

NATÁLIA HELENA GAVILAN

**DIVERSIDADE GENÉTICA E QUANTIFICAÇÃO DE VERBASCOSÍDEO EM
POPULAÇÕES NATURAIS DE *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers**

**Botucatu
2019**

NATÁLIA HELENA GAVILAN

**DIVERSIDADE GENÉTICA E QUANTIFICAÇÃO DE VERBASCOSÍDEO EM
POPULAÇÕES NATURAIS DE *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers**

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

Orientadora: Dr^a. Ana Maria Soares Pereira

Coorientadora: Dr^a. Bianca Waleria Bertoni

**Botucatu
2019**

G283d Gavilan, Natália Helena
Diversidade genética e quantificação de verbascosídeo em populações naturais de *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers / Natália Helena Gavilan. -- Botucatu, 2019
57 p. : tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu
Orientadora: Ana Maria Soares Pereira
Coorientadora: Bianca Waleria Bertoni

1. Plantas medicinais. 2. Conservação de recursos genéticos. 3. Fitoquímica. 4. Verbascosídeo. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título:

“DIVERSIDADE GENÉTICA E QUANTIFICAÇÃO DE VERBASCOSÍDEO EM POPULAÇÕES NATURAIS DE *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl) Miers”

AUTORA: NATÁLIA HELENA GAVILAN


ORIENTADORA: ANA MARIA SOARES PEREIRA

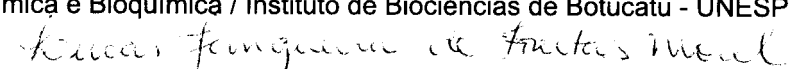
COORIENTADORA: BIANCA WALERIA BERTONI

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
Biotecnologia / Universidade de Ribeirão Preto


Prof. Dr. FILIPE PEREIRA GIARDINI BONFIM
Horticultura / Faculdade de Ciências Agrônômicas, de Botucatu - UNESP


Prof.^a Dr.^a GIUSEPPINA PACE PEREIRA LIMA
Química e Bioquímica / Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP


Prof. Dr. LUCAS JUNQUEIRA DE FREITAS MOREL
Biotecnologia / Universidade de Ribeirão Preto


Prof.^a Dr.^a JULIANA DA SILVA COPPEPE
Biotecnologia / Universidade de Ribeirão Preto

Botucatu, 23 de agosto de 2019.

Dedico aos meus pais, Vera e Ulderico, que nunca mediram esforços para que minha trajetória acadêmica pudesse ser cumprida. E aos meus irmãos, Arthur e João Pedro, por sempre me propiciarem momentos único de irmandade.

Essa tese é para eles.

AGRADECIMENTOS

Muitas são as pessoas a quem eu gostaria de agradecer, essa tese é o encerramento de um ciclo, e muitos foram aqueles que contribuíram para minha chegada até aqui.

Agradeço,

A todos os professores que passaram pela minha vida escolar/acadêmica, sou fruto do que aprendi com cada um deles.

Aos meus pais, que sempre me incentivaram, apoiaram e acreditaram nos meus estudos. Aos meus irmãos Arthur e João Pedro, pela cumplicidade e companheirismo que temos, cada um à sua forma e tão essenciais em minha vida. Tudo o que eu sou, sou por vocês.

Ao Alisson, pelo companheirismo, apoio, cumplicidade, amor, e principalmente, por ter feito desses anos de doutorado mais fáceis e felizes para mim.

A Prof. Dr.^a Ana Maria Soares Pereira, que aceitou fazer parte dessa jornada, me orientando, me fazendo acreditar que eu deveria aprender sempre mais e, principalmente, compartilhando comigo todo o seu conhecimento com as plantas medicinais. Por ser o exemplo de orientação que eu quero seguir por toda a minha vida. Minha gratidão por podermos dividir esses anos não cabe em um parágrafo de agradecimento.

A Prof. Dr.^a Bianca Waleria Bertoni, pela coorientação, pela amizade, por todos os ensinamentos que compartilhou gentilmente comigo, sempre paciente, explicando, ensinando, mostrando o caminho certo para se obter as respostas necessárias.

Aos membros da banca de avaliação, Dr.^a Juliana da Silva Coppede, Prof.^a Dr.^a Giuseppina Pace Pereira Lima, Prof. Dr. Filipe P. G. Bonfim e Dr. Lucas J. F. Morel, pela disponibilidade e contribuições para melhoria deste trabalho.

Aos Prof. Dr. Filipe P. G. Bonfim, Luiz Fernando R. de Almeida pelas contribuições em minha banca de qualificação. Ao Filipe, agradeço também por sempre estar disposto a me ajudar e facilitar minha vida no Departamento de Horticultura.

As Dr.^{as} Isabela C. G. Honório e Juliana S. Coppede e ao Dr. Lucas J. F. Morel, que foram meus tutores nas atividades laboratoriais, me explicando, ensinando e ajudando em todas as etapas da pesquisa. Assim como as técnicas, Simone, Patrícia, Sarazete e Letícia.

As amigas que fizeram esse doutorado mais leve e feliz: Marcela, Samara, Larissa, Sayuri, Estefânia, Carol, Marla e Zildélia. Além de todos os meus amigos da vida inteira, que sempre me apoiaram e incentivaram, em cada passo da minha vida acadêmica.

A Unesp e ao Departamento de Horticultura, pela oportunidade de realização do doutorado.

Ao Departamento de Biotecnologia de Plantas Medicinais da UNAERP, pela oportunidade de realização da pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos concedida.

A todos, meus sinceros agradecimentos.

“Ela se deixou influenciar por sua convicção de que os seres humanos não nascem de uma vez por todas no dia em que suas mães dão à luz a eles, mas que a vida nos obriga repetidas vezes a dar à luz a si mesmos.”

O amor nos tempos do cólera (Gabriel Garcia Márquez, 1985).

RESUMO

Pyrostegia venusta (Ker Gawl.) Miers é uma planta medicinal indicada para o tratamento de vitiligo, amplamente distribuída nas Américas e, no Brasil ocorre principalmente nos biomas Cerrado e Mata Atlântica. O objetivo deste trabalho foi avaliar a variabilidade genética e quantificar o teor de verbascosídeo em populações naturais de *P. venusta*, usando marcador molecular SRAP e CLAE para quantificar o verbascosídeo nas flores. A avaliação da diversidade genética e a quantificação do marcador químico foram realizadas a partir de populações coletadas nos estados de Mato Grosso, Minas Gerais e São Paulo. A população de Nova Mutum apresentou a maior diversidade genética com índice de Nei (h) de 0,2759, de Shannon (I) de 0,4170 e 85,14 % de *locus* polimórficos e a menor diversidade genética foi encontrada na população de Araxá ($h = 0,1811$, $I = 0,2820$ e 70,27 % de *locus* polimórficos). A variabilidade genética foi maior dentro das populações (79%) do que entre elas (21%) e apresentou um índice de fixação de alelos moderado com F_{st} de 0,20. Quanto ao teor de verbascosídeo a maior concentração foi encontrada na população de Araxá (170,17 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ de extrato seco), foi avaliada a correlação entre o teor de verbascosídeo e os fatores ambientais, onde a correlação com altitude foi $r = 0,80$ e com temperatura, $r = - 0,92$. A produção dessa substância foi mais influenciada por fatores ambientais do que pelo genótipo. A espécie estudada encontra-se vulnerável à extinção, sendo necessário estabelecer estratégias de conservação para a mesma.

Palavras-chave: Cipó-de-são-joão. *Bignoniaceae*. SRAP. Acteosídeo.

ABSTRACT

Pyrostegia venusta (Ker Gawl.) Miers is a medicinal plant indicated for the treatment of vitiligo, widely distributed in the Americas, being that in Brazil occurs mainly at Cerrado and Mata Atlântica forests. The aim of this research was evaluate the genetic variability and quantify verbascoside content in flowers of natural populations of *P. venusta*, using molecular marker SRAP and HPLC. The genetic diversity evaluation and quantification of the chemical marker were carried out from populations collected in the states of Mato Grosso, Minas Gerais and São Paulo. The population of Nova Mutum presented the highest genetic diversity with a Nei (h) index of 0.2759, of Shannon (I) of 0.4170 and 85.14% of polymorphic locus, and the lowest genetic diversity was found in the population of Araxá (h = 0.1811, I = 0.2820 and 70.27% polymorphic locus). Genetic variability was higher within populations (79%) than among them (21%) and had a moderate Fst allele fixation index of 0.20. Furthermore, the highest concentration of verbascoside content was found in the population of Araxá (170.17 µg.mg⁻¹ dry extract), the correlation between the verbascoside content and the environmental factors was evaluated, where the correlation with altitude was r = 0.80 and with temperature, r = - 0.92. The production of this substance was more influenced by environmental factors than by the genotype. *Pyrostegia venusta* is vulnerable to extinction, thus it is necessary to establish conservation strategies for this species.

Keywords: Flame vine. *Bignoniaceae*. SRAP. Acteoside.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – <i>Pyrostegia venusta</i> : parte aérea (A), folhas (B), raíz (C), flores imaturas fechadas (D), flores maduras abertas (E), frutos verdes (F), frutos secos (G) e sementes (H)	24
Figura 2 – Proposta de rota biosintética do verbascosídeo.....	26
Figura 3 – Locais de coleta das populações de <i>Pyrostegia venusta</i> nos estados de Mato Grosso, Minas Gerais e São Paulo: PA – Paranaíta; SI – Sinop; NM – Nova Mutum; SE – Serrana; B – Botucatu e; A – Araxá.....	33
Figura 4 – Dados de precipitação acumulada (mm) e temperatura média (°C) dos os locais de coleta de <i>Pyrostegia venusta</i> no período de 6 meses anteriores às coletas	33
Figura 5 - Curva dos padrões de verbascosídeo utilizados para quantificar a espécie <i>Pyrostegia venusta</i>	37
Figura 6 – Dendograma das populações naturais de <i>Pyrostegia venusta</i> obtido pelo UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average)	42
Figura 7 – Representação gráfica da análise de dispersão em coordenadas principais (PCoA) de seis populações naturais de <i>Pyrostegia venusta</i>	42
Figura 8 – Análise Bayesiana obtida pelo software STRUCTURE de seis populações naturais de <i>Pyrostegia venusta</i>	42
Figura 9 - Correlação entre fatores ambientais e teor de verbascosídeo em <i>Pyrostegia venusta</i> . A: Altitude; B: Temperatura; C: Latitude; e D: Longitude	45
Figura 10 - Dendograma de distâncias genéticas dos indivíduos de <i>Pyrostegia venusta</i> e classificação quanto ao teor de verbascosídeo	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Substâncias isoladas em flores e raízes de <i>Pyrostegia venusta</i>	25
Tabela 2 – Localização, número de indivíduos coletados (N), coordenadas geográficas e altitude dos locais de coleta de <i>Pyrostegia venusta</i>	32
Tabela 3 – Sequência de combinações de primers avaliada para SRAP em <i>Pyrostegia venusta</i>	35
Tabela 4 – Número de locus e polimorfismo obtidos em cada combinação de primers em <i>Pyrostegia venusta</i>	39
Tabela 5 – Parâmetros genéticos avaliados em <i>Pyrostegia venusta</i> : % locus polimórficos; Na: número de alelos observados; Ne: número de alelos efetivos; h: índice de Nei; I: Índice de Shannon	40
Tabela 6 – Distância geográfica (Km) e genética entre populações naturais de <i>Pyrostegia venusta</i>	40
Tabela 7 – Variabilidade genética entre e dentro de populações naturais de <i>Pyrostegia venusta</i>	41
Tabela 8 – Concentração de verbascosídeo em seis populações naturais de <i>Pyrostegia venusta</i>	43
Tabela 9 – Concentração de verbascosídeo ($\mu\text{g.mg}^{-1}$ de extrato) em indivíduos de seis populações naturais de <i>Pyrostegia venusta</i>	44

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	23
2.1	A espécie <i>Pyrostegia venusta</i>	23
2.1.1	Etnofarmacologia e atividade farmacológica.....	24
2.1.2	Fitoquímica.....	25
2.1.2.1	Verbascosídeo.....	26
2.2	Diversidade genética.....	27
2.2.1	Marcadores Moleculares.....	29
2.2.1.1	SRAP (<i>Sequence-related Amplified Polymorphism</i>).....	30
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.1	Coleta.....	32
3.2	Análise da variabilidade genética.....	34
3.2.1	Extração de DNA.....	34
3.2.2	Análise SRAP.....	35
3.3	Extração e quantificação de verbascosídeo.....	36
3.4	Análises estatísticas.....	37
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
4.1	Diversidade Genética.....	39
4.2	Teor de verbascosídeo.....	43
5	CONCLUSÃO.....	48
	REFERÊNCIAS.....	49

1 INTRODUÇÃO

Tradicionalmente grupos étnicos usam plantas medicinais para o tratamento de diversas enfermidades. A Organização Mundial de Saúde (OMS) apoia e incentiva o uso de plantas medicinais e fitoterápicos, como alternativa à medicina convencional. No Brasil, em 2006 foi consolidada a Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos, com o objetivo de garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Nas últimas décadas, diversas plantas medicinais foram incluídas em lista de interesse do SUS (Sistema Único de Saúde) com objetivo de aumentar o número de medicamentos fitoterápicos no Brasil. Várias espécies têm potencial de serem utilizadas em programas de saúde do Governo Federal, por apresentarem registros de uso em humanos por mais de trinta anos, sendo portanto consideradas produto tradicional fitoterápico e, dentre estas espécies destaca-se *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers.

