbeliferona.

5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo mostraram uma diferença notável nas características agronômicas e químicas das plantas de *J. pectoralis* cultivadas e colhidas em vários meses durante o ano. Assim, para se obter maior produtividade e teor de cumarina deve-se evitar a colheita das plantas nos períodos mais secos do ano e para maior obtenção de umbeliferona o inverno ou a primavera são as estações mais adequadas para maior acúmulo desse composto.

Pela primeira vez, a diversidade genética de diferentes genótipos de *J. pectoralis* foi analisada usando marcador molecular SCoT, o qual foi eficiente para distinguir os vários genótipos analisados, demonstrando que há diversidade entre os materiais utilizados como fitoterápicos em várias regiões do Brasil.

A investigação da diversidade genética é essencial para a seleção de indivíduos elite, o quais deverão ser conservados e cultivados para produção de medicamento.

Os marcadores químicos cumarina e umbeliferona foram detectados em todos os genótipos avaliados e houve expressiva diferença do teor desses compostos entre os indivíduos avaliados. O genótipo coletado no município de Feijó, apresentou expressivo teor de cumarinas sendo considerado um material elite que deve ser cultivado em várias regiões para avaliar o efeito do ambiente sobre a produtividade e teor de marcadores químicos.

REFERÊNCIAS

- AGOSTINI-COSTA, T. S.; GOMES, I. S.; FONSRCA, M. C. M.; ALONSO, A. M.; PEREIRA, R. C. A.; JUNIOR, I. M.; SILVA, J. P.; PEREIRA, A. M. S.; SILVA, D. B.; VIEIRA, F. R.; VAZ, A. P; Effect of accessions and environment conditions on conditions oncoimarn) – coumarin and kaurenoic acids levels of *Mikania laevigata* **Planta Medica**, v. 82, p.1431-1437, 2016.
- AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 114–140, 2007.
- AGRITEMPO. Sistema de Monitoramento Agrometeorológico. 2021. Disponível em: <<https://www.agritempo.gov.br/agritempo/jsp/Estatisticas/index.jsp?siglaUF=SP>>. Acessado em: 15/07/2021.
- AGUILAR, R.; QUESADA, M.; ASHWORTH, L.; HERRERIAS-DIEGO, Y.; LOBO, J. Genetic consequences of habitat fragmentation in plant populations: susceptible signals in plant traits and methodological approaches. **Molecular Ecology**, v. 17, p. 5177–5188, 2008. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2008.03971.x
- ALLEVATO, D. M.; GROppo, M.; KIYOTA, E.; MAZZAFERA, P.; NIXON, P. K. C.; Evolution of phytochemical diversity in *Pilocarpus* (Rutaceae). **Phytochemistry**, v. 163, p. 132–146, 2019.
- AL-MAJEDY, Y. K.; KADHUM, A. A. H.; AL-AMIERY, A. A.; MOHAMAD, A. B. Coumarins: The Antimicrobial agents. **Systematic Reviews in Pharmacy**, v. 8, n. 1, p. 62-70, 2017.
- ALVES, L.; DESCHAMPS, C. Radiation levels of UV-A and UV-B on growth parameters and coumarin content in guaco. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 49, n. 06, p. e20190042, 2019.
- AOYAMA, E.M.; INDRIUNAS, A. Micromorfologia e anatomia foliar de duas espécies de *Justicia* L. (Acanthaceae) de uso medicinal. **Revista De Biologia Neotropical**, v. 11, n. 2, p. 97-106, 2015. DOI: 10.5216/rbn.v11i2.29671
- ANDRADE, F. M. C.; CASALI, V. W. D.; CECON, P. R. C. Efeito de dinamização de *Arnica montana* L. no metabolismo de chambá (*Justicia pectoralis* Jacq.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.14, p.159-162, 2012.a
- ANDRADE, F. M. C.; CASALI, V. W. D.; CECON, P. R. C. Crescimento e produção de cumarina em plantas de chambá (*Justicia pectoralis* Jacq.) tratadas com isoterápico. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, p. 154–158, 2012.b

- BAGDONAITE, E.; MÁRTONFIB, P.; REPCÁK, M.; LABOKAS, J. Variation in concentrations of major bioactive compounds in *Hypericum perforatum* L. from Lithuania. **Industrial Crops and Products**, v. 35, p. 302–308, 2012.
- BALLESTER, A. R.; LAFUENTE, M. T.; DE VOS, R. C. R.; BOVY, A. G.; GONZÁLEZ-CANDELAS, L. Citrus phenylpropanoids and defence against pathogens. Part I: Metabolic profiling in elicited fruits. **Food Chemistry**, v. 136, p. 178–185, 2013.
- BANSAL, M.; REDDY, S.; KUMAR, A. Seasonal variations in harvest index and bacoside A contents amongst accessions of *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. Collected from wild populations. **Physiol Mol Biol Plants**, v. 22, n. 3, p. 407–413, 2016.
- BERTOLUCCI, S.K.V.; PEREIRA, A.B.D.; PINTO, J.E.B.P.; OLIVEIRA, A.B.; BRAGA, F.C. Seasonal variation on the contents of coumarin and 56ecente-type diterpenes in *Mikania laevigata* and *M. glomerata* leaves under different shade levels. **Chemistry and Biodiversity**, v.10, n.2, p.288-295, 2013.
- BEZERRA, E.; MARCOS, A.; TERTULIANO, F. Rendimento de biomassa, óleo essencial, teores de fósforo e potássio de chambá em resposta à adubação orgânica e mineral. **Revista Ciência Agronômica**, v. 37, n. 2, p. 124–129, 2006.
- BRASIL. Farmacopeia Brasileira. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 6ªed, p. 180-185, 2019. Disponível em: < <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/farmacopeia-brasileira/arquivos/7989json-file-1>>. Acesso em: 16/07/2021.
- BRAZ, D.M.; CHAGAS, E.C.O.; FERNANDES, U.G.; COSTA-LIMA, J.L.; ZANATTA, M.R.V.; KAMEYAMA, C.; CÔRTEZ, A.L.A.; INDRIUNAS, A.; SILVA, F.A.; MONTEIRO, F.K.S.; AZEVEDO, I.H.F.; ZUNTINI, A.R.; RODRIGUES, M.C.; PAGLIA, I.; SOUZA, V.C.; PIONER, N.C.; MELO, J.I.M.; GIL, A.S.B.; EZCURRA, C.; PESSOA, C.S.; HIRAO, Y.V.; FERNANDO, E.M.P. 2020. *Acanthaceae in Flora do Brasil 2020*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB33>>. Acesso em: 25 junho. 2021
- BORGHI, A. A.; ALMEIDA, C. L.; SAWAYA, A. C. H. F. Damage and drying modify the composition of *Mikania glomerata* and *Mikania laevigata* leaves Brazilian **Journal of Pharmacognosy**, v. 29, p. 793–797, 2019.
- BOREM A.; FRITSCHÉ-NETO, R. **Biotecnologia aplicada ao melhoramento de plantas**. Visconde do Rio Branco, Editora Suprema, 1ªEd, p. 69-117, 2012.
- BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, v.32, p.314-331, 1980.
- CABO, S.; FERREIRA, L.; CARVALHO, A.; MARTINS-LOPES, P.; MARTÍN, A.; LIMA-BRITO, J. E. Potential of Start Codon Targeted (ScoT) markers for DNA fingerprinting

