

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

SISTEMÁTICA MOLECULAR DE *Utricularia* L. (LENTIBULARIACEAE)

Saura Rodrigues da Silva

Bióloga

2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

SISTEMÁTICA MOLECULAR DE *Utricularia* L. (LENTIBULARIACEAE)

Saura Rodrigues da Silva

Orientador: Prof. Dr. Vitor Fernandes Oliveira de Miranda

Coorientador: Dr. Eduardo Custódio Gasparino

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas)

2014

S586s Silva, Saura Rodrigues da
Sistemática molecular de *Utricularia* L. (Lentibulariaceae) / Saura
Rodrigues da Silva. -- Jaboticabal, 2014
iii, 83 p. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2014
Orientador: Vitor Fernandes Oliveira de Miranda
Coorientador: Eduardo Custódio Gasparino
Banca examinadora: Alessandro de Mello Varani, Maurício Bacci
Junior
Bibliografia

1. *Utricularia*. 2. Sistemática Molecular. 3. "DNA Barcoding". 4.
Filogenia. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias.

CDU 581.137.2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: SISTEMÁTICA MOLECULAR DE *Utricularia* L. (Lentibulariaceae)

AUTORA: SAURA RODRIGUES DA SILVA

ORIENTADOR: Prof. Dr. VITOR FERNANDES OLIVEIRA DE MIRANDA

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. EDUARDO CUSTODIO GASPARINO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM AGRONOMIA (GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS), pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. VITOR FERNANDES OLIVEIRA DE MIRANDA
Departamento de Biologia Aplicada À Agropecuária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal


Prof. Dr. ALESSANDRO DE MELLO VARANI
Departamento de Tecnologia / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal


Prof. Dr. MAURÍCIO BACCI JUNIOR
Departamento de Bioquímica e Microbiologia / Instituto de Biociências de Rio Claro

Data da realização: 27 de fevereiro de 2014.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

SAURA RODRIGUES DA SILVA, nascida em 03 de março de 1989 na cidade de Mogi das Cruzes – SP, é filha de Márcia Rejane Rodrigues da Silva e Laércio Julio da Silva. cursou o ensino fundamental e médio no Colégio São Marcos em Mogi das Cruzes – SP. Em dezembro de 2008 graduou-se em Ciências Biológicas pela Universidade de Mogi das Cruzes (UMC) – câmpus de Mogi das Cruzes, durante o qual teve participação em diversos projetos de iniciação científica, todos com fomento do CNPq e FAPESP sob orientação do prof. Dr. Vitor Fernandes Oliveira de Miranda. Em março de 2012 foi admitida, com bolsa de estudos CAPES, no curso de mestrado em Agronomia do Programa de Genética e Melhoramento de Plantas da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) – UNESP – câmpus de Jaboticabal. Recentemente foi aprovada no curso de Doutorado do Programa de Biologia Vegetal (Botânica) da Unesp – câmpus Botucatu, com início em março de 2014.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Márcia Rejane Rodrigues, pela vida, pelo grande apoio, confiança, perseverança e paciência.

Agradeço imensamente ao meu orientador Prof. Dr. Vitor Fernandes Oliveira de Miranda por abrir as portas para o mundo das pequenas notáveis lentibulariáceas, que nesses quase quatro anos de orientação se tornaram uma grande paixão.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Eduardo Custódio Gasparino pelas fecundas discussões a respeito das características morfológicas das espécies e críticas ao trabalho.

À equipe do laboratório LSVP por sempre fazer cada dia de trabalho uma alegria, mesmo nos momentos de dificuldade e estresse.

Às mais que especiais e queridas amigas Yani Aranguren, Cristine Gobbo Menezes, Gabriela Jacques e Talyta Schartmann pelo companheirismo, confiança, por muitas risadas e apoio nos momentos de tristeza, mesmo a distância.

À nova integrante da equipe Michelle Pena pela grande ajuda nas últimas etapas do trabalho de bancada.

Ao querido amigo Yoannis Dominguez que muito além de colega de laboratório se tornou parte da minha família.

Aos pesquisadores/colecionadores de plantas carnívoras Dr. Robert Gibson e Dr. Lubomír Adamec pelas amostras doadas que muito enriqueceram o trabalho.

Aos professores responsáveis pelo Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada, Prof. Dr. Manoel Vitor Franco Lemos e Profa. Dra. Janete Aparecida Desidério pela disponibilização da infraestrutura para a realização das análises moleculares.

Pelas técnicas dos laboratórios Eliane Cristina da Cunha Alves, Roseli Conceição e Claudia Rodrigues pelo apoio na realização dos experimentos.

Aos professores Prof. Dr. Alessandro Varani e Profa. Dra. Janete Aparecida Desidério pelas enriquecedoras discussões levantadas no Exame de Qualificação.

Aos membros da banca de defesa Prof. Dr. Alessandro Varani e Prof. Dr. Mauricio Bacci Jr. pela avaliação do trabalho, críticas e sugestões.

Ao Conselho do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas).

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

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) e à PROPe/ UNESP pelo auxílio financeiro.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp, câmpus de Jaboticabal, pela oportunidade.

À “Dona” Raquel Matassa e “Seu” Geraldo (Mineiro) por toda a ajuda e descontraídas conversas durante toda a fase final do trabalho.

Ao amigo Elias Matarazzo pelas fecundas discussões a respeito do Pólipo-Bio.

Ao meu namorado André Assis de Melo Neto pelo companheirismo, paciência, dedicação e principalmente amor.

355. A origem do nosso conceito de conhecimento.

“Que entende o povo verdadeiramente por conhecimento? Só isto: algo de estranho deve ser transformado em algo de familiar. E para nós, os filósofos, não é a nossa necessidade de conhecimento a mesma necessidade do que é conhecido, a vontade de, no meio de tudo o que é estranho, fora do usual e duvidoso descobrir algo que já não nos perturbe? Não será o instinto do medo que nos obriga a conhecer? Quando os que buscam o conhecimento reencontram algo nas coisas, sob as coisas ou por trás das coisas, que já é muito conhecido, como, por exemplo, a tabuada, ou a lógica, ou as nossas vontades e apetites, que felizes ficam logo! Porque “o que é familiar é conhecido”, e nisso estão de acordo. Mesmo os mais cuidadosos entre eles acham que o que é familiar é pelo menos mais facilmente conhecido do que o que é estranho. Erro dos erros! O que é conhecido é habitual; e o habitual é o mais difícil de 'conhecer', isto é, de ver como problema, isto é, de ver como estranho, afastado, 'fora de nós'...” (Gaia da Ciência – Nietzsche, F.)

À minha recentemente falecida avó,
Maria Aparecida Rodrigues, por
sempre me ensinar que a dificuldade
é necessária para sempre superar-
se a si mesmo.

OFEREÇO

À minha mãe, Márcia Rejane Rodrigues, pela
dedicação, carinho e amor incondicional.

DEDICO

SUMÁRIO

| | Página |
|---|------------|
| RESUMO | ii |
| ABSTRACT | iii |
| CAPÍTULO 1 – Considerações gerais | 1 |
| Introdução | 1 |
| Revisão de literatura | 3 |
| Referências | 13 |
| CAPÍTULO 2 – Revelando o DNA “Barcoding” para plantas carnívoras do gênero <i>Utricularia</i> L. | 22 |
| Resumo | 22 |
| Introdução | 23 |
| Material e Métodos | 25 |
| Resultados | 30 |
| Discussão | 35 |
| Conclusão | 41 |
| Referências | 42 |
| CAPÍTULO 3 – Filogenia de <i>Utricularia</i> L. (Lentibulariaceae) baseada em quatro sequências do DNA cloroplastidial e nuclear | 50 |
| Resumo | 50 |
| Introdução | 51 |
| Material e Métodos | 53 |
| Resultados | 60 |
| Discussões | 67 |
| Referências | 78 |

SISTEMÁTICA MOLECULAR DE *Utricularia* L. (LENTIBULARIACEAE)

RESUMO - O uso da sistemática molecular, nas mais variadas abordagens existentes atualmente, é de suma importância para produzir e complementar dados relativos à identificação e história evolutiva das mais diversas espécies. O emprego do DNA, aliado às ferramentas atuais baseadas em sistemática filogenética, pode ser de grande valia para a proposição de um sistema classificatório mais próximo do natural. O gênero *Utricularia* (Lentibulariaceae) compreende cerca de 250 espécies, das quais cerca de 90 ocorrem nos Neotrópicos e 69 no Brasil, sendo que 20 destas são endêmicas. Muitas espécies ocorrem em ampla variedade de *habitats* e apresentam alto grau de polimorfismo estrutural, sendo comumente identificadas de forma equivocada, mesmo por especialistas. A delimitação infragenérica também apresenta inconsistências quanto às circunscrições e relações filogenéticas dos subgêneros e seções, fato que evidencia a necessidade de estudos filogenéticos, principalmente baseados em dados moleculares. Assim fica clara a necessidade de pesquisas em sistemática para o grupo, o que poderia trazer informações diagnósticas para as delimitações interespecíficas, assim como para as relações dos táxons infragenéricos (subgêneros, seções e espécies). Sendo assim, o presente estudo teve por objetivos principais avaliar (i) a eficácia da aplicação do DNA “Barcoding” e (ii) realizar o maior estudo filogenético já proposto para *Utricularia*, baseado em sequências de DNA dos genomas nuclear e cloroplastidial.

Palavras chave: Sistemática molecular, *Utricularia*, filogenia, DNA “Barcoding”

**MOLECULAR SYSTEMATICS OF THE GENUS *Utricularia* L.
(LENTIBULARIACEAE)**

ABSTRACT - The use of molecular systematics in various existing approaches is currently of paramount importance to produce and supplement data concerning the identification and evolutionary history of several species. The use of the DNA molecule, combined with the current tools based on systematics, can be of great value to the proposition of a classificatory system closer to natural. The genus *Utricularia* L. (Lentibulariaceae) comprises about 250 species, of which about 90 occur in the Neotropics and 69 in Brazil, and 20 of these are endemic. Many species occur in a wide variety of habitats and has a high degree of structural polymorphism, by that they are commonly mistakenly identified, even by experts. Infrageneric delimitation has also inconsistencies regarding boundaries and phylogenetic relationships of the subgenera and sections, a fact that highlights the need for phylogenetic studies based mainly on molecular data. Thus there is a clear need for systematic research for the group, which could provide diagnostic information for interspecific boundaries as well as the relationships of taxa (subgenera, sections and species). Therefore, the present study was to evaluate the main objectives (i) the effectiveness of the application of DNA barcoding and (ii) hold the largest phylogenetic study already proposed for *Utricularia*, based on DNA sequences of nuclear and chloroplast genomes.

Keywords: Molecular Systematics, *Utricularia*, Phylogeny, DNA Barcoding

CAPITULO 1 – Considerações gerais

Introdução

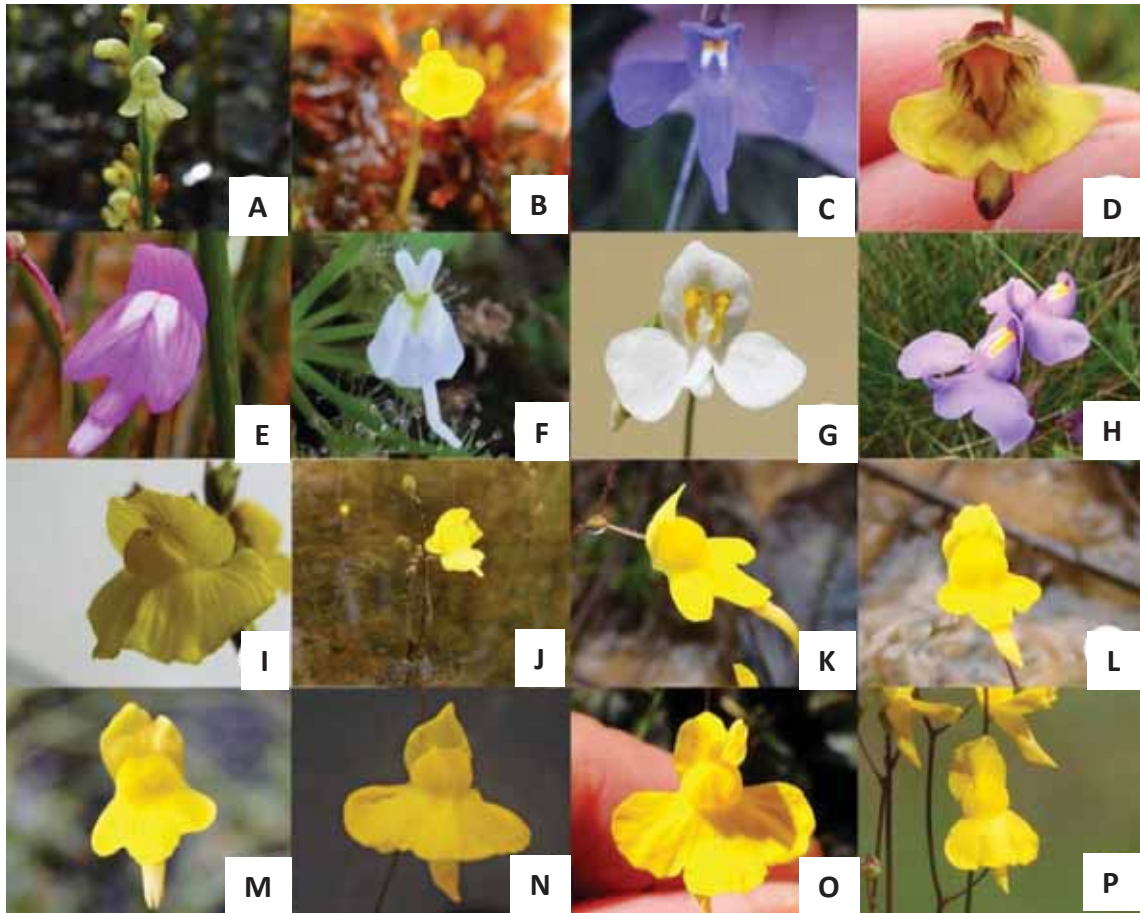
A sistemática molecular tem por objetivo primordial, a aplicação de biomoléculas – principalmente o DNA – para o reconhecimento das linhagens evolutivas e os táxons envolvidos, a identificação de supostos ancestrais, assim como a inferência de todos os processos que são responsáveis pelo padrão atual encontrado para os mesmos táxons (EGAN *et al.*, 2012). A abordagem foi historicamente realizada com o emprego de sequências de DNA ou mesmo proteínas, mas, com as novas tecnologias para o sequenciamento, inclusive de genomas inteiros e com o barateamento dessas aplicações, a sistemática molecular ganha cada vez mais subsídios e conseqüentemente se depara com mais desafios metodológicos (MCCORMACK *et al.*, 2013).

As espécies da família Lentibulariaceae vêm ganhando foco, pois muitas são fortes candidatas à planta modelo. Recentemente, descobriu-se que as espécies *Utricularia* e *Genlisea* têm os menores genomas e que possuem as maiores taxas de mutações para todas as organelas em relação a todas as angiospermas (GREILHUBER *et al.*, 2006; JOBSON; ALBERT, 2002; 2013).

Muitas espécies ocorrem em ampla variedade de *habitats* e apresentam alto grau de polimorfismo estrutural (TAYLOR, 1989), sendo muitas vezes identificadas de forma equivocada, mesmo por especialistas. Não menos preocupante, estão determinadas espécies que não apresentam circunscrições muito claras, havendo sobreposições de caracteres, o que torna a delimitação e o reconhecimento das espécies, no mínimo, processo duvidoso, principalmente quando extremos populacionais são observados (Figura 1).

Esses fatos revelam a necessidade de pesquisas em sistemática para o grupo. Nesse contexto, a sistemática molecular com a abordagem do DNA “Barcoding” para a identificação de táxons e a reconstrução de hipóteses filogenéticas robustas podem ser importantes ferramentas à taxonomia do grupo, o que poderia trazer informações diagnósticas para as delimitações interespecíficas

assim como a criação de hipóteses de relacionamentos para as espécies e grupos infragênicos.



Figuras 1. Espécies do gênero *Utricularia* L. **A.** *Utricularia neottioides* A.St.-Hil. & Girard; **B.** *U. nana* A.St.-Hil. & Girard; **C.** *U. amethystina* Salzm. ex A.St.-Hil. & Girard; **D.** *U. hispida* Lam.; **E.** *U. cucullata* A.St.-Hil. & Girard; **F.** *U. sandersonii* Oliver; **G.** *U. nephrophylla* Benj.; **H.** *U. reniformis* A.St.-Hil.; **I.** *U. foliosa* L.; **J.** *U. gibba* L.; **K.** *U. nigrescens* Sylvén; **L.** *U. pusilla* Vahl; **M.** *U. flaccida* A.DC.; **N.** *U. triloba* Benj.; **O.** *U. subulata* L.; **P.** *U. nervosa* G.Weber ex Benj. (Fotos de nosso grupo – LSVF/FCAV/UNESP.)

Revisão de literatura

A família Lentibulariaceae é formada por três gêneros monofiléticos: *Pinguicula* L., *Genlisea* A.St.-Hil. e *Utricularia* L. (TAYLOR, 1989; MULLER *et al.*, 2006). É a maior em número de espécies (aproximadamente 350), diferentes *habitats*, diferentes mecanismos e especializações de captura entre as todas as plantas carnívoras (JUNIPER *et al.*; 1989; KRÓL *et al.*, 2012). De acordo com o APG III (2009), Lentibulariaceae integra a ordem Lamiales (SCHÄFERHOFF *et al.*, 2010; REFULIO-RODRIGUEZ; OLMEASTED, 2014), que abriga a maioria dos gêneros de plantas carnívoras, constituindo um grupo monofilético. Os gêneros são classificados a partir de características morfológicas e anatômicas, tanto as florais (relacionadas ao perianto) quanto às adaptações ao hábito carnívoro (morfoanatomia das armadilhas foliares; Figura 2) e dados moleculares (JOBSON; ALBERT, 2002; JOBSON *et al.*, 2003; MÜLLER *et al.*, 2000; 2005; 2006).

O gênero *Pinguicula* L. (Figura 2A) agrupa mais de 100 espécies e se faz presente, principalmente no Hemisfério Norte (CASPER, 1966; CIESLAK *et al.*, 2005). Sua estrutura adaptada à carnivoría é formada por folhas rosetadas e adesivas devido à grande quantidade de tricomas glandulares pedunculados e sésseis, que se posicionam adnatas ao solo (HESLOP-HARRISON, 2004). De acordo com estudos morfológicos, ecológicos e filogenéticos, são as formas mais plesiomórficas de captura de presas (geralmente pequenos artrópodos) quando comparados aos demais gêneros na família (MÜLLER *et al.*, 2004; 2006; CIESLAK *et al.*, 2005; ALCALÁ *et al.*, 2010). Não há representante para o Brasil, embora alguns táxons sejam nativos de regiões de clima frio na América do Sul (LEGENDRE, 2000). De acordo com Cieslak *et al.* (2005), desde 1844 o gênero *Pinguicula* sofreu diversas modificações taxonômicas (BARNHART, 1916; WOOD; GODFREY, 1957; GODFREY; STRIPLING, 1961; ERNST, 1961), sendo a classificação atualmente aceita. Nesta classificação, as espécies estão agrupadas nos três subgêneros *Isoloba*, *Pinguicula* e *Temnoceras* segregados em diversas seções, subseções e séries, tendo sido elaborada por Casper (1966) em sua monografia, com a junção de dados citológicos, morfológicos e de *habitat*.

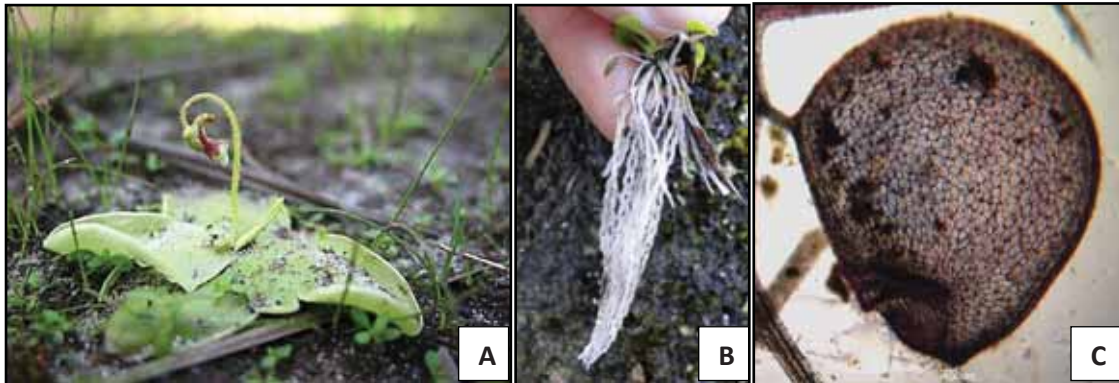


Figura 2. Tipos de armadilhas na família Lentibulariaceae. **A.** *Pinguicula albida* C.Wright ex Griseb.; **B.** *Genlisea violacea* A.St.-Hil.; **C.** *Utricularia foliosa* L. (Fotos de nosso grupo – LSVP/FCAV/UNESP)

As espécies de *Genlisea* (Figura 2B) possuem folhas dispostas em roseta, como em *Pinguicula*, entretanto suas armadilhas são subterrâneas e possuem a forma de “Y”, cuja porção proximal consiste numa região intumescida. Nela ocorre a digestão de presas como protozoários, pequenos invertebrados e algas, atraídas pelas estruturas distais que se parecem com dois tubos retorcidos (BARTHLOTT *et al.*, 1998; PŁACHNO *et al.*, 2008). O gênero *Genlisea* sofreu recente adição de espécies devido à concatenação de dados morfológicos, moleculares e biogeográficos por Fleischmann *et al.* (2010; 2011). Atualmente são reconhecidas para o gênero 29 espécies (TAYLOR, 1991; FISCHER *et al.*, 2000; FLEISCHMANN *et al.*, 2010; 2011; FLEISCHMANN, 2012) agrupadas em dois subgêneros, *Tayloria* e *Genlisea*, que podem ser anatomicamente diferenciados pela deiscência dos frutos, morfologia do pólen, ultraestrutura de glândulas digestivas e o padrão de distribuição das glândulas quadrífidas no interior das armadilhas (FROMM-TRINTA, 1977; FROMM-TRINTA, 1981; TAYLOR, 1989; PLACHNO *et al.*, 2007; FLEISCHMANN, *et al.*, 2010; 2011; FLEISCHMANN, 2012). Estão distribuídas nas Américas Central e do Sul e também na África (FLEISCHMANN *et al.*, 2012). Para o Brasil foram registradas 15 espécies, das quais 10 são endêmicas, sendo o subgênero *Tayloria* endêmico do leste do Brasil (MIRANDA; RIVADAVIA, 2014).

Recentemente, estudos revelaram que o gênero *Genlisea* possui espécies com os menores cromossomos encontrados em angiospermas, comparáveis aos de bactérias (GREILHUBER *et al.*, 2006; ALBERT *et al.*, 2010), e também o maior entre

as espécies de Lentibulariaceae, inclusive com variações intraespecíficas (ALBERT *et al.*, 2010).