A espécie *Pyrostegia venusta*, popularmente conhecida por cipó-de-São-João, faz parte da família *Bignoniaceae*. É conhecida por seu potencial medicinal bastante difundido em comunidades tradicionais, sendo também componente de paisagens das regiões de Cerrado e Mata Atlântica, chamando atenção pelas suas flores.

Estudos etnobotânicos mostram que extratos de *P. venusta* são utilizados para tratamento de diversas enfermidades, com destaque para o vitiligo. Em vista disso, tem sido recorrente a busca por identificar e verificar a atividade farmacológica dos compostos químicos presentes nessa planta, como é o caso do verbascosídeo.

Assim como outras espécies de ocorrência no Cerrado e na Mata Atlântica, *P. venusta* está submetida aos processos de antropização decorrente da expansão de áreas agrícolas e urbanas nos biomas e estes fatores representam riscos para a sobrevivência da espécie. Além disso, as mudanças ambientais que vêm ocorrendo nos últimos anos, podem afetar a diversidade genética da planta e a produção dos seus compostos.

Técnicas de biologia molecular e genética de populações são utilizadas para estudar a diversidade genética em populações naturais de plantas, sendo os marcadores moleculares muito utilizados para essa finalidade. O marcador SRAP (*Sequence-related Amplified Polymorphism*) é utilizado para identificar níveis de

estruturação de populações, permitindo melhorar estratégias de conservação para espécies de interesse comercial, ecológico, entre outros.

Quando é realizado estudo de diversidade genética de plantas medicinais é recomendado que seja feito também avaliação de teores de marcadores químicos, por meio de técnicas analíticas como cromatografia gasosa ou líquida. Assim, a associação de técnicas de biologia molecular com o uso de marcadores moleculares e a quantificação de metabólitos secundários têm permitido amplos avanços de estudos com plantas medicinais, tornando possível o estabelecimento de estratégias eficientes de conservação.

O objetivo desse trabalho foi avaliar a variabilidade genética e quantificar o teor de verbascosídeo, em populações naturais de *Pyrostegia venusta*, dentro de uma visão de conservação da espécie e uso sustentável pela indústria farmacêutica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

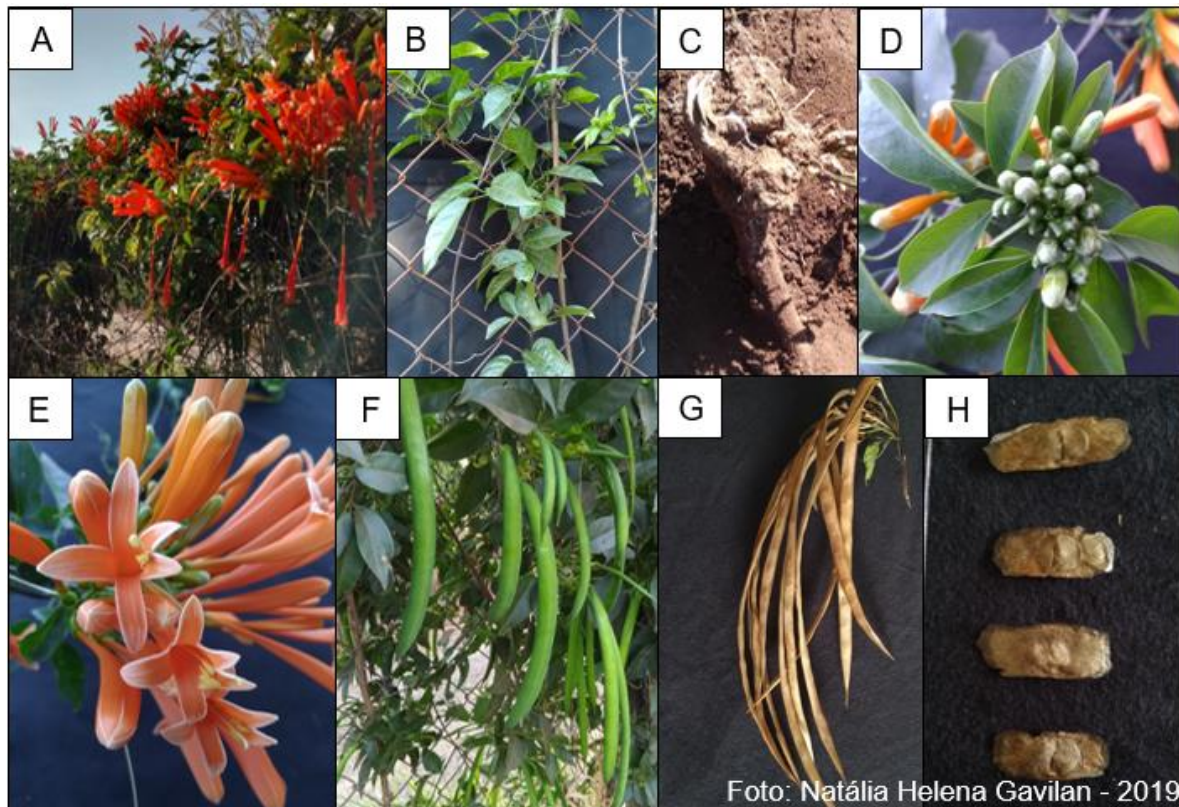
2.1 A espécie *Pyrostegia venusta*

A família *Bignoniaceae* inclui aproximadamente 113 gêneros e 800 espécies de árvores, arbustos ou lianas, distribuídos em regiões tropicais e subtropicais, particularmente na América do Sul, onde muitos representantes dessa família fornecem madeira, são ornamentais e são utilizados como plantas medicinais (CRONQUIST, 1981; JUDD et al., 1999). Dentre os vários gêneros que compõe a família *Bignoniaceae* destaca-se *Pyrostegia* C. Presl, pelo reduzido número de espécies que são restringidas a duas: *Pyrostegia millingtonioides* Sandwith e *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers, (TRÓPICOS, 2019; THE PLANT LIST, 2019).

A *Pyrostegia venusta* é uma liana perene de crescimento rápido e vigoroso, que floresce no inverno e na primavera, com flores de coloração alaranjada (NISHA et al., 2012) (Figura 1 A-H), sendo polinizadas, principalmente por beija-flor (SAMPAIO; ALMEIDA, 1995). Conhecida popularmente no Brasil como cipó-de-São-João ou flor de São João essa espécie é amplamente cultivada como planta ornamental, devido à beleza de suas flores (MOSTAFA; EL-DAHSHAN; SINGAB, 2013; LORENZI; SOUZA, 2001; POOL, 2008).

A espécie é encontrada em regiões tropicais e subtropicais, é nativa do Brasil, Argentina, Bolívia e Paraguai (NISHA et al., 2012; KUMAR et al., 2013). Está distribuída em regiões com altitudes de 70 a 1300 m de elevação, sendo geralmente encontrada abaixo dos 1000 m e no Brasil localiza-se geralmente na Mata Atlântica secundária e no Cerrado (LOHMANN, 2006; POOL, 2008; ROY et al., 2012). A beleza das flores torna essa espécie um componente importante das paisagens desses biomas (MANTOVANI; MARTINS, 1988; MORELATTO; LEITÃO-FILHO, 1996; LORENZI; SOUZA, 2001; UDULUTSCH; ASSIS; PICCHI, 2004).

Figura 1 – *Pyrostegia venusta*: parte aérea (A), folhas (B), raiz (C), flores imaturas fechadas (D), flores maduras abertas (E), frutos verdes (F), frutos secos (G) e sementes (H)



2.1.1 Etnofarmacologia e atividade farmacológica

Existem relatos dos usos *P. venusta* por comunidades tradicionais como planta medicinal com variadas aplicações. Das partes aéreas são preparadas infusões ou decoctos, os quais são utilizados como tônicos ou no tratamento de diarreia, vitiligo, tosses e doenças relacionadas a infecções do sistema respiratório como bronquite, resfriado e gripe (VELOSO et al., 2010). Além disso, a infusão preparada da casca do caule e raízes é amplamente utilizada no tratamento de erisipela, icterícia, hiperbilirrubinemia e infecções do útero e vagina (SENS, 2002).

Adicionalmente, estudos farmacológicos comprovaram várias atividades biológicas de extratos de flores de *P. venusta*, como por exemplo, atividade anti-inflamatória e o efeito antinocepcivo do extrato hidroetanólico e atividade antioxidante, antimicrobiana e cicatrizante do extrato metanólico (VELOSO et al., 2012; ROY et al., 2011; ROY et al., 2012). Além disso, outros extratos da planta também apresentam

ação citotóxica, antitumoral, antihelmínticas, antibacteriana em doenças periodontais e antifúngica contra candidíase (SILVA et al., 2012; NISHA et al., 2012; PEREIRA et al., 2014; SOUSA et al., 2016).

Um destaque importante da atividade farmacológica de *P. venusta* é o efeito melanogênico dos extratos hidroetanólicos de folhas e flores indicado para o tratamento de doenças hipopigmentadoras, como o vitiligo (MOREIRA et al., 2012; 2015).

2.1.2 Fitoquímica

Estudos de diversidade química *P. venusta* relatam grande variedade de compostos, dentre eles o verbascosídeo. Na Tabela 1 está a descrição das principais substâncias já isoladas em *P. venusta*.

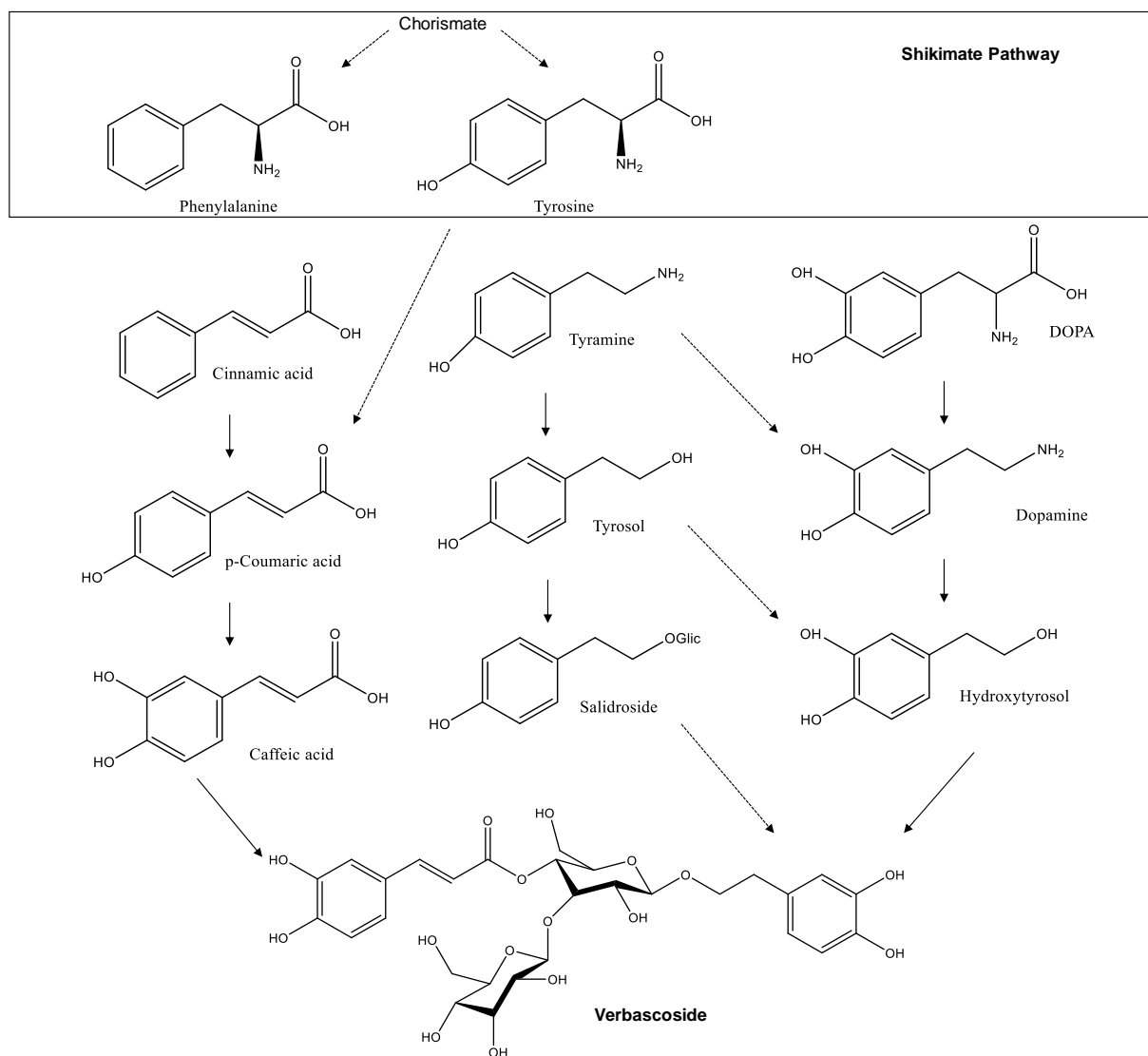
Tabela 1 – Substâncias isoladas em *Pyrostegia venusta*