of newly synthesized tritordeums and their respective 57ecente57. **Journal of Applied Genetics**, v. 55, n. 3, p. 307–312, 2014. DOI:10.1007/s13353-014-0211-3

CAMERON, C.; JACOB, A. S.; THOMAS, E. A.; LEVY, A. S. Preliminary Investigations of the Anti-asthmatic Properties of the Aqueous Extract of *Justicia pectoralis* (Fresh Cut). **West Indian Med Journal**, v. 64, n. 4, p. 320-324, 2015.

CARBONELL-BEJERANO, P.; MARIA-PAZ, D.; MARTÍNEZ-ABAIGAR, J.; MARTÍNEZ-ZAPATER J. M; TARDÁGUILA, J.; NÚÑEZ-OLIVERA, E. Solar ultraviolet radiation is necessary to enhance grapevine fruit ripening transcriptional and phenolic responses. **BMC Plant Biology**, v. 14, n. 183, 2014.

CASSOLA, F.; SILVA, M. H. R.; BORGHI, A. A.; LUSA, M. G; SAWAYA, A. C. H. F.; GARCIA, V. L.; MAYER, J. L. S. Morphoanatomical characteristics, chemical profiles, and antioxidante activity of three species of *Justicia* L. (Acanthaceae) under different growth conditions. **Industrial Crops & Products**, v. 131, p. 257–265, 2019.

CASTRO, E. M.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V.; MALTA, M. R.; CARDOSO, M. G.; SILVA, F. A. M. Coumarin Contents in Young *Mikania glomerata* Plants (Guaco) under Different Radiation Levels and Photoperiod. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v. 25, n.3, p.387-92, 2006.

CHAGAS, E.C.O.; COSTA-LIMA, J.L. 2020. *Justicia* in **Flora do Brasil 2020**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB4137>>. Acesso em: 25 junho. 2021.

COLLARD, B. C. Y.; MACKILL, D. J. Start codon targeted (ScoT) polymorphism: a simple, novel DNA marker technique for generating genetargeted markers in plants. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 27, p. 86–93, 2009.

CONDE, V. S.; CERDEIRA, A. L.; FACHIN, A. L.; BERTONI, B. W.; PEREIRA, P. S.; FRANÇA, S. C.; MOMM, H. G.; MORAES, R. M.; PEREIRA, A. M. S. Geographical variation and quality assessment *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville within Brazil. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 59, p. 1349–1356, 2012. DOI: 10.1007/s10722-011-9761-y

CRUZ, C. D. Programa GENES – versão 57ecente. Aplicativo computacional em Genética e Estatística. 1. Ed. Viçosa-MG: Editora UFV, v. 1, p.648, 2001.

DOYLE, J. DNA protocols for plants. **Molecular Techniques in Taxonomy**, v. H57, p. 283-293, 1991.

DROBY, S.; VINOKUR, V.; WEISS, B.; COHEN, L.; DAUS, A.; GOLDSCHMIDT, E. E.; PORAT, R. Induction of Resistance to *Penicillium digitatum* in Grapefruit by the Yeast Biocontrol Agent *Candida oleophila*. **Phytopathology**, v. 92, n. 4, p. 393-399, 2002.

DURKEE, L. H. Flora Costaricensis: Acanthaceae. **Fieldiana Botany**, v. 18, p. 57, 1986. DOI: 10.5962/bhl.title.2628

ENDRESS, P. Diversity and evolutionary biology of tropical 58ecente. Cambridge: Cambridge University Press. p. 528, 1994.

ETMINAN, A., POUR-ABOUGHADAREH, A., NOORI, A., AHMADI-RAD, A., SHOOSHTARI, L., MAHDAVIAN, Z., YOUSEFIAZAR-KHANIAN, M. Genetic relationships and diversity among wild *Salvia* accessions revealed by ISSR and SCoT markers. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 32, n. 3, p. 610–617, 2018. DOI: 10.1080/13102818.2018.1447397.

EVANNA, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology**, v.14, n.8, p. 2611-2620, 2005.

EZCURRA C. El Género *Justicia* (Acanthaceae) na Sudamérica Austral. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 89, n. 2., p. 225-280, 2002. DOI: 10.2307/3298565

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, Documentos 20, p.220, 1998.