O gênero *Utricularia* L. (do latim *utriculus*, que significa “pequena vesícula”; QUATTROCHI, 1999; Figura 2C), por sua vez, possui aproximadamente 220 espécies agrupadas em 35 seções de acordo com a monografia de Taylor (1989). É o gênero com maior distribuição totalizando aproximadamente 35% das espécies de plantas carnívoras existentes (JUNIPER *et al.*, 1989).

É o gênero mais derivado da família Lentibulariaceae (MÜLLER *et al.*, 2004, 2006). Tem hábito herbáceo, e sua grande maioria possui estruturas que nem sempre seguem os modelos tradicionais de classificação, com órgãos bem definidos em folha, caule e raiz. Assim, em muitos casos não se sabe se ocorrem folhas ou filocládios com função fotossintética (JUNIPER *et al.*, 1989; RUTISHAUSER; ISLER, 2001). Ademais, não possuem raízes verdadeiras, mas estruturas similares conhecidas como rizoides que funcionam como grampos de fixação em um determinado substrato (TAYLOR, 1989).

Não é somente diverso em número de espécies, mas também *habitats*, plasticidade fenotípica e especialização nutricional (LLOYD, 1942; JUNIPER *et al.*, 1989; TAYLOR, 1989; ADAMEC *et al.*, 2010). O *habitat* onde ocorre, é geralmente oligotrófico, com vegetação rasteira, de solos arenosos a pedregosos e com a capacidade de formar filmes de água e até pequenos alagados. A plasticidade fenotípica em *Utricularia* provavelmente é consequência da diversidade de ambientes em que são encontradas, podendo ser terrícolas, aquáticas e livres, aquáticas e fixas, reofíticas, litofíticas e epífitas, sendo que em algumas espécies ocorre sobreposição de “habitat” por condições sazonais (TAYLOR, 1989; MÜLLER *et al.*, 2006; GUISANDE *et al.*, 2007).

De acordo com Taylor (1989), sua origem geográfica não está totalmente esclarecida, porém estudos filogenéticos (e.g. JOBSON *et al.*, 2003; MÜLLER *et al.*, 2002, 2004, 2006) indicam uma possível origem neotropical. Houve posteriormente dispersão para as regiões Afrotropical e Australásia, assim como para as demais regiões do mundo (GUISANDE *et al.*, 2007). São amplamente distribuídas na América do Sul que abriga uma grande diversidade de espécies (TAYLOR, 1989).

Para o Brasil foram catalogadas 69 espécies, das quais 20 são consideradas endêmicas (MIRANDA; RIVADAVIA, 2014).

A primeira listagem de espécies de *Utricularia* na literatura brasileira foi escrita por Ludovicus Benjamin na *Flora Brasiliensis* de Martius (1847). Contudo, de acordo com Hoehne & Kuhlmann (1918), a chave de identificação proposta é deficiente devido à pobre descrição das espécies, justificável já que a qualidade da preservação do material analisado era duvidosa, portanto, características fundamentais para a diagnose das espécies (como folhas e as armadilhas) não foram documentadas. Posteriormente foram compiladas por Hoehne & Kuhlmann (1918) descrições de 17 espécies do Rio de Janeiro. Fromm-Trinta (1977; 1979; 1981; 1985; 1988; 1989; 1991; 1996) realizou um dos estudos mais completos para o gênero no Brasil com trabalhos que focaram desde floras e listagens até a proposição de espécies novas, mais recentemente, Miranda & Rivadavia (2014) listaram as espécies de *Utricularia* e *Genlisea* do Brasil.

Taylor (1989) foi um dos principais estudiosos das espécies de *Utricularia*. Quando iniciou sua atividade com o gênero durante a década de 40, tinham sido descritas mais de 600 espécies, muitas das quais com circunscrições inconsistentes. Em sua carreira, publicou diversos estudos florísticos e taxonômicos para diversas regiões do mundo, como Índia, África e Américas Central e do Sul (TAYLOR, 1964; 1964; 1967; 1986), assim como rearranjos taxonômicos (e.g. TAYLOR, 1986). A sua monografia para o gênero, publicada em 1989, constitui obra ainda básica e essencial para qualquer estudo taxonômico do grupo. De acordo com sua proposta taxonômica, o gênero *Utricularia* está subdividido em dois subgêneros: *Polypompholyx* (Lehm.) P. Taylor (com 2 seções: *Polypompholyx* e *Tridentaria*) e *Utricularia* (com 33 seções: *Pleiochasia*, *Meionula*, *Australes*, *Nigrescentes*, *Calpidisca*, *Lloydia*, *Candollea*, *Aranella*, *Martinia*, *Psyllosperma*, *Foliosa*, *Enside*, *Oligocista*, *Chelidon*, *Orchidioides*, *Iperua*, *Stylotheca*, *Stomoisia*, *Benjaminia*, *Kamienskia*, *Phyllaria*, *Oliveria*, *Sprucea*, *Avesicaria*, *Mirabiles*, *Choristothecae*, *Avesicarioides*, *Steyermarkia*, *Setiscapella*, *Nelipus*, *Lectricula*, *Utricularia* e *Vesiculina*). Para o tratamento, o autor se baseou, principalmente na morfologia vegetativa, com exceção dos subgêneros que foram segregados pela diferença no número de lobos no cálice. Em alguns casos foram formadas seções monotípicas devido à existência

de espécies muito distintas (e.g. seção *Benjaminia*). Já outros grupos, como a seção *Utricularia*, foram arranjados principalmente pela forma do utrículo e pela forma de vida aquática. As delimitações específicas como subespécies ou outras categorias inferiores não foram consideradas por Taylor (1989), uma vez que o autor acreditou que apenas com estudos morfológicos superficiais não seria possível resolver esses táxons.

Considerações sobre DNA “Barcoding”

Nas últimas décadas houve um aumento de interesse acerca do tema “biodiversidade” nas áreas de ecologia, biologia evolutiva, agronomia, economia, entre outras. Nesse sentido, cada vez mais há necessidade de se identificar precisamente as espécies. Entretanto, o número de taxonomistas tem diminuído drasticamente, sendo de extrema importância a criação de métodos de identificação (JINBO *et al.*, 2011).

Proposto pela primeira vez por Hebert *et al.* (2003) a partir do gene COI (citocromo oxidase subunidade I) do DNA mitocondrial, o DNA “Barcoding” se trata de uma abordagem que busca identificar todos os organismos vivos por meio de pequenas regiões ortólogas do DNA que estão em regiões padronizadas do genoma, chamadas de “DNA barcodes” (HEBERT *et al.*, 2003).

É uma abordagem extremamente promissora posto que não terá como objetivo só a identificação de espécies taxonomicamente resolvidas, mas também poderá auxiliar na identificação de espécies morfológicamente inconclusivas e até na descoberta de espécies crípticas (HEBERT, 2003; BARRETT *et al.*, 2005; PANG *et al.*, 2012). Além disso, pode auxiliar na resolução de casos relacionados à biologia forense e biossegurança, colaborando para a investigação de, por exemplo, contrabando de organismos, identificação de madeira e ervas medicinais e de espécies invasoras ou introduzidas.

Entretanto os maiores obstáculos encontrados na completa aplicação do DNA “Barcoding” são: grupos com baixa diversidade gênica em suas sequências, resolução de espécies que divergiram recentemente, análise de híbridos e os pseudogenes nucleares (HERBERT *et al.*, 2003; STOECKLE *et al.*, 2005). Ademais, o uso desse método para diferenciar espécies, inclusive as vegetais, tem gerado

controvérsias (e.g. MORITZ; CÍCERO, 2004; MEYER; PAULAY, 2005). Diferentemente dos animais, a região COI não pode ser usada para plantas devido às altas taxas mutacionais que ocorre no genoma mitocondrial, além de transferência horizontal de genes. Portanto pesquisadores têm enfrentado dificuldades em selecionar qual região de cada *locus* ou combinações de *loci* pode promover o melhor desempenho para um maior número de grupos taxonômicos.

De acordo com Hollingsworth *et al.* (2011) e Stoeckle *et al.* (2005), para uma região ser considerada como um bom “barcode”, a mesma deve conter variação intra e interespecífica, deve ser de fácil amplificação e sequenciamento, deve estar presente em um grande número de cópias por célula e deve resolver todas senão a maior parte das espécies em todos os níveis taxonômicos. Contudo nunca foi encontrada uma região que atendesse a todos esses quesitos. Como resultado dessa discussão, alguns estudos preliminares relacionados ao DNA “Barcoding” para as plantas indicam que, ao contrário de utilizar o DNA mitocondrial, o emprego de sequências do genoma cloroplastidial e nuclear podem fomentar um maior número de dados de DNA diagnósticos em plantas.

Após algumas reuniões entre pesquisadores da área, Kress *et al.* (2005) sugeriram que a região *psbA-trnH* deveria ser utilizada como “barcode” universal. Chegaram então à conclusão de que a região possui muita variação em alguns grupos, portanto, não poderia ser utilizada como “barcode” de todas as plantas. Assim foi proposta uma combinação entre dois *loci*: *trnH-psbA* e um fragmento da região *rbcL*, gene conservado, ou seja, com baixas taxas de mutação (KRESS *et al.*, 2005; 2007; PENNISI, 2007). Contudo posteriores estudos revelaram que para vários grupos de plantas não é possível a distinção entre espécies utilizando essa região (e.g. Cycadales). Assim, em 2009 o *Consortium Barcode of Life Plant Working Group* (HOLLINGSWORTH *et al.*, 2009) executou um ensaio com 907 amostras, representando espécies de angiospermas, gimnospermas e criptógamas a fim de descobrir quais regiões indicaram resultados mais favoráveis para a aplicação de “barcoding” para todos os grupos de plantas.

Essas regiões eleitas seriam dos genes codificadores cloroplastidiais *matK*, os quais codificam a proteína maturase K (BARTHET; HILU, 2007), e *rbcL*, que codifica a subunidade grande da ribulose-1,5- bifosfato carboxilase/oxigenase

(HIDALGO *et al.*, 2004), assim como espaçadores cloroplastidiais *trnH-psbA*, cujos genes *psbA* e *trnH* codificam, respectivamente a proteína D1 do fotossistema II e tRNA^{His}; *atpF-atpH* que codificam as subunidades CFOI e CFOIII da ATP sintase, e *psbK-psbI*, as quais codificam dois polipeptídeos de baixa massa molecular K e I do fotossistema II. De acordo com os referidos autores, os resultados indicaram que as regiões combinadas *rbcL* + *matK* seriam bons “barcodes” para todas as plantas.

Porém, ao ser avaliado mediante uma abordagem aplicada, como na identificação de ervas medicinais (CHEN *et al.*, 2010), a combinação entre regiões revelou ser pouco eficaz para muitas das plantas. Apesar de que, inicialmente, pesquisadores afirmarem que a região ITS não seria um bom “barcode” devido à baixa variabilidade em alguns grupos, o risco de serem sequenciadas cópias parálogas do gene, e contaminação por fungos, os autores testaram para mais de 907 amostras de 550 espécies a região ITS2 do rDNA de plantas medicinais, que resultou em boa resolução das espécies das plantas amostradas. Posteriores estudos avaliaram a região com resultados bastante promissores para o DNA “Barcoding” (KRESS *et al.*, 2005; MIRANDA *et al.*, 2010; CHEN *et al.*, 2010; HOLLINGSWORTH *et al.*, 2011; LI, 2011). Liu *et al.* (2012) foram mais audaciosos, a partir de dados de 12.221 animais e 50.790 plantas propuseram que a região ITS2 deveria ser utilizada como “barcode” universal para ambas plantas e animais, juntamente com a região COI para animais. A região ITS também é uma das mais sequenciadas para reconstrução filogenéticas de plantas, inclusive no estudo das relações inter e intraespecíficas de *Utricularia* (MIRANDA *et al.*, dados não-publicados).

Considerações sobre a filogenia para *Utricularia*

As filogenias reconstruídas até hoje (JOBSON *et al.*, 2003; MULLER; BORSCH, 2005; MULLER *et al.*, 2006; REUT; JOBSON, 2010) revelaram que diversos grupos propostos por Taylor (1989) fundamentados somente em características morfológicas corroboram as análises baseadas em sequências de DNA, contudo ainda revelam incongruências em diversos níveis taxonômicos.

As duas primeiras propostas filogenéticas para o grupo incluem trabalhos de Jobson *et al.* (2003), que utilizaram as regiões *trnL-F* e *rps16*, enquanto que Muller e Borsch (2005), utilizaram a região *trnK/matK* do DNA cloroplastidial (cpDNA). Os resultados revelaram estrutura similar com a classificação proposta por Taylor (1989) a nível seccional.

Entre elas, Taylor (1989) sugere que, a partir das características morfológicas, deveriam existir dois subgêneros no gênero, *Polypompholyx* e *Utricularia*. Contudo as filogenias mostram que o gênero é separado em três grandes clados: *Polypompholyx* e que *Utricularia* de Taylor deveria ser dividida nos subgêneros *Bivalvaria* [gênero reconsiderado a partir dos trabalhos de Kurz (1874)] e *Utricularia*. Ademais o subgênero *Utricularia* é parafilético, pois é consenso entre as propostas filogenéticas que a seção *Pleiochasia* deve ser incluída no subgênero *Polypompholyx* junto com a seção *Polypompholyx* (JOBSON *et al.*, 2003; MULLER; BORSCH, 2005; MULLER *et al.*, 2006; REUT; JOBSON, 2010). Também, para Jobson *et al.* (2003), o subgênero é basal em relação aos subgêneros *Polyphompholyx-Utricularia*, contudo os dados de Muller e Borsch (2005) indicam que *Polyphompholyx* e *Bivalvaria* formam um grupo monofilético, irmão de *Utricularia*.

A fim de tentar resolver estas e outras questões, Muller *et al.* (2006) utilizaram a abordagem de superárvores para concatenar as filogenias contraditórias. Os autores afirmam que os clados não têm boa resolução devido às diferenças entre a amostragem de táxons, além de apresentar as maiores taxas de substituição para os genes entre as angiospermas até hoje conhecidas (MULLER *et al.*, 2004; MULLER; BORSCH, 2005). Essa rápida evolução molecular pode levar à especiação e diversificação, mas também à miniaturização de genomas corroborando com dados recentes para *Utricularia gibba* (IBARRA-LACLETTE *et al.*, 2011;2013).

Reut e Jobson (2010) fizeram uma ampla amostragem de espécies das seções *Pleiochasia* e *Polypompholyx*; a fim de testar a monofilia do grupo, utilizaram os genes *trnL-F* e *rps16*, corroborando a inserção de *Pleiochasia* no subgênero *Utricularia*, e quais são as relações entre as espécies e características morfológicas para estas e os subgêneros. Apesar de encontrar elevado suporte para a monofilia do subgênero *Polypompholyx* (como em outras filogenias para o gênero,

e.g. MULLER; BORSCH, 2005), ainda não se sabe se o grupo *Pleiochasia* + *Polypompholyx* é monofilético posto que as análises dos genes *trnL-F* e *rps16* revelam que esse clado é politômico. Entretanto, de acordo com os dados a seção *Pleiochasia* pode ser separada em dois clados a partir da distribuição geográfica das espécies, morfologia das armadilhas e características relacionadas às flores (REUT; JOBSON, 2010).

Outros estudos foram propostos para a filogenia do gênero por Rahman e Kondo (2002; 2003a; 2003b) e Rahman (2006; 2007) por meio dos marcadores moleculares ISSR e RAPD. Entretanto a baixa amostragem de espécies resultou em conclusões preliminares e de caráter praticamente exploratório.

Trabalhos sobre a filogeografia de espécies de *Utricularia* são pífios (MENEZES; MIRANDA, dados não publicados), contudo recentemente foram desenvolvidos microssatélites para o gênero que poderão revelar dados importantes sobre a diversidade genética das populações (CLIVATI *et al.*, 2012).

Apesar de estudos filogenéticos terem sido realizados para *Utricularia*, ainda existe ainda uma lacuna importante com a maior parte das espécies neotropicais, geralmente subamostradas.

Dessa maneira, o alto grau de incongruências nas diferentes propostas filogenéticas e a falta de consenso para proposição de um novo sistema classificatório para *Utricularia* são, possivelmente, os principais responsáveis pela grande maioria dos pesquisadores ainda empregarem o sistema classificatório de Taylor (1989).

***Utricularia* como planta modelo**

O gênero *Utricularia* é um excelente candidato à planta modelo para estudos experimentais. É uma planta pequena, portanto ocupa pouco espaço, de crescimento rápido, sendo que, para a maioria das espécies, a principal forma de reprodução é a clonal. Ademais a grande maioria das espécies é de fácil cultivo e manutenção.

Jobson e Albert (2002) relatam que os genomas (cloroplastidial, mitocondrial e nuclear) dos gêneros de *Utricularia* e *Genlisea* possuem uma das maiores taxas de substituição entre as angiospermas. Isso pode ser explicado pela grande

diversidade morfológica, diversificação das espécies e, possivelmente, pela hipótese de mutação pela formação de oxigênio reativo (ROS), que tem a capacidade de quebrar as moléculas de DNA em nível de nucleotídeos (deleções e inserções) e hélice inteira (ALBERT *et al.*, 2010).

De acordo com Bennet e Leitch (2011), por mais 30 anos se acreditava que o menor genoma de todas angiospermas era da planta modelo *Arabidopsis thaliana*. Contudo contundentes pesquisas feitas com *Genlisea* e *Utricularia* revelam que as espécies *U. gibba* (1C= 0,09 pg e 88,3 Mb) e *G. aurea* (1C= 0,065 e 63,6 Mb) possuem os menores cromossomos, com tamanho semelhante aos de bactérias (GREILHUBER *et al.*, 2006). Ademais as espécies de *Utricularia* e *Genlisea* têm genomas de aproximadamente 60Mb a 1.500Mb, com grande variação intraespecífica em algumas espécies entre populações de diferentes localidades (e.g. *G. aurea*), portanto modelo interessante no entendimento da evolução de genomas mínimos nas angiospermas (ALBERT *et al.*, 2010; IBARRA-LACLETTE *et al.*, 2011; IBARRA-LACLETTE *et al.*, 2013).

Referências

ADAMEC L.; SIROVÁ D.; VRBA J. Contrasting growth effects of prey capture in two aquatic carnivorous plant species. **Fundamental Applied Limnology**, v. 176, n. 2, p. 153–160, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1127/1863-9135/2010/0176-0153>>

ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP III (APG III). An update of the Angiosperm Phylogeny Group Classification for the orders and families of flowering plants. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 161, n. 2, p. 105-121, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1095-8339.2009.00996.x>>

ALBERT, V. A.; JOBSON, R. W.; MICHAEL, T. P.; TAYLOR, D. J. The carnivorous bladderwort (*Utricularia*, Lentibulariaceae): a system inflates. **Journal of Experimental Botany**, v. 61, n.1, p.5-9, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nature12132>>

ALCALÁ, R. E.; MARIANO, N. A.; OSUNA, F.; ABARCA, C. A. An experimental test of the defensive role of sticky traps in the carnivorous plant *Pinguicula moranensis* (Lentibulariaceae). **Oikos**, v.119, n. 5, p. 891-895, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1890/04-1340>>

BARTHLOTT, W.; POREMBSKI, S.; FISCHER, E.; GEMMEL, B. First protozoa-trapping plant found. *Genlisea*. Subterranean leaves, modified & hollow. **Nature**, v. 392, n. 6675, p. 447, 1998. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/33037>>

BARNHART, J. H. Segregation of genera in Lentibulariaceae. **Memoirs of the New York Botanical Garden** v. 6, n. 2, p. 39–64, 1916.

BARTHET, M. M.; HILU, K. W. Expression of *matK*: functional and evolutionary implications. **American Journal of Botany**, v. 94, n. 8, p. 1402-1412, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3732/ajb.94.8.1402>>

BARRETT R. D. H.; HEBERT, P. D. N. Identifying spiders through DNA barcodes. **Canadian Journal of Zoology**, v. 83, n.1, p. 481–491, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3897/zookeys.365.5787>>

BENJAMIN, L. Utricularieae - In C. F. P. Von Martius *et al.* **Flora Brasiliensis** Vol. XV, I-II-III, Monachii, 1847.

CASPER, S. J. Monographie der Gattung *Pinguicula* L. **Bibliotheca Botanica** v. 127-128, n. 1, p. 123–145, 1966.

CLIVATI, D.; GITZENDANNER, M. A.; HILSDORF, A. S. W. ; ARAUJO, W. L. ; MIRANDA, V. F. O. de. Microsatellite markers developed for *Utricularia reniformis* (Lentibulariaceae). **American Journal of Botany**, v. 99, n. 9, p. e375-e378, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3732/ajb.1200080>>

CHEN S. L.; YAO H.; HAN J. P.; LIU C.; SONG J. Y. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. **PLoS ONE**. v. 5, n.1, e8613, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0013102>>

CIESLAK, T.; POLEPALLI, J. S.; WHITE, A.; MÜLLER, K.; BORSCH, T.; BARTHLOTT, W.; STEIGER, J.; MARCHANT, A.; LEGENDRE, L. Phylogenetic analysis of *Pinguicula* (Lentibulariaceae): chloroplast DNA sequences and morphology support several geographically distinct radiations. **American Journal of Botany**, v. 92, n. 10, p.1723-1736, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3732/ajb.92.10.1723>>

EGAN, A. N.; SCHLUETER, J.; SPOONER, D. M. Applications of next-generation sequencing in plant biology. **American journal of botany**, v. 99, n. 2, p.175-185, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3732/ajb.1200020>>

ERNST, A. Revision der Gattung *Pinguicula*. **Botanische Jahrbur Systematik, Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie**. v. 80, n. 1, p. 145–194, 1961.

FISCHER, E.; POREMBSKI, S.; BARTHLOTT, W. Revision of the genus *Genlisea* (Lentibulariaceae) in Africa and Madagascar with notes on ecology and phytogeography. **Nordic Journal of Botany**, v. 20, n. 3, p. 291-318, 2000. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1756-1051.2000.tb00746.x>>.

FLEISCHMANN, A.; SCHÄFERHOFF, B.; HEUBL, G.; RIVADAVIA, F.; BARTHLOTT, W.; MÜLLER, K. Phylogenetics and character evolution in the carnivorous plant genus *Genlisea* A. St.-Hil. (Lentibulariaceae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 56, n. 2, p. 768-783, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2010.03.009>>.

FLEISCHMANN, A.; RIVADAVIA, F.; GONELLA, P. M.; HEUBL, G. A revision of *Genlisea* subgenus *Tayloria* (Lentibulariaceae). **Phytotaxa** v. 33, n. 1, p.1-40, 2011.

FLEISCHMANN, A. **Monograph of the genus *Genlisea***. Redfern Natural History Productions Ltd.: Poole, 2012. p. 124.