Órgãos	Substâncias Isoladas	Referência
Folhas	Alantoína	Moreira et al. (2012; 2015)
	Luteína, β -caroteno, β -criptoxantina, violaxantina e zeaxantina.	Harbone (1967); Tinoi; Rakariyatham; Deming (2006).
	7-O- β -D-glicopiranosilacetina e meso-inositol.	Dubey; Misra (1976); Ferreira et al. (2000)
Flores	Ácido hexadeianoico, ácido linoleico, estigmasteril tosilato, diazoprogesterona, arabipiranoze, ácido propanoico, ester pentametildissilânico, acetofenona, ácido trans-3-hexenodioico e ácido 9-octadecenoico ácido (Z)-metil éster.	Roy et al. (2011)
	Acacetina-7-O-glicosídeo, fenóis, flavonoides e taninos condensados.	Veloso et al. (2010); Veloso et al. (2014)
	Octacosano, 3-metil-2-pentanona, 3-metil-3-pantanol, 3-hexenol, 4-metil-2-pantanol, acetato de alila e 2,2-metilpentanal.	Figueiredo et al. (2014)
	Verbascosídeo, isoverbascosídeo e quercetina-3-O- α -L-ramnopiranosil- (1 \rightarrow 6)- β -D-galactopiranosídeo.	Pereira et al. (2014)
Raiz	Alantopina, β -sitosterol, 3- β -O- β -D-glicopiranosil-sitoesterol e hesperidina.	Ferreira et al. (2000)

2.1.2.1 Verbascosídeo

Um glicosídeo feniletanoide foi isolado a partir de *Verbascum sinuatum* L., sendo denominado verbascosídeo (SCARPATI; MONACHE, 1963), no entanto, a estrutura 2-(3,4-dihidroxifeniletíl)-1-O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 3)- β -D-(4-O-cafeil)-glucopiranosídeo foi completamente elucidada apenas por Birkofer; Kaiser; Thomas (1968), ao isolá-la de *Syringa vulgaris*, denominando a substância de acteosídeo. Atualmente, cinco décadas após a descoberta ainda existe controvérsia em relação a nomenclatura, sendo as duas formas aceitas: verbascosídeo ou acteosídeo (ALIPIEVA et al., 2014a) (Figura 2).

Figura 2 – Proposta de rota biosintética do verbascosídeo



Fonte: ALIPIEVA et al. (2014, p. 9).

Desde a sua descoberta, esse composto já foi isolado em diversas espécies vegetais, entre elas *Paulownia tomentosa* (STICHER; LAHLOUB, 1982), *Castilleja linariaefolia* (PETTIT et al., 1990), *Verbena litoralis* (LI et al., 2003), *Castilleja tenuiflora* (LÓPEZ-LAREDO et al., 2012), *Buddleja brasiliensis* (GITZEL FILHO et al., 2012), *Striga asiatica* (HUANG et al., 2013), *Phlomis anisodonta*, *P. bruguieri* e *P. olivieri* (SARKHAIL et al., 2014), *Verbascum* sp. (ALIPIEVA et al., 2014b), *Plantago australis* (SPEROTTO et al., 2018) *Sesamum indicum* (FUJI et al., 2018) e *Aloysia triphylla* (FRAISSE et al., 2018). Em *Pyrostegia venusta*, o verbascosídeo foi isolado pela primeira vez por Pereira et al. (2014), em extratos preparados a partir de suas flores.

Esse composto tem sido alvo de diversos estudos farmacológicos que comprovaram as atividades antioxidante (ZHOU; ZHENG, 1991; ABDERRAHIM et al., 2011), anti-inflamatória (DIÁZ et al., 2004; KORKINA et al., 2007; PEREIRA et al., 2014), imunomoduladora (AKBAY et al., 2002; QIU et al., 2013), fotoprotetora (ACEVEDO et al., 2005), antiasmática (LEE et al., 2011) e antifadiga (ZHU et al., 2016). Além disso, o verbascosídeo apresenta efeito neuroprotetor, podendo ser útil para tratamento de pacientes portadores da doença de Parkinson (SHENG et al., 2002) e reduz a agregação plaquetária em pacientes com doenças cardiovasculares (CAMPO et al., 2015).

O verbascosídeo, além da importância como fitomedicamento apresenta relevância como fitocosmético, pois possui estabilidade em formulações dermocosméticas (VERTUANI et al., 2011).

2.2 Diversidade genética

O Brasil possui a maior biodiversidade do mundo, ocupando a posição de principal nação entre os 17 países megadiversos, correspondendo a 20 % do número total de espécies vegetais encontradas na Terra e os seus seis biomas terrestres incluindo Cerrado, Mata Atlântica, Pantanal, Amazônia, Caatinga e Pampas, juntos apresentam cerca de 43.020 espécies vegetais conhecidas (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2019a). Entre esses biomas, o Cerrado merece destaque por possuir cerca de 5 % da biodiversidade do planeta, sendo considerada a savana mais rica do mundo, dentro de toda essa biodiversidade, 20 % das espécies nativas correm risco de extinção, o que leva o Cerrado a ser um dos *hotspots* mundiais de biodiversidade (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2019b).

A crescente exploração dos biomas brasileiros, alerta para a necessidade de estudos que visem a conservação dos recursos genéticos vegetais. É imprescindível encontrar alternativas que permitam a conservação e a preservação dessas espécies vegetais e dos ecossistemas (HONÓRIO, 2016). Em vista da necessidade de reduzir as taxas de extinção e preservar a biodiversidade, têm-se a genética da conservação, que visa estudar e preservar a diversidade genética (FRANKHAM; BALLOU; BRIOSCOE, 2004).

Os indivíduos distintos de uma determinada espécie não são geneticamente idênticos, suas sequências de DNA diferem até certo ponto, e essas diferenças formam a diversidade genética, conhecida como polimorfismo de uma espécie (ELLEGREN; GALTIER, 2016). Informações sobre diversidade e relacionamentos genéticos dentre e entre indivíduos e populações é de suma importância para a biologia da conservação e para estudos da ecologia evolutiva das populações (DURAN et al., 2009).

A diversidade genética é a base sobre a qual a seleção natural atua e, de acordo com os níveis dessa diversidade é possível analisar e monitorar populações de espécies ameaçadas de extinção (FRANKHAM; BALLOU; BRIOSCOE., 2004). O estudo da estrutura genética de populações naturais de espécies nativas é importante, pois permite inferências sobre seu estado atual de vulnerabilidade a extinção e contribui para o estabelecimento de estratégias de conservação ou de recuperação do potencial genético da espécie (ZIMBACK et al. 2004).

A perda da diversidade genética diminui a capacidade dos organismos responderem às mudanças ambientais, acarretando a eliminação de informações biológicas úteis (CRUZ; SALGADO; BHERING, 2013). Em vista disso, existe uma grande necessidade de se estudar a diversidade genética de plantas potencialmente úteis, como o caso de diversas espécies nativas brasileiras com compostos fitoquímicos de interesse. A análise da diversidade genética possibilita a seleção de genótipos de interesse para conservação em vários níveis e sistemas, incluindo bancos de germoplasma, visando preservar a variabilidade genética presente em populações naturais e desacelerar o ritmo de erosão genética (BERTONI et al., 2010a).

Como ferramenta para os estudos de diversidade genética, têm-se os marcadores moleculares, que apresentam como grande vantagem a avaliação da variabilidade existente diretamente no DNA, o que permite realizar estudos sobre

associações evolutivas, bem como estabelecer estratégias para conservação e manejo do material genético (CRUZ; SALGADO; BHERING, 2013). Estudos completos da diversidade genética permitem uma visão sem precedentes sobre as forças que contribuem para o estabelecimento da diversidade genética nas espécies (DURAN et al., 2009).

2.2.1 Marcadores Moleculares

A matéria bruta dos estudos em biodiversidade molecular é a mesma envolvida na evolução das espécies, a variabilidade gênica, que permite comparar indivíduos, populações ou espécies diferentes (SOLÉ-CAVA, 2001). No final da década de 80, as técnicas de biologia molecular sofreram avanços consideráveis, a partir da manipulação do DNA, culminando no surgimento de novos tipos de marcadores moleculares e várias simplificações tecnológicas para resolver problemas associados à essa tecnologia (MAHESWARAN, 2004; GUIMARÃES et al., 2009).

Com os avanços da biologia molecular e das técnicas de DNA recombinante, da reação em cadeia da polimerase (PCR) e do sequenciamento automático do DNA os marcadores moleculares foram desenvolvidos e usados para identificar recursos genéticos vegetais (FALEIRO, 2007). Os marcadores moleculares fornecem uma ferramenta importante para avaliar a variabilidade genética e a estrutura das populações naturais, visando o estudo da biodiversidade em geral (FRANKHAM; BALLOU; BRIOSCOE, 2008).

Nos últimos anos, muitas novas e promissoras técnicas de marcadores moleculares alternativos foram desenvolvidas na genética de plantas, tendo um papel fundamental no estudo de variabilidade e diversidade, na construção de ligações mapas e no rastreamento de indivíduos ou linhas que transportam genes particulares (GUPTA; RUSTGI, 2004; KALENDAR et al., 2011).

Vários tipos de técnicas moleculares baseadas em DNA são utilizados para avaliar o polimorfismo do DNA, como métodos baseados em hibridização, em PCR e em sequenciamento (THARACHAND; SELVARAJ; MYTHILI, 2012). Os marcadores também podem ser classificados de acordo com o tipo de herança alélica em dominantes e codominantes. Os marcadores codominantes possibilitam diferenciar indivíduos homozigotos e heterozigotos, o que não é possível com marcadores

dominantes, para os quais apenas identifica-se a presença ou ausência de um determinado alelo (TURCHETTO et al., 2017).

Baseado no desenvolvimento das técnicas de marcadores moleculares, três classes podem ser mencionadas: os marcadores de primeira geração, baseado em hibridação, como RFLP; marcadores de segunda geração, baseados em PCR, como RAPD, AFLP e SSR; e marcadores de terceira geração, a partir da sequência de DNA, como SNP e SRAP, sendo o segundo, também baseado em PCR (JONES et al., 2009).

2.2.1.1 SRAP (*Sequence-related Amplified Polymorphism*)

O marcador SRAP é um sistema de marcador baseado em PCR, foi desenvolvido com o objetivo de simplificar o procedimento de detecção do AFLP, aumentar o rendimento da técnica e melhorar a reprodutibilidade em comparação com o RAPD (LI; QUIROS, 2001; LI; MCVETTY; QUIROS, 2013). A técnica foi proposta combinando simplicidade, confiabilidade, taxa de transferência moderada, sequenciamento fácil de bandas selecionadas. Além disso, tem como alvo sequências de codificação no genoma, as ORFs que são consideradas regiões de leitura aberta (LI; QUIROS, 2001).

A técnica foi desenvolvida por Li e Quiros (2001) baseando a amplificação em 2 *primers*, *Forward* e *Reverse*, em que os *primers forward* consistem em uma sequência central de 14 bases, sendo que as primeiras dez bases que começam na extremidade 5' são sequências sem constituição específica, seguidas pela sequência CCGG para hibridizar com os éxons (geralmente ricos em GC) e depois por três nucleotídeos seletivos na extremidade 3'. Enquanto os *primers reverses* apresentam os mesmos componentes que os *primers forward* entretanto é seguido por AATT para hibridizar com regiões íntrons (ricas em AT) em vez da sequência CCGG. A única regra para a construção dos *primers forward* e *reverse* é que eles tenham de 40-50 % de bases GC. Além disso, as sequências de “enchimento” devem ser diferentes umas das outras e podem ter 10 ou 11 bases.

O marcador SRAP tem sido utilizado em vários estudos de diversidade genética em plantas com importância cultural e econômica como: *Cucurbita pepo* L. (FERRIOI; PICÓ; NUEZ, 2003), *Celosia argentea* (FENG et al., 2009), *Salvia miltiorrhiza* (SONG et al., 2010), *Saccharum spontaneum* (CHANG et al., 2012), *Allium sativum* L. (CHEN

et al., 2013), *Butea monosperma* (Lam.) Taub. (VASHISHTHA; JEHAN; LAKHANPAUL, 2013), *Prunus sibirica* L. (LI et al., 2014), *Pistacia vera* L. (GUENNI; AOUDI; CHATTI, 2016), *Cynodon dactylon* (L.) Pers. (ZHENG et al., 2017), *Cuminum cyminum* L. (BHATT et al., 2017), *Uncaria tomentosa* (HONÓRIO et al., 2017), *Camelia sinensis* (ZHANG et al., 2018), *Uncaria guianensis* (HONÓRIO et al., 2018) além de 14 espécies do gênero *Alcea* (BADRKHANI; AHMANI; ARTI, 2014).