FERREIRA, T. A.; CHAVES, P. P. N.; GELLEN, L. F. A.; MARQUES, K. M.; NASCIMENTO, I. R. Produção de mudas de chambá (*Justicia pectoralis* Jacq) em diferentes tipos de substratos e tamanhos de recipientes. **Agropecuária Científica no Semiárido**, v. 11, p. 93–96, 2015.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia (UFPA)**, v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.

FRANZON, R. C.; CASTRO, C. M.; RASEIRA, M. C. B. VARIABILIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE PITANGUEIRA ORIUNDAS DE AUTOPOLINIZAÇÃO E POLINIZAÇÃO LIVRE, ACESSADA POR AFLP. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 1, p. 240-250, 2010.

FREITAS, R. M. O.; NOGUEIRA, N. W.; PRAXEDES, S. C. Multiplicação de anador (*Justicia pectoralis*) *in vitro*. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v.11, n.3, p.159-163, 2016.

GARG, S. S.; GUPTA, J.; SHARMA, S.; SAHU, D. An insight into the therapeutic applications of coumarin compounds and their mechanisms of action. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 152, 105424, 2020. DOI: 10.1016/j.ejps.2020.105424

GUIMARAES, C. T.; MAGALHAES, J. V.; LANZA, M. A.; SCHUSTER, I. Marcadores moleculares e suas aplicações no melhoramento genético. **Informe Agropecuário - Biotecnologia**, EMBRAPA milho e sorgo, v. 30, n. 253, p. 24-33, 2009.

GORJI, A. M.; POCZAI, P.; POLGAR, Z.; TALLER, J. Efficiency of arbitrarily amplified dominant markers (ScoT, ISSR and RAPD) for diagnostic fingerprinting in tetraploid potato. **American Journal of Potato Research**, v. 88, p. 226–237, 2011.

HAMADA, H.; PETRINO, M.C.; TAKUGANA, T. A novel repeated element with Z-forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.79, p.6465-6469, 1982.

HASSANA, F. A. S.; ISMAILA, I. A.; MAZROUD, R.; HASSANA, M. Applicability of inter-simple sequence repeat (ISSR), start codon targeted (SCoT) markers and ITS2 gene sequencing for genetic diversity assessment in *Moringa oleifera* Lam. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v.18, p. 100256, 2020.

HONÓRIO, I. C.; COPPEDE, J. S.; DELPRETE, P. G.; COSTA, F. H. S.; TELLES, M. P. C.; BRAGA, R. S.; DINIZ-FILHO, J. A. F. Genetic structure and chemical diversity in natural populations of *Uncaria guianensis* (Aubl.) J.F.Gmel. (Rubiaceae). **PLOS ONE**, v. 13, n. 10, p. e0205667, 2018. DOI: 10.1371/journal.pone.0205667

HRICHI, S.; CHAABANE-BANAOUES, R.; GIUFFRIDA, D.; MANGRAVITI, D.; MAJDOUB, Y. O. E.; RIGANO, F.; MONDELLO, L.; BABBA, H.; MIGHRI Z.; CACCIOLA, F. Effect of seasonal variation on the chemical composition and antioxidant and antifungal activities of *Convolvulus althaeoides* L. leaf extracts. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 13, n. 3p. 5651-5668, 2020.

INNECCO, R. CRUZ, G. F.; VIEIRA, A. V.; MATTOS, S. H.; CHAVES, F. C. M. Espaçamento, época e número de colheitas em hortelã-rasteira (*Mentha x villosa* Huds). **Revista Ciência Agronômica**, v. 34, n. 2, p. 247-251, 2003.

IWATA, N.; KAINUMA, M.; KOBAYASHI, D.; KUBOTA, T.; SUGAWARA, N.; UCHIDA, A.; OZONO, S.; YAMAMURO, Y.; FURUSYO, N.; UEDA, K.; TAHARA, E.; SHIMAZOE, T. The Relation between Hepatotoxicity and the Total Coumarin Intake from Traditional Japanese Medicines Containing Cinnamon Bark. **Frontiers in Pharmacology**, v. 7, artigo 174, 2016. DOI:10.3389/fphar.2016.00174

JOSEPH, H.; GLEYE, J.; FOURASTE, I.; SATANISLAS, E. 0-Methoxylated C-Glycosylflavones From *Justicia pectoralis*. **Journal of natural products**, v. 51, n. 4, p. 804-801, 1988.

KIRCHHOFF, V. W. J. H.; ECHER, E; LEME, N. P.; A. A. SILVA, A Variação Sazonal da Radiação Ultravioleta Solar Biologicamente Ativa. **Brazilian Journal of Geophysics**, v. 18, n. 1, 2000.

KUNIGA, T.; NESUMI, H. UV-C Irradiation Affects Accumulation of Scoparone in Citrus. **Acta Horticultura**, v. 907, p. 81-86, 2011.

LEAL, L. K. A. M.; FERREIRA, A. A. G.; BEZERRA, G. A.; MATOS, F. J. A.; VIANA, G. S. B. Antinociceptive, anti-inflammatory and bronchodilator activities of Brazilian

medicinal plants containing coumarin: a comparative study. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 70, n. 2, p. 151–159, 2000.

LEE, S. R.; CHOI, J. E.; LEE, B. Y.; YU, J. N.; LIM, C. E. Genetic diversity and structure of an endangered medicinal herb: implications for conservation. **AoB PLANTS**, 10: ply021, 2018. DOI: 10.1093/aobpla/ply021

LIMA, A. R. S.; LÔBO, L. A. C.; COSTA, T. L. C.; PEIXOTO, J. C.; BORGES, L. L.; AMARAL, V. C. S.; PAULA, J. A. M. Eco-friendly extraction and simultaneous determination of two coumarins in *Justicia pectoralis* (Acanthaceae). **Pharmacognosy**, 2020. DOI: 10.1590/2175-7860202071041

LIMA, P. Z. **Cultivo e teor de cumarinas em *Justicia pectoralis* Jacq. var. *stenophylla* Leonar**. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Horticultura) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Agronomia (Horticultura), Campus Botucatu, p. 75, 2018.