FROMM-TRINTA, E. *Tayloria* Fromm-Trinta, nova seção do gênero *Genlisea* St-Hil. **Boletim do Museu Nacional do Rio de Janeiro**, v. 44, n. 1, p. 1-4, 1977.

FROMM-TRINTA, E. Revisão das espécies do gênero *Genlisea* St-Hil. (Lentibulariaceae) das regiões sudeste e sul do Brasil. **Rodriguésia**, v. 31, n. 49, p. 17-139, 1979.

FROMM-TRINTA, E. Revisão do gênero *Genlisea* St.-Hil. (Lentibulariaceae) no Brasil. **Boletim do Museu Nacional do Rio de Janeiro**, v. 61, n. 1, p.1-21, 1981.

FROMM-TRINTA, E. Lentibulariaceae do Brasil. Utriculárias Aquáticas I. **Bradea**, v. 4, n. 29, p. 188-210, 1985.

FROMM-TRINTA, E. Lentibulariaceae do Brasil II. Utriculárias Epífitas. **Bradea** v. 5, n. 9. p. 91-107, 1988.

FROMM-TRINTA, E. O gênero *Utricularia* L. no Brasil V. espécies da região sudeste. **Bradea**, v. 5, n. 24. p. 267-274, 1989.

FROMM-TRINTA, E. Lentibulariaceae do Brasil. Utriculárias Aquáticas II, espécies fixas. **Bradea**, v. 6, n. 1, p. 1-12, 1991.

FROMM-TRINTA, E. Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: Lentibulariaceae. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, v. 14, n. 1, p. 105-118, 1996.

GODFREY, R. H.; H. L. STRIPLING. A synopsis of *Pinguicula* (Lentibulariaceae) in the southeastern United States. **American Midland Naturalist**, v. 66, p. 395-409, 1961.

GREILHUBER, J.; BORSCH, T.; MÜLLER, K.; WORBERG, A.; POREMBSKI, S.; BARTHLOTT, W. Smallest angiosperm genomes found in Lentibulariaceae, with chromosomes of bacterial size. **Plant Biology**, v. 8, n. 6, p. 770-777, 2006.

GUISANDE, C.; GRANADO-LORENCIO, C.; ANDRADE-SOSSA, C.; DUQUE, S. R. Bladderworts. **Functional Plant Science and Biotechnology**, v. 1, n. 1, p. 58-68, 2007.

HERBERT P. D. N.; CYWINSKA A.; BALL S. L.; WAARD J. R. Biological identification through DNA barcodes. **Plos Biology** v. 2, n. 1512; p. 01-06, 2003. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>>.

HESLOP-HARRISON, Y. *Pinguicula* L. **Journal of Ecology**, v. 92, n. 6, p. 1071–1118, 2004.

HOLLINGSWORTH, P. M.; FORREST, L. L.; SPOUGE, J. L.; HAJIBABAEI, M.; RATNASINGHAM, S.; VAN DER BANK, M.; CHASE, M. W.; COWAN, R. S.; ERICKSON, D. L.; FAZEKAS, A. J.; GRAHAM, S. W.; JAMES, K. E.; KIM, K. J.; KRESS, W. J.; SCHNEIDER, H.; VAN ALPHENSTAHL, J.; BARRETT, S. C. H.; VAN DEN BERG, C.; BOGARIN, D.; BURGESS, K. S.; CAMERON, K. M.; CARINE, M.; CHACÓN, J.; CLARK, A.; CLARKSON, J. J.; CONRAD, F.; DEVEY, D. S.; FORD, C. S.; HEDDERSON, T. A. J.; HOLLINGSWORTH, M. L.; HUSBAND, B. C.; KELLY, L. J.; KESANAKURTI, P. R.; KIM, J. S.; KIM, Y. D.; LAHAYE, R.; LEE, H. L.; LONG, D. G.; MADRIÑÁN, S.; MAURIN, O.; MEUSNIER, I.; NEWMMASTER, S. G.; PARK, C. H. W.; PERCY, D. M.; PETERSEN, G.; RICHARDSON, J. E.; SALAZAR, G. A.; SAVOLAINEN, V.; SEBERG, O.; WILKINSON, M. J.; YI, D. K.; LITTLE, D. P. A DNA barcode for land plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences** v. 106, n. 31, p. 12794-12797, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0905845106>>

HOLLINGSWORTH P. M., GRAHAM S. W., LITTLE D. P. Choosing and using a plant DNA barcode. **PloS ONE**, v. 6, n. 5, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0019254>>

HOEHNE, F.C; KUHLMANN, J.G. Utriculárias do Rio de Janeiro e seus arredores. **Memórias do Instituto Butantã**. v. 1, n. 1, p. 4-34, 1918.

IBARRA-LACLETTE, E., ALBERT, V. A., & PEREZ-TORRES, C. A. Transcriptomics and molecular evolutionary rate analysis of the Bladderwort (*Utricularia*), a Carnivorous Plant with a Minimal Genome Transcriptomics and rate analysis of the Bladderwort (*Utricularia*), a Carnivorous Plant with a Minimal Genome. **BMC Plant**

Biology, v. 101, n. 11, p. 1-15, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/1471-2229-11-101>>

IBARRA-LACLETTE, E.; LYONS, E., HERNÁNDEZ-GUZMÁN, G.; PÉREZ-TORRES, C.; CARRETERO-PAULET, L.; CHANG, T.-H.; LAN, T.; WELCH, A.; JUÁREZ, M.; SIMPSON, J.; FERNÁNDEZ-CORTÉS, A.; ARTEAGA-VÁZQUEZ, M.; GÓNGORA-CASTILLO, E.; ACEVEDO-HERNÁNDEZ, G.; SCHUSTER, S.; HIMMELBAUER, H.; MINOCHE, A.; XU, S.; LYNCH, M.; OROPEZA-ABURTO, A.; CERVANTES-PÉREZ, S.; de JESÚS ORTEGA-ESTRADA, M.; CERVANTES-LUEVANO, J.; MICHAEL, T.; MOCKLER, T.; BRYANT, D.; HERRERA-ESTRELLA, A.; ALBERT, V.; HERRERA-ESTRELLA, L. Architecture and evolution of a minute plant genome. **Nature**, v. 498, n. 7452, p. 94–8, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/10.1038/nature12132>>

JINBO, U.; KATO, T.; ITO M. Current progress in DNA barcoding and future implications for entomology. **Entomological Science**, v. 14, n. 2, p. 107-124, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1479-8298.2011.00449.x>>

JOBSON, R. W. & ALBERT, V. Molecular Rates Parallel Diversification Contrasts between Carnivorous Plant Sister Lineages. **Cladistics**, v. 18, p. 127-136, 2002.

JOBSON, R. W.; PLAYFORD, J.; CAMERON, K. M.; ALBERT, V. Molecular Phylogenetics of Lentibulariaceae Inferred from Plastid *rps16* Intron and *trnL-F* DNA sequences: Implications for Character Evolution and Biogeography. **Systematic Botany**, v. 28, n. 1, p. 157-171, 2003. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1043/0363-6445-28.1.157>>

JUNIPER, B. E.; ROBINS, R. J.; JOEL, D. M. **The Carnivorous Plants**. Academic Press: London, 1989. p. 156-175.

KRESS, W. J.; ERICKSON, D. L. A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcL* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region. **PLoS ONE**, v. 2, n. 6, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0000508>>.

KRESS, W. J.; WURDACK, K. J.; ZIMMER, E. A.; WEIGT, L. A.; JANZEN, D. H. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 23, p. 8369-8374, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0503123102>>

KRÓL, E.; PŁACHNO, B. J.; ADAMEC, L.; STOLARZ, M.; DZIUBIŃSKA, H.; TREBACZ, K. Quite a few reasons for calling carnivores “the most wonderful plants in the world”. **Annals of Botany**, v. 109, n. 1, p.47–64, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1093/aob/mcr249>>.

KURZ, S. Description of *Utricularia nivea*. **British and foreign Journal of botany**. v. 12, n.1, p. 53-54, 1874.

LEGENDRE L. The genus *Pinguicula* L. (Lentibulariaceae): an overview. **Acta Botanica Gallica** v. 147, n. 1, p. 77-9, 2000.

LI, D. Z.; GAO, L. M.; LI, H. T.; WANG, H.; GE, X.J; LIU, J.Q.; CHEN, Z.D; ZHOU, S. L.; YANG, J. B.; FU, C. X.; ZENG, C. X; YAN, H. F.; ZHU, Y. J.; SUN, Y. S.; CHEN, S. Y.; ZHAO, L.; WANG, K.; YANG, T.; DUAN, G. W. Comparative analysis of a large dataset indicates that internal transcribed spacer (ITS) should be incorporated into the core barcode for seed plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**. v. 108, n. 49, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1104551108>>

LLOYD, F. E. **The Carnivorous Plants**. The Ronald Press Company: New York, 1942. p. 256-345.

MCCORMACK, J. E.; HARVEY, M. G.; FAIRCLOTH, B. C.; CRAWFORD, N. G.; GLENN, T. C.; BRUMFIELD, R.T. A phylogeny of birds based on over 1,500 loci collected by target enrichment and high-throughput sequencing. **PLoS One** v. 8, n.1, p. 1-11,2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0054848>>

MEYER C. P. & PAULAY G. DNA Barcoding: Error Rates Based on Comprehensive Sampling. **PLoS Biology** v. 3, n. 12, p. 2229-2238, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.0030422>>

MIRANDA, V. F. O.; MARTINS, V. G.; M., FURLAN, A. & BACCI M. J. R. Plant or Fungal Sequences? An Alternative Optimized PCR Protocol to Avoid ITS (nrDNA) Misamplification. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 53, n. 1, p. 141-152, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132010000100018>>

MIRANDA, V.F.O.; RIVADAVIA, F. Lentibulariaceae. In **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2012. <Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB008570>>. Acesso em 01/06/2011.

MORITZ C.; CICERO C. DNA barcoding: Promise and pitfalls. **PLoS Biology**, v. 2, n. 10, p. 1529-1531, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.0020354>>

MÜLLER K. T.; BORSCH L.; LEGENDRE S.; POREMBSKI; W. BARTHLOTT. A phylogeny of Lentibulariaceae based on sequences of *matK* and adjacent non-coding regions. **American Journal of Botany**, v.87, n. 10, p.145-146, 2000. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3732/ajb.92.10.1723>>

MÜLLER, K.; BORSCH, T.; LEGENDRE, L.; POREMBSKI, S.; THEISEN, I. & BARTHLOTT, W. Evolution of carnivory in Lentibulariaceae and the Lamiales. **Plant Biology**, v. 6, n. 4, p. 477-490, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1055/s-2004-817909>>

MÜLLER, K.; BORSCH, T. Phylogenetics of *Utricularia* and molecular evolution of the *trnK* intron in a lineage with high substitutional rates. **Plant Systematic and Evolution**, v. 250, n. 1, p. 39-67, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00606-004-0224-1>>

MÜLLER, K. F.; BORSCH, T.; LEGENDRE L.; POREMBSKI, S. & BARTHLOTT, W. Recent Progress in Understanding the Evolution of Carnivorous Lentibulariaceae (Lamiales). **Plant Biology**, v. 8, n. 6, p. 748–757, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1055/s-2006-924706>>

PANG X.; LIU C.; SHI L.; LIU R.; LIANG D.; LI H.; CHERNY S.S.; CHEN S. Utility of the *trnH-psbA* intergenic spacer region and its combinations as plant DNA barcodes: A meta-analysis. **PLoS ONE** v. 7, n. 11, p. 1-9,0 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0048833>>

PENNISI E. **Taxonomy. Wanted: a barcode for plants.** Science v.318, n. 5848, p.190–191, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1126/science.318.5848.190>>

PLACHNO, B. J.; KOZIERADZKA-KISZKURNO, M.; ŚWIĄTEK, P. & DARNOWSKI, D. W. Prey attraction in carnivorous *Genlisea* (Lentibulariaceae). **Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica** v. 50, n. 2, p. 87–94, 2008.

PLACHNO, B. J.; KOZIERADZKA-KISZKURNO, M.; & SWIATEK, P. Functional ultrastructure of *Genlisea* (Lentibulariaceae) digestive hairs. **Annals of Botany**. v. 100, n. 2, p. 195-203, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1093/aob/mcm109>>

RAHMAN M. O. Evaluation of RAPD markers for taxonomic relationships in some aquatic species of *Utricularia* L. (Lentibulariaceae). **Bangladesh Journal of Plant Taxonomy** v.13, n. 2, p. 73-82, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3329/bjpt.v13i2.580>>

RAHMAN M. O. DNA fingerprinting in *Utricularia* L. section *Utricularia* as revealed by PCR based assay. **International Journal of Botany**. v.3, n. 1, p. 56-63, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3923/ijb.2007.56.63>>

RAHMAN, M.O; KONDO, K. Evaluation of inter simple sequence repeat (ISSR) for systematic relationship of some terrestrial species of *Utricularia* L. (Lentibulariaceae). p. 175-188. **Proceedings of the 4th International Carnivorous Plant Conference**, Tokyo, 2002.

RAHMAN, M.O.; KONDO, K. Genetic diversity and species relationship of some terrestrial bladderwort (*Utricularia* L.) as revealed by inter simple sequence repeat (ISSR) markers. **Acta Phytotaxonomical Geobotany**, v.54, n.1, p. 49-57, 2003a.

RAHMAN, M.O.; KONDO, K. Molecular characterization of some closely related species of *Utricularia* L. using inter-SSR markers. **Bangladesh Journal of Plant Taxonomy** v.10, n. 2, p.11-19, 2003b.

REFULIO-RODRIGUEZ N.F.; OLMSTEAD R.G. Phylogeny of Lamiidae **American Journal of Botany**. v. 101, n.2, p.287-99, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3732/ajb.1300394>>

REUT, M.S.; JOBSON, R. W. A phylogenetic study of subgenus *Polypompholyx*: a parallel radiation of *Utricularia* (Lentibulariaceae) throughout Australasia. **Australian Systematic Botany**, v. 23, n. 3, p. 152-161, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1071/SB0905>>

RUTISHAUSER, R.; ISLER, B. Developmental genetics and morphological evolution of flowering plants, especially bladderworts (*Utricularia*): fuzzy arberian morphology complements classical morphology. **Annals of Botany** v. 88, n. 6, p.1173–1202, 2001. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1006/anbo.2001.1498>>

SCHÄFERHOFF, B.; FLEISCHMANN A.; FISCHER, E.; ALBACH, D.C.; BORSCH, T.; HEUBL, G.; MÜLLER, K.F. Towards resolving Lamiales relationships: insights from rapidly evolving chloroplast sequences. **BMC Evolutionary Biology** v.10, n. 1, p.352, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/1471-2148-10-352>>

STOECKLE, M.; P.E. WAGGONER; J.H. AUSUBEL. **Barcoding Life, Illustrated. Goals, Rationale, Results.** ppt v1.3, 2005 Disponível em http://phe.rockefeller.edu/PDF_FILES/BLIllustrated26jan04print%20v1-3.pdf. Acesso em 01/06/2011.

TAYLOR, P. Word list of genus *Utricularia* (revised). **Carnivorous Plant Newsletter** v 20, n. 1, p.45-58, 1991.

TAYLOR, P. Lentibulariaceae in Maguire, B. *et al.* Botany of the Guayana Highland VII. **Memoirs of New York Botanical Garden**. v. 17, p. 201-228, 1967.

TAYLOR, P. The genus *Utricularia* L. (Lentibulariaceae) in Africa (south of the Sahara) and Madagascar. **Kew Bulletin** v.18, p.1–245, 1964.

TAYLOR, P. **The Genus *Utricularia* – A Taxonomic Monograph.** Kew Bulletin Additional Series XIV. Royal Botanic Gardens, Kew: London, 1989.

TAYLOR, P. New taxa in *Utricularia* (Lentibulariaceae). **Kew Bulletin**, v.41, n. 1, p.11-18, 1986. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2307/4103020>>

WOOD J. R.; GODFREY, R. K. A synopsis of *Pinguicula* (Lentibulariaceae) in the southeastern United States. **Rhodora** v. 59, n. 1, p. 217–230, 1957. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2307/2423039>>

CAPÍTULO 2 - Revelando o DNA “Barcoding” de plantas carnívoras do gênero *Utricularia* L. (Lentibulariaceae)

Resumo - Pela primeira vez foi investigado o poder discriminatório de seis regiões de DNA e suas combinações (*rbcL*, *matK*, *psbA-trnH*, ITS, ITS2 e *rpl20-rps12*) em 112 espécimes representando 55 espécies do gênero de plantas carnívoras *Utricularia*. Para tanto, foram empregados métodos de avaliação descritiva dos resultados de distância, “barcoding gap”, análise baseada em cladogramas e sequência. Os resultados indicaram que todas as regiões e suas combinações podem ser utilizadas como “barcodes”, exceto *rbcL* por possuir baixo poder de resolução. Contudo, se forem considerados o sucesso do sequenciamento, a quantidade de sítios variáveis, a diferença entre as distâncias intra e interespecíficas, o “best match”, o “best close match”, além da resolução dos clados, os melhores “barcodes” para o diagnóstico das espécies do gênero *Utricularia* foram as regiões ITS e espaçador ITS2 do rDNA.

Palavras-chave: DNA “Barcoding”, Lentibulariaceae, planta carnívora, *Utricularia*

Introdução

A família Lentibulariaceae agrupa mais de 320 espécies e compreende três gêneros: *Genlisea*, *Pinguicula* e *Utricularia* (TAYLOR, 1989; GUISANDE *et al.*, 2007). Os recentes trabalhos de filogenia posicionam Lentibulariaceae como integrante da ordem Lamiales, constituindo um grupo monofilético (APG III, 2009; SCHÄFERHOFF *et al.*; 2010; SOLTIS *et al.*, 2011).

O gênero *Utricularia* (Lentibulariaceae) possui cerca de 250 espécies, sendo que 20 destas são endêmicas do Brasil (MIRANDA; RIVADAVIA, 2014). Do total de plantas carnívoras já descritas, as utriculárias representam aproximadamente 35% e são as que possuem maior número de espécies e ocorrem em uma ampla variedade de *habitats* (TAYLOR, 1989; KRÓL *et al.*, 2011).

No Brasil as espécies foram levantadas por Fromm-Trinta (1977; 1981; 1985; 1988; 1989; 1991; 1996; 2004) e, recentemente, Miranda e Rivadavia (2014) listaram as espécies e as demais Lentibulariaceae. Fromm-Trinta realizou muitos estudos do gênero com trabalhos que focaram desde a elaboração de floras e listagens (e.g. FROMM-TRINTA, 1979) até a proposição de espécies novas a partir de características morfológicas (e.g. FROMM-TRINTA, 1996; 2004).

Cada vez mais pesquisadores têm adquirido interesse pelo grupo, pois pesquisas recentes revelaram que *Utricularia gibba* apresenta um dos menores genomas em angiospermas relatados até agora, com 82 Mb e 28.500 genes, portanto serve de planta modelo no entendimento sobre o processo de miniaturização de genomas (IBARRA-LACLETTE *et al.*, 2013).

A identificação das espécies em *Utricularia* é feita principalmente a partir da sua morfologia que, para alguns grupos, representa um verdadeiro desafio, já que muitas espécies são morfologicamente similares, sendo separadas somente por poucas características que podem se perder durante o processo de conservação do espécime. Além disso, muitos dos caracteres diagnósticos são baseados somente em poucos caracteres florais, que dificulta sua identificação (TAYLOR, 1989).

O “DNA Barcoding” tem atraído um grande número de pesquisadores a fim de contribuir para uma taxonomia cada vez mais acurada e acessível por meio de

pequenas regiões ortólogas do DNA, localizadas em regiões padronizadas do genoma, chamadas de DNA “barcodes” (HAJIBABAEI *et al.*, 2007).

A ideia de um código de barras biológico para identificação rápida de animais foi proposta por Hebert *et al.* (2003) a partir de uma sequência única de DNA mitocondrial do gene COI (citocromo oxidase subunidade I). A aplicação dessa região tem se mostrado bastante eficaz na identificação de espécies de diversos grupos, tais como artrópodos, aves, peixes, anfíbios, entre outros grupos diversos de animais (HEBERT, 2003; BARRETT *et al.*, 2005; WARD, 2005). Além disso, pode ser utilizada na identificação de novas espécies e espécies crípticas (HEBERT *et al.*, 2004), assim como na identificação de diversos estádios de vida de uma mesma espécie, assim como para a identificação utilizando-se para tanto de poucos fragmentos de materiais biológicos (HEBERT *et al.*, 2003).

Muito além do que se imaginava inicialmente, o DNA “Barcoding” tem ampla utilidade na biologia forense e biossegurança, colaborando para a investigação de contrabando de organismos, identificação de ervas medicinais e de espécies invasoras ou introduzidas (SASS *et al.*, 2007; CHEN *et al.*, 2010; PANG *et al.*, 2012).

Para as plantas, o DNA “Barcoding” tem se revelado de grande valia na taxonomia de diversas famílias como Cyperaceae (STARR *et al.*, 2009), Fabaceae (GAO *et al.*, 2010), Vitaceae (FU *et al.*, 2011), Lamiaceae (DE MATTIA *et al.*, 2011; CHRISTINA *et al.* 2014), Araliaceae (LIU *et al.*, 2012), Iridaceae (ALVES *et al.*, 2013), Rubiaceae (GUO *et al.*, 2011) e Orchidaceae (KIM *et al.*, 2013) ao contribuir na identificação de espécies mesmo utilizando diversos tecidos provenientes de variadas formas de preservação, desde semente, material herborizado, até amostras de tecidos pulverizadas.

Durante o processo de seleção de uma série amostral para as regiões de DNA “barcodes”, a escolha de cada *locus* (ou combinações de *loci* a fim de promover o melhor desempenho para um maior número de grupos taxonômicos em plantas) tem se mostrado uma tarefa difícil. O desacordo mútuo é evidenciado pelo número de propostas para definir essa questão (KRESS *et al.*, 2005; CHASE *et al.*, 2005; COWAN *et al.*, 2006; CHASE *et al.*, 2007; KRESS; ERICKSON, 2008; FAZEKAS *et al.*, 2008; LAHAYE *et al.*, 2008; CBOL PLANT WORKING GROUP, 2009; FORD *et al.*, 2009; CHEN *et al.*, 2010; HOLLINGSWORTH *et al.*, 2011).

Após pesquisas realizadas pelo CBOL (HOLLINGSWORTH *et al.*, 2009), as sequências que indicaram resultados mais favoráveis para a aplicação da abordagem do DNA “Barcoding” para plantas foram regiões dos genes codificadores cloroplastidiais *matK* + *rbcL* (denominadas “core barcodes”), assim como o espaçador *trnH-psbA*. Apesar de haver risco de contaminação por fungos (ÁLVAREZ, 2003; FELINER;ROSSELLÓ, 2007; HILLIS;DIXON, 2007; MIRANDA *et al.*, 2010), presença de cópias parálogas e ser de difícil amplificação em alguns grupos, estudos revelaram que a região ITS2 do rDNA é um dos melhores “barcodes”, pois apresenta grande poder de resolução em relação aos outros para todos os organismos. (CHEN *et al.*, 2010; HOLLINGSWORTH, 2011; LI *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2012). Recentemente foi proposta a utilização de “mini-barcodes”, ou seja, pequenas regiões obtidas a partir dos “barcodes” estudados, considerada vantajosa principalmente quando são encontradas amostras de plantas degradadas (LITTLE, 2013).