3 MATERIAL E MÉTODOS

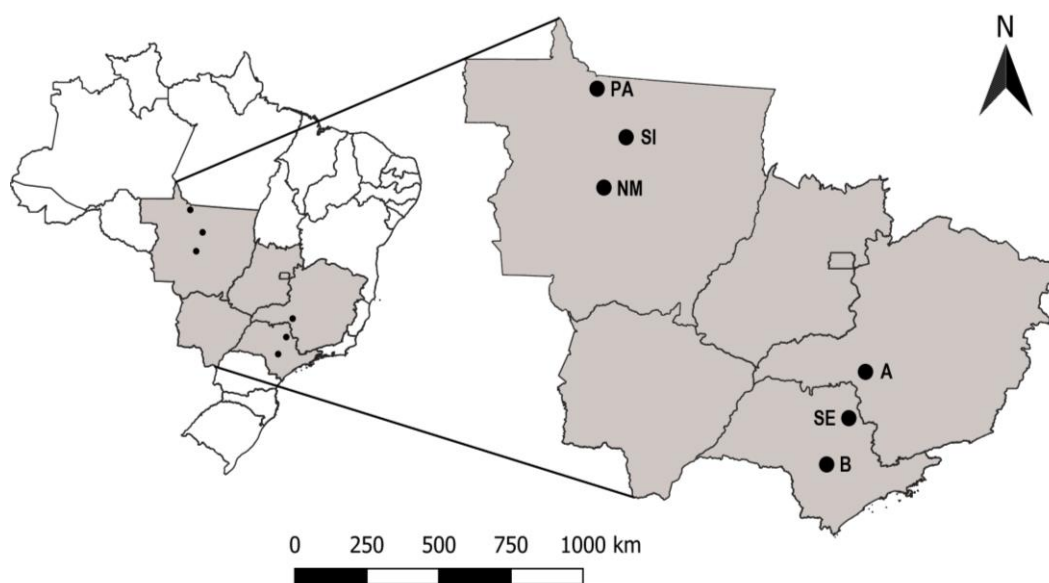
3.1 Coleta

Partes aéreas de *P. venusta* foram coletadas nos municípios de Paranaíta (MT), Sinop (MT), Nova Mutum (MT), Serrana (SP), Botucatu (SP) e Araxá (MG) entre os meses de junho a agosto de 2016, época em que há o florescimento da espécie. A atividade de acesso ao Patrimônio Genético foi cadastrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado – SisGen, com número de cadastro AD5C959. As amostras populacionais coletadas foram realizadas em áreas de ocorrência natural da espécie e estão identificadas na Tabela 2, junto com as coordenadas geográficas e altitude dos ambientes de coletas, os locais de coletas estão mapeados na Figura 3.

Tabela 2 – Localização, número de indivíduos coletados (N), coordenadas geográficas e altitude dos locais de coleta de *Pyrostegia venusta*

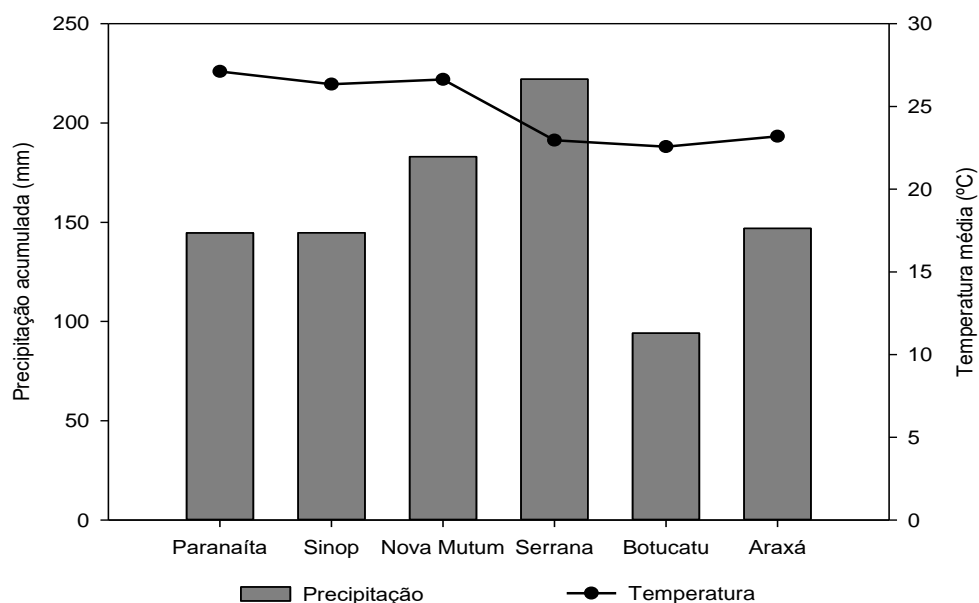
Localidade	N	Latitude	Longitude	Altitude
Paranaíta (MT)	20	-09°44'54,2"	-56°19'52,2"	250
Sinop (MT)	20	-11°32'27,4"	-55°23'37,0"	302
Nova Mutum (MT)	20	-14°04'47,1"	-56°06'34,1"	408
Serrana (SP)	20	-21°12'36,1"	-47°38'45,0"	541
Botucatu (SP)	20	-22°51'14,9"	-48°26'04,9"	825
Araxá (MG)	20	-19°35'02,4"	-46°54'38,8"	1.058

Figura 3 – Locais de coleta das populações de *Pyrostegia venusta* nos estados de Mato Grosso, Minas Gerais e São Paulo: PA – Paranaíta; SI – Sinop; NM – Nova Mutum; SE – Serrana; B – Botucatu e; A – Araxá



Informações climáticas dos ambientes de coletas foram obtidos através do site Agritempo (<https://www.agritempo.gov.br>), a fim de elucidar sobre as condições de precipitação e temperatura do período de 6 meses que antecederam as coletas (Figura 4).

Figura 4 – Dados de precipitação acumulada (mm) e temperatura média (°C) dos os locais de coleta de *Pyrostegia venusta* no período de 6 meses anteriores às coletas



A análise de diversidade genética foi realizada com folhas jovens e sadias e para a quantificação do teor de verbascosídeo, foram utilizadas flores formadas e abertas. As folhas e as flores foram acondicionadas em sacos de papel, devidamente identificados, secos em estufa de circulação forçada a 45 °C (MARCONE® MA35/5, série 00100169) até obter peso constante e posteriormente estocados em ambiente com ar refrigerado a temperatura de 22 °C ± 3, até o momento da extração.

Foi realizada a confecção de exsiccatas de alguns indivíduos coletados e depositadas no Herbário de Plantas Medicinais da Universidade de Ribeirão Preto (HPMU, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil), sob o número 3146. A identificação botânica foi realizada pela Dra. Inês Cordeiro do Instituto de Botânica de São Paulo.

Os experimentos foram realizados nos Laboratórios de Biologia Molecular e de Química de Produtos Naturais do Departamento de Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP).

3.2 Análise da variabilidade genética

3.2.1 Extração de DNA

A extração do DNA genômico foi realizada pelo método CTAB com adaptações (DOYLE; DOYLE, 1987). Para os indivíduos das seis populações foram utilizados 100 mg de folha de cada indivíduo, maceradas em nitrogênio líquido para realizar a ruptura física da parede celular e, posteriormente adicionados 1000 µL do tampão de extração para lise das membranas celulares. Em seguida, os tubos foram incubados em banho-maria a 65 °C por 30 min. Posteriormente, a amostra foi resfriada à temperatura ambiente por aproximadamente 5 minutos. Logo após, foi adicionado à amostra 200 µL de clorofil (clorofórmio + álcool isoamílico 24:1) para promover a extração dos lipídeos, proteínas e polissacarídeos e, após agitação manual, o material foi centrifugado a 20817 x g por 10 minutos. Para as populações de Paranaíta, Sinop, Nova Mutum, Araxá e Botucatu, após a remoção do clorofil, foi adicionado novamente 1000 µL do tampão de extração, e em seguida, os tubos foram incubados em banho-maria a 65 °C por 5 minutos, após a amostra resfriar foi adicionado 200 µL de clorofil e, realizada a agitação manual, o material foi centrifugado novamente a 15294 x g por 10 minutos, esse procedimento foi realizado a fim de obter amostras de DNA íntegro para realização das reações de PCR.

Em sequência, para todas as amostras, a fase aquosa foi removida para outro tubo, à qual foi adicionado 600 μL de isopropanol gelado, misturando-se bem e deixando em repouso por 15 minutos à temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, para a precipitação dos ácidos nucleicos. Após centrifugação a 20817 x g por 10 minutos, a fase aquosa foi removida e foi adicionado ao sedimento 1000 μL de tampão de lavagem (etanol 70 % v/v e acetato de amônio 10 mM), que havia permanecido à temperatura ambiente por 20 min. A centrifugação foi repetida a 20817 x g rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o sedimento (DNA) lavado duas vezes em etanol 70 % e uma vez em etanol absoluto, seguido de centrifugação a 20817 x g por 5 minutos a cada lavagem. Após uma hora de secagem, à temperatura ambiente, o “pellet” foi ressuscendido em 50 μL de água ultrapura (Milli-Q).

O DNA foi tratado com a enzima RNase 1 μL (10 mg.mL^{-1}) para a retirada de RNA, que poderia interferir nas análises posteriores. A qualidade do material genético de cada indivíduo foi analisada por meio de eletroforese em gel de agarose 1 % com tampão de corrida TEB 1X e a concentração ($\eta\text{g.}\mu\text{L}^{-1}$) avaliada através do espectrofotômetro *NanoDrop* (NANOPHOTOMETER IMPLIN P 360).

3.2.2 Análise SRAP

A análise SRAP foi realizada de acordo com o protocolo desenvolvido por Li e Quiros (2001). Para a determinação do marcador molecular SRAP cinco combinações aleatórias foram selecionadas para as análises (Tabela 3), sendo utilizados um *primer* IRDye 700 e um *primer* IRDye 800 marcados com fluorescência (fosforamídita).

Tabela 3 – Sequência de combinações de *primers* avaliada para SRAP em *Pyrostegia venusta*

<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>
me1, 5'-TGAGTCCAAACCGGATA-3'	em3, 5'-GACTGCGTACGAATTGAC-3'
me3, 5-TGAGTCCAAACCGGAAT-3'	em3, 5'-GACTGCGTACGAATTGAC-3'
me2, 5'-TGAGTCCAAACCGGAGC-3'	em1, 5'-GACTGCGTACGAATTAAT-3'
me3, 5-TGAGTCCAAACCGGAAT-3'	em6, 5'-GACTGCGTACGAATTGCA-3'
me2, 5'-TGAGTCCAAACCGGAGC-3'	em2, 5'-GACTGCGTACGAATTTGC-3'

As reações de amplificação foram efetuadas contendo 1 μL do tampão de reação 10X, 0,8 μL de MgCl_2 (25 mM), 1 μL de mix de dNTP (2,5 mM), 0,4 μL *primer*

Forward (me) (5 μM) e 0,4 μL *primer Reverse* (em) (5 μM), 0,2 μL *Taq* DNA polimerase (5 $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$), 1 μL de DNA (10 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) e água deionizada para completar o volume de 10,0 μL . A reação foi submetida a cinco ciclos a 94 °C, 1 min, 35 °C, 1 min, e 72 °C, 1 min. Em seguida, a 35 ciclos a 94 °C, 1 min; 50 °C, 1 min, 72 °C, 1 min; e para finalizar 7 min a uma temperatura de 72 °C para a extensão da fita de DNA. Antes da aplicação das amostras no gel, as amostras foram diluídas para a concentração de 5 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ e foi feita a desnaturação das fitas em termociclador a 95 °C por 5 minutos.

Os fragmentos resultantes da PCR foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida (20 mL de Matriz de poliacrilamida 6,5 % (KB Plus), 150 μL de solução APS 10 %, 150 μL de TEMED) em placa de 25 x 25 cm montada com espaçadores de 0,25 mm e pente de 48 poços (formato dente de tubarão) de espessura de 0,25 mm. Após a polimerização da matriz, foi realizada a pré-corrída sob condições controladas de 1500 V, 40 W, 40 mA, 45 °C por 25 minutos.

Foram aplicados 1 μL para cada amostra e 0,8 μL para o marcador de peso molecular de 50 a 700 pb. As condições da corrida foram: 1500 V, 40 W, 40 mA, 45 °C por 2 horas e 30 minutos. A visualização do gel aconteceu em tempo real e a leitura da placa foi realizada posteriormente no programa LI-COR[®] SAGAMX Automated Analysis v.3.3., e foi gerada uma matriz binária considerando a presença (1) e ausência (0) de bandas.

3.3 Extração e quantificação de verbascosídeo

Flores secas foram moídas em moinho de facas (MARCONI[®] MA048, série 010892) até a granulometria de 40 mesh. Foram transferidos 300 mg da droga vegetal para tubos de ensaio de 10 mL, para realizar a extração com 3 mL de metanol por 24 horas. Esse procedimento foi efetuado em triplicatas. Posteriormente, o extrato foi filtrado em funil de vidro com algodão e o solvente foi evaporado em capela de exaustão, por 24 horas e permaneceu mais 48 horas em bancada a temperatura ambiente.

Para realização das análises através de cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE), 1 mg do extrato seco foi ressuspendido em 1 mL metanol grau HPLC. A solução foi filtrada em filtro de seringa Millipore Millex[®] – HN Nylon 0,45 mm e injetada em CLAE Shimadzu[®], acoplado a coluna de fase reversa Phenomenex[®] Luna C18 (250 mm x 10 mm, 5 μ) conectado a um detector de arranjo de diodo SPD-M10A.