LINO, C. S.; TAVEIRA, M. L.; VIANA, G. S. B.; MATOS, F. J. A. Analgesic and Antiinflammatory Activities of *Justicia pectoralis* Jacq and its Main Constituents: coumarin and Umbelliferone. **Phytotherapy research**, v, 11, p. 211–215, 1997.

LITT, M.; LUTY, J.A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a nucleotide repeat within the cardiac muscle action gene. **American Journal of Human Genetics**, v.44, p.398-401, 1989.

LUO, C.; HE, X.; CHEN, H.; HU, Y.; OU, S. Genetic relationship and diversity of *Mangifera indica* L.: revealed through ScoT analysis. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 59, p. 1505–1515, 2012. DOI: 10.1007/s10722-011-9779-1

MACRAE, W. D.; TOWERS, G. H. N. *Justicia pectoralis*: a study of the basis for its use as a hallucinogenic snuff ingredient. **Journal of ethnopharmacology**, v. 12, n. 1, p. 93-111, 1984.

MARRELLI, M.; STATTI, G. A.; TUNDIS, R. MENICHINI, F.; CONFORTI, F. Fatty acids, coumarins and polyphenolic compounds of *Ficus carica* L. cv. Dottato: variation of bioactive compounds and biological activity of aerial parts. **Natural Product Research**, v. 28, n. 4, p. 271–274, 2014.

MATOS, F.J.A. **Farmácias vivas; sistemas de utilização de plantas Mediciniais projetado para pequenas comunidades**. 2 ed. Fortaleza: EUFC, 1994, p. 180.

MERT, C.; BARUT, E.; İPEK, A. Quantitative Seasonal Changes in the Leaf Phenolic Content Related to the Alternate-Bearing Patterns of Olive (*Olea europaea* L. cv. Gemlik). **Journal of Agricultural Science and Technology**, v. 15, n. 5, p. 995-1006, 2013.

MILACH, S.C.K. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 1998.

MISHRA, S.; PANDEY, A.; MANVATI, S. Coumarin: An emerging antiviral agente. **Heliyon**, v. 6, p. e03217, 2020.

MORIKAWA, C. I. O.; MIYAURA, R.; KAMO, T.; HIRADATE, S.; PÉREZ, J. A. C.; FUJII, Y. Isolation of umbelliferone as a principal allelochemical from the peruvian medicinal plant *Diplostegium foliosissimum* (Asteraceae). **Revista de la Sociedad Química del Perú**, v. 77, n. 4, p. 285-291, 2011.

MOURA, C. T. M.; BATISTA-LIMA, F. J.; BRITO, T. S.; SILVA, A. A. V.; FERREIRA, L. C.; ROQUE, C. R.; ARAGÃO, K. S.; HAVT, A.; FONSECA, F. N.; LEAL, L. K. A. M.; MAGALHÃES, P. J. C. Inhibitory effects of a standardized extract of *Justicia pectoralis* in an experimental rat model of airway hyper-responsiveness **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 69, n. 6, p. 722–732, 2017. DOI: 10.1111/jphp.12689

OLIVEIRA, S. G. D.; MOURA F. R. R.; DEMARCO, F. F.; NASCENTE, P. S.; DEL PINO, F.A.B.; LUND, R. G. An ethnomedicinal survey on phytotherapy with professionals and patients from Basic Care Units in the Brazilian Unified Health System. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 140, n. 2 p. 428– 437, 2012. DOI: 10.1016/j.jep.2012.01.054

OLIVEIRA, A. F. M.; XAVIER, H. S.; SILVA, N. H.; ANDRADE, L. H. C. Screening cromatográfico de Acanthaceae medicinais: *Justicia pectoralis* Jacq. e *J. geradarussa* Burm. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 3, p, 37–41, 2000.

OZORIO, P. R. S.; ATROCH, A. L.; NASCIMENTO FILHO, F.J. agro-morphological characterization and genetic diversity of *Paulliniacupana* var. *sorbilis*. **Brazilian Journal of Agriculture**, v.94, n.3, p. 166 – 178, 2019.

PASSARI, L. M. Z. G.; SCARMINIO, I. S.; MARCHEAFAVE, G. G.; BRUNS, R. E. Seasonal changes and solvent effects on fractionated functional food component yields from *Mikania laevigata* leaves. **Food Chemistry**, v. 273, p. 151–158, 2019.

PEAKALL, R., SMOUSE, P.E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes**, v. 6, p. 288–295, 2006.

PECCHIONI, N.; FACCIOLI, P.; MONETTI, A.; STANCA, A.M.; TERZI, V. Molecular markers for genotype identification in small grain cereals. **Journal of Genetics & Breeding**, v.50, p.203-219, p. 1996.

PEREIRA, A. M. S. Formulário Fitoterápico da Farmácia da Natureza. ed. 1, São Paulo: **Editora Bertolucci**, 2020, 410 p.

PEREIRA, J. B. A.; RODRIGUES, M. M.; MORAIS, I. R.; VIEIRA, C. R. S.; SAMPAIO, J. P. M.; MOURA, M. G.; DAMASCENO, M. F. M.; SILVA, J. N.; CALOU, I. B. F.; DEUS, F. A.; PERON, A. P.; ABREU, M. C.; MILITÃO, G. C. G.; FERREIRA, P. M. P. O papel terapêutico do Programa Farmácia Viva e das plantas medicinais

no centro-sul piauiense. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.17, n.4, p.550-561, 2015.

PEREIRA, A. M. S.; BERTONI, W. B.; JORGE, C. R.; FERRO, D.; CARMONA, F. MOREL, L. J. F.; OLIVEIRA, M. **Manual prático de multiplicação e colheita de plantas medicinais**. Universidade de Ribeirão Preto-UNAERP. Ed.Bertolucci, p. 280, 2011.