Assim, o presente estudo pretendeu responder se (i) a abordagem DNA “Barcoding” possibilita a separação e a identificação de espécies de *Utricularia* e (ii) qual(is) região(ões) e/ou combinações de regiões do DNA podem servir para separar as espécies de maneira mais eficiente, ou seja, apresentar maior poder diagnóstico.

Materiais e Métodos

Amostras vegetais e extração do DNA

Foram avaliadas 112 espécimes de *Utricularia* L. (55 espécies), 6 do gênero *Genlisea* A.St.-Hil. (duas espécies) e três espécimes de *Pinguicula* L. (uma espécie). A maioria dos espécimes foi coletada de populações naturais do Brasil, Austrália, República Tcheca, Canadá, Estados Unidos, Japão, assim como de material em cultivo. Todos os espécimes foram armazenados em sílica gel e depositados materiais-testemunho no Herbário JABU da Universidade Estadual Paulista Câmpus Jaboticabal (UNESP/FCAV) (Tabela 1).

Para a extração de DNA total foi utilizado o método CTAB (DOYLE; DOYLE, 1987) com modificações de Lodhi *et al.* (1994) de tecido fresco, herborizado e preservado em sílica gel.

Tabela 1. Lista de táxons, número de espécies sequenciadas, classificação infragenérica (Taylor, 1989) e local de coleta.

| Espécie | nº | Classificação | Local de coleta |
|--|-----------|----------------------|---|
| <i>Pinguicula filifolia</i> C. Wright ex Griseb. | 5 | <i>Agnata</i> | Pinar del Rio, Cuba Ocidental Parque Serra da Canastra, Minas |
| <i>Genlisea filiformis</i> A.St.-Hil. | 4 | <i>Genlisea</i> | Gerais, Brasil Parque Serra da Canastra, Minas |
| <i>G. violacea</i> A.St.-Hil. | 4 | <i>Tayloria</i> | Gerais, Brasil Parque Serra da Canastra, Minas |
| <i>Utricularia laciniata</i> A.St.-Hil. & Girard | 3 | <i>Aranella</i> | Gerais, Brasil Parque Serra da Canastra, Minas |
| <i>U. simulans</i> Pilger | 1 | <i>Aranella</i> | Gerais, Brasil Parque Serra da Canastra, Minas |
| <i>U. neottioides</i> A.St.-Hil. & Girard. | 4 | <i>Avesicaria</i> | Gerais, Brasil Parque Serra da Canastra, Minas |
| <i>U. nana</i> A.St.-Hil. & Girard | 1 | <i>Benjaminia</i> | Gerais, Brasil |
| <i>U. arenaria</i> A.DC. | 4 | <i>Calpidisca</i> | Sob cultivo |
| <i>U. sandersonii</i> Oliver | 2 | <i>Calpidisca</i> | Sob cultivo |
| <i>U. amethystina</i> Salzm. ex St.Hil. & Gir. | 6 | <i>Foliosa</i> | Parque Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil |
| <i>U. tricolor</i> A.St.-Hil. | 4 | <i>Foliosa</i> | São Joao Del Rei, Minas Gerais, Brasil |
| <i>U. tridentata</i> Sylvén | 1 | <i>Foliosa</i> | Sob cultivo |
| <i>U. nelumbifolia</i> A.St.-Hil. & Girard. | 1 | <i>Iperua</i> | Sob cultivo |
| <i>U. nephrophylla</i> Benj. | 1 | <i>Iperua</i> | Sob cultivo |
| <i>U. reniformis</i> A.St.-Hil | 4 | <i>Iperua</i> | Sob cultivo |
| <i>U. resupinata</i> B.D. Greene ex Bigelow | 1 | <i>Lectricula</i> | Florida, USA |
| <i>U. bifida</i> L. | 1 | <i>Oligocista</i> | Sob cultivo |
| <i>U. laxa</i> A.St.-Hil. & Girard. | 1 | <i>Oligocista</i> | Mato Grosso, Brasil |
| <i>U. livida</i> E Meyer | 1 | <i>Oligocista</i> | Sob cultivo |
| <i>U. meyeri</i> Pilger | 1 | <i>Oligocista</i> | Mato Grosso, Brasil |
| <i>U. uliginosa</i> Vahl. | 1 | <i>Oligocista</i> | Wales, Australia |
| <i>U. dichotoma</i> Labill. | 1 | <i>Pleiochasia</i> | Wales, Australia |
| <i>U. menziesii</i> R.Br. | 1 | <i>Pleiochasia</i> | Darling, Australia |
| <i>U. uniflora</i> R.Br. | 1 | <i>Pleiochasia</i> | Wales, Australia |
| <i>U. volubilis</i> R.Br. | 1 | <i>Pleiochasia</i> | Sudeste da Australia |
| <i>U. multifida</i> R.Br. | 1 | <i>Polypompholyx</i> | Darling, Australia |
| <i>U. calycifida</i> Benj. | 2 | <i>Psyllosperma</i> | Sob cultivo Parque Serra da Canastra, Minas |
| <i>U. hispida</i> Lam. | 6 | <i>Psyllosperma</i> | Gerais, Brasil |
| <i>U. longifolia</i> Gardner | 2 | <i>Psyllosperma</i> | Rio de Janeiro, Brasil |
| <i>U. praelonga</i> A.St.-Hil. | 1 | <i>Psyllosperma</i> | Rio de Janeiro, Brasil Parque Serra da Canastra, Minas |
| <i>U. pusilla</i> Vahl | 1 | <i>Setiscapella</i> | Gerais, Brasil |
| <i>U. nervosa</i> G.Weber ex Benj. | 4 | <i>Setiscapella</i> | Itirapina, São Paulo, Brasil APA Várzea do Rio Tietê, Salesópolis, |
| <i>U. subulata</i> L. | 5 | <i>Setiscapella</i> | São Paulo, Brasil Parque Serra da Canastra, Minas |
| <i>U. triloba</i> Benj. | 4 | <i>Setiscapella</i> | Gerais, Brasil APA Várzea do Rio Tietê, Salesópolis, |
| <i>U. foliosa</i> L. | 4 | <i>Utricularia</i> | São Paulo, Brasil APA Várzea do Rio Tietê, Salesópolis, |
| <i>U. gibba</i> L. | 1 | <i>Utricularia</i> | São Paulo, Brasil |
| <i>U. aurea</i> Lour. | 2 | <i>Utricularia</i> | Siem Reap, Cambodia |

| | | | |
|---|---|--------------------|--|
| <i>U. biovularioides</i> (Kuhlm.) P. Taylor | 1 | <i>Utricularia</i> | Mato Grosso, Brasil |
| <i>U. bremii</i> Herr ex Kölliker | 1 | <i>Utricularia</i> | Boemia, República Tcheca APA Várzea do Rio Tietê, Salesópolis, São Paulo, Brasil |
| <i>U. breviscapa</i> C. Wright ex Griseb | 4 | <i>Utricularia</i> | São Paulo, Brasil |
| <i>U. dimorphanta</i> Makino. | 1 | <i>Utricularia</i> | Ilha Honshu, Japão |
| <i>U. floridana</i> Nash | 1 | <i>Utricularia</i> | Florida, USA |
| <i>U. geminiscapa</i> Benj. | 1 | <i>Utricularia</i> | Canada |
| <i>U. hydrocarpa</i> Vahl | 1 | <i>Utricularia</i> | Puerto Cabezas, Nicarágua |
| <i>U. inflexa</i> Forssk. | 1 | <i>Utricularia</i> | Rwanda, África |
| <i>U. intermedia</i> Hayne | 1 | <i>Utricularia</i> | Boemia, República Tcheca |
| <i>U. macrorrhiza</i> Le Conte | 1 | <i>Utricularia</i> | Canada |
| <i>U. minor</i> L. | 1 | <i>Utricularia</i> | Boemia, República Tcheca |
| <i>U. ochroleuca</i> R.Hartm. | 1 | <i>Utricularia</i> | Boemia, República Tcheca |
| <i>U. radiata</i> Small. | 1 | <i>Utricularia</i> | Virginia, USA |
| <i>U. reflexa</i> Oliver. | 1 | <i>Utricularia</i> | Pantano de Okavango, Botswana |
| <i>U. stellaris</i> Linn. | 1 | <i>Utricularia</i> | Yetman, NE of NSW, e Australia |
| <i>U. striata</i> LeConte ex Torrey | 1 | <i>Utricularia</i> | Georgia, USA |
| <i>U. stygia</i> G. Thor. | 1 | <i>Utricularia</i> | Boemia, República Tcheca |
| <i>U. australis</i> R.Br. | 1 | <i>Utricularia</i> | Boemia, República Theca |
| <i>U. cucullata</i> A.St.-Hil. & Girard | 3 | <i>Vesiculina</i> | Itirapina, São Paulo, Brasil |
| <i>U. purpurea</i> Walter | 2 | <i>Vesiculina</i> | Florida, USA |

Amplificação, purificação e sequenciamento

As regiões escolhidas foram *rbcL*, *matK*, região ITS, ITS2 e *psbA-trnH* segundo recomendações do CBOL (HOLLINGSWORTH *et al.*, 2009) e Liu *et al.* (2012). O espaçador intergênico *rpl20-rps12* não é considerado um “barcode”, contudo revelou ter bom poder discriminatório intraespecífico em trabalhos realizados por Menezes e Miranda (em preparação) para estudos populacionais de *Utricularia*.

As PCRs foram realizadas utilizando os iniciadores *barcoding matK* (KIM, em preparação), *rbcL* (WANG *et al.*, 2010), *psbA-trnH* (WANG *et al.*, 2010) e *rpl20-rps12* (HAMILTON, 1999) de cloroplasto e ITS (WHITE *et al.*, 1990) do genoma nuclear. A região ITS2 foi obtida a partir da região ITS sequenciada. As amplificações foram realizadas com o uso de termociclador PTC-100 (*MJ Research*). A partir do DNA extraído, realizaram-se reações de 25µL com 20ng de DNA, 1 U de *DreamTaq polimerase* (Fermentas) contendo 20mM de MgCl₂, 0,2µL de dNTPs (100 mM), 0,1 µL de cada iniciador (6 mM); para a região ITS, foi adicionado o adjuvante dimetilssulfóxido (DMSO), segundo os protocolos da Tabela 2. A purificação do material amplificado foi feita por meio de lavagens com isopropanol 100% e etanol 70%.

Tabela 2. Iniciadores e condições das reações para amplificação das regiões do DNA nuclear e cloroplastidial. (n/a= não aplica)

| Região | Iniciadores | Sequência dos iniciadores (direção 5'-3') | Condição das reações |
|--------------|-------------------|---|--|
| <i>rbcl</i> | <i>rbcl</i> a_f | ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC (Levin, 2013) | 94°C 3 min, 92°C 40 s, 50°C 50 s, 72°C 1 min, por 29 ciclos e 72°C 10 min |
| | <i>rbcl</i> a_rev | GTAAAATCAAGTCCACCRG (KRESS <i>et al.</i> , 2009) | |
| <i>rpl20</i> | <i>rpl20</i> | TTTGTTCTACGTCTCCGAGC | 94°C 1 min 94°C 40 s, 52°C 20 s, 72°C 50 s, por 35 ciclos e 72°C 5 min |
| <i>rps12</i> | 5'- <i>rps12</i> | GTCGAGGAACATGTACTAGG (HAMILTON, 1999) | |
| <i>matK</i> | 3F_KIM | CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGAG | |
| | 1R_KIM | ACCCAGTCCATCTGGAAATCTTGGTTC (KIM, em preparação) | |
| ITS | ITS4 | TCCTTCCGCTTATTGATATGC | 95°C 1 min 92°C 30 s, 50°C 50 s, 70°C 60 s, por 34 ciclos e 70°C 10 min |
| | ITS5 | GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG (WHITE <i>et al.</i> , 1990) | |
| <i>psbA</i> | <i>psbA</i> | CGAAGCTCCATCTACAAATGG | n/a |
| <i>trnH</i> | <i>trnH</i> | CGAAGCTCCATCTACAAATGG (KRESS <i>et al.</i> , 2005) | |

O sequenciamento foi realizado no CREBIO - Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica da UNESP/FCAV câmpus Jaboticabal (<http://www.fcav.unesp.br/crebio>). Foram realizadas reações de 10 µL, contendo 2,5 µL de *ABI Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)*, 2,5 pmoles de cada iniciador e 100 ng de cada amostra previamente amplificada. Os produtos das reações de sequenciamento foram lidos por sequenciador automático modelo 3730xl *ABI (Applied Biosystems)*. Foram sequenciadas as fitas senso e antissenso de cada amostra. Todos os cromatogramas obtidos a partir das sequências foram analisados para a identificação e possível correção de erros de leitura. Todas as sequências foram submetidas e comparadas por meio do aplicativo BLASTN (*Basic Local Alignment Search Tool; ALTSCHUL et al.*, 1990) com as sequências depositadas na base nr/nt do GenBank/ NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

Alinhamento das sequências

As sequências senso e antissenso foram comparadas com o programa BioEdit 7.5.0.2 (HALL, 1999). As sequências editadas foram alinhadas com o

programa ClustalW v. 2.1.2 (THOMPSON *et al.*, 1994) e Mafft v. 7.0 (KATOH *et al.*, 2002) e foram feitos ajustes manuais quando necessário.

Avaliação do poder de resolução das espécies

Para avaliar as diferenças intra e interespecíficas, distâncias genéticas foram calculadas utilizando o modelo Kimura-2-Parâmetros (KIMURA, 1980) para cada conjunto de dados (sequências e suas combinações), assim como também foi realizada a análise de agrupamento baseada em “Neighbor-Joining” (SAITOU; NEI, 1987) como proposto por Lahaye *et al.* (2008) e recomendação do CBOL (<http://www.barcoding.si.edu/>) usando o programa PAUP* ver 4.0b10 (SWOFFORD, 2003). O suporte dos ramos foi avaliado por “bootstrap” com 2000 réplicas e adição aleatória de sequências (SWOFFORD, 2003).

O poder de resolução das espécies, ou seja, se a espécie foi de fato discriminada das demais, foi calculado por meio de dois métodos: (i) *método baseado em árvores*, em que cada região e combinação de regiões foram avaliadas a partir da razão entre o número total de espécies corretamente identificadas na árvore de “Neighbor-Joining” (NJ) e o total de espécies, sendo que foram consideradas espécies os clados comparados par-a-par que possuíssem comprimento dos ramos diferentes de zero (KIM *et al.*, 2013); e (ii) *método baseado em sequência* com o emprego do software TaxonDNA (MEIER *et al.*, 2006), no qual foram identificados os “best match” e “best close match”. O método baseado em NJ utiliza uma única árvore estimada (o que é típico para métodos baseados em distância), portanto diversas árvores alternativas não são avaliadas (MEIER *et al.*, 2006). Sendo assim, as análises de “best match” e “best close match” podem ser uma importante avaliação, já que não se baseiam em apenas uma hipótese de filograma, mas na análise global de sequências par-a-par. Para a análise de “best close match” foi determinado um valor limite de 95% para todas as distâncias intraespecíficas encontradas.

Resultados

Sucesso de amplificação, sequenciamento e alinhamento

Somente a região *rbcl* foi amplificada e sequenciada com sucesso em todas os espécimes estudados (100% de aproveitamento). O sequenciamento das regiões ITS, *rpl20-rps12* e *matK* tiveram respectivamente, 76%, 68% e 58% de sucesso, mesmo após testes com modificações de parâmetros dos protocolos de amplificação. Duas amostras dos espécimes sequenciados a partir do marcador ITS revelaram ser contaminações de DNA de fungos, identificadas por meio da submissão e comparação utilizando-se do aplicativo BLASTN (*Basic Local Alignment Search Tool*) com as sequências depositadas na base nr/nt do GenBank/ NCBI (*Nacional Center for Biotechnology Information*). Não foi possível amplificar a região *psbA-trnH* das espécies do gênero *Utricularia* e *Genlisea*, contudo houve amplificação da espécie *Pinguicula filifolia* ao utilizar os iniciadores recomendados (HOLLINGSWORTH *et al.*, 2009; Tabela 2), sugerindo possível mutação na região em que os iniciadores se ligam.

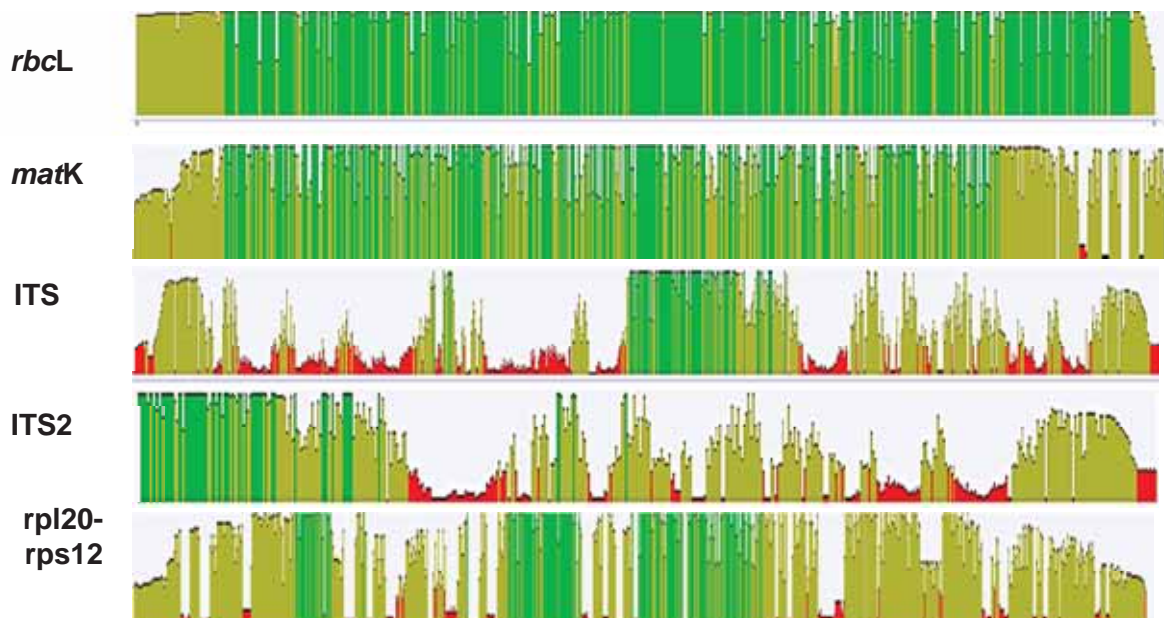


Figura 1. Frequência e identidade das regiões sequenciadas para todas as espécies. Verde: 100% de identidade; Marrom: 33%-99%; Vermelho: <33%. * Tamanho dos alinhamentos: *rbcl* – 522pb; *matK* – 898pb; ITS – 1110 pb; ITS2 – 522pb; *rps12-5'-rpl20* – 1051pb.

As regiões *rbcL* e *matK* permitiram construir alinhamento com facilidade, dada a alta conservação dos sítios, com sequências de 522pb e 898pb, respectivamente. Para a região ITS foi obtido alinhamento com 1102pb, para ITS2 522pb e *rpl20-rps12* 1051 pb (Figura 1; Tabela 3). As regiões ITS, ITS2 e *rpl20-rps12* foram de difícil alinhamento, dado o alto polimorfismo e muitos eventos de inserção e deleção (“indels”), sendo necessários muitos ajustes manuais.

Avaliação da variação intra e interespecífica

Entre as regiões candidatas, a região *rbcL* foi a que apresentou o menor valor de número de caracteres variáveis (91 bases; 17,43%) e distância interespecífica (0,03702) e intraespecífica (0,00149), seguida da combinação *rbcL* + *matK* (0,08034 de distância interespecífica e 0,00843 de intraespecífica). Já a região ITS foi a que apresentou o maior número de caracteres variáveis (830 bases; 75,31%), maior valor de distância interespecífica (0,46297) e distância intraespecífica (0,05454) (Tabela 3).

Avaliação segundo método baseado em árvores

A maioria das regiões únicas e concatenadas apresentou 100% de monofilia entre espécies (Figuras 2 e 4). A região que apresentou o menor número de espécies resolvidas, foi a região *rbcL* com 80% das espécies. A partir dos valores de Kimura-2-Parâmetros, foi possível observar que não houve “barcoding gap” nas sequências avaliadas (Figura 3). As regiões ITS e ITS2 apresentaram, em algumas espécies, distância intraespecífica superior a 0,2, contudo a grande maioria das distâncias interespecíficas foram superiores a 0,4 (Figura 3, ITS e ITS2). Assim, apesar de alguns valores de distância intraespecífica se sobreporem aos de distância interespecífica, a maioria das espécies pode ser discriminadas com maior sucesso em relação às outras regiões (Figura 2 e 3).

Avaliação segundo método de similaridade baseado em sequência

‘O software TaxonDNA (MEIER *et al.*, 2006) é programa de agrupamento paramétrico, baseado no alinhamento das sequências que determina qual a

sequência mais parecida em relação as das outras espécies, para a análise de “best match” (MEIER *et al.*, 2006). Se as sequências comparadas forem iguais e da mesma espécie, a identificação é considerada como correta, caso contrário é considerada incorreta. Se sequências de diferentes espécies são iguais, elas são consideradas ambíguas. De acordo com os resultados encontrados para *Utricularia*, o estudo evidencia o sucesso de identificação correta de 50,47% para *rbcL*, 42,62% para *matK*, 58,75% e 54,54% para ITS e ITS2, respectivamente, e 48,57% para *rpl20-rps12* (Figura 5). A identificação considerada como ambígua para *rbcL*, *matK*, ITS, ITS2 e *rpl20-rps12* foi de 22,85%, 6,55%, 8,74%, 11,68% e 0%, respectivamente (Figura 5). As incorretamente identificadas representaram 26,66% para *rbcL*, 50,81% para *matK*, 32,50% para ITS, 33,76% para ITS2 e 51,42% para *rpl20-rps12* (Figura 5)

O “best close match” consiste na frequência relativa das distâncias intraespecíficas determinadas a partir de um limite abaixo de 95%. Todas as sequências que possuem identidade menor do que 95%, em comparação a todas as outras sequências, são tidas como sem identificação, ou seja, sem correspondência. As classificações são identificadas como “correta”, quando as distâncias genéticas comparadas entre uma determinada sequência com as demais se enquadram em 95% do limite calculado; “ambígua”, quando uma sequência se encontra dentro do limite, mas é igual a outras sequências.