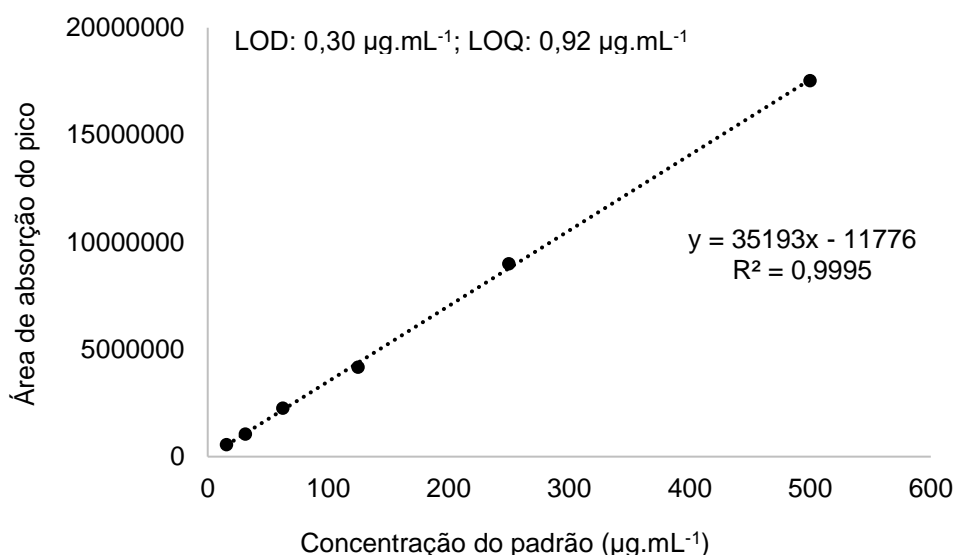
Como fase móvel foi utilizado o sistema água + ácido acético 0,1 % (A) e metanol (B), de 10 a 70 % B (0 até 32 minutos); de 70 a 10 % B (32 até 35 minutos); 10 % B (35 até 40 minutos) com vazão de 1 mL.min⁻¹ por 40 min com detecção em UV a 330 nm. As análises foram realizadas em triplicata.

O marcador verbascosídeo (MERCK® V4015) foi utilizado como padrão de referência para a determinação do teor do ativo no extrato. A curva padrão do marcador verbascosídeo foi realizada nas concentrações de 500, 250, 125, 62,5, 31,25 e 15,625 µg.mL⁻¹, utilizando como solvente metanol.

A validação dos dados analíticos (linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção - LOD e limite de quantificação - LOQ) foi realizada seguindo os parâmetros estabelecidos pela resolução RDC nº166 de 24 de julho de 2017, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

O verbascosídeo foi identificado em todas as populações estudadas, sendo que o limite de detecção foi de e o limite de quantificação foi de.

Figura 5 - Curva dos padrões de verbascosídeo utilizados para quantificar a espécie *Pyrostegia venusta*



3.4 Análises Estatísticas

Os dados binários (presença ou ausência de bandas nos indivíduos), obtidos a partir do SRAP, foram utilizados para realizar a genotipagem dos indivíduos. Os parâmetros de variabilidade genética através do índice de Nei e a porcentagem de *locus* polimórficos, que com a distância geográfica, possibilitou a análise da correlação

entre distância genética e geográfica pelo teste de Mantel (DINIZ-FILHO, 2000) foi analisado utilizando os softwares Popgene32 e Genes v. 2009.7.0 com 1000 simulações.

A partir dos dados binários, foram efetuadas análises através do software GenAIEx v 6.5 e (PEAKALL; SMOUSE, 2006), para o cálculo da frequência alélica, análise molecular de variância (AMOVA) e análise de Coordenadas Principais (PCoA). Pelo programa STRUCTURE v.2.2.4 (PRITCHARD et al., 2000) houve o delineamento dos indivíduos em grupos com base em seus genótipos, usando algoritmo bayesiano de agrupamento (EVANNO; REGNAUT; GOUDET, 2005), onde para cada corrida, o *burn-in* inicial foi de 200.000 iterações seguidas por um comprimento de corrida de 500.000 iterações para K = 1 a 10 agrupamentos genéticos populacionais. Os dendogramas foram elaborados pelo programa MEGA v. 6.06

As análises químicas foram realizadas em triplicata e o delineamento adotado foi o inteiramente casualizado. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), sendo as médias dos tratamentos comparados pelo teste de Scott-Knott a 5 % de significância. Para correlacionar os parâmetros ambientais com o teor de verbascosídeo, foi realizada a análise de correlação de Pearson.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Diversidade Genética

A extração de DNA foi eficiente para todos os indivíduos de *Pyrostegia venusta* e houve amplificação de *locus* nas cinco combinações de *primers* selecionadas, com excelente polimorfismo e nitidez dos fragmentos para todas as populações. As análises das placas de poliacrilamida com DNA de *P. venusta* resultaram em 296 *locus*, das quais apenas a combinação me2/em2 não apresentou 100% de polimorfismo (Tabela 4).

O marcador molecular SRAP foi eficiente para analisar a variabilidade genética em populações naturais de *Pyrostegia venusta* sendo a primeira vez que foi utilizado para espécie da família *Bignoniaceae*. A eficiência da amplificação de *locus* utilizando esse marcador já foi confirmada em estudos de diversidade genética em populações naturais de plantas da família *Rubiaceae* como *Uncaria guianensis* e *Uncaria tomentosa* (HONÓRIO et al., 2018; 2017), da espécie *Toona ciliata* da família *Meliaceae* (LI et al., 2015) e da espécie *Erianthus arundinaceus* pertencente a *Poaceae* (ZANGH et al., 2013).

Tabela 4 – Número de *locus* e polimorfismo obtidos em cada combinação de *primers* em *Pyrostegia venusta*

Pares de <i>primers</i>	Nº de <i>locus</i>	Nº de <i>locus</i> polimórficos	Polimorfismo (%)
me2/em1	89	89	100
me3/em6	71	71	100
me3/em3	54	54	100
me1/em3	49	49	100
me2/em2	33	32	96,96
Total	296	295	

De acordo com os parâmetros genéticos avaliados para *P. venusta* (Tabela 5), a população de Nova Mutum apresentou a maior diversidade genética, índice de Nei (h), 0,2759 e maior índice de Shannon (I), 0,4170, com 85,14 % de *locus* polimórficos. A população que apresentou menor diversidade genética foi a de Araxá, considerando que seus parâmetros genéticos foram os mais baixos (h = 0,1811, I = 0,2820 e 70,27 % de *locus* polimórficos) quando comparados as demais populações.

Tabela 5 – Parâmetros genéticos avaliados em *Pyrostegia venusta*: % locus polimórficos; Na: número de alelos observados; Ne: número de alelos efetivos; h: índice de Nei; I: Índice de Shannon

Populações	% de <i>locus</i> polimórficos	Na	Ne	h	I
Paranaíta (MT)	81,08	1,81	1,38	0,2348	0,3616
Sinop (MT)	84,46	1,81	1,33	0,2093	0,3316
Nova Mutum (MT)	85,14	1,85	1,46	0,2759	0,4170
Serrana (SP)	77,70	1,77	1,28	0,1793	0,2875
Araxá (MG)	70,27	1,70	1,30	0,1811	0,2820
Botucatu (SP)	78,38	1,78	1,35	0,2136	0,3293
Total	99,66	1,99	1,43	0,2596	0,3989

De acordo com o teste de Mantel (Tabela 6), não existe correlação ($r = 0,328$) entre as distâncias genética e geográfica entre as seis populações de *P. venusta* estudadas, sugerindo uma estruturação em modelo de ilhas proposto por Whrigh (1978). Esse resultado corrobora com o trabalho de Evanno, Regnaut e Goudet (2005) que afirmaram que a estrutura genética das populações nem sempre se reflete na proximidade geográfica dos indivíduos. Resultado semelhante foi observado em populações naturais de outra bignoniaceae denominada *Anemopaegma arvense*, em que a diversidade genética existente entre as populações amostradas não estava fortemente estruturada no espaço geográfico, mas havia uma tendência à estruturação (BATISTINI et al., 2009).

Tabela 6 – Distância geográfica (Km) e genética entre populações naturais de *Pyrostegia venusta*

	PA	SI	NM	SE	A	B
PA	*	223,43	485,85	1592,31	1488,04	1681,05
SI	0,0242	*	297,05	1366,42	1273,15	1462,51
NM	0,0474	0,0702	*	1206,06	1153,00	1264,16
SE	0,0854	0,1121	0,0646	*	195,15	198,35
A	0,0613	0,0586	0,1186	0,117	*	393,46
B	0,0424	0,0374	0,0799	0,0918	0,0293	*

Acima da diagonal está representada a distância geográfica e abaixo a distância genética.

A variabilidade genética das populações de *P. venusta* estudadas foi maior dentro das populações (79%) do que entre elas (21%), apresentado um índice de fixação de alelos moderado com F_{st} de 0,20 (Tabela 7). A maior variabilidade intrapopulacional parece seguir um padrão dentro de populações naturais, considerando que isso também foi observado em outras espécies de *Bignoniaceae* como *Tabebuia impetiginosa* (CIAMPI; AZEVEDO; SILVA, 2003), *Zeyheria montana* (BERTONI et al., 2007), *Anemopaegma arvense* (BATISTINI et al., 2009) e *Jacaranda decurrens* (BERTONI et al., 2010b).

Todas essas espécies possuem sementes de dispersão anemocórica uma vez que são leves e aladas, o que explica o padrão de variabilidade intrapopulacional, uma vez que a dispersão de sementes pelo o vento tende a aumentar a variabilidade dentro as populações (LOVELESS; HAMRICK, 1984). A alta variabilidade intrapopulacional sugere que o risco de extinção não é elevado, já que dentro de um mesmo fragmento, independentemente do nível de perturbação, a variabilidade genética é muito grande (CIAMPI; AZEVEDO; SILVA, 2003). Apesar disso, com os resultados aqui obtidos, podemos presumir que a espécie *Pyrostegia venusta* está vulnerável a extinção.

Tabela 7 – Variabilidade genética entre e dentro de populações naturais de *Pyrostegia venusta*

FONTES	GL	QM	COMPONENTE DE VARIÂNCIA	%	P	F_{st}
Entre	5	228,323	9,591	21	0,001	0,208
Dentro	114	36,509	36,509	79		
Total	119		46,100	100		

GL = grau de liberdade; QM = Quadrado médio; F_{st} = Índice de Fixação de alelos.

As análises que incluem o dendograma, a dispersão em coordenadas principais e o agrupamento realizado pelo programa STRUCTURE mostram que as populações naturais de *P. venusta* estão distribuídas em dois grupos gênicos (Figuras 5, 6 e 7). A formação desses grupos está de acordo com as distâncias genéticas observadas, sendo que as populações de Paranaíta e Sinop (0,0242) são, entre si, as mais similares geneticamente, seguidas pelas populações de Botucatu e de Araxá (0,0293), compondo assim o primeiro grupo gênico. As populações de Nova Mutum e de Serrana são bem distintas entre si, com uma distância genética de 0,0646 e

compõem o segundo grupo gênico, sendo essas populações geneticamente mais distantes de todas as outras.

Figura 6 – Dendrograma das populações naturais de *Pyrostegia venusta* obtido pelo UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average*)

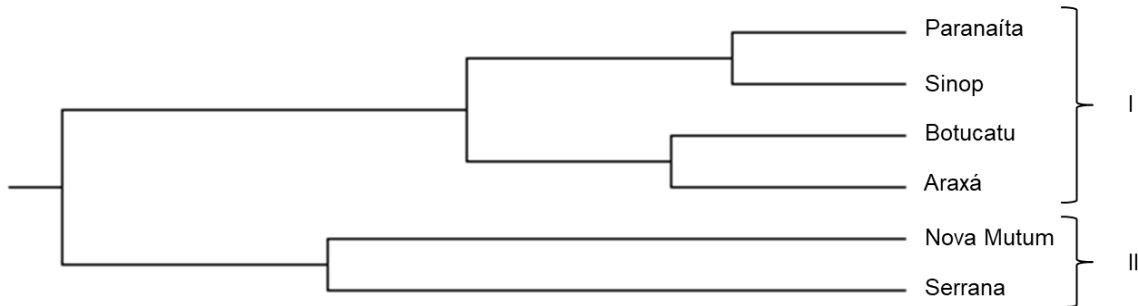


Figura 7 – Representação gráfica da análise de dispersão em coordenadas principais (PCoA) de seis populações naturais de *Pyrostegia venusta*