PEREIRA, A. M. S.; CÂMARA, F. L. A.; CELEGHINI, R. M. S.; VILEGAS, J. H. Y.; LANÇAS, F. M.; FRANÇA, S. C. Seasonal Variation in Coumarin Content *Mikania glomerata*. **Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants**, v. 7. N. 2, p. 1-10,2000. DOI: 10.1300/J044v07n02_01

PHROMPITTAYARAT, W.; JETIYANON, K.; WITTAYA-AREEKUL, S.; PUTALUN, W.; TANAKA, H.; KHAN. I.; INGKANINAN, K. Influence of seasons, different plant parts, and plant growth stages on saponin quantity and distribution in *Bacopa monnieri*. **Songklanakarin Journal of Science and Technolgy**, v. 33, n. 2, p. 193-199, 2011.

POCZAI, P.; VARGA, I.; LAOS, M.; CSEH, A.; BELL, N.; VALKONEN, J.P.T.; HYVÖNEN, J. Advances in plant gene-targeted and functional markers: a review. **Plant Methods**, v. 9, n. 1, p. 6, 2013.

POUR-ABOUGHADAREH, A.; AHMADI, J.; MEHRABI, A. A.; ETMINAN, A.; MOGHADDAM, M. Assessment of Genetic Diversity among Iranian *Triticum* Germplasm Using Agro-morphological Traits and Start Codon Targeted (ScoT) Markers. **Cereal Research Communications**, v.45, n. 4, p. 574–586, 2017.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. INFERENCE OF POPULATION STRUCTURE USING MULTILOCUS GENOTYPE DATA. **GENETICS**, v. 155, n. 2, p. 945-959, 2000.

PROFICE, S. R.; KAMEYAMA, C.; CÔRTEZ, A. L. A.; BRAZ, D. M.; INDRIUNAS, A.; VILAR, T.; PESSOA, C.; EZCURRA, C.; WASSHAUSEN, D. Acanthaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB21673>>. Acesso em: 25 de junho 2021.

QUE, Y.; PAN, Y.; LU, Y.; YANG, C.; YANG, Y.; HUANG, N.; XU, L. Genetic Analysis of Diversity within a Chinese Local Sugarcane Germplasm Based on Start Codon Targeted Polymorphism. **BioMed Research International**, p. 1–10, 2014. DOI:10.1155/2014/468375

RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. Genetic diagnostics in plant breeding: RAPDs, microsatellites, and machines. **Trends in Genetics**, v.9, p.275-280, 1993.

RAJESH, M. K.; SABANA, A. A.; RACHANA, K. E.; RAHMAN, S.; JERARD, B.A.; KARUN, A. Genetic relationship and diversity among coconut (*Cocos nucifera* L.) accessions re- vealed through ScoT Analysis. **3 Bitech**, v. 5, p. 999–1006, 2015. DOI: 10.1007/ s13205-015-0304-7.

RAMESH, B.; PUGALENDI, K. V. Anti-hyperglycemic effect of umbelliferone in streptozotocin-diabetic rats. **Journal of Medicinal Food**, v. 9, n. 4, p. 562–566, 2006.

RAUF, A.; KHAN, R.; KHAN, H.; PERVEZ, S.; PIRZADA, A.S. In vivo antinociceptive and anti-inflammatory activities of umbelliferone isolated from *Potentilla evestita*. **Natural Product Research**, v. 28, n. 17, p. 1371–1374, 2014.

REPCAČ, M.; IMRICH, J.; FRANEKOVÁ, M. Umbelliferone, a stress metabolite of *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert. **Journal of Plant Physiology**, v. 158, p. 1085–1087, 2001.

REZENDE, C. F. A.; DUTRA, G. A.; VIEIRA, R. M.; PEIXOTO, J. C. Produção de biomassa e teor foliar de nutrientes em *Justicia pectoralis* Jacq. Com diferentes tipos de adubação **Research, Society and Development**, v. 9, n.9, e185997040, 2020. DOI: 10.33448/rsd-v9i9.7040

RUTKOWSKA, M.; BALCERCZAK, E.; ŚWIECHOWSKI, R.; DUBICKA, M.; OLSZEWSKA, M. A. Seasonal variation in phenylpropanoid biosynthesis and in vitro antioxidant activity of *Sorbus domestica* leaves: Harvesting time selection for medicinal application. **Industrial Crops & Products**, v. 156, 112858, 2020.

SALOMÃO, A. N. Manual de curadores de germoplasma – Vegetal: Glossário, Doc 326. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF. 1ª Ed, 14p, 2010.

SATYA, P.; KARAN, M.; JANA, S.; MITRA, S.; SHARMA, A.; KARMAKAR, P. G.; RAY, D. P. Start codon targeted (ScoT) polymorphism reveals genetic diversity in wild and domesticated populations of ramie (*Boehmeria nivea* L. Gaudich.), a premium textile fiber producing species. **Meta Gene**, v. 3, p. 62–70, 2015. DOI: 10.1016/j.mgene.2015.01.003

SCHIPPMANN, U.; LEAMAN, D.; CUNNINGHAM, A. B. A comparison of cultivation and wild collection of medicinal and aromatic plants under sustainability aspects, in: R.J. BOGERS, L.E. CRAKER AND D. LANGE (eds.), **Medicinal and Aromatic Plants**, p. 75-95. 2006.

SMITH, J.S.C.; SMITTH, O.S. Fingerprinting crop varieties. **Advances in Agronomy**, v.47, p.85-140, 1992.

SOUTHWELL, I. A.; BOURKE, C.A. Seasonal variation in hypericin content of *Hypericum perforatum* L. (St. John's Wort). **Phytochemistry**, v. 56, p. 437–441, 2001.