Os resultados para “best close match” para as regiões *rbcL*, *matK*, ITS, ITS2 e *rpl20-rps12* foram de 50,47%, 42,62%, 57,49%, 51,49% e 48,57%, respectivamente, de sequências identificadas como corretas. A porcentagem de sequências consideradas como ambíguas foram 6,55% para *matK*, 7,50% para ITS, 11,68% para ITS2 e 0% para *rpl20-rps12* (Figura 5). Já as porcentagens de sequências incorretamente identificadas foram 26,66%, 44,66%, 11,25%, 11,68% e 50%, para as regiões *rbcL*, *matK*, ITS, ITS e *rpl20-rps12*. O restante dos valores está representado por sequências únicas, que não estão apresentando mais de um espécime por população (Figura 5).

Resolução das espécies

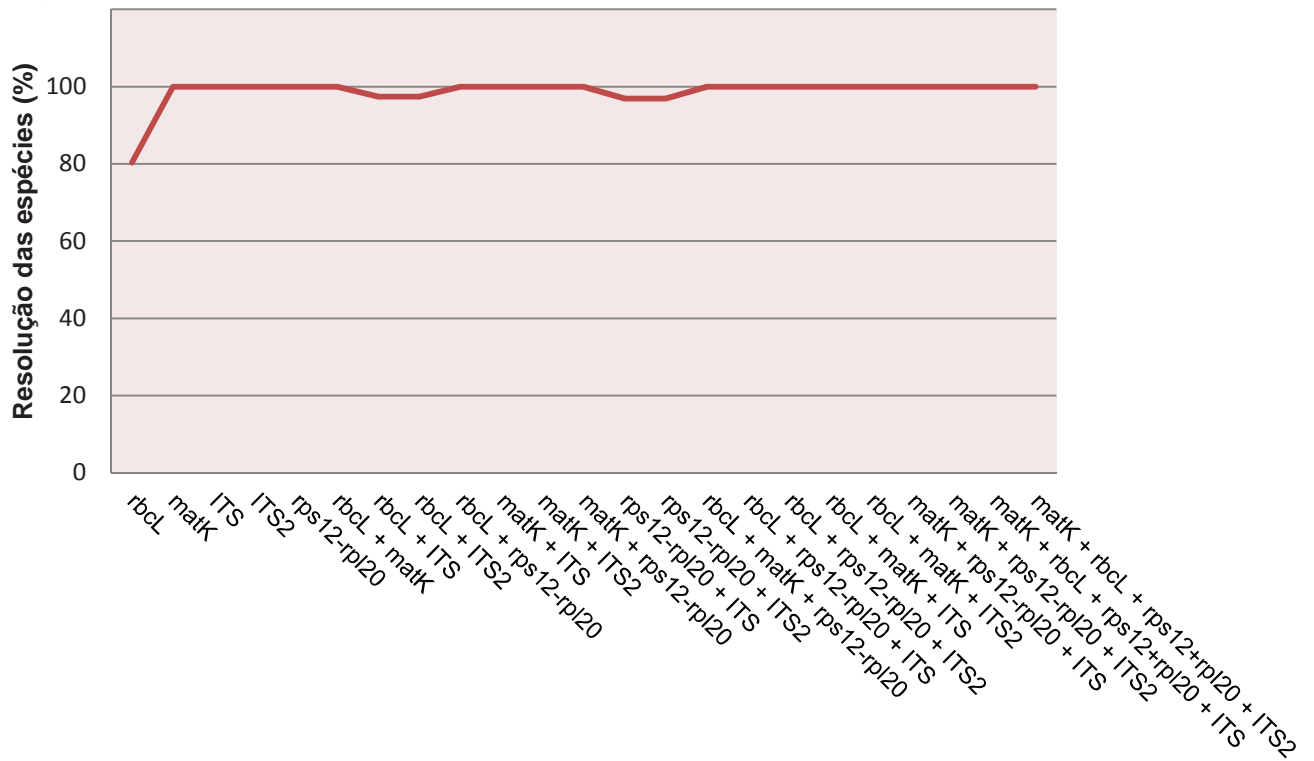


Figura 2. Taxa de resolução das espécies dos "barcodes" de sequência única e combinadas de acordo com método baseado em árvores.

Tabela 3. Dados descritivos das sequências de DNA assim como resultados das distâncias intra e interespecíficas para *Utricularia*.
 * Grupo externo não incluso.

| Sequências | Espécies | | | Tam. do | | Kimura-2-Parâmetros | | | |
|--|-------------|-------------|----------------|--|--|----------------------------------|--|--|----------------------------------|
| | (espécimes) | alinhamento | n.car.var. (%) | $\bar{\chi}$ da distância intraespecífica (dv) | $\bar{\chi}$ da distância interespecífica (dv) | Máx da distância interespecífica | $\bar{\chi}$ da distância intraespecífica (dv) | $\bar{\chi}$ da distância interespecífica (dv) | Máx da distância interespecífica |
| <i>rbcl</i> | 55 (105) | 522 | 91 (17,43) | 0,001 (0,01) | 0,037 (0,01) | 0,065 | 0,001 (0,01) | 0,037 (0,01) | 0,065 |
| <i>matK</i> | 40 (61) | 898 | 412 (45,87) | 0,018 (0,02) | 0,116 (0,03) | 0,200 | 0,018 (0,02) | 0,116 (0,03) | 0,200 |
| ITS | 42 (80) | 1102 | 830 (75,31) | 0,054 (0,07) | 0,462 (0,10) | 0,755 | 0,054 (0,07) | 0,462 (0,10) | 0,755 |
| ITS2 | 42 (80) | 522 | 397 (76,05) | 0,047 (0,06) | 0,425 (0,09) | 0,699 | 0,047 (0,06) | 0,425 (0,09) | 0,699 |
| <i>rp120-rps12</i> | 44 (72) | 1051 | 422 (40,15) | 0,004 (0,01) | 0,100 (0,03) | 0,179 | 0,004 (0,01) | 0,100 (0,03) | 0,179 |
| <i>rbcl + matK</i> | 35 (55) | 1418 | 467 (32,93) | 0,008 (0,01) | 0,080 (0,02) | 0,123 | 0,008 (0,01) | 0,080 (0,02) | 0,123 |
| <i>rbcl + ITS</i> | 40 (73) | 1609 | 915 (56,86) | 0,030 (0,04) | 0,228 (0,04) | 0,341 | 0,030 (0,04) | 0,228 (0,04) | 0,341 |
| <i>rbcl + ITS2</i> | 41 (73) | 1041 | 474 (45,53) | 0,018 (0,02) | 0,166 (0,03) | 0,246 | 0,018 (0,02) | 0,166 (0,03) | 0,246 |
| <i>rbcl + rp120-rps12</i> | 45 (65) | 1590 | 577 (36,28) | 0,049 (0,01) | 0,656 (0,01) | 0,117 | 0,049 (0,01) | 0,656 (0,01) | 0,117 |
| <i>matK + ITS</i> | 31 (45) | 1984 | 1178 (59,37) | 0,043 (0,06) | 0,243 (0,04) | 0,390 | 0,043 (0,06) | 0,243 (0,04) | 0,390 |
| <i>matK + ITS2</i> | 31 (45) | 1417 | 754 (53,21) | 0,023 (0,03) | 0,194 (0,03) | 0,305 | 0,023 (0,03) | 0,194 (0,03) | 0,305 |
| <i>matK + rp120-rps12</i> | 30 (40) | 1928 | 723 (37,5) | 0,014 (0,01) | 0,104 (0,02) | 0,160 | 0,014 (0,01) | 0,104 (0,02) | 0,160 |
| <i>rp120-rps12 + ITS</i> | 34 (49) | 2125 | 1148 (54,02) | 0,027 (0,03) | 0,223 (0,04) | 0,351 | 0,027 (0,03) | 0,223 (0,04) | 0,351 |
| <i>rp120-rps12 + ITS2</i> | 34 (49) | 1564 | 740 (47,31) | 0,017 (0,02) | 0,178 (0,03) | 0,292 | 0,017 (0,02) | 0,178 (0,03) | 0,292 |
| <i>rbcl + matK+ ITS</i> | 29 (42) | 2503 | 1215 (48,54) | 0,034 (0,04) | 0,177 (0,03) | 0,254 | 0,034 (0,04) | 0,177 (0,03) | 0,254 |
| <i>rbcl + matK+ ITS2</i> | 34 (42) | 1936 | 803 (41,47) | 0,023 (0,03) | 0,139 (0,02) | 0,203 | 0,023 (0,03) | 0,139 (0,02) | 0,203 |
| <i>rbcl + matK+ rp120-rps12</i> | 29 (40) | 2426 | 758 (31,24) | 0,076 (0,01) | 0,082 (0,02) | 0,126 | 0,076 (0,01) | 0,082 (0,02) | 0,126 |
| <i>rbcl + rp120-rps12 + ITS</i> | 34 (49) | 2656 | 1293 (48,68) | 0,020 (0,02) | 0,163 (0,03) | 0,255 | 0,020 (0,02) | 0,163 (0,03) | 0,255 |
| <i>rbcl + rp120-rps12 + ITS2</i> | 34 (49) | 2095 | 881 (42,05) | 0,011 (0,01) | 0,126 (0,02) | 0,195 | 0,011 (0,01) | 0,126 (0,02) | 0,195 |
| <i>matK+ rp120-rps12 + ITS</i> | 25 (31) | 2992 | 1372 (45,85) | 0,030 (0,04) | 0,177 (0,04) | 0,264 | 0,030 (0,04) | 0,177 (0,04) | 0,264 |
| <i>matK+ rp120-rps12 + ITS2</i> | 25 (31) | 2438 | 996 (40,85) | 0,024 (0,03) | 0,147 (0,03) | 0,220 | 0,024 (0,03) | 0,147 (0,03) | 0,220 |
| <i>matK+ rbcl + rp120-rps12 + ITS</i> | 25 (33) | 3487 | 1419 (40,69) | 0,036 (0,04) | 0,142 (0,03) | 0,210 | 0,036 (0,04) | 0,142 (0,03) | 0,210 |
| <i>matK+ rbcl + rp120-rps12 + ITS2</i> | 25 (33) | 2932 | 1041 (35,50) | 0,021 (0,02) | 0,117 (0,03) | 0,176 | 0,021 (0,02) | 0,117 (0,03) | 0,176 |

Discussões

Comparação entre as seis regiões estudadas

É desejável que uma sequência candidata a ser um efetivo “barcode” de um grupo inclua principalmente grande variabilidade, que permita a identificação das espécies com pouca variação intraespecífica, e universalidade, ou seja, que os iniciadores possam amplificar a região candidata da maioria das espécies, sem que haja necessidade de serem criados iniciadores específicos e que sejam fáceis de sequenciar (HOLLINGSWORTH *et al.*, 2011).

A escolha de *rbcL* + *matK*, de acordo com diversos estudos como “core barcodes” para as plantas, baseou-se na facilidade de amplificação e sequenciamento de *rbcL*, somado ao alto poder discriminatório de *matK* (HOLLINGSWORTH, 2009). Contudo, entre as regiões avaliadas por esse estudo, a região *matK* resultou como de difícil amplificação e sequenciamento, portanto para a região foram necessárias várias tentativas para se obter uma sequência de boa qualidade, corroborando os dados de Starr *et al.* (2009). Além disso, as regiões combinadas apresentaram um dos menores valores para as distâncias intra e interespecífica (0,00843; 0,08034, respectivamente) para o grupo. Portanto os dados desta pesquisa indicam que essa região e a combinação entre essas regiões não são bons “barcodes” para *Utricularia*.

Já a região *rbcL* foi a que mais se destacou quanto ao sucesso de amplificação e sequenciamento, contudo foi a região que apresentou o menor poder de resolução de espécies (Figura 3-5), menor número de sítios variáveis (17,43%) e as menores distâncias inter e intraespecífica (0,03702 e 0,00149, respectivamente; Tabela 3), corroborando estudos prévios (HOLLINGSWORTH, 2009).

Apesar de a região *psbA-trnH* ser um “barcode” que auxilia na identificação de inúmeras famílias de angiospermas, considerada por Kress *et al.* (2005) como o “barcode” das plantas com flores”, para todas as plantas do gênero *Utricularia* não foi possível amplificar utilizando os iniciadores propostos pelo CBOL (*psbA*: 5'-CGAAGCTCCATCTACAAATGG-3'; *trnH*: 5'-ACTGCCTTGATCCACTTGGC-3'). Portanto, se essa região for escolhida de fato como “barcode” universal, será

necessário o desenvolvimento de novos iniciadores para obter essa informação dos genomas das espécies de *Utricularia*.

O espaçador intergênico *rpl20-rps12* tem sido utilizado principalmente para identificar SNPs em estudos filogeográficos (MIRANDA; MENEZES em preparação), porém essa é a primeira vez que o mesmo é avaliado como um possível “barcode”. Para o gênero *Utricularia* a região foi de fácil amplificação e sequenciamento, além de apresentar polimorfismos intra e interespecíficos (Tabela 3).

Proposto por Liu *et al.* (2012) como o melhor “barcode” para todos os organismos, o espaçador ITS2 possui as mesmas qualidades que a região ITS completa quanto ao poder discriminatório, contudo possui menores valores para sítios variáveis (397; Tabela 3), naturalmente em consequência do seu tamanho menor em relação à região ITS (830 sítios variáveis, incluindo os 397 do espaçador ITS2). Mesmo assim, o espaçador ITS2 poderia ser empregado como um bom “barcode” para *Utricularia*, já que seus valores de distância intra e interespecífica pouco se sobrepõe (Tabela 3; Figura 3).

Espécies identificadas usando a análise de “best match” e “best close match” revelaram que as regiões *rbcL*, *matK*, *rpl20-rps12* apresentam cerca de 60% de espécies identificadas como ambíguas, incorretamente identificadas e sem sequência correspondente (Figura 5). Já as sequências únicas ITS (58,75%; 57,49%) e ITS2 (54,54%; 51,94%) possuem os maiores valores de espécies identificadas corretamente em relação às outras regiões (Figura 5). Portanto, as regiões ITS e ITS2, entre as regiões estudadas, foram as que melhor identificaram corretamente as espécies de *Utricularia*.

Fazekas *et al.* (2008) sugerem que a resolução de espécies é maior se aumentada a quantidade de *loci* de “barcodes”. Entretanto, de acordo com os resultados obtidos nesta pesquisa para as espécies de *Utricularia*, a porcentagem de identificação dos “barcodes” não foi aumentada, portanto a combinação entre marcadores não melhorou a eficiência dos “barcodes” em relação às regiões de sequência única. De todas as combinações binárias de “barcodes”, a maior porcentagem de sítios variáveis foi encontrada para *matK*+ITS (59,37%; Tabela 3). Para as trincas de “barcodes” avaliados, o maior valor foi obtido para a combinação *rbcL+rpl20-rps12*+ITS (48,68%; Tabela 3), nenhuma trinca os 75,31% obtidos para a

região ITS. É importante notar que, mesmo para as combinações citadas, fez parte da concatenação a região ITS (*matK*+ITS e *rbcL+rpl20-rps12*+ITS).

A grande maioria das pesquisas que teve como objetivo a avaliação de possíveis “barcodes”, discutiram os dados em nível de família (GUO *et al.*, 2011) considerando gêneros distintos. Ainda assim, apesar da comparação no presente estudo avaliar distâncias em nível infragenérico (interespecífico), as regiões analisadas exibiram altos valores de distância (Tabela 3) em relação a esses resultados que levaram em conta a comparação intergenérica. Possivelmente, a causa para esses altos valores de distância encontrados seja devido à elevada taxa evolutiva molecular que é comum para as linhagens de *Utricularia* (JOBSON *et al.*, 2002; 2004).

Avaliação do “barcoding gap”

De acordo com certos autores, para que a região seja considerada um bom “barcode”, é necessário haver uma lacuna (“barcoding gap”) entre as variações intra e interespecífica, ou seja, não haver sobreposição entre os valores de ambas as distâncias (MEYER; PAULA, 2005; LAHAYE *et al.*, 2008). Os dados estudados no presente trabalho revelam que não há “barcoding gap” entre todas as regiões e combinações entre regiões. Estudos realizados por Meier *et al.* (2006) indicam que a avaliação do “barcoding gap” com o emprego dos métodos de distância não devem ser considerados como decisivos na distinção de espécies, pois, de acordo com os autores, a ausência de “barcoding gap” representa espécies resultantes de eventos de hibridação, com pouco tempo de divergência e/ou polimorfismo próprio do grupo (MEIER *et al.*, 2006), comum para *Utricularia* posto que seu principal meio de propagação é clonal.

Regiões ITS e ITS2 como “barcodes” do gênero Utricularia

Apesar de as sequências da região ITS obtidas serem de difícil alinhamento, que possivelmente se deve à grande quantidade de homopolímeros (STARR *et al.*, 2009), o risco de contaminação por fungos e, principalmente considerando as condições ambientais às quais as utriculárias estão submetidas, a região ITS revelou-se o melhor “barcode” dentre todas as regiões e combinações estudadas

(Tabela 3). De fácil amplificação e sequenciamento para o gênero, essa região é extremamente variável e, em comparação com sua distância interespecífica, é nove vezes maior do que a distância interespecífica (Tabela 3, Figura 3). Da mesma forma como a região ITS permitiu resolver as espécies de *Utricularia*, essa região de DNA ribossomal também possibilitou distinguir as espécies de diversas outras famílias de plantas (CHEN *et al.*, 2010; HOLLINGSWORTH, 2011; FU *et al.*, 2011; ALVES *et al.*, 2013). Ademais todas as combinações foram analisadas pelos mesmos métodos, entretanto as matrizes concatenadas não apresentaram maior poder discriminatório quando comparadas aos “barcodes” ITS e ITS2.

Os resultados da árvore gerada por “Neighbor-Joining” para a região escolhida (ITS) indicam diferenciação em nível de espécie e a nível de população, já que a maioria das espécies de mesma população formaram clados monofiléticos apesar da baixa amostragem intraespecífica (Figura 4), corroborando assim que as regiões ITS e ITS2 têm informação suficientemente diagnóstica para a separação dos grupos. Algumas espécies morfologicamente similares formam clados parafiléticos (e.g. *U triloba*), corroborando com o fato de não haver “barcoding gap” (Figura 4).

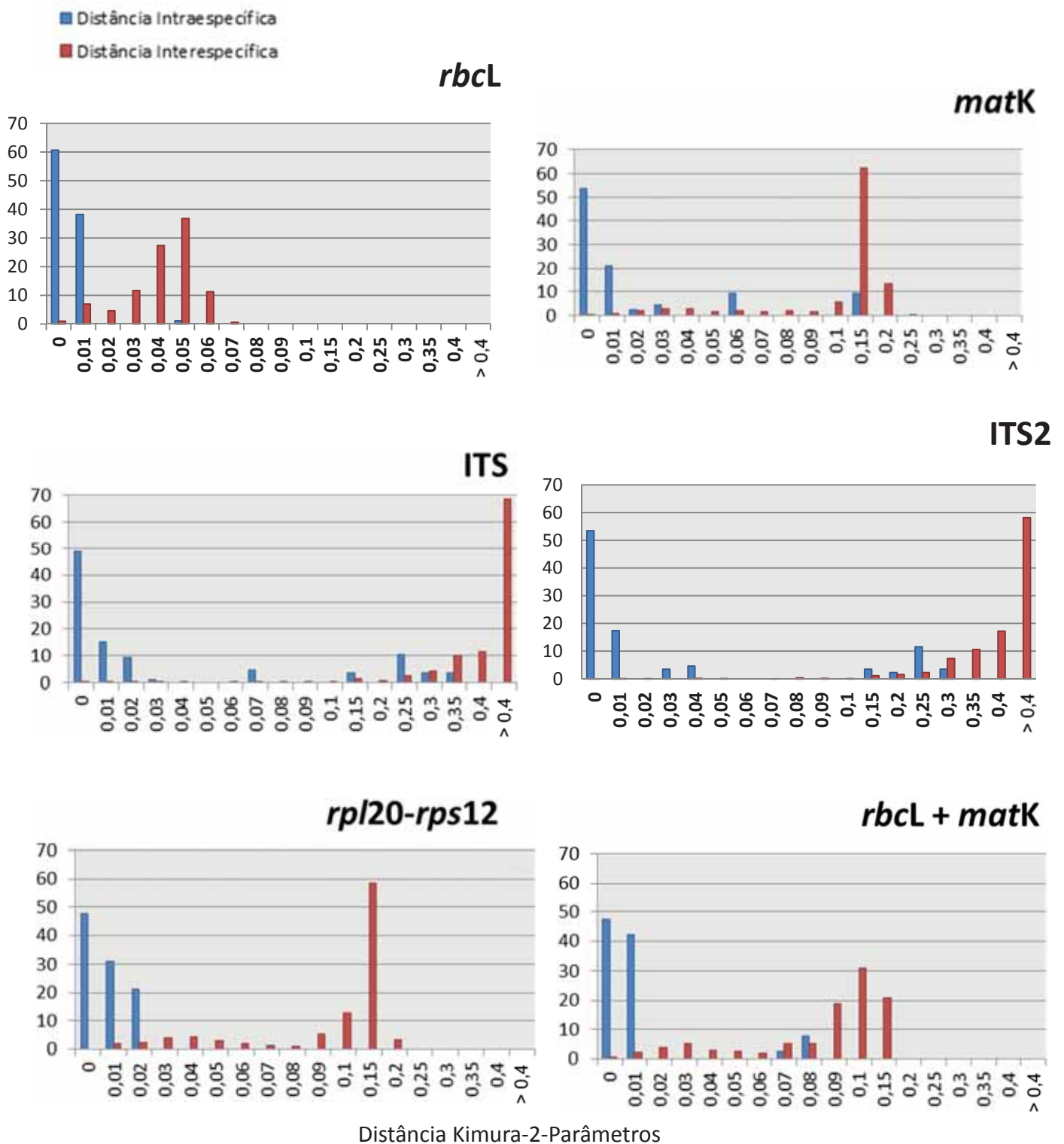


Figura 3. Histograma da frequência da distribuição da distância Kimura-2-Parâmetros intra e interespecifica para as cinco regiões candidatas a DNA “barcode” e a combinação recomendado pelo *CBOL Plant Working Group* (*rbcL* + *matK*).