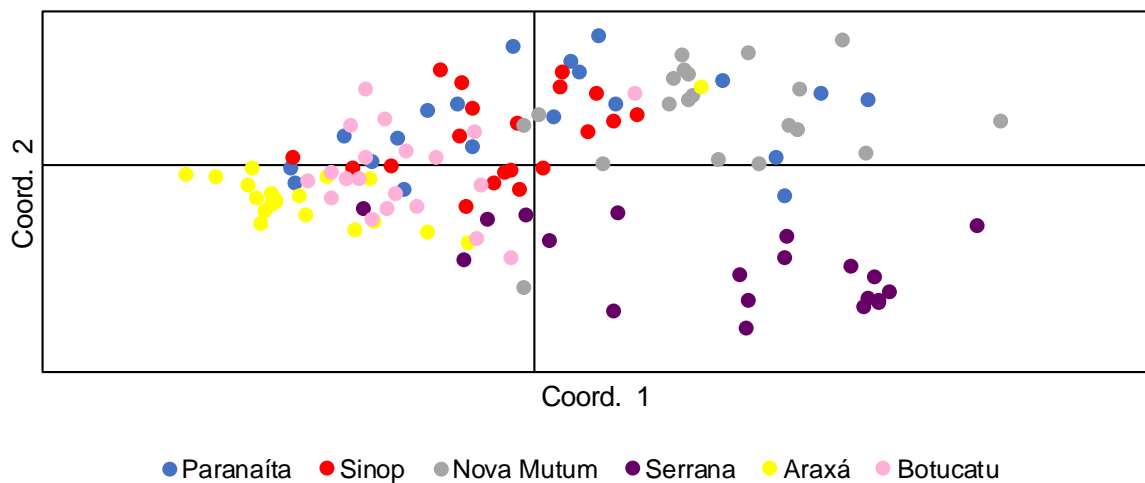
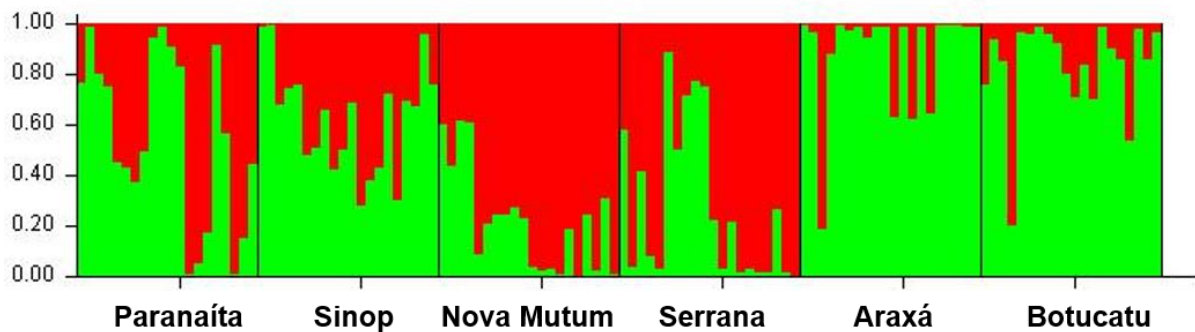


Figura 8 – Análise Bayesiana obtida pelo software STRUCTURE de seis populações naturais de *Pyrostegia venusta*



O modelo de estruturação genética das populações de *P. venusta* observado neste trabalho está associado não apenas ao seu modo de dispersão das sementes, mas também ao fato de ser uma planta ruderal com ampla distribuição geográfica, ocorrendo, portanto, não apenas em seu habitat natural, mas também frequentemente em áreas antropizadas. Sabe-se que espécies de comportamento ruderal se adaptam com mais facilidade a perturbações antrópicas, o que favorece expansão demográfica de plantas com essa característica (PINO et al., 2009; ALEXANDER et al., 2012; VARGAS-MENDONZA et al., 2015). Essas considerações explicam pelo menos em parte porque a espécie *P. venusta* encontre-se em risco moderado de extinção.

4.2 Teor de verbascosídeo

Houve diferença significativa quanto ao teor de verbascosídeo entre as populações estudadas. A concentração de verbascosídeo foi maior nas populações de Araxá (170,17 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$) e Serrana (157,29 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$), seguido de Botucatu (122,93 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$) e as três populações coletadas no estado do Mato Grosso, apresentaram as menores concentrações (Tabela 8).

Tabela 8 – Concentração de verbascosídeo em seis populações naturais de *Pyrostegia venusta*

População	Concentração de verbascosídeo ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ de extrato)
Araxá (MG)	170,17 a
Serrana (SP)	157,29 a
Botucatu (SP)	122,93 b
Nova Mutum (MT)	24,83 c
Paranaíta (MT)	18,75 c
Sinop (MT)	12,17 c
CV (%)	18,73

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knot a 5% de probabilidade.

As populações de Araxá e Serrana destacam-se por apresentar o maior número de indivíduos com concentrações de verbascosídeo superiores a 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$, com 6 e 5 indivíduos cada, respectivamente (Tabela 9). A menor concentração foi encontrada em um indivíduo coletado em Paranaíta, com apenas 5,45 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$. A

presença de verbascosídeo foi comprovada em todos os 120 indivíduos de *P. venusta* estudados neste trabalho.

Tabela 9 – Concentração de verbascosídeo ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ de extrato) em indivíduos de seis populações naturais de *Pyrostegia venusta*.

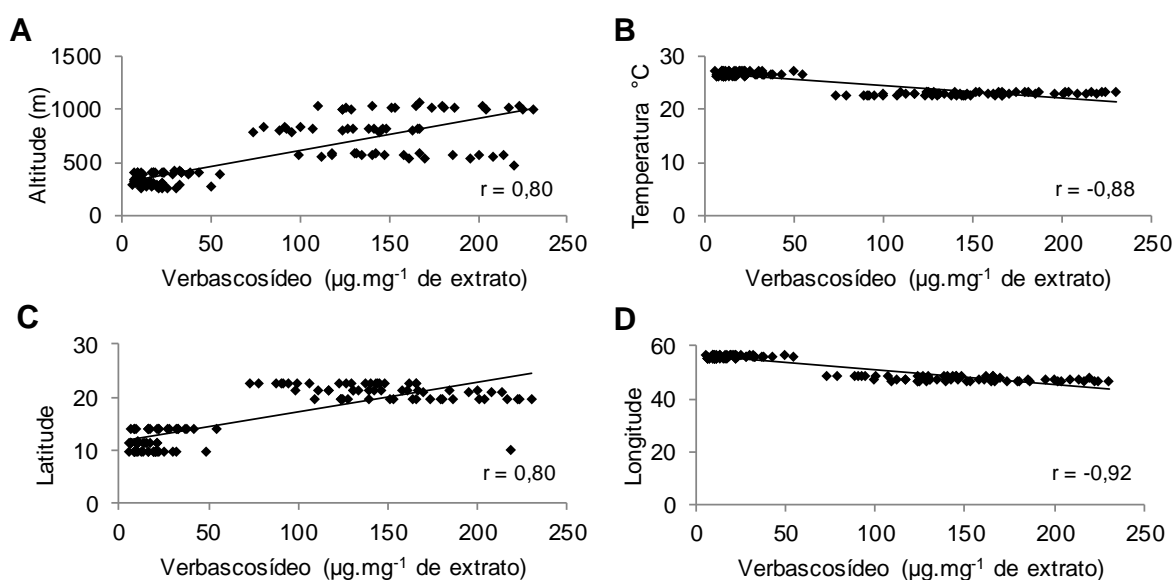
Conc*.	População					
	Paranaíta (MT)	Sinop (MT)	Nova Mutum (MT)	Serrana (SP)	Araxá (MG)	Botucatu (SP)
1	11,2 f	11,2 c	16,9 f	219,3 a	203,8 a	126,7 a
2	21,0 d	10,6 c	21,7 e	169,6 b	224,2 a	138,1 a
3	9,0 g	17,2 b	42,2 b	195,1 a	216,4 a	144,8 a
4	9,2 g	10,3 c	16,4 f	213,6 a	173,6 b	162,2 a
5	9,0 g	10,6 c	18,0 f	161,1 c	186,4 b	172,9 a
6	16,3 e	7,2 d	32,3 d	208,2 a	139,7 d	143,6 a
7	19,5 d	21,7 a	28,5 d	111,8 e	166,3 c	94,9 b
8	5,5 h	9,5 c	6,6 g	99,1 e	201,7 a	88,3 b
9	32,0 b	11,2 c	8,6 g	116,9 e	109,3 d	123,5 a
10	22,0 d	6,8 d	9,9 g	139,7 d	222,3 a	140,5 a
11	30,2 b	11,0 c	33,1 d	146,4 d	164,6 c	148,1 a
12	20,4 d	7,1 d	33,0 d	200,3 a	179,3 b	129,6 a
13	13,2 f	10,2 c	22,9 e	185,1 b	180,7 b	78,6 b
14	16,8 e	9,8 c	38,1 c	134,0 d	153,0 c	92,0 b
15	19,4 d	16,2 b	22,8 e	158,0 c	151,1 c	90,9 b
16	13,4 f	21,9 a	17,0 f	130,9 d	125,1 d	99,9 b
17	49,3 a	6,6 d	8,4 g	116,9 e	123,7 d	106,9 b
18	10,0 g	6,4 d	37,0 c	142,4 d	128,4 d	165,8 a
19	22,4 d	13,3 c	54,4 a	130,6 d	230,3 a	166,1 a
20	25,4 c	15,2 b	27,9 d	166,8 b	123,7 d	145,4 a
CV (%)	11,09	14,43	13,14	8,48	12,22	15,76

*Concentração de verbascosídeo ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ de extrato) por indivíduo. Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knot a 5% de probabilidade.

Houve forte correlação entre os fatores ambientais avaliados e o teor de verbascosídeo, sendo correlação positiva para altitude e latitude ($r = 0,80$ e $r = 0,80$, respectivamente) e negativa para temperatura e longitude ($r = -0,92$ e $r = -0,88$, respectivamente) (Figura 8). As populações encontradas na zona tropical sul (Araxá, Serrana e Botucatu), tiveram o teor de verbascosídeo superior às demais populações.

O verbascosídeo apresenta expressivo efeito antioxidante e protetor contra raios ultravioleta (UV) e tem sido demonstrado, em estudos realizados com outras espécie produtoras de verbascosídeo, que existe uma correlação positiva entre a produção desse composto com a altitude, justamente porque quanto maior a altitude maior a incidência de UV e maior a necessidade da planta em produzir essa substância para se proteger desse estresse abiótico (GANZERA et al., 2008, MURAI et al., 2009; TAMURA; NISHIBE, 2002).

Figura 9 - Correlação entre fatores ambientais e teor de verbascosídeo em *Pyrostegia venusta*. A: Altitude; B: Temperatura; C: Latitude; e D: Longitude



A temperatura é outro fator que pode influenciar significativamente a composição do metabolismo secundário em plantas (YANG et al., 2018) e nesse estudo realizado com *P. venusta* foi verificado uma correlação negativa entre o teor de verbascosídeo e a temperatura. Essa correlação está coerente com a altitude, considerando que temperaturas mais baixas ocorrem em áreas mais elevadas, como foi constatado nas regiões de Araxá, Serra e Botucatu que apresentam altitudes acima de 500 m, e temperatura média abaixo de 25 $^{\circ}\text{C}$.

A interação entre as plantas e o meio ambiente é mediada principalmente pela biossíntese do metabolismo secundário, o qual desempenha papéis biológicos como resposta adaptativa ao ambiente (BORGES et al., 2017).

Assim, a diferença encontrada entre os teores de verbascosídeo nas populações naturais de *P. venusta* é um exemplo importante do quanto as variações

abióticas estimulam resposta adaptativa, as quais podem ser detectadas pela variação de teores e tipos de compostos produzidos.

A discrepância do teor de verbascosídeo detectada nas 6 populações de *P. venusta* pode ser explicada por vários fatores, em especial pela interação entre os genótipos e os fatores ambientais próprios do local de ocorrência das populações estudadas.

Neste trabalho podemos inferir que as alterações observadas no teor de verbascosídeo dos indivíduos avaliados está mais relacionada aos fatores ambientais do que aos genéticos, considerando que as populações de Nova Mutum, Sinop e Paranaíta apresentaram dissimilaridade genética e os teores de verbascosídeo foram semelhantes. Este fato está relacionado as características ambientais dos locais de ocorrências das populações estudadas onde a temperatura, a precipitação e a altitude são semelhantes.