SOUZA-NETO, A. C.; CIANCIARUSO, M. V.; COLLEVATTI, R. G. Habitat shifts shaping the diversity of a biodiversity hotspot through time: insights from the phylogenetic structure of *Caesalpinioideae* in the Brazilian Cerrado. **Journal of Biogeography**, v. 43, n. 2, p. 340–350, 2015. DOI:10.1111/jbi.12634

SRIVASTAVA, A.; GUPTA, S.; SHANKER, K.; GUPTA, N.; GUPTA, A.K.; LAL, R. K. Genetic diversity in Indian poppy (*P. somniferum* L.) germplasm using multivariate and ScoT marker analyses. **Industrial Crops & Products**, v. 144, p. 112050, 2020. DOI: 10.1016/j.indcrop.2019.112050

TAJBAKHT, P.; TALEBI, M.; RAHIMMALEK, M. Genetic diversity among and within *Ferula asafoetida* H. Karst. Populations using molecular and phytochemical markers. **Phytochemistry**, v. 155, p. 19–29, 2018. DOI: 10.1016/j.phytochem.2018.07.004

TENE, V.; MALAGON, O.; FINZI, P. V.; VIDARI G., ARMIJOS, C. ZARAGOZA, T. An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Loja and Zamora-Chinchipec, Ecuador. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 1, p. 63–81, 2007.

TROPICOS. *Justicia pectoralis* Jacq. Disponível em: <<http://www.tropicos.org/Name/100660>>. Acesso em: 04 Sep 2017.

TYAGI, R. SHARMA, V.; SUREJA, A. K.; MUNSHI, A. D.; ARYA, L.; SAHA, D.; VERMA, M. Genetic diversity and population structure detection in sponge gourd (*Luffa cylindrica*) using ISSR, ScoT and morphological markers. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 26, n. 1, p. 119–131, 2020.

VASCONCELOS, J. F.; TEIXEIRA, M. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; AGRA, M. F.; NUNES, X. P.; GIULIETTI, A. M.; SANTOS, R. R.; SOARES, M. B. Effects of umbelliferone in a murine model of allergic airway inflammation. **European journal of pharmacology**, v. 609, n. 1-3, p. 126-131, 2009.

VERMA, N.; SHUKLA, S. Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites. Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 2, p. 105–113, 2015.

VIEIRA, M. L. C. Conservação de germoplasma in vitro. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. N.3, v.14, 2000. P.18-20.

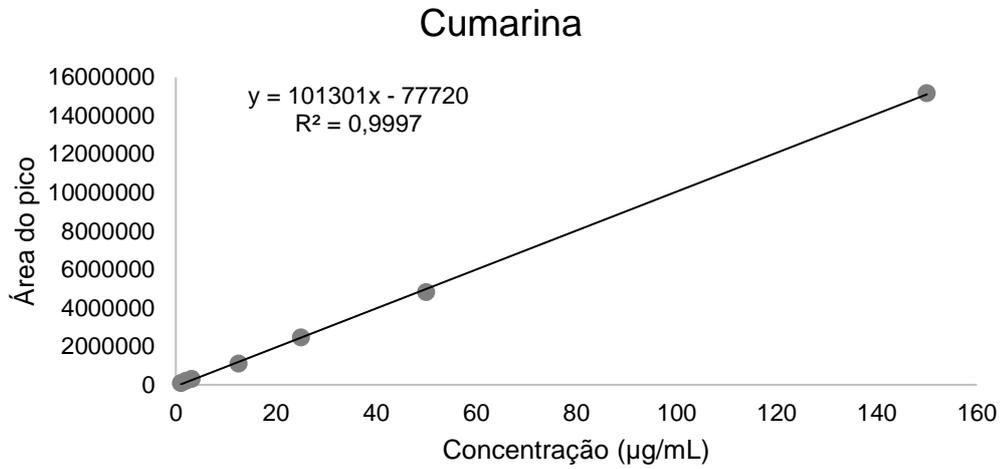
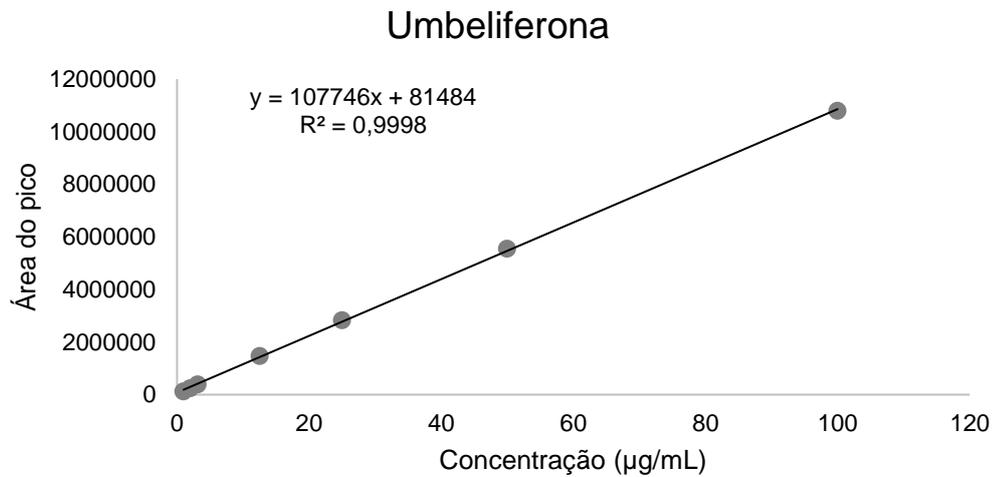
VIEIRA, R. M.; VIEIRA, A. S.; REZENDE, C. F. A.; PEIXOTO, J. C. Crescimento, acúmulo de nutrientes e prospecção fitoquímica da *Justicia pectoralis* Jacq em função do tipo de adubação. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável (RBAS)**, v.9, n.4, p.27-33, 2019.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v.23, p.4407-4414, 1995.

VRIES, J. X.; TAUSCHER, B.; WURZEL, G. Constituents of *Justicia pectoralis* Jacq. 2. Gas chromatography/mass spectrometry of simple coumarins, 3-phenylpropionic acids and their hydroxy and methoxy derivatives. **Biomedical mass spectrometry**, v. 15, n. 8, p. 413-417, 1988.