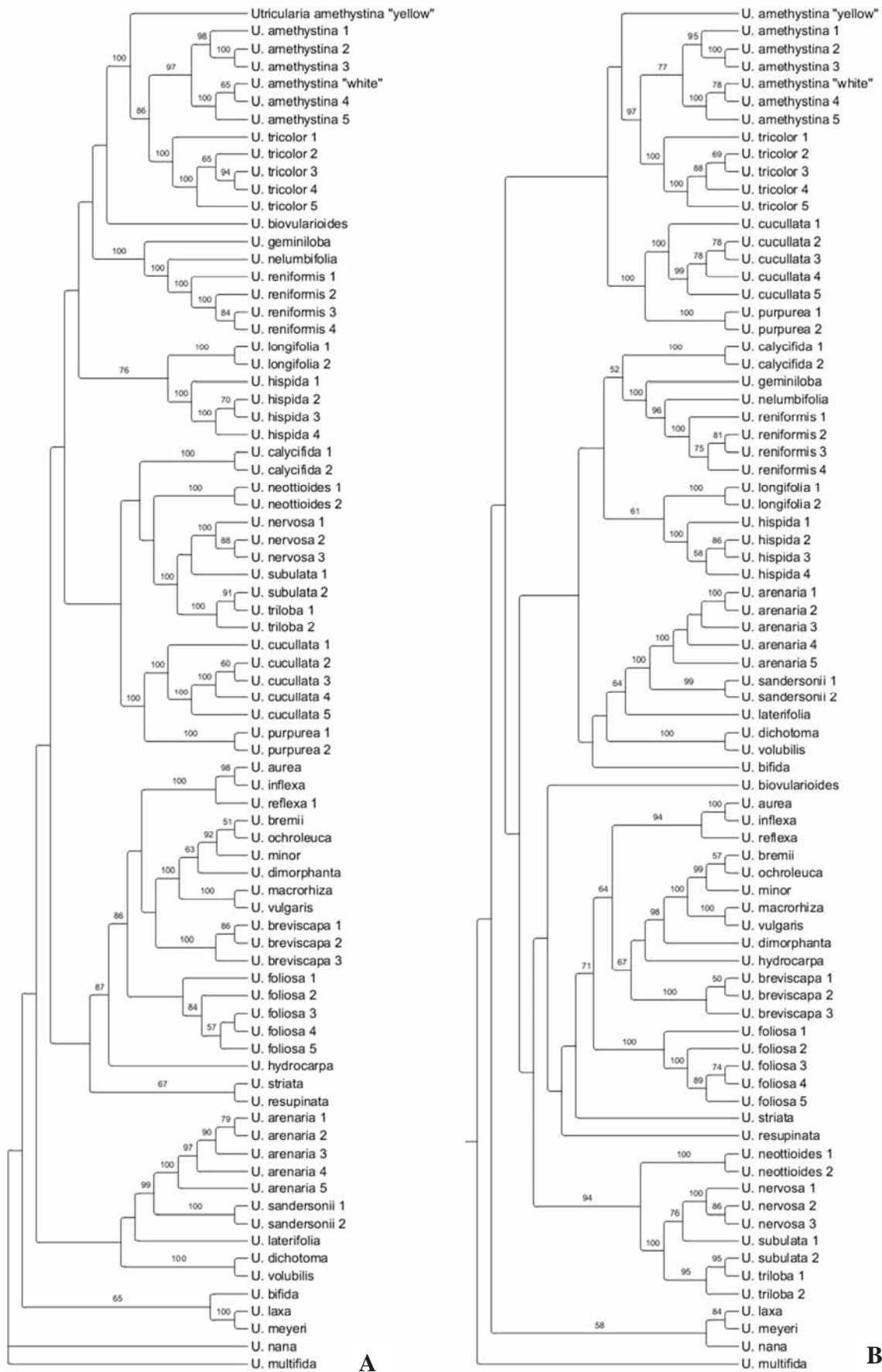


Figura 4. Árvore resultante de análise de “Neighbor-Joining” com o emprego do modelo de distância Kimura-2-Parâmetros utilizando a região ITS (A) e ITS2 (B) (rDNA) de todas as espécies estudadas. Os valores de “bootstrap” encontram-se próximo dos ramos.

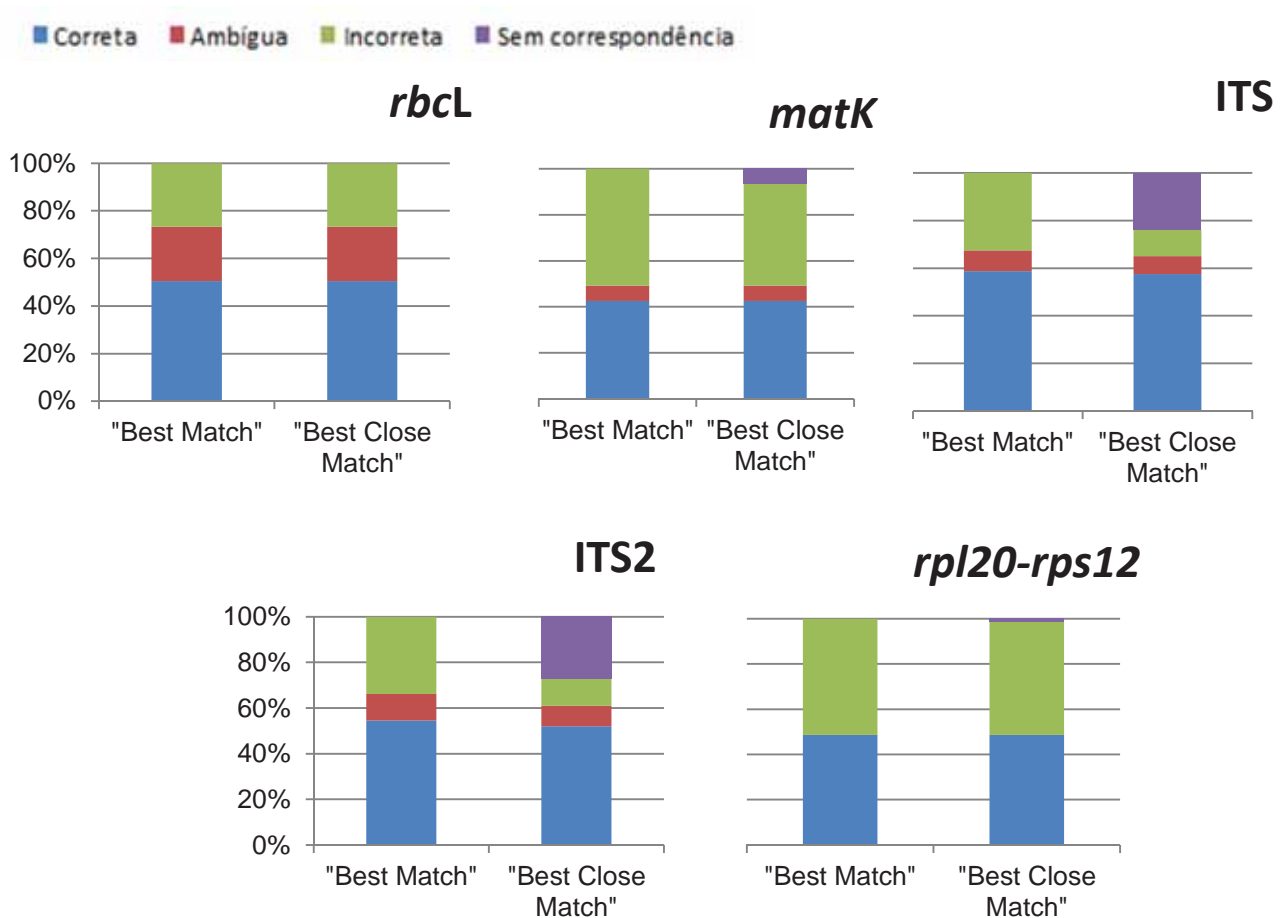


Figura 5. Sucesso de identificação das espécies de *Utricularia* L. obtidos pelos testes de "best match" e "best close match" (MEIER *et al.*, 2006).

Conclusão

Todas as regiões e combinações entre as regiões de DNA estudadas (*rbcl*, *matK*, ITS, ITS2, *rpl20-rps12*) possuem valores bastante discrepantes entre valores de distância intra e interespecífica e altas porcentagem de espécies monofiléticas na análise de NJ. Somente as regiões ITS e ITS2 apresentaram altas porcentagens de identificação correta por meio da análise de "best match" e "best close match" em relação às demais regiões. Contudo, se também consideradas as resoluções interespecíficas, as taxas de amplificação, o sucesso do sequenciamento, a quantidade de sítios variáveis, as diferenças entre as distâncias intra e interespecíficas, a resolução dos clados em comparação com prévios estudos filogenéticos e o custo do processamento do material, os melhores "barcodes" dentre os estudados para o gênero *Utricularia* são as regiões ITS e ITS2 do rDNA.

Referências

ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP III (APG III). An update of the Angiosperm Phylogeny Group Classification for the orders and families of flowering plants. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 161, n. 2, p. 105-121, 2009. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1095-8339.2009.00996.x>>

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. "Basic local alignment search tool." **Journal of Molecular Biology** v.215, p.403-410, 1990.

ÁLVAREZ, I. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 29, n.3, p.417-434, 2003. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/S1055-7903\(03\)00208-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1055-7903(03)00208-2)>

BARRETT R. D. H.; HEBERT, P. D. N. Identifying spiders through DNA barcodes. **Canadian Journal of Zoology**, v. 83, n.1, p. 481-491, 2005. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3897/zookeys.365.5787>>

HOLLINGSWORTH, P. M.; FORREST, L. L.; SPOUGE, J. L.; HAJIBABAEI, M.; RATNASINGHAM, S.; VAN DER BANK, M.; CHASE, M. W.; COWAN, R. S.; ERICKSON, D. L.; FAZEKAS, A. J.; GRAHAM, S. W.; JAMES, K. E.; KIM, K. J.; KRESS, W. J.; SCHNEIDER, H.; VAN ALPHENSTAHL, J.; BARRETT, S. C. H.; VAN DEN BERG, C.; BOGARIN, D.; BURGESS, K. S.; CAMERON, K. M.; CARINE, M.; CHACÓN, J.; CLARK, A.; CLARKSON, J. J.; CONRAD, F.; DEVEY, D. S.; FORD, C. S.; HEDDERSON, T. A. J.; HOLLINGSWORTH, M. L.; HUSBAND, B. C.; KELLY, L. J.; KESANAKURTI, P. R.; KIM, J. S.; KIM, Y. D.; LAHAYE, R.; LEE, H. L.; LONG, D. G.; MADRIÑÁN, S.; MAURIN, O.; MEUSNIER, I.; NEWMMASTER, S. G.; PARK, C. H. W.; PERCY, D. M.; PETERSEN, G.; RICHARDSON, J. E.; SALAZAR, G. A.; SAVOLAINEN, V.; SEBERG, O.; WILKINSON, M. J.; YI, D. K.; LITTLE, D. P. A DNA barcode for land plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences** v. 106, n. 31, p. 12794-12797, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0905845106>>

CHASE M. W.; COWAN R. S.; HOLLINGSWORTH P. M.; BERG, C.V.D.; MADRIÑÁN S.; PETERSEN G.; SEBERG O.; JØRGENSEN T.; CAMERON K. M.; CARINE M.; PEDERSEN N.; HEDDERSON T. A. J.; CONRAD F.; SALAZAR G. A.; RICHARDSON J. E.; HOLLINGSWORTH M. L.; BARRACLOUGH T. G.; KELLY L WILKINSON. A proposal for a standardised protocol to barcode all land plants. **Taxon**, v. 56, p. 295-299, 2007.

CHASE, M.W.; SALAMIN, N.; WILKINSON, M.; DUNWELL, J.M.; KESANAKURTH, R.P.; HAIDAR, N.; SAVOLAINEN, V. Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences** n. 360, p. 1889-1895, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2005.17206>>

CHEN S. L.; YAO H.; HAN J. P.; LIU C.; SONG J. Y. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. **PLoS ONE**. v. 5, n.1, e8613, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0013102>>

LI, D. Z.; GAO, L. M.; LI, H. T.; WANG, H.; GE, X.J; LIU, J.Q.; CHEN, Z.D; ZHOU, S. L.; YANG, J. B.; FU, C. X.; ZENG, C. X; YAN, H. F.; ZHU, Y. J.; SUN, Y. S.; CHEN, S. Y.; ZHAO, L.; WANG, K.; YANG, T.; DUAN, G. W. Comparative analysis of a large dataset indicates that internal transcribed spacer (ITS) should be incorporated into the core barcode for seed plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**. v. 108, n. 49, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1104551108>>

CHRISTINA V. L.; ANNAMALAI A. Nucleotide based validation of *Ocimum* species by evaluating three candidate barcodes of the chloroplast region. **Molecular Ecology and Resources** v. 14, n.1, p.60-68, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/1755-0998.12167>>

COWAN R. S.; CHASE M. W.; KRESS W. J.; SAVOLAINEN V. 300,000 species to identify: problems, progress, and prospects in DNA barcoding of land plants. **Taxon** v. 55, p. 611-616, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2307/25065638>>

DE MATTIA F.; BRUNI I.; GALIMBERTI A.; CATTANEO F.; CASIRAGHI M.; LABRA M. A comparative study of different DNA barcoding markers for the identification of some members of Lamiaceae. **Food Research International** v. 44, n. 1, p. 693-702, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782012000100004>>.

DOYLE, J. J. E DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation method for small quantities of fresh tissues. **Phytochemical Bulletin of Botanical Society of America** v. 19, p. 11-15, 1987.

FAZEKAS A. J.; BURGESS K. S.; KESANAKURTI P. R.; GRAHAM S. W.; NEWMASER S. G. .; HUSBAND, B. C.; PERCY, D. M.; HAJIBABAEI, M.; BARRETT, S. C. H. Multiple Multilocus DNA Barcodes from the Plastid Genome Discriminate Plant Species Equally Well. **PLoS ONE** v. 3, n. 7, p. 1-12, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0002802>>.

FELINER, G. NIETO; ROSSELLÓ, J. A. Better the devil you know? Guidelines for insightful utilization of nrDNA ITS in species-level evolutionary studies in plants. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 44, n. 2, p. 911–9, 2007.

FORD, C.S. AYRES, K.L.; TOOMEY, N.; HAIDER, N.; VAN ALPHEN STAHL, J.; KELLY, L.J.; WIKSTRÖM, N.; HOLLINGSWORTH, P.M.; DUFF, R.J.; HOOT, S.B.; COWAN, R.S.; CHASE, M.W; WILKINSON, M.J. Selection of candidate coding DNA barcoding regions for use on land plants. **Botanical Journal of Linnean Society** v. 159, p. 1-11, 2009.

FROMM-TRINTA, E. *Tayloria* Fromm-Trinta, nova seção do gênero *Genlisea* St-Hil. **Boletim do Museu Nacional do Rio de Janeiro**, v. 44, n. 1, p. 1-4, 1977.

FROMM-TRINTA, E. Revisão das espécies do gênero *Genlisea* St-Hil. (Lentibulariaceae) das regiões sudeste e sul do Brasil **Rodriguésia** v. 31, n. 49, p. 17-139, 1979.

FROMM-TRINTA, E. Revisão do gênero *Genlisea* St.-Hil. (Lentibulariaceae) no Brasil. **Boletim do Museu Nacional do Rio de Janeiro** v. 61, n. 1, p. 1-21, 1981.

FROMM-TRINTA, E. Lentibulariaceae do Brasil. Utriculárias Aquáticas I. **Bradea** v. 4, n. 29, p. 188-210, 1985.

FROMM-TRINTA, E. Lentibulariaceae do Brasil II. Utriculárias Epífitas. **Bradea** v. 5, n. 9, p. 91-107, 1988.

FROMM-TRINTA, E. O gênero *Utricularia* L. no Brasil V. espécies da região sudeste. **Bradea** v. 5, n. 24. p. 267-274, 1989.

FROMM-TRINTA, E. Lentibulariaceae do Brasil. Utriculárias Aquáticas II, espécies fixas. **Bradea** v. 6, n. 1, p. 1-12, 1991.

FROMM-TRINTA, E. Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: Lentibulariaceae. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo** v. 14, n. 1, p. 105-118, 1996.

FROMM-TRINTA, E. Flora de Grão-Mongol, Minas Gerais: Lentibulariaceae. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo** v. 22, n. 2, p. 267-271, 2004.

FU Y. M.; JIANG W. M.; FU C. X. Identification of species within *Tetrastigma* (Miq.) Planch. (Vitaceae) based on DNA barcoding techniques. **Journal of Systematics Evolution**, v. 49, n. 3, p. 237-245, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1759-6831.2011.00126.x>>

GAO T.; YAO H.; SONG J.; LIU C.; ZHU Y.; MA X.; Pang X.; Xu H.; Chen S. Identification of medicinal plants in the family Fabaceae using a potential DNA barcode ITS2. **Journal of Ethnopharmacology** v. 130, p. 116–21, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2010.04.026>>

GUISANDE, C. *et al.* Bladderworts. **Functional Plant Science and Biotechnology**, v. 1, n. 1, p. 58-68, 2007.

GUO, X.; SIMMONS M.P.; BUT P.P.H; SHAW P.C.; WANG R.J. Application of DNA barcodes in *Hedyotis* L. (Spermacoaceae, Rubiaceae). **Journal of Systematics and Evolution** v. 49, p. 203-212, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1759-6831.2011.00130.x>>

HAJIBABAEI M.; SINGER G. A. C.; HEBERT P. D. N.; HICKEY D. A. DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. **Trends Genetics** v. 23, n. 4, p. 167-172, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tig.2007.02.001>>

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 1, n. 41, p. 95-98, 1999. Disponível em: <<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>>. Acesso em 12 de junho de 2013.

HAMILTON, M. B. Four primer pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraspecific variation. **Molecular Ecology** v. 8, p. 521-523, 1999.

HILLIS; DIXON. Ribosomal DNA: Molecular Evolution and Phylogenetic Inference In: David M . Hillis ; Michael T . Dixon. **Review Literature And Arts Of The Americas**, v. 66, n. 4, p.411–453, 2007.

HERBERT P. D. N.; CYWINSKA A.; BALL S. L.; WAARD J. R. Biological identification through DNA barcodes. **Plos Biology** v. 2, n. 1512; p. 01-06, 2003. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>>.

HEBERT P. D. N.; PENTON E. H.; BURNS J. M.; JANZEN D. H.; HALLWACHS W. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 101, n. 41, p. 14812–14817, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0406166101>>.

HOLLINGSWORTH P. M., GRAHAM S. W., LITTLE D. P. Choosing and using a plant DNA barcode. **PloS ONE**, v. 6, n. 5, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0019254>>

IBARRA-LACLETTE, E.; LYONS, E., HERNÁNDEZ-GUZMÁN, G.; PÉREZ-TORRES, C.; CARRETERO-PAULET, L.; CHANG, T.-H.; LAN, T.; WELCH, A.; JUÁREZ, M.; SIMPSON, J.; FERNÁNDEZ-CORTÉS, A.; ARTEAGA-VÁZQUEZ, M.; GÓNGORA-CASTILLO, E.; ACEVEDO-HERNÁNDEZ, G.; SCHUSTER, S.; HIMMELBAUER, H.; MINOCHE, A.; XU, S.; LYNCH, M.; OROPEZA-ABURTO, A.; CERVANTES-PÉREZ, S.; de JESÚS ORTEGA-ESTRADA, M.; CERVANTES-LUEVANO, J.; MICHAEL, T.; MOCKLER, T.; BRYANT, D.; HERRERA-ESTRELLA, A.; ALBERT, V.; HERRERA-ESTRELLA, L. Architecture and evolution of a minute plant genome. **Nature**, v. 498, n. 7452, p. 94–8, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/10.1038/nature12132>>

JOBSON R.; NIELSEN R.; LAAKKONEN L.; WIKSTRÖM M.; ALBERT V. Adaptive evolution of cytochrome oxidase: infrastructure for a carnivorous plant radiation. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA** v. 101, n. 52, p. 18064-18068, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.040809210>>

KATOH, K.; MISAWA, K.; KUMA, K.; MIYAVA, T. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. **Nucleic Acid Resources** n. 30, p. 3059-3066, 2002. Disponível em: <<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>> Acesso em: 14 de junho de 2013.

KIM H. M.; OH S. H.; PARK C. W. DNA barcoding of Orchidaceae in Korea. **Molecular Ecology and Resources**, In press, 2013.

KIMURA M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution** n. 16, v. 2, p. 111-120, 1980.

KRESS, W. J.; ERICKSON, D. L. A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcL* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region. **PLoS ONE**, v. 2, n. 6, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0000508>>.

KRESS, W. J.; WURDACK, K. J.; ZIMMER, E. A.; WEIGT, L. A.; JANZEN, D. H. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 23, p. 8369-8374, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0503123102>>

KRÓL, E.; PŁACHNO, B. J.; ADAMEC, L.; STOLARZ, M.; DZIUBIŃSKA, H.; TREBACZ, K. Quite a few reasons for calling carnivores “the most wonderful plants in the world”. **Annals of Botany**, v. 109, n. 1, p.47–64, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1093/aob/mcr249>>.

LAHAYE, R. M.; VAN DER BANK, D.; BOGARIN, J.; WARNER, F.; PUPULIN, G.; GIGOT, O.; MAURIN, S.; DUTHOIT, T.; G. BARRACLOUGH; V. SAVOLAINEN . DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA** v. 105, n. 8, p.2923–2928, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0709936105>>

LITTLE, D. P. A DNA mini–barcode for land plants. **Molecular Ecology Resources**. In press, 2013 Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/1755-0998.1219>>

LIU Z.; ZENG X.; YANG D.; CHU G.; YUAN Z.; CHEN S. Applying DNA barcodes for identification of plant species in the family Araliaceae. **Gene** v. 499, n. 1, p.76-80, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2012.02>>

LODHI M. A.; YE G. N.; WEEDEN N. F.; REISCH B. I. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *vitis* species. **Plant Molecular Biology Reporter** v. 12, n. 1, p. 6-13, 1994.

MEIER, R.; KWONG S.; VAIDYA, G.; P. K. L. N.G. DNA barcoding and taxonomy in Diptera: A tale of high intraspecific variability and low identification success. **Systematic Biology** v. 55, p. 715–728, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/10635150600969864>>

MEYER C. P. & PAULAY G. DNA Barcoding: Error Rates Based on Comprehensive Sampling. **PLoS Biology** v. 3, n. 12, p. 2229-2238, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.0030422>>

MIRANDA, V. F. O.; MARTINS, V. G.; M., FURLAN, A. & BACCI M. J. R. Plant or Fungal Sequences? An Alternative Optimized PCR Protocol to Avoid ITS (nrDNA) Misamplification. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 53, n. 1, p. 141-152, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132010000100018>>

MIRANDA, V. F. O.; RIVADAVIA, F. Lentibulariaceae. In **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2012. <Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB008570>>. Acesso em 01/06/2011.

PANG X.; LIU C.; SHI L.; LIU R.; LIANG D.; LI H.; CHERNY S.S.; CHEN S. Utility of the *trnH-psbA* intergenic spacer region and its combinations as plant DNA barcodes: A meta-analysis. **PLoS ONE** v. 7, n. 11, p. 1-9, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0048833>>

PANG X.; LUO H.; SUN C. Assessing the potential of candidate DNA barcodes for identifying non-flowering seed plants. **Plant Biology (Stuttg)** v. 14, n. 5, p. 839-844, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0013102>>

SASS C.; LITTLE D.P.; STEVENSON D. W. E.; SPECHT C. D. DNA barcoding in the Cycadales: testing the potential of proposed barcoding markers for species identification of cycads. **PLoS ONE** v. 2, n. 11, p. 1-9, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0001154>>.