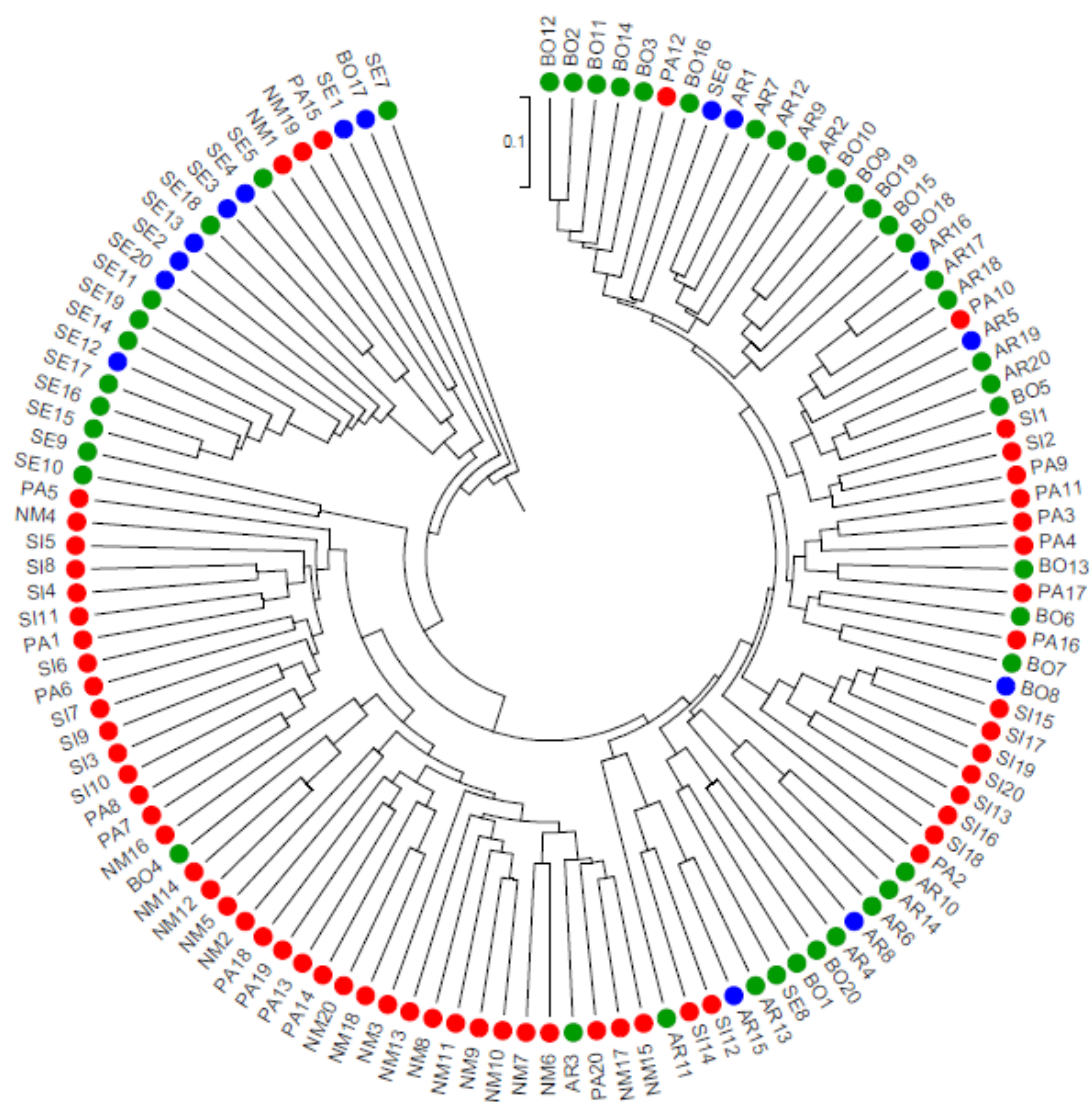
A ausência de correlação entre parâmetros químicos e genéticos observados nas populações de *P. venusta* também foi constatada em estudos com outras espécies de plantas medicinais, a exemplo de *Lippia alba* (MANICA-CATTANI et al., 2009), *Zataria multiflora* (HADIAN et al., 2011), *Cananga odorata* (BENINI et al., 2012), *Erigeron breviscapus* (LI et al., 2013), *Croton antisyphiliticus* (OLIVEIRA, 2015) e *Uncaria tomentosa* (HONÓRIO et al., 2017).

A indústria de fitoterápico estipula o preço da droga vegetal pelo teor do marcador químico, em especial quando esse marcador não é apenas analítico, mas está relacionado ao efeito terapêutico, como é o caso de *P. venusta*. Assim, os resultados obtidos com os experimentos químicos são relevantes, pois foram identificadas duas populações, localizadas em Araxá e Serrana, que se destacaram por apresenta maior concentração média dessa substância.

A população de Serrana se destacou por apresentar indivíduos com maior distância genética e 8 plantas com alto teor de verbascosídeo, enquanto na população de Araxá os indivíduos apresentaram menor distância genética e 5 indivíduos foram classificados com alto teor de verbascosídeo (Figura 9).

Este trabalho mostrou que nos ambientes que as populações foram coletadas existem indivíduos altamente produtores de verbascosídeo com expressiva diversidade genética, os quais poderão ser conservados e/ou multiplicados no intuito de atender possíveis demandas da indústria farmacêutica de fitoterápicos.

Figura 10 - Dendrograma de distâncias genéticas dos indivíduos de *Pyrostegia venusta* e classificação quanto ao teor de verbascosídeo



Legenda:

- Baixa: $18,63 \pm 11,02$ ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ de extrato)
- Média: $138,60 \pm 14,67$ ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ de extrato)
- Alta: $184,70 \pm 19,10$ ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ de extrato)

5 CONCLUSÃO

A espécie *P. venusta* encontra-se vulnerável à extinção e a diversidade genética intrapopulacional, encontrada nas populações naturais avaliadas, sinalizam ser esse o melhor momento para estabelecer estratégias de conservação, visando a manutenção da diversidade ainda existente. Todos os indivíduos avaliados apresentaram verbascosídeo, sendo a produção desta substância mais influenciada por fatores ambientais do que pelo genótipo.

REFERÊNCIAS

- ABDERRAHIM, F. et al. The antioxidant activity and thermal stability of lemon verbena (*Aloysia triphylla*) infusion. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, n. 5, p. 517–527, 2011.
- ACEVEDO, J.G.A. et al. Photoprotective activity of *Buddleja scordioides*. **Fitoterapia**, v. 76, p. 301–309, 2005.
- AKBAY, P. et al. *In vitro* immunomodulatory activity of verbascoside from *Nepeta ucrainica* L. **Phytotherapy Research**, v. 16, p. 593–595, 2002.
- ALEXANDER, J. M. et al. Different genetic clines in response to temperature across the native and introduced ranges of a global plant invader. **Journal of Ecology**, 100, 771–781, 2012.
- ALIPIEVA, K.I. et al. Verbascoside — A review of its occurrence, (bio)synthesis and pharmacological significance. **Biotechnology Advances**, p. 1-12, 2014a.
- ALIPIEVA, K.I. et al. Treasure from garden: chemical profiling, pharmacology and biotechnology of mulleins. **Phytochemistry Review**, v. 13, p. 417–444, 2014b.
- BADRKHANI, N.A.B.; AHMANI, F.A.R.; ARTI, M.O.L. Evaluation of genetic diversity in *Alcea* (*Malvaceae*). **Botanical Sciences**, v. 92, n. 3, p. 433–439, 2014.
- BATISTINI, A.P. et al. Genetic diversity of natural populations of *Anemopaegma arvense* (*Bignoniaceae*) in the Cerrado of São Paulo State, Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 8, n. 1, p. 52–63, 2009.
- BHATT, J. et al. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP) markers based genetic diversity analysis of cumin genotypes. **Annals of Agrarian Science**, v. 15, n. 4, p. 434–438, 2017.
- BENINI, C. et al. Comparative chemical and molecular variability of *Cananga odorata* (Lam.) Hook.f. & thomson forma genuina (Ylang-Ylang) in the western Indian ocean islands: Implication for valorization. **Chemistry and Biodiversity**, v. 9, n. 7, p. 1389–1402, 2012.
- BERTONI, B.W. et al. Genetic variability in natural populations of *Zeyheria montana* mart. from the brazilian cerrado. **Scientia Agricola**, v.64, n.4, p.409-415, 2007.
- BERTONI, B.W. et al. Genetic diversity among natural populations of *Mandevilla velutina*. **Horticultura Brasileira**, v. 28, n. 2, p. 209–213, 2010a.
- BERTONI, B.W. et al. Genetic diversity in natural populations of *Jacaranda decurrens* Cham. determined using RAPD and AFLP markers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 33, n. 3, p. 532–538, 2010b.
- BIRKOFER, L.; KAISER, C.; THOMAS, U. Acteoside and neoacteoside sugar esters from *Syringa vulgaris* (L). **Z. Naturforsch B**, v. 23, n. 8, p. 1051-1058, 1968.

- BORGES, C.V. et al. Medicinal plants: Influence of environmental factors on the content of secondary metabolites. **Medicinal Plants and Environmental Challenges**, p. 259–277, 2017.
- CAMPO, G. et al. Platelet aggregation values in patients with cardiovascular risk factors are reduced by verbascoside treatment. A randomized study. **Pharmacological Research**, v. 97, p. 1–6, 2015.
- CHANG, D. et al. SRAP analysis of genetic diversity of nine native populations of wild sugarcane, *Saccharum spontaneum*, from Sichuan, China. **Genetics and molecular research: GMR**, v. 11, n. 2, p. 1245–53, 2012.
- CHEN, S. et al. Analysis of the genetic diversity of garlic (*Allium sativum* L.) germplasm by SRAP. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 50, p. 139–146, 2013.
- CIAMPI, A. Y.; AZEVEDO, V. C. R.; SILVA, V. P. da. **Análise genética populacional de *Tabebuia impetiginosa* utilizando marcadores moleculares RAPD**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2003. 15 p.
- CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. Nova Iorque: Columbia University, 1981. 1262 p.
- CRUZ, C.D.; SALGADO, C.C.; BHERING, L.L. Biometria aplicada à análise molecular em diversidade genética. In: BÖREM, A.; FRITSCHÉ-NETO, R. (eds). **Biotecnologia aplicada ao melhoramento de plantas**. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2013. p. 69-117.
- DIÁZ, A.M. et al. Phenylpropanoid glycosides from *Scrophularia scorodonia*: *In vitro* anti-inflammatory activity. **Life Science**, v. 74, p. 2515–2526, 2004.
- DINIZ-FILHO, J.A.F. **Métodos Filogenéticos Comparativos**. Holos, Ribeirão Preto, 2000, 162 p.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus (Rockville)**, v.12, n.1, p.13-15, 1987.
- DUBEY, R. C.; MISRA, K. Chemical components of *Pyrostegia venusta* flowers. **Journal of the Indian Chemical Society**, v. 53, p. 378-381, 1976.
- DURAN, C.; et al. Molecular Genetic Markers: discovery, applications, data storage and visualization. **Current Bioinformatics**, v. 4, n. 1, p. 16–27, 2009.
- ELLEGREN, H.; GALTIER, N. Determinants of genetic diversity. **Nature reviews. Genetics**, v. 17, n. 7, p. 422–33, 2016.
- EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 14, p. 2611–2620. 2005.

FALEIRO, F. **Marcadores moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2007. 102 p.

FENG, N. et al. Genetic diversity and population structure of *Celosia argentea* and related species revealed by SRAP. **Biochemical Genetics**, v. 47, p. 521–532, 2009.

FERREIRA, D., et al. Constituintes químicos das raízes de *Pyrostegia venusta* e considerações sobre a sua importância medicinal. **Química Nova**, v. 1, n. 1, p. 1–5, 2000.

FERRIOL, M.; PICÓ, B. NUEZ, F. Genetic diversity of a germplasm collection of *Cucurbita pepo* using SRAP and AFLP markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 107, p. 271-282, 2003.

FIGUEIREDO, C.R., et al. *Pyrostegia venusta* heptane extract containing saturated aliphatic hydrocarbons induces apoptosis on B16F10-Nex2 melanoma cells and displays antitumor activity *in vivo*. **Pharmacognosy Magazine**, v. 10, n. 38, p. 363-376, 2014.

FRAISSE, D. et al. A novel HPLC method for direct detection of nitric oxide scavengers from complex plant matrices and its application to *Aloysia triphylla* leaves. **Molecules**, v. 23, n. 1574, p. 1-8, 2018.

FRANKHAM, R., BALLOU, J.D., BRIOSCOE, D.A. **A Primer Conservation Genetics**. Cambridge: Cambridge University Press, 2004. 220 p.

FUJI, Y. Chemical characterization and biological activity in young sesame leaves (*Sesamum indicum* L.) and changes in iridoid and polyphenol content at different growth stages. **Plos One**, v. 13, n. 3, p. 1-15, 2018.

GANZERA, M. et al. Altitudinal variation of secondary metabolite profiles in flowering heads of *Matricaria chamomilla* cv. BONA. **Planta Medica**, v. 74, p. 453-457, 2008.

GITZEL FILHO, A. et al. Inhibitory effect of verbascoside isolated from *Buddleja brasiliensis* Jacq. ex Spreng on prolyl oligopeptidase activity. **Phytotherapy Research**, v. 12, p. 1-4, 2012.

GUENNI, K.; AOUADI, M.; CHATTI, K. Analysis of genetic diversity of Tunisian pistachio (*Pistacia vera* L.) using sequence-related amplified polymorphism (SRAP) markers. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 4, 2016.

GUIMARÃES, C.T. et al. Marcadores moleculares e suas aplicações no melhoramento genético. **Biotecnologia**, Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v.30, n. 253, p. 24-33, 2009.

GUPTA, R.P.K.; RUSTGI, S. Molecular markers from the transcribed/expressed region of the genome in higher plants. **Functional & Integrative Genomics**, v. 4, p. 139–162, 2004.