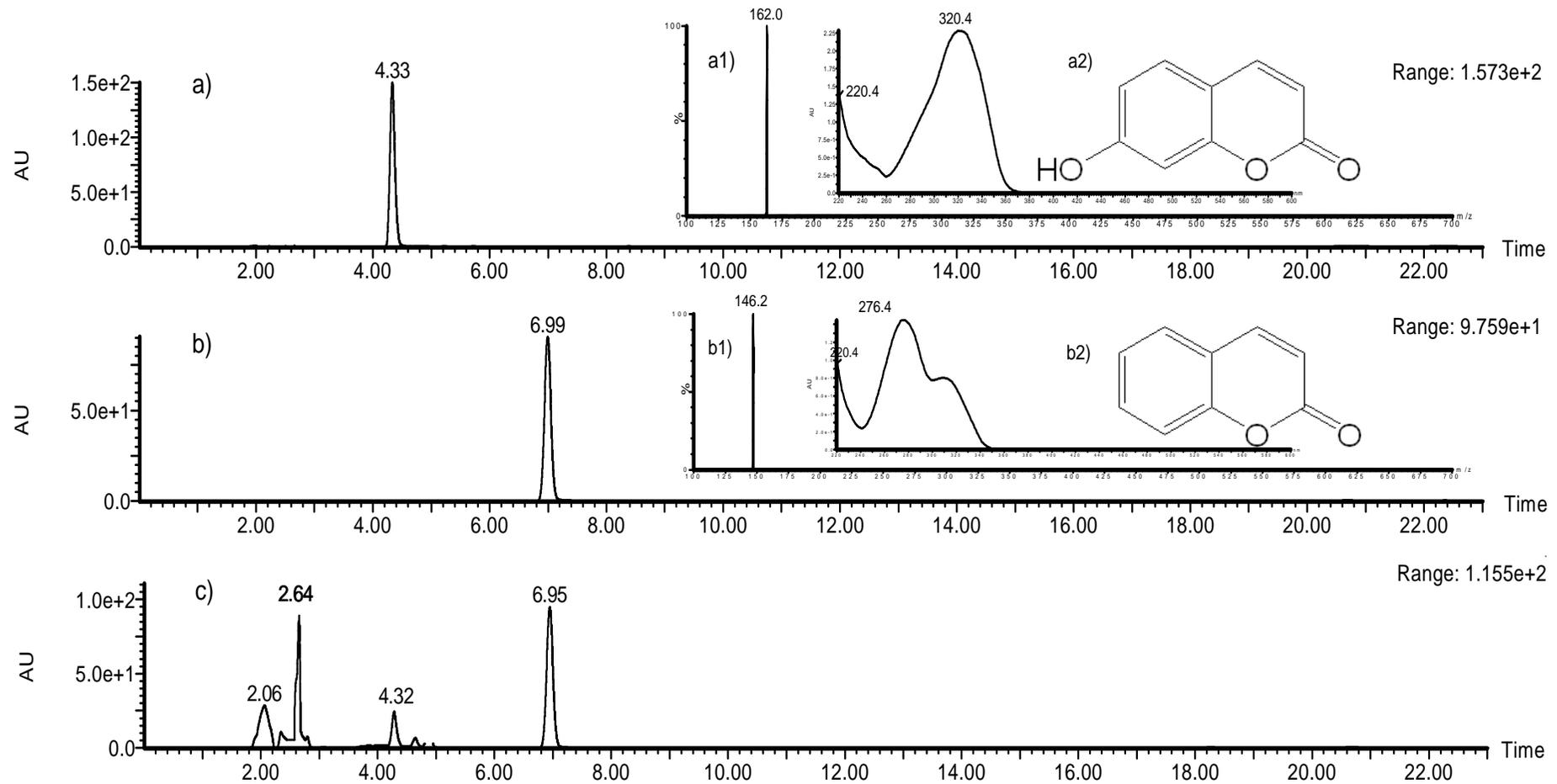
- WASSHAUSEN, D. C.; WOOD, J. R. I. Acanthaceae of Bolivia. **Contributions from the United States National Herbarium**, v. 49, 2004.
- WHITE, T.J.; ARNHEIM, N.; ERLICH, H.A. The polymerase chain reaction. **Trends in Genetics**, v.5, p.185-189, 1989.
- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIC, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary *primers* are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v.18, p.6531-6535, 1990.
- WILT, F. M.; MILLER, G. C. Seasonal variation of coumarin and flavonoid concentrations in persistent leaves of wyoming big sagebrush (*Artemisia tridentata* ssp. *wyomingensis*: Asteraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 20, n. 1, p. 53–67, 1992. DOI:10.1016/0305-1978(92)90072-I
- XIONG, F.; ZHONG, R.; HAN, Z.; JIANG, J.; HE, L.; ZHUANG, W.; TANG, R. Start 65ecen targeted polymorphism for evaluation of functional genetic variation and relationships in cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.) genotypes. **Molecular Biology Reports**, v. 38, n. 5, p. 3487–3494, 2010. DOI:10.1007/s11033-010-0459-6
- YARNELL, E.; ABASCAL, K. Plant Coumarins: Myths and Realities. **Alternative and Complementary Therapies**, v. 15, n. 1, p. 24-30, 2009. DOI: 10.1089/act.2009.15104.
- YASMIN, G. S.; CARVALHO, L. C. V.; UERIC, J. B. S.; LAYARA, A. B. Recent Trends in Research on the Genetic Diversity of Plants: Implications for Conservation. **Diversity**, v.11, 62, 2019. DOI:10.3390/d11040062
- YUAN, Q. J.; ZHANG, Z. Y.; HU, J.; GUO, L. P.; SHAO, A. J.; HUANG, L. Q. Impacts of 65ecente cultivation on genetic diversity pattern of a medicinal plant, *Scutellaria baicalensis* (Lamiaceae). **BMC Genetics**, 11:29, 2010. DOI:10.1186/1471-2156-11-29
- YUE, Q.; ZHANG, C.; WANG, Q.; WANG, W.; WANG, J.; WU, Y. Analysis on genetic diversity of 51 Grape germplasm resources. **Ciência Rural**, v. 49, n. 11, p. e20190247, 2019.
- ZABEAU, M. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. **European Patent Application**, No 0534858, 1993.
- ZHANG, J.; XIE, W.; WANG, Y.; ZHAO, X. Potential of Start Codon Targeted (ScoT) Markers to Estimate Genetic Diversity and Relationships among Chinese *Elymus sibiricus* Accessions. **Molecules**, v. 20, n. 4, p. 5987–6001, 2015. DOI:10.3390/molecules20045987
- ZOBEL, A. M.; BROWN, S. A. Seasonal changes of furanocoumarin concentrations in leaves of *Heracleum lanatum*. **Jounal of Chemical Ecology**, v. 16, n. 5, p. 1623-1634, 1990.