SCHÄFERHOFF, B.; FLEISCHMANN A.; FISCHER, E.; ALBACH, D.C.; BORSCH, T.; HEUBL, G.; MÜLLER, K.F. Towards resolving Lamiales relationships: insights from rapidly evolving chloroplast sequences. **BMC Evolutionary Biology** v. 10, n. 1, p. 352, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/1471-2148-10-352>>

SOLTIS D. E.; SMITH S. A.; CELLINESE N.; WURDACK K. J.; TANK D. C.; BROCKINGTON S. F.; REFULIO-RODRIGUEZ N. F.; WALKER J. B.; MOORE M. J.; CARLSWARD B. S.; BELL C. D.; LATVIS M.; CRAWLEY S.; BLACK C.; DIOUF D.; XI Z.; RUSHWORTH C. A.; GITZENDANNER M. A.; SYTSMA K. J.; QUI Y-L.; HILU K. W.; DAVIS C. C.; SANDERSON M. J.; BEAMAN R. S.; OLMSTEAD R. G.; JUDD W. S.; DONOGHUE M. J.; SOLTIS P. S. Angiosperm phylogeny: 17 genes, 640 taxa. **American Journal of Botany** v. 98, n. 4, p. 704-730, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3732/ajb.1000404>>

STARR J. R.; NACZI R. F.; CHOUINARD B. N. Plant DNA barcodes and species resolution in sedges (*Carex*, Cyperaceae). **Molecular Ecology and Resources** v. 9, p. 151-163, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02640.x>>

SWOFFORD D. **PAUP***. **Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods)**. Version 10. Sinauer, Sunderland, 2003. Disponível em: <<http://paup.csit.fsu.edu/>> Acesso em 14 de junho de 2013.

TAYLOR, P. **The Genus *Utricularia* – A Taxonomic Monograph**. Kew Bulletin Additional Series XIV. Royal Botanic Gardens, Kew: London, 1989.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acid Resources**. v. 22, p. 4673-4680, 1994. Disponível em: <<http://www.clustal.org/clustal2/>> Acesso em: 27 de dezembro de 2013.

WANG W.; WU Y.; YAN Y.; ERMAKOVA M.; KERSTETTER R.; MESSING, J. DNA barcoding of the Lemnaceae, a family of aquatic monocots. **BMC Plant Biology** v. 10, n. 205, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/1471-2229-10-205>>

WARD, R. D.; ZEMLAK, T. S.; INNES, B. H.; LAST, P. R.; HEBERT, P. D. N DNA barcoding Australia's fish species. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 360, n. 1462, p. 1847–1857, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2005.1716>>

WHITE T. J.; BRUNS T.; LEE S.; TAYLOR J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: **PCR Protocols: a guide to methods and applications**. (Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J., White T. J., eds). Academic Press: New York, USA, 1990. p.315–322.

CAPÍTULO 3 – Filogenia de *Utricularia* L. (Lentibulariaceae) baseada em quatro sequências do DNA cloroplastidial e nuclear.

Resumo – Foram realizadas análises filogenéticas de máxima parcimônia, máxima verossimilhança e análise bayesiana de três regiões de cloroplasto (*rbcL*, *matK* e *rpl20-rps12*), uma de núcleo (ITS) e matriz combinada. As árvores foram comparadas com as classificações morfológicas de Taylor (1989), dados geográficos e relacionados ao *habitat* a fim de solucionar clados não monofiléticos e incongruências de pesquisas anteriormente feitas para o grupo, além de levantar dados a respeito da evolução das espécies, formas de vida e sua biogeografia. As análises revelaram árvores altamente congruentes com altos índices de suporte dos clados. O presente trabalho apresenta a filogenia mais completa até a presente data, tanto pelo número de espécies, quanto pela amostragem diversa.

Palavras-chave: *Utricularia*, sistemática molecular, filogenia, Lentibulariaceae

Introdução

O gênero *Utricularia* L. agrega cerca de 220 espécies inseridas em 35 seções (sensu TAYLOR, 1989). É o maior gênero e o que mais amplamente se distribui em relação a todas outras plantas carnívoras (KRÓL *et al.*, 2012). São consideradas por pesquisadores como a planta com as armadilhas mais intrigantes do reino vegetal, chamadas de *utrículos*, dada à complexidade tanto estrutural quanto fisiológica dessas estruturas, ainda hoje não totalmente compreendidas (JUNIPER; ROBINS; JOEL, 1989). Os utrículos são estruturas foliares em forma de pequenas vesículas, as quais são ativas na captura de presas e secreção de enzimas (esterases, glicosidases, proteases, quitinases e proteases) para a digestão dos pequenos animais (KRÓL *et al.*, 2012; SIROVÁ *et al.*, 2003; 2009; ADAMEC, 2010).

O clado *Utricularia-Genlisea* é o mais derivado da família Lentibulariaceae, tendo *Pinguicula* como o mais basal (MÜLLER *et al.*, 2000; 2004). As espécies de *Utricularia* têm hábito herbáceo, e suas estruturas vegetativas não seguem os modelos tradicionais de classificação morfológica, pois não possuem delimitação definida entre os órgãos vegetais típicos (e.g. caules, folhas) além de não possuírem raízes verdadeiras (RUTISHAUSER; ISLER, 2001).

A classificação das espécies proposta por Taylor (1989) em sua monografia “O gênero *Utricularia* – uma monografia taxonômica” é baseada em caracteres morfológicos, principalmente das estruturas reprodutivas (cálice, corola e eixo floral) e características relacionadas às armadilhas (os utrículos). O gênero possui diverso polimorfismo estrutural intra e interespecífico, e espécies bastante similares morfológicamente, sendo muitas vezes erroneamente identificadas mesmo por especialistas (Figura 1A-I).

O grupo tem ganho interesse de muitos pesquisadores, já que recentemente se descobriu que o gênero possui espécies com os menores genomas já estudados entre as angiospermas, com tamanho comparáveis aos de bactérias (GREILHUBER *et al.*, 2006), além da grande variação de tamanho dentro dos gêneros e espécies, e altas taxas de mutação entre todos os compartimentos intracelulares (mitocôndria, cloroplasto e núcleo). Portanto, *Utricularia* pode servir como planta modelo no entendimento do processo de miniaturização de genomas (JOBSON *et al.*, 2003;

MULLER *et al.*, 2005; GREILHUBER *et al.*, 2006; IBARRA-LACLETTE *et al.*, 2011; 2013).

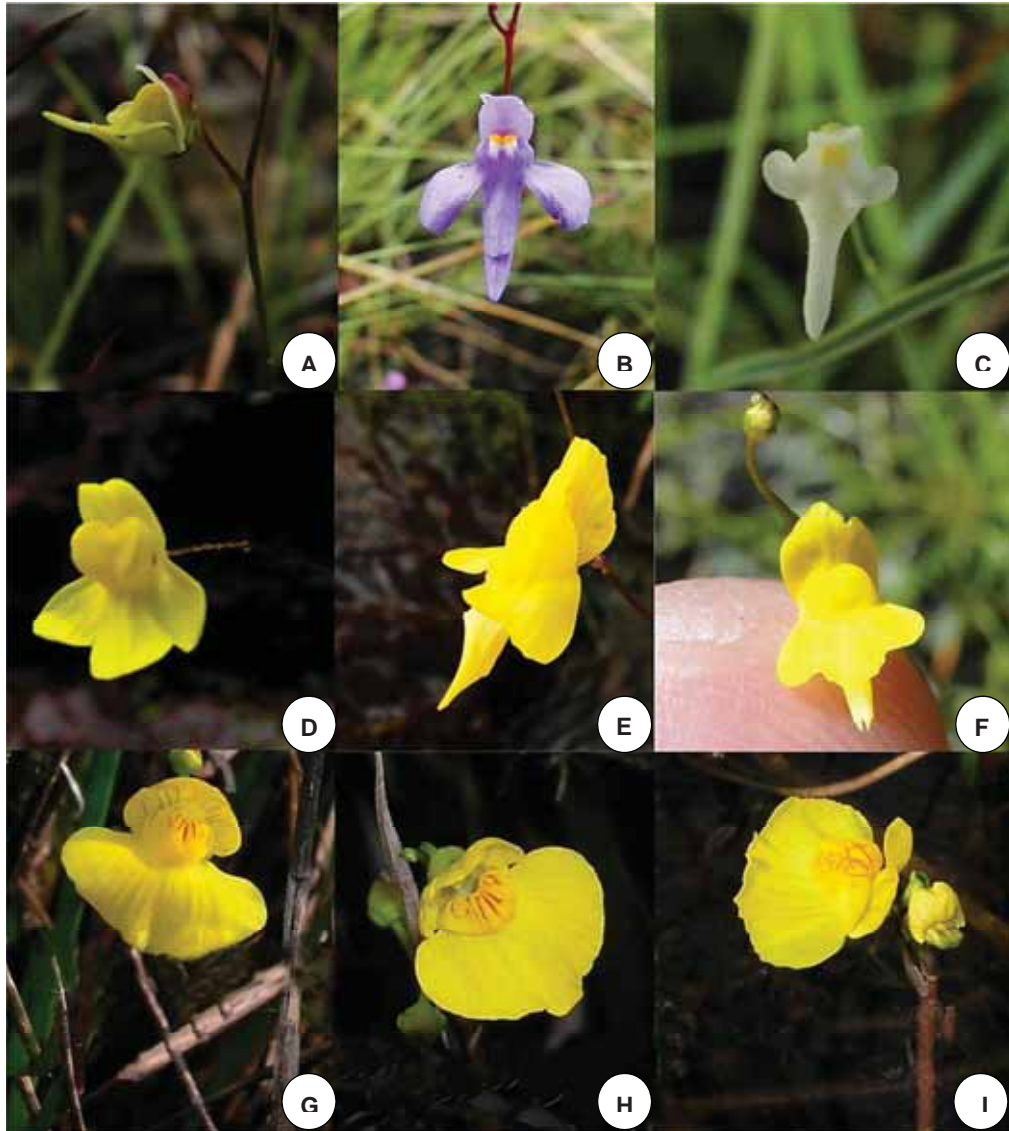


Figura 1. Espécies com morfologia controvertida de *Utricularia* estudadas. A. *U. amethystina* Salzm. ex A.St.-Hil. & Girard morfotipo “amarelo”; B. *U. amethystina* Salzm. ex A.St.-Hil. & Girard típica; C. *U. amethystina* Salzm. ex A.St.-Hil. & Girard morfotipo “branca”; D. *U. flaccida* A.DC.; E. *U. nervosa* G.Weber ex Benj.; F. *U. pusilla* Vahl; G. *U. intermedia* Hayne; H. *U. ochroleuca* Hartm.; I. *U. australis* R.Br. (Créditos A-F: nosso grupo (LSVP/FCAV/UNESP); G-I: J. Flisek < <http://www.bestcarnivorouplants.org/fotogalerie/sr151-.html>>).

Apesar das interessantes características genômicas, estudos sobre a filogenia do gênero são pífios. Há somente três estudos anteriores para a família, que

incluíram o uso das regiões *trnL-F* e *rps16* (JOBSON; ALBERT, 2002; REUT; JOBSON, 2010), *trnK* e o gene *matK* (MULLER *et al.*, 2005).

Os estudos filogenéticos prévios, de maneira geral, são congruentes com a delimitação seccional de Taylor (1989), entretanto há diversas inconsistências demonstradas pelas incongruências entre os clados, pela posição discordante de diversas espécies e a baixa resolução na forma de politomias.

Para tentar sanar essas questões, Müller e Borch (2006) utilizaram a abordagem de superárvores, contudo questões importantes, como por exemplo, a posição filogenética dos subgêneros *Polypompholyx* e *Utricularia* ainda não tiveram uma possível solução.

Neste estudo, são apresentados resultados de análises filogenéticas sem precedentes para *Utricularia*, baseadas em três sequências provenientes do genoma cloroplastidial (*rbcl*, *matK* e *rp120-rps12*) e região ITS do rDNA (ITS1 + 5,8S + ITS2). São também propostas hipóteses evolutivas para a irradiação das formas de vida nos diferentes *habitats* e também para a biogeografia dos grupos de espécies de *Utricularia*.

Materiais e Método

Foram coletados 115 espécimes representando 55 espécies de *Utricularia* no Brasil, Austrália, República Tcheca, Nicarágua, Estados Unidos, África, assim como proveniente de material em cultivo (Tabela 1). Também foram utilizadas sequências disponíveis no GenBank. As espécies dos gêneros *Genlisea* e *Pinguicula* foram utilizadas como grupo externo. Todos os espécimes coletados para esse estudo foram depositados no Herbário Jaboti da Unesp/FCAV de Jaboticabal (JABU).

Tabela 1. Lista de táxons, número de acesso do GenBank e número de espécies sequenciadas para o estudo (*n = número de amostras sequenciadas para a espécie).

| Táxon | <i>rbcL</i> | <i>matK</i> | <i>rpl20-rps12</i> | ITS |
|--|--|---|--------------------|-----|
| <i>Pinguicula</i> L. | | | | |
| <i>P. filifolia</i> subs <i>alba</i> C.Wright ex Griseb. | *5 | AF531786.1; *5 | *3 | *4 |
| <i>P. moranensis</i> Kunth | HQ384871.1 | | | |
| <i>P. vulgaris</i> L. | KC483449.1; KC483448.1 | | | |
| <i>P. agnata</i> Casper | AY128627 | AF531782.1 | | |
| <i>P. villosa</i> L. | AY128627; JN965727.1; JN965726.1 | | | |
| <i>P. lusitanica</i> L. | JN893189.1 | DQ010661.1 ; DQ010653.1 | | |
| <i>P. gypsicola</i> Brandegeee | AF482526.1 | | | |
| <i>P. grandiflora</i> Lam. | AF482525.1 | | | |
| <i>P. gracilis</i> Zamudio | AF482524.1 | | | |
| <i>P. ehlersiae</i> Speta & F.Fuchs | AF482523.1 | | | |
| <i>P. caerulea</i> Walter | LO1942.2 | | | |
| <i>P. antartica</i> Vahl. | | DQ010653.1 | | |
| <i>Genlisea</i> A.St.-Hil. | | | | |
| <i>G. aurea</i> A.St.-Hil. | AUSU01000124.1 | FN641614.1; FN641694.1; FN641695.1; | | |
| <i>G. guianensis</i> N.E.Br. | AY128631.1 | | | |
| <i>G. filiformis</i> A.St.-Hil. | | FN641691.1; FN641690.1 | *1 | |
| <i>G. violacea</i> A.St.-Hil. | | FN641717.1; FN641716.1 FN641711.1 | *3 | *5 |
| <i>G. lobata</i> Fromm | | | | |
| <i>G. repens</i> Benj. | | FN641689.1 | | |
| <i>Utricularia</i> L. | | | | |
| <i>U. adpressa</i> salzm. Ex A.St.-Hil. & Girard | AF482527.1 | AF531834.1 | | |
| <i>U. alpina</i> Jacq. | AF482528.1 | AF531822.1 | | |

| | | | | |
|--|---------------------------|---|-------------------|--------------|
| <i>U. amethystina</i> Salzm. ex A.St.-Hil. | *6 | *2 | *3 | *7 |
| <i>U. arenaria</i> A.DC. | *5 | *1 | *3 | *5 |
| <i>U. aurea</i> Lour | *1 | | *1 | *1 |
| <i>U. australis</i> R.Br. | JN893443.1; JN893264.1 | AF531823.1 | *1 | |
| <i>U. bifida</i> L. | *1 | *1 | *1 | *1 |
| <i>U. biloba</i> R.Br. | | FN773562.1 | | |
| <i>U. biovularioides</i> (Kuhlm.) P.Taylor | *1 | | | |
| <i>U. blanchetii</i> A.DC. | | AF531841.1 | | |
| <i>U. bremii</i> Herr ex Kölliker | *1 | *1 | *1 | *1 |
| <i>U. breviscapa</i> C.Wright ex Griseb. | *5 | *2 | *3 | *3 |
| <i>U. calycifida</i> Benj. | *2 | AF531824.1 | *3 | *2 |
| <i>U. costata</i> P.Taylor | AY128628.1 | | | |
| <i>U. cucullata</i> A.St.-Hil. & Girard | | | *2 | *5 |
| <i>U. dichotoma</i> Labill. | AY128632.1; *1 | AF531826.1 | *1 | *1 |
| <i>U. dimorphanta</i> Makino | *1 | | *1 | *1 |
| <i>U. flaccida</i> A.DC. | | AF531830.1 | | |
| <i>U. floridana</i> Nash | *1 | *1 | *1 | |
| <i>U. foliosa</i> L. | *4 | *2 | *2 | *5 |
| <i>U. foveolata</i> Edgew. | | AF531850.1 | | |
| <i>U. geminiloba</i> Benj. | | *1 | | *1 |
| <i>U. geminiscapa</i> Benj. | AF482529.1 | | *1 | EF5263 99 |
| <i>U. gibba</i> L. | L13190.2; *1 | | NC021449.1 ;*1 | |
| <i>U. hispida</i> Lam. | *5 | AF531829.1; *4 | | *4 |
| <i>U. humboldtii</i> Schomb. | | AF531836.1 | | |
| <i>U. hydrocarpa</i> Vahl. | *1 | *1 | *1 | *1 |
| <i>U. inflexa</i> Forssk. | *1 | | *1 | *1 |
| <i>U. intermedia</i> Hayne | JN966055.1; JN890776.1 | NJ966728.1; JN89429.1; JN89428.1; *1 | | |
| <i>U. juncea</i> Vahl | AY128632.1 | AF531832.1 | | |

| | | | | |
|---|--|----------------------------------|----|----|
| <i>U. laciniata</i> A.St.-Hil. & Girard | *3 | *1 | *1 | |
| <i>U. laterifolia</i> R.Br. | *1 | *1 | *1 | *1 |
| <i>U. laxa</i> A.St.-Hil & Girard | *1 | | | |
| <i>U. livida</i> E.Meyer | *1 | AF531833.1 | *1 | |
| <i>U. longifolia</i> Gardner | *2 | AF531835.1; | | *2 |
| <i>U. macrorhiza</i> LeConte | AF531835.1; *2 | *2 AF531835.1 | *1 | *1 |
| <i>U. menziesii</i> R.Br. | *1 | | | |
| <i>U. meyeri</i> Pilger | *1 | *1 | *1 | |
| <i>U. minor</i> L. | KC484305.1; KC584902.1; JN890553.1; JN891120.1;*1 | KC584950.1; JN894431.1; *1 | *1 | *1 |
| <i>U. monanthos</i> J.D.Hook | *1 | | | |
| <i>U. multifida</i> R.Br. | *1 | AF531848.1; *1 | *1 | |
| <i>U. nana</i> A.St.Hil. & Girard | *1 | AF531837.1; *1 | *1 | |
| <i>U. nelumbifolia</i> A.St.-Hil. & Girard | *1 | *1 | *1 | |
| <i>U. neottioides</i> A.St.-Hil. & Girard | *2 | *3 | *4 | *1 |
| <i>U. nephrophylla</i> Benj. | | AF531827.1 | | |
| <i>U. nervosa</i> G.Weber ex Benj. | *4 | *4 | *5 | *3 |
| <i>U. ochroleuca</i> R.Hartm. | *1 | | *1 | *1 |
| <i>U. olivacea</i> Wright ex Griseb | | AF531840.1 | | |
| <i>U. parthenopipes</i> P.Taylor | | AF531842.1 | | |
| <i>U. praelonga</i> A.St.-Hil | *2 | AF531843.1; *1 | | |
| <i>U. pubescens</i> Sm. | AY128629.1 | AF531844.1 | | |
| <i>U. purpurea</i> Walter | *2 | AF531845.1 | *2 | |
| <i>U. pusilla</i> Vahl | *1 | | | |
| <i>U. quelchii</i> N.E.Br. | | AF531846.1 | | |
| <i>U. radiata</i> Small | *1 | | *1 | |
| <i>U. reflexa</i> Oliv. | *2 | | *2 | |
| <i>U. reniformis</i> A.St.-Hil. | *4 | AF531828.1; *3 | *4 | *4 |
| <i>U. resupinata</i> B.D.Greene ex Bigelow | *1 | | *1 | *1 |

| | | | | |
|-------------------------------------|-------------------------------|--|----|----|
| <i>U. rigida</i> Benj. | | AF531838.1 | | |
| <i>U. sandersonii</i> Oliver | *2 | AF531847.1; *1 | *1 | *2 |
| <i>U. simulans</i> Pilger | *1 | | | |
| <i>U. spiralis</i> Sm. | | AF531851.1 | | |
| <i>U. stellaris</i> Linn. | *1 | | *1 | |
| <i>U. striata</i> LeConte ex Torrey | *1 | | *1 | |
| <i>U. stygia</i> G.Thor | JN890776.1; *1 | JN894027.1; *1 | *1 | |
| <i>U. subulata</i> L. | *6 | AF531821.1 | *4 | *2 |
| <i>U. tricolor</i> A.St.-Hil. | *4 | | *3 | *5 |
| <i>U. tridentata</i> Sylvén | *1 | AF531825.1 | *2 | |
| <i>U. triloba</i> Benj. | AF482530.1; *4 | | *4 | *2 |
| <i>U. uliginosa</i> Vahl | *1 | AF531849.1 | *1 | |
| <i>U. uniflora</i> R.Br. | *1 | | | |
| <i>U. volubilis</i> R.Br. | *1 | *1 | | *1 |
| <i>U. vulgaris</i> L. | JN 890809.1; JN890556.1;*1 | JN896195.1; JN89454.1; AF531831.1; *1 | *1 | *2 |
| <i>U. "sp. nova"</i> | *1 | | *1 | |

Extração de DNA e amplificação das regiões

A extração de DNA foi realizada de acordo com protocolo de Doyle & Doyle (1987) com modificações de Lodhi *et al.* (1994) a partir de tecido vegetal fresco, herborizado ou desidratado em sílica gel. Foram amplificados os genes do genoma de cloroplasto *rbcL* (utilizando os iniciadores *rbcLa-F*, *rbcLa-R*, LEVIN, 2003; KRESS;ERICKSON, 2007), *matK* (3F-KIM e 1R-KIM; Kim, em preparação), o espaçador intergênico *rpl20-rps12* (*rpl20* e 5'-*rps12*; HAMILTON, 1999) e a região ITS (ITS4 e ITS5; WHITE *et al.*, 1990) do rDNA.

As reações de amplificação foram realizadas com o emprego de reagentes *Dream Taq* DNA polimerase (Fermentas), contendo 20mM de MgCl₂, nucleotídeos, solução tampão, incluindo-se nas reações os adjuvantes dimetilsulfóxido (DMSO), quando necessário, segundo recomendações de Miranda *et al.* (2010).

A eletroforese foi realizada a partir de gel de agarose a 1,6% e precipitado com isopropanol 100% seguido de lavagem com etanol 70%.

Sequenciamento e alinhamento

O sequenciamento foi realizado na “facility” CREBIO - Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica da UNESP/FCAV câmpus Jaboticabal (<http://www.fcav.unesp.br/crebio>). Todos os cromatogramas obtidos a partir das sequências foram analisados para a identificação e possível correção de erros de leitura com o programa BioEdit versão 7.0.9.0 (HALL, 1999).