- HADIAN, J. et al. Chemical and genetic diversity of *Zataria multiflora* Boiss. Accessions growing wild in Iran. **Chemistry and Biodiversity**, v. 8, n. 1, p. 176–188, 2011.
- HARBORNE, J. B. Comparative biochemistry of the flavonoids-vi: flavonoid patterns in the *Bignoniaceae* and the *Gesneriaceae*. **Phytochemistry**, v. 6, p. 1643–1651, 1967.
- HONÓRIO, I.C.G. **Estudo da diversidade genética e química de *Uncaria tomentosa* Willd. ex Roem. & Schult. e *Uncaria guianensis* Gmel de populações naturais localizadas na Amazônia**. 2016. 86 f. Tese (Doutorado em Agronomia – Horticultura) -Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2016.
- HONORIO, I.C.G. et al. Genetic and chemical diversity of *Uncaria tomentosa* (Willd. ex. Schult.) DC. in the Brazilian Amazon. **PLoS ONE**, v. 12, n. 5, p. 1–17, 2017.
- HONÓRIO, I.C.G. et al. Genetic structure and chemical diversity in natural populations of *Uncaria guianensis* (Aubl.) J.F.Gmel. (*Rubiaceae*). **PLoS ONE**, v. 13, n. 10, p. 1–13, 2018.
- HUANG, W. et al. Chemical constituents from *Striga asiatica* and its chemotaxonomic study. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 48, p. 100–106, 2013.
- JONES, N. et al. Markers and mapping revisited: finding your gene. **New Phytologist**, v. 183, p. 935–966, 2009.
- JUDD, W.S. et al. **Plant systematics - a phylogenetic approach**. Sunderland: Sinauer Associates, 1999. 464 p.
- KALENDAR, R. et al. Analysis of plant diversity with retrotransposon-based molecular markers. **Heredity**, v. 106, n. 4, p. 520–530, 2011.
- KORKINA, L.G. et al. Molecular mechanisms underlying wound healing and anti-inflammatory properties of naturally occurring biotechnologically produced phenylpropanoid glycosides. **Cellular and Molecular Biology**, v. 53, n. 5, p. 84–91, 2007.
- KUMAR, A., et al. Phytochemistry and pharmacology of *Pyrostegia venusta*: a plant of Family Bignoniaceae. **International Journal of Phytomedicine**, v. 5, n. 3, p. 257-261, 2013.
- LEE, J.Y. et al. Phytomedicine Anti-asthmatic effects of phenylpropanoid glycosides from *Clerodendron trichotomum* leaves and *Rumex gmelini* herbes in conscious guinea-pigs challenged with aerosolized ovalbumin. **Phytomedicine**, v. 18, p. 134–142, 2011.
- LI, G.; QUIROS, C. F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and

gene tagging in *Brassica*. **Theoretical and Applied Genetics**, v.103, p.455-461, 2001.

LI, G.; MCVETTY, P.B.E.; QUIROS, C.F. SRAP Molecular Marker Technology in Plant Science. **Plant Breeding from Laboratories to Fields**, p. 23–43, 2013.

LI, M. et al. Genetic diversity and population structure of siberian apricot (*Prunus sibirica* L.) in China. **International Journal of Molecular Sciences**, v.15, p. 377–400, 2014.

LI, P. et al. Genetic Diversity and Population Structure of *Toona Ciliata* Roem. Based on Sequence-Related Amplified Polymorphism (SRAP) Markers. **Forests**, v. 6, n. 4, p. 1094–1106, 2015.

Li, X. et al. Conservation genetics and population diversity of *Erigeron breviscapus* (Asteraceae), an important Chinese herb. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 49, p. 156–166, 2013

LI, Y. et al. A new iridoid glycoside with nerve growth factor-potentiating activity, gelsemiol 6'-*trans*-Caffeoyl-1-glucoside, from *Verbena littoralis*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 51, n. 9, p. 1103–1105, 2003.

LOHMANN, L. G. Untangling the phylogeny of neotropical lianas (Bignoniaceae, Bignoniaceae). **American Journal of Botany**, v. 93, n. 2, p. 304–318, 2006.

LÓPEZ-LAREDO, A.R. Variation in antioxidant properties and phenolics concentration in different organs of wild growing and greenhouse cultivated *Castilleja tenuiflora* Benth. **Acta Physiological Plant**, v. 34, p. 2435-2442, 2012.

LORENZI, H.; SOUZA, H.M. **Plantas ornamentais do Brasil. Arbustivas, herbáceas e trepadeiras**. 3.ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2001. 1088p.

LOVELESS, M.D.; HAMRICK, J.L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 15, p. 65-95, 1984

MAHESWARAN, M. History, Features History, Features and Applications Markers: Molecular Markers. **Advances Biotechnology**, p. 17-24, 2004.

MANICA-CATTANI, M. et al. Genetic variation among South Brazilian accessions of *Lippia alba* Mill. (*Verbenaceae*) detected by ISSR and RAPD markers. **Brazilian Journal of Biology**, v. 69, n. 2, p. 375–380, 2009.

MANTOVANI, W.; MARTINS, F.R. Variações fenológicas das espécies do cerrado da Reserva Biológica de Moji Guaçu, Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 11, p. 101-112, 1988.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 166, de 24 de julho de 2017**. 2017. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401)

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos**. 2006. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_nacional_fitoterapicos.pdf

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Biodiversidade brasileira**. 2019a. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-brasileira.html>.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **O Bioma Cerrado**. 2019b. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/biomas/cerrado>.

MOREIRA, C.G., et al. Hyperpigmentant activity of leaves and flowers extracts of *Pyrostegia venusta* on murine B16F10 melanoma. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 141, n. 3, p. 1005–1011, 2012.

MOREIRA, C.G., et al. Pre-clinical evidences of *Pyrostegia venusta* in the treatment of vitiligo. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 168, p. 315–325, 2015.

MORELLATO, L.P.C.; LEITÃO FILHO, H.F. Reproductive phenology of climbers in a South-eastern Brazilian forest. **Biotropica**, v. 28, n. 2, p. 180-191, 1996.

MOSTAFA N.M., EL-DAHSHAN O., SINGAB A.N.B. *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers: A Botanical, Pharmacological and Phytochemical Review. **Medicinal & Aromatic Plants**, v. 2, n. 3, p. 123-128, 2013.

MURAI, Y. et al. Altitudinal variation of UV-absorbing compounds in *Plantago asiatica*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 37, p. 378-384, 2009.

NISHA, P.V. et al. Anthelmintic activity of *Pyrostegia venusta* using *Pheretima posthuma*. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research**, v. 4, n. 3, p. 205-208, 2012.

OLIVEIRA, T. **Estudo da diversidade genética e química e produção do epímero do ácido caurenóico em calos de *Croton antisyphiliticus* mart.** 2015. 83 f. Tese (Doutorado em Agronomia – Horticultura) -Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2015.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P.E. Genealex 6.5: genetic analysis in Exel population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes**, v. 6, p. 288-295, 2006.

PEREIRA, A.M.S., et al. Evaluation of anticandidal and antioxidant activities of phenolic compounds from *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers. **Chemico-Biological Interactions**, v. 224, p. 136–141, 2014.

PETTIT, G.R. et al. Antineoplastic agents, 107. isolation of acteoside and isoacteoside from *Castilleja linariaefolia*. **Journal of Natural Products**, v. 53, n. 2, p. 456–458, 1990.

PINO, J. et al. Floristic homogenization by native ruderal and alien plants in north-east Spain: the effect of environmental differences on a regional scale. **Global Ecology and Biogeography**, 18(5), 563–574, 2009.

POOL, A. A review the genus *Pyrostegia* (*Bignoniaceae*), **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 95, n. 3, p. 495-510, 2008.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of populations structure using multilocus genotype data. **Genetics Society of America**, v.155, p.945-959, 2000.

QIU, H. et al. General acteoside of *Rehmanniae* leaves in the treatment of primary chronic glomerulonephritis: a randomized controlled. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 10, n. 4, p. 109–115, 2013.

ROY, P. et al. Preliminary study of the antioxidant properties of flowers and roots of *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl) Miers. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 11, p. 1-8, 2011.

ROY, P. et al. In vivo antioxidative property, antimicrobial and wound healing activity of flower extracts of *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl) Miers. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 140, p. 186–192, 2012.

SAMPAIO E.S, ALMEIDA A.A. Morfologia floral e biologia reprodutiva de *Pyrostegia venusta* (*Bignoniaceae*) na região urbana de Curitiba, Paraná. **Acta Biológica Paranaense**, v. 24, n. 1, p. 25-38, 1995.

SARKHAIL, P. et al. Quantification of verbascoside in medicinal species of *Phlomis* and their genetic relationships. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 22, n. 32, p. 1–9, 2014.

SCARPATI M.L, MONACHE F.D. Isolation from *Verbascum sinuatum* of two new glucosides, verbascoside and isoverbascoside. **Annals of Chimica (Roma)**, v. 53, p. 356–367, 1963.

SENS, S.L. **Alternativas para auto-sustentabilidade dos Xokleng da terra indígena Ibirama**. 2002. 386 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) -Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.

SHENG, G. et al. Protective effect of verbascoside on 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced neurotoxicity in PC12 cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 451, p. 119–124, 2002.

SILVA, R.M.G. et al. Antitumor and cytotoxic activity of *Kielmeyera coriacea* Mart. Zucc. and *Pyrostegia venusta* (Ker-Gawl.) Miers extracts. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, n. 24, p. 4142–4148, 2012.

SOLE-CAVA A.M. Biodiversidade molecular e genética da conservação. In: MATIOLI S.R. (ed). **Biologia Molecular e Conservação**. Ribeirão Preto: Editora Holos, 2001. p.172-192.

SONG, Z. et al. Genetic diversity and population structure of *Salvia miltiorrhiza* Bge in China revealed by ISSR and SRAP. **Genetica**, v. 138, p. 241–249, 2010.

SOUSA, M.B., et al. *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers crude extract and fractions: prevention of dental biofilm formation and immunomodulatory capacity plant material. **Pharmacognosy Magazine**, p. 1–5, 2016.

SPEROTTO, N.D.M. et al. Wound healing and anti-inflammatory activities induced by a *Plantago australis* hydroethanolic extract standardized in verbascoside. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 225, p. 178–188, 2018.

STICHER, O.; LAHLOUB, M.F. Phenolic Glycosides of *Paulownia tomentosa* Bark. **Journal of Medicinal Plant Research: Planta medica**, v. 46, p. 145–148, 1982.

TAMURA, Y. AND NISHIBE, S. Changes in the concentrations of bioactive compounds in plantain leaves. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 2514-2518, 2002.

THARACHAND, C.; SELVARAJ, C.I.; MYTHILI, M.N. Molecular markers in characterization of medicinal plants: An overview. **Research in Plant Biology**, v. 2, n. 2, p. 01-12, 2012.

TINOI, J.; RAKARIYATHAM, N.; DEMING, R.L. Determination of major carotenoid constituents in petal extracts of eight selected flowering plants in the north of Thailand. **Chiang Mai Journal Science**, v. 33, n. 2, p. 327 – 334, 2006.

TRÓPICOS. Missouri Botanical Garden. <http://www.tropicos.org/Name/3700580>. 21 jun 2019.

THE PLANT LIST. <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/kew-317916>. 16 out 2019.

TURCHETTO, C. et al. Marcadores genéticos baseados em DNA. In: TURCHETTO-ZOLET, A. C., et al. (orgs). **Marcadores Moleculares na Era genômica: Metodologias e Aplicações**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2017. cap.1, p. 12-20.

UDULUTSCH, R.G., ASSIS, M.A., PICCHI, D.G. Florística de trepadeiras numa floresta estacional semidecídua, Rio Claro - Araras, Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, n. 1, p. 125-134, 2004.

VARGAS-MENDOZA, C.F. et al. Genetic diversity, outcrossing rate, and demographic history along a climatic gradient in the ruderal plant *Ruellia nudiflora* (*Acanthaceae*). **Revista Mexicana de Biodiversidad**, v. 86, p. 508–520, 2015.

VELOSO, C.C., et al. *Pyrostegia venusta* attenuate the sickness behavior induced by lipopolysaccharide in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 132, n. 1, p. 355–358, 2010.

VELOSO, C.C. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of the hydroethanolic extract of the flowers of *Pyrostegia venusta* in mice. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 1, p. 162–168, 2012.

VELOSO, C.C. et al. Hydroethanolic extract of *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers flowers improves inflammatory and metabolic dysfunction induced by high-refined carbohydrate diet. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 151, p. 722-728, 2014.

VERTUANI, S. et al. Activity and stability studies of verbascoside, a novel antioxidant, in dermo-cosmetic and pharmaceutical topical formulations. **Molecules**, v. 16, p. 7068–7080, 2011.

VASHISHTHA, A.; JEHAN, T.; LAKHANPAUL, S. Genetic diversity and population structure of *Butea monosperma* (Lam.) Taub. - a potential medicinal legume tree. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 19, n. 3, p. 389–397, 2013.

WRIGHT, S. **Evolution and the genetics of populations**. The University of Chicago Press, London. 1978.

YANG, L. et al. Response of plant secondary metabolites to environmental factors. **Molecules**, v. 23, n. 4, p. 1–26, 2018.

ZHANG, J. et al. Molecular insights of genetic variation in *Erianthus arundinaceus* populations native to China. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, p. 1–8, 2013.

ZHANG, Y. et al. Genetic diversity and structure of tea plant in Qinba area in China by three types of molecular markers. **Hereditas**, v. 155, n. 22, p. 1–12, 2018.

ZHENG, Y. et al. Genetic diversity and population structure of Chinese natural bermudagrass [*Cynodon dactylon* (L.) Pers.] germplasm based on SRAP markers. **PLoS ONE**, v. 12, n. 5, p. 1–15, 2017.

ZHOU, Y.C.; ZHENG, R.L. Phenolic compounds and an analog as superoxide anion scavengers and antioxidants. **Biochemical Pharmacology**, v. 42, n. 6, p. 1177–1179, 1991.

ZHU, M. et al. Central anti-fatigue activity of verbascoside. **Neuroscience Letters**, v. 616, p. 75–79, 2016.

ZIMBACK, L. et al. Estrutura genética de populações de *Trichillia pallida* Swartz (*Meliaceae*) por marcadores RAPD. **Scientia Florestalis**, n.65, p.114-119, 2004.