ZULOAGA, F. O.; MORRONE, O.; BELGRANO, M.J.; MARTICORENA, C.; MARCHESI, E. Catálogo de las Plantas Vasculares del Cono Sur – Argentina, Sur de Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay). In: Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden, 107 1-3348, 2008.

APÊNDICE A - Curvas de calibração**Figura 11 - Curva de calibração de cumarina utilizada nos experimentos de *Justicia pectoralis*****Figura 12 - Curva de calibração de umbeliferona utilizada nos experimentos de *Justicia pectoralis***

APÊNDICE B - Cromatograma obtido por CLUE-DAD-EM

Figura 13 - Cromatogramas obtidos por CLUE-DAD-EM dos padrões umbeliferona (a), espectro de massa e UV(a1) e cumarina (b), espectro de massa e UV (b1) e extratos de parte aérea do material de Feijó (c)



APÊNDICE C - Resumo das análises de variância (ANOVA)

Tabela 10 - Resumo da análise de variância para a época de cultivo na altura da parte aérea (APA), diâmetro de crescimento da parte aérea (DCPA), presença de inflorescência (PI), massa de parte aérea fresca (MPAF), massa de parte aérea seca (MPAS), teores de cumarinas (CUM) e umbeliferona (UMB) em *Justicia pectoralis* cultivadas por 3, 6, 9 e 12 meses

FV	GL	Quadrado médio						
		APA	DCPA	PI	MPAF	MPAS	CUM	UMB
Época	3	276,43*	237,38*	3,57*	25704,77*	1960,72*	33,42*	1,16*
Bloco	5	17,10 ^{ns}	114,10*	0,08 ^{ns}	1703,58 ^{ns}	123,01 ^{ns}	1,40*	0,02*
Resíduo	15	17,92	36,83	0,07	1498,12	124,69	0,24	0,00
Total	23							
C.V.(%)		12,33	14,99	8,68	32,89	30,48	11,15	2,69
Média geral		18,09	21,07	0,68	61,64	18,56	1,02	0,19

^{ns} Não significativo; * Significativo pelo teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. Dados transformados em raiz quadrada de $Y + 1.0 - \text{SQRT} (Y + 1.0)$.

FV = fonte de variação, G.L. = grau de liberdade.

Tabela 11 - Resumo da análise de variância para a rebrota na altura da parte aérea (APA), diâmetro de crescimento da parte aérea (DCPA), presença de inflorescência (PI), massa de parte aérea fresca (MPAF), massa de parte aérea seca (MPAS), teores de cumarinas (CUM) e umbeliferona (UMB) em *Justicia pectoralis*

FV	GL	Quadrado médio						
		APA	DCPA	PI	MPAF	MPAS	CUM	UMB
Rebrota	4	205,88*	1211,93*	3,51*	3454,60*	188,41*	31,97*	0,52*
Bloco	5	12,74 ^{ns}	583,47*	0,01 ^{ns}	489,63*	22,12 ^{ns}	2,17*	0,04*
Resíduo	20	9,96	129,86	0,01	202,58	10,78	0,73	0,00
Total	29							
C.V.(%)		13,48	14,74	4,02	35,21	27,94	13,89	3,10
Média geral		10,87	38,11	0,21	19,73	4,76	1,38	0,26

^{ns} Não significativo; * Significativo pelo teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. Dados transformados em raiz quadrada de $Y + 1.0 - \text{SQRT} (Y + 1.0)$.

FV = fonte de variação, G.L. = grau de liberdade.

Tabela 12 - Resumo da análise de variância para altura da parte aérea (APA), diâmetro do caule (DC), número de folhas (NF), número de gemas (NG), número de ramos (NR), massa de parte aérea fresca (MPAF), massa de parte aérea seca (MPAS), massa de raiz fresca (MRF), massa de raiz seca (MRS), comprimento de raiz (CR), teores de cumarinas (CUM) e umbeliferona (UMB) de oito genótipos de *Justicia pectoralis* cultivados em casa de vegetação

FV	GL	Quadrado médio											
		APA	DC	NF	NG	NR	MPAF	MPAS	MRF	MRS	CR	CUM	UMB
Genótipos	7	15,70*	0,09 ^{ns}	1902,28*	470,52*	54,26*	1,77*	0,13*	1,19*	0,01*	48,37*	1,15*	0,00*
Resíduo	32	1,83	0,05	172,50	74,75	8,62	0,10	0,00	0,26	0,00	7,62	0,02	0,00
Total	39												
C.V.(%)		15,60	12,46	15,35	19,37	23,65	12,88	12,40	33,11	19,94	13,97	4,20	1,38
Média geral		8,68	1,79	85,54	44,62	12,42	2,49	0,55	1,53	0,26	19,75	0,72	0,10

^{ns} Não significativo; * Significativo pelo teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

FV = fonte de variação, G.L. = grau de liberdade.