O alinhamento das sequências foi realizado com o programa MAFFT versão 7 (KATO, 2013), com a aplicação da estratégia automática (FFT-NS-1, FFT-NS-2, FFT-NS-i ou L-INS-i) e com penalidade *default* de GAPs igual a 1,53. Quando necessário, foram realizados ajustes manuais com o programa BioEdit versão 7.0.9.0 (HALL, 1999). Para a matriz das sequências da região ITS, o aplicativo GBLOCKS versão 0.91b (CASTRESANA, 2000; TALAVERA; CASTRESANA, 2007) foi utilizado para remover as sequências dos sítios menos conservados (com excesso de ruído). Para a matriz ITS, devido à presença de sequências com baixa identidade às demais do alinhamento (algumas com valores par-a-par inferiores a 40%), o aplicativo MaxAlign versão 1.1 Server (GOUVEIA-OLIVEIRA *et al.*, 2007) foi

utilizado para identificar e remover as sequências que causavam maior perturbação no alinhamento (aquelas com menores valores de identidade par-a-par).

Análises filogenéticas – máxima parcimônia, máxima verossimilhança e bayesiana

Para o enraizamento dos cladogramas e polarização das transformações, foram empregadas como grupo-externo espécies de *Genlisea* e *Pinguicula* (Tabela 1). As análises de máxima parcimônia (MP) foram realizadas com o aplicativo PAUP* versão 4b10 (“Phylogenetic Analysis Using Parsimony”) (SWOFFORD, 2002). As árvores mais parcimoniosas foram encontradas por meio de buscas heurísticas com adição aleatória de terminais e 2.000 réplicas (“branching swapping” com o algoritmo “NNI – Nearest Neighbor Interchange”). O suporte dos clados foi avaliado com índice de decaimento (*decay index*; Bremer, 1988) e “bootstrap” (FELSENSTEIN, 1985) com 2.000 pseudorréplicas (pseudomatrizes) com buscas heurísticas de 1.000 réplicas [com adição aleatória de terminais com o algoritmo NNI para “branching swapping”]. Os índices de decaimento (*decay*) foram calculados com o aplicativo TNT versão 1.1 (GOLOBOFF *et al.*, 2003), com buscas baseadas em “New Technology Search” com “Ratchet” de 2.000 interações. Foram avaliadas as árvores sub-ótimas com valores iguais ou inferiores a 100 passos adicionais em relação à(s) árvore(s) mais parcimoniosa(s). Para as análises probabilísticas, foram escolhidos os melhores modelos evolutivos (“best-of-fit”) com o aplicativo jModelTest versão 2.1.1 (DARRIBA *et al.*, 2012) em infraestrutura nas nuvens. Assim, o modelo “best-of-fit” de substituições de DNA foi avaliado para cada matriz de dados (sequências individuais e combinadas) com o critério “Akaike information criterion” corrigido (AICc; AKAIKE, 1973; BURNHAM; ANDERSON, 2002) para estimar os parâmetros. Foram realizadas análises de máxima verossimilhança (ML) e bayesiana (“posterior probabilities”; PP) com o algoritmo “Metropolis-coupled Markov chain Monte Carlo” (MCMCMC; GEYER, 1991) para estimar as hipóteses filogenéticas para cada matriz de dados. Foram realizadas análises de máxima verossimilhança (ML) com o programa RAxML BlackBox (STAMATAKIS *et al.*, 2008). Para as buscas das melhores árvores, foi empregado o modelo GTRGAMMA+I e para o “bootstrapping” foi aplicada a opção “halt automatically”. Os valores de “bootstrap” para ML foram identificados com a análise de todos os

cladogramas amostrados com o emprego do aplicativo PAUP versão 4b10. As análises de MCMCMC foram realizadas com o emprego do MrBayes versão 3.2.2 (HUELSENBECK; RONQUIST, 2001) para cada matriz com 9×10^6 gerações amostradas a cada 100 gerações, usando os parâmetros padrão do aplicativo. Para cada análise duas rodagens ($nruns=2$) com quatro cadeias ($nchains=4$) foram realizadas iniciando-se de árvores aleatórias. Foram descartadas amostras iniciais como “burn-in” após o alcance da “stationary” (estimado em 25% das árvores amostradas). As probabilidades posteriores (PP) para cada clado foram obtidas por meio da comparação e congruência das análises individuais com a análise de uma árvore de consenso de maioria (>50%) realizada com o auxílio do programa PAUP versão 4b10. As análises com os aplicativos RAxML e MrBayes foram realizadas nas nuvens com a plataforma CIPRES (MILLER *et al.*, 2010). Os cladogramas (exceto os com as otimizações de estados ancestrais) foram desenhados com o programa TreeGraph2 versão 2.0.52-347 beta (STÖVER; MÜLLER, 2010). Os cladogramas com a otimização dos dados de distribuição geográfica e formas de vida (hábitos) das espécies e a inferência dos estados ancestrais foram construídos com o aplicativo Mesquite versão 2.75 (Maddison; Maddison, 2011). O cloudograma (*cloudgram*) foi calculado a partir das árvores amostradas com a análise bayesiana para a matriz de sequências combinadas (análise de evidência total) e desenhado com o aplicativo DensiTree versão 2.1.11 (BOUCKAERT, 2010).

Resultados

As características das sequências estão resumidas na tabela 2 que inclui o tamanho do alinhamento, número de caracteres variáveis, número de caracteres parcimoniosamente informativos, número de clados com índices maiores do que 50%, respectivamente. A matriz do gene *rbcL* resultou 608 nucleotídeos alinhados, os quais 128 são variáveis, 101 são parcimoniosamente informativos, possui porcentagem de clados com índices maiores do que 50% de 26%, 30% e 36%, para máxima parcimônia (MP), máxima verossimilhança (ML) e análise bayesiana (PP). Para o gene *matK*, o alinhamento teve 960pb de tamanho, com 582 sítios variáveis, dos quais 471 são parcimoniosamente informativos, com suporte maior do que 50%

há 53%, 59% e 61% clados na análise de MP, ML e PP, respectivamente. Para o espaçador intergênico *rpl20-rps12*, o alinhamento foi de 1.096 caracteres, com 498 sítios variáveis, 345 parcimoniosamente informativos. Clados com índices maiores do que 50% incluem 45% para MP, 58% para ML e 64% para PP.

Para a região ITS, foi aplicado o programa GBlocks (CASTRESANA, 2000; TALAVERA; CASTRESANA, 2007) com o intuito de localizar e excluir os sítios mais polimórficos que causassem maior ruído (gerando assim excesso de homoplasia). No entanto, dos 1.091 pares de bases de alinhamento, 844 foram excluídos restando menos de 23% dos sítios da matriz original. Assim, ficou decidido manter matriz original com todos com todos os pares de bases (1.091 pb).

Assim, com o objetivo de identificar as sequências da matriz que estivessem causando maior perturbação na análise, ou seja, com identidade excessivamente baixa gerando assim excesso de alinhamentos nucleotídicos duvidosos, foi empregado o programa MaxAlign (GOUVEIA-OLIVEIRA *et al.*, 2007). Como resultado, foram excluídas 27 sequências da matriz original: *Pinguicula crystallina* (DQ438082.1), *P. filifolia* (AB212104.1), *P. lusitanica* (DQ222960.1), *P. primuliflora* (DQ222964.1), *P. vulgaris* (DQ438093.1), *Genlisea hispidula* (AB212112.1), *G. lobata* (AB212113.1), *G. pallida* (AB212114.1), *G. repens* (AB212116.1), *G. violacea* (AB212116.1), *Utricularia alpina* (AB212117.1), *U. bifida* (KF016005.1), *U. biovularioides*, *U. furcellata* (KF016006.1), *U. intermedia* (DQ225109.1), *U. laxa*, *U. meyeri*, *U. minor* (AB212118.1), *U. multifida*, *U. nana*, *U. nelumbifolia*, *U. neottioides* (amostra 16404), *U. purpurea* (duas amostras), *U. reflexa*, *U. reniformis* (DQ225108.1), *U. striata* e *U. striatula* (KF016004.1) (sequências sem códigos de acesso NCBI foram produzidas no presente estudo). Dessa forma, para a região do rDNA ITS (ITS1 + 5,8S + ITS2) foram obtidos 1.091 caracteres alinhados, 818 variáveis, dos quais 753 são parcimoniosamente informativos. Clados com valores de suporte maiores do que 50% são de 44% para MP, 51% de ML e 65% para PP (Tabela 2).

Na análise combinada obtiveram-se 3.793 nucleotídeos com 1.825 sítios variáveis, dos quais 1.440 são parcimoniosamente informativos. A porcentagem de clados com suporte é de 85%, 90% e 90%, para MP, ML e PP, respectivamente (Tabela 2).

O modelo “best-of-fit” obtido para todas as matrizes foi o GTR+G+I, exceto para a do *rbcl* que foi o modelo K80+I+G e *matK* que foi o GTR+G.

As topologias das árvores oriundas de cada região e dados combinados foram processados com o emprego de todos os métodos descritos, entretanto, para mostrar as relações filogenéticas, foi escolhida a árvore de consenso da análise bayesiana, adotando-se assim uma postura mais conservadora para a proposição das hipóteses evolutivas.

Quando analisadas e comparadas as hipóteses filogenéticas obtidas com os diferentes marcadores moleculares (*rbcl*, *matK*, *rpl20-rps12*, ITS e combinada), mesmo provenientes de compartimentos genômicos distintos (cloroplasto e núcleo), a congruência entre as diferentes topologias foi consideravelmente elevada (Figuras 2-7), sendo a maioria das incongruências encontradas de clados com poucas espécies e não houve conflito em relação aos gêneros ou subgêneros.

Tabela 2. Matrizes e estatísticas dos alinhamentos e cladogramas inferidas por máxima parcimônia (AMPs=árvores mais parcimoniosas; *boot* ML=*bootstrap* das análises de máxima verossimilhança; *boot* MP=*bootstrap* das análises de máxima parcimônia; IC=índice de consistência dos cladogramas; IR=índice de retenção dos cladogramas; PP=probabilidade posterior/ análise bayesiana).

| Matriz | Genoma | Terminais (n) | Tamanho do alinhamento (pb) | Sítios variáveis (pb) | Sítios parcimoniosamente informativos (pb) | Clados com suporte $\geq 50\%$ [n (%)]* | | | AMPs (n) | IC das AMPs | IR das AMPs |
|--------------------|-----------------------|---------------|-----------------------------|-----------------------|--|--|----------------|---------|----------|-------------|-------------|
| | | | | | | [n (%)]* | | | | | |
| | | | | | | <i>boot</i> MP | <i>boot</i> ML | PP | | | |
| <i>rbcl</i> | Cloroplasto | 153 | 608 | 128 | 101 | 40 (26) | 46 (30) | 54 (36) | 8 | 0,53 | 0,92 |
| <i>matK</i> | Cloroplasto | 119 | 960 | 582 | 471 | 63 (53) | 70 (59) | 72 (61) | 5 | 0,57 | 0,89 |
| <i>rpl20-rps12</i> | Cloroplasto | 79 | 1.096 | 498 | 345 | 35 (45) | 45 (58) | 50 (64) | 4 | 0,65 | 0,90 |
| ITS | Nuclear | 78 | 1.091 | 818 | 753 | 34 (44) | 39 (51) | 50 (65) | 4 | 0,43 | 0,83 |
| Combinada | Cloroplasto + Nuclear | 41 | 3.793 | 1.825 | 1.440 | 34 (85) | 36 (90) | 36 (90) | 1 | 0,55 | 0,75 |

* A porcentagem dos clados (%) foi calculada sobre o número total de clados possíveis para o cladogramas (= n terminais - 1).

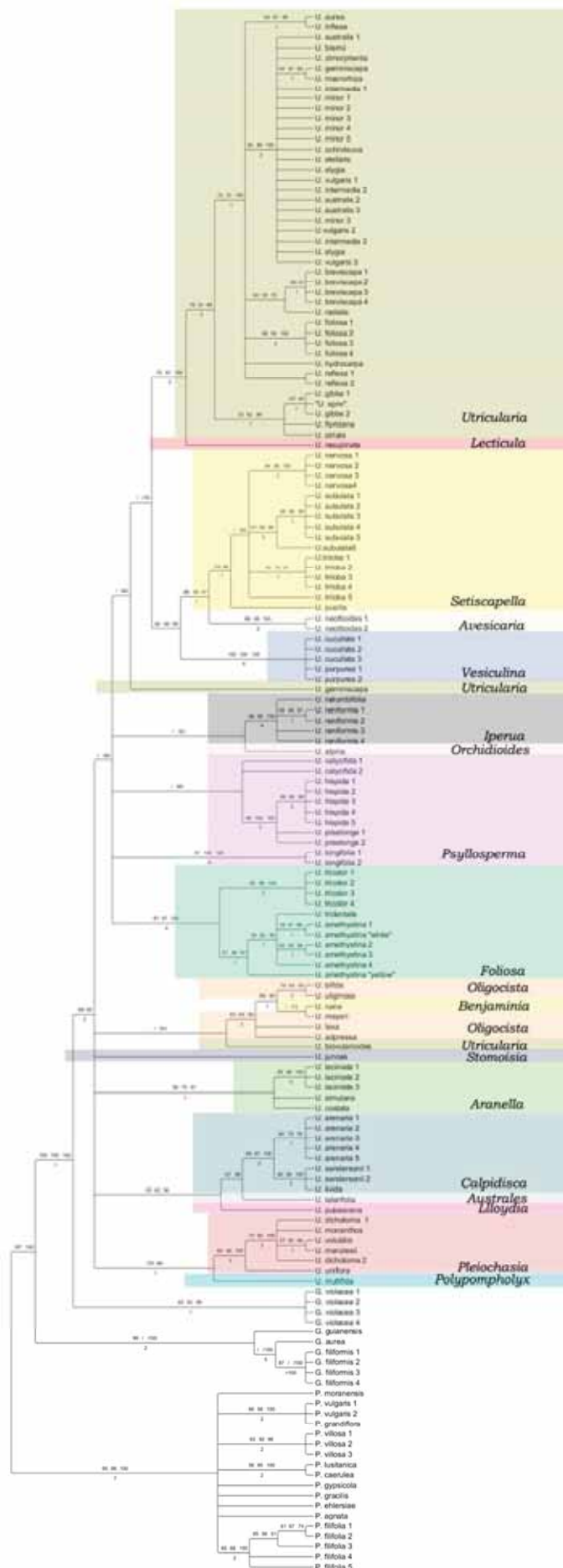


Figura 2. Filograma de análise bayesiana para Lentibulariaceae baseada no gene *rbcL* (cpDNA). (Valores acima dos ramos: *bootstrap* de máxima parcimônia/ *bootstrap* de máxima verossimilhança / probabilidade posterior; abaixo dos ramos: decay; *Pinguicula* e *Genlisea* empregados como grupo externo.)

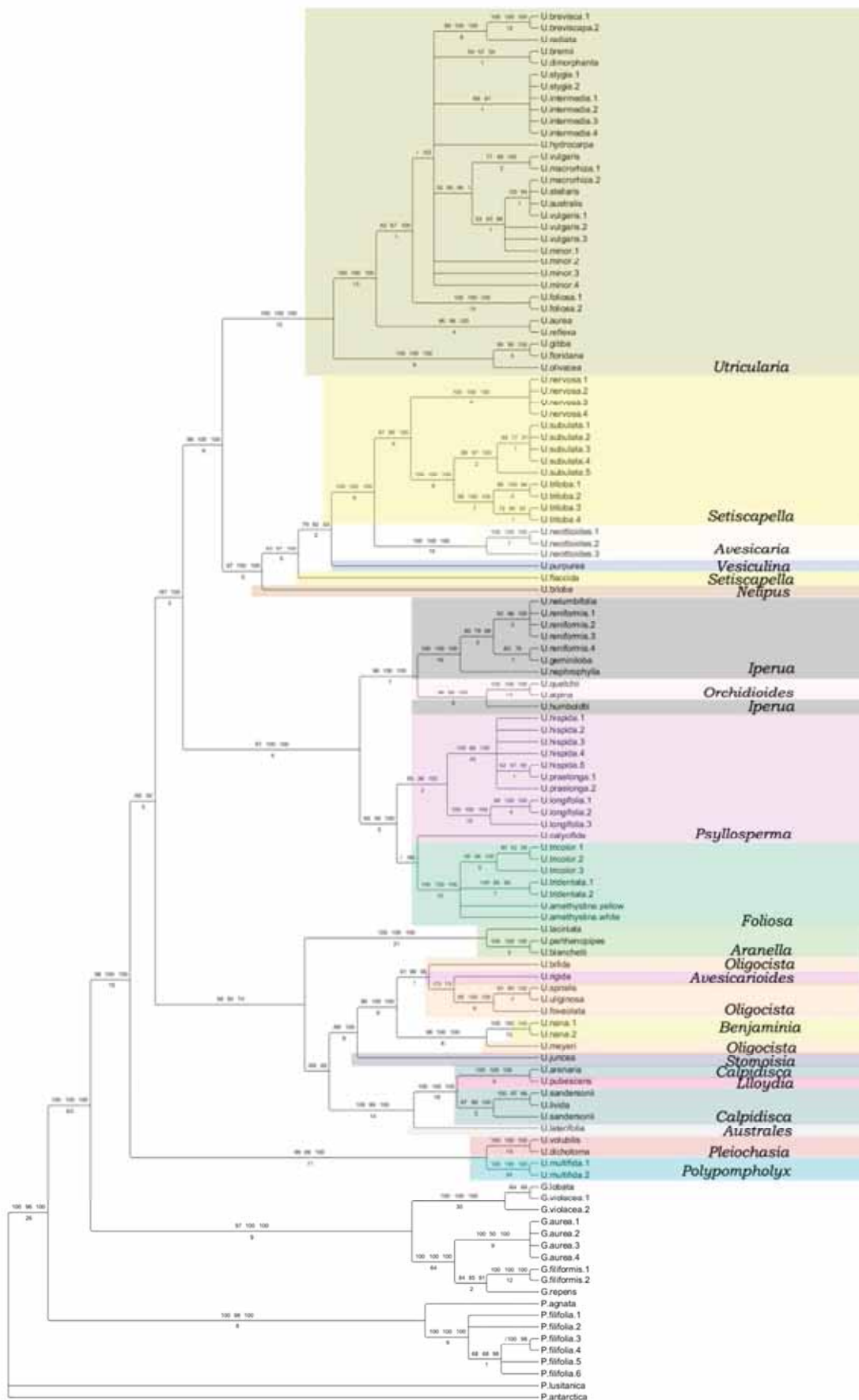


Figura 3. Filograma de análise bayesiana para Lentibulariaceae baseada no gene *matK* (cpDNA). (Valores acima dos ramos: *bootstrap* de máxima parcimônia/*bootstrap* de máxima verossimilhança / probabilidade posterior; abaixo dos ramos: decay; *Pinguicula* e *Genlisea* empregados como grupo externo.)

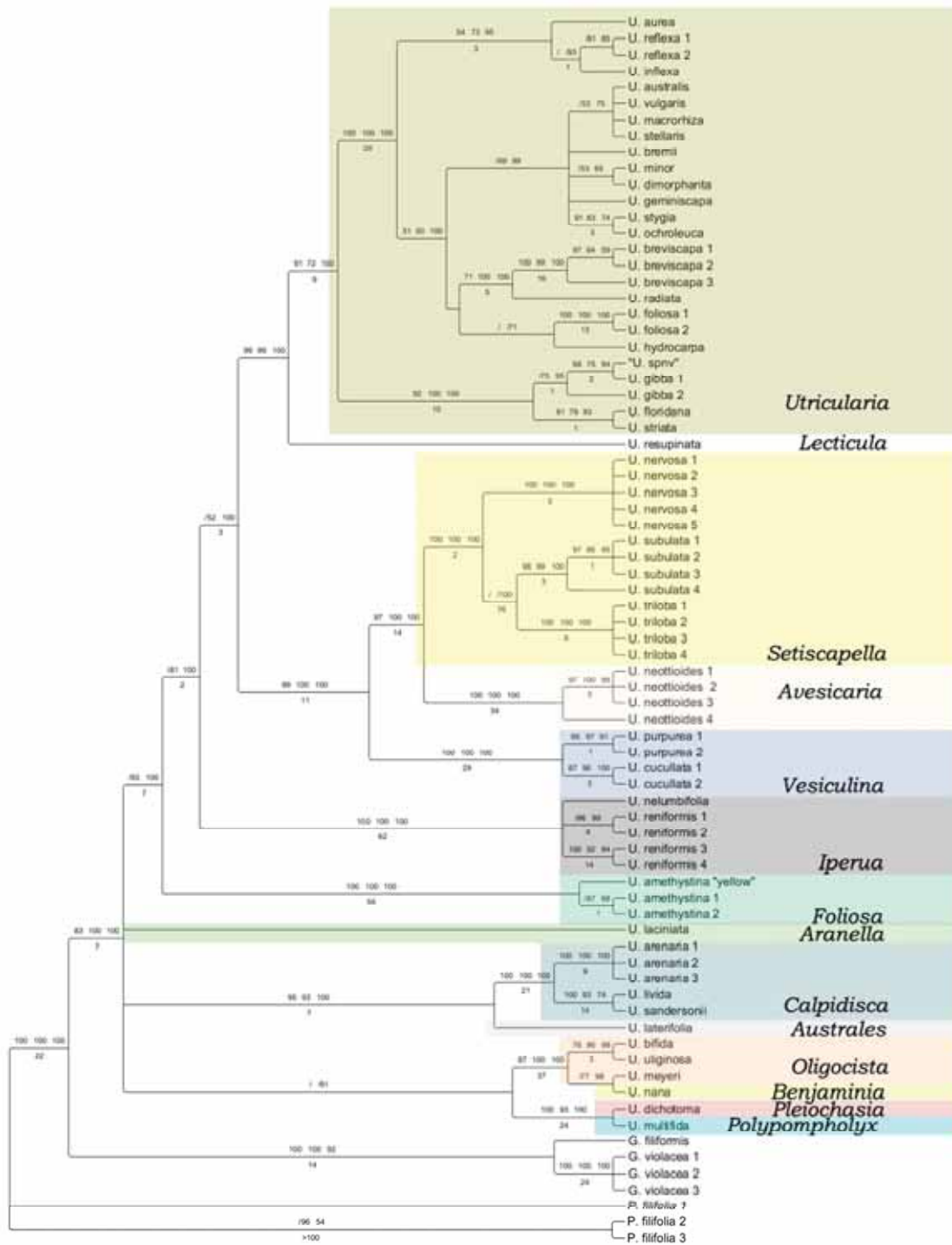


Figura 4. Filograma de análise bayesiana para Lentibulariaceae baseada no espaçador *rpl20-rps12* (cpDNA). (Valores acima dos ramos: *bootstrap* de máxima parcimônia/ *bootstrap* de máxima verossimilhança / probabilidade posterior; abaixo dos ramos: decay; *Pinguicula* e *Genlisea* empregados como grupo externo.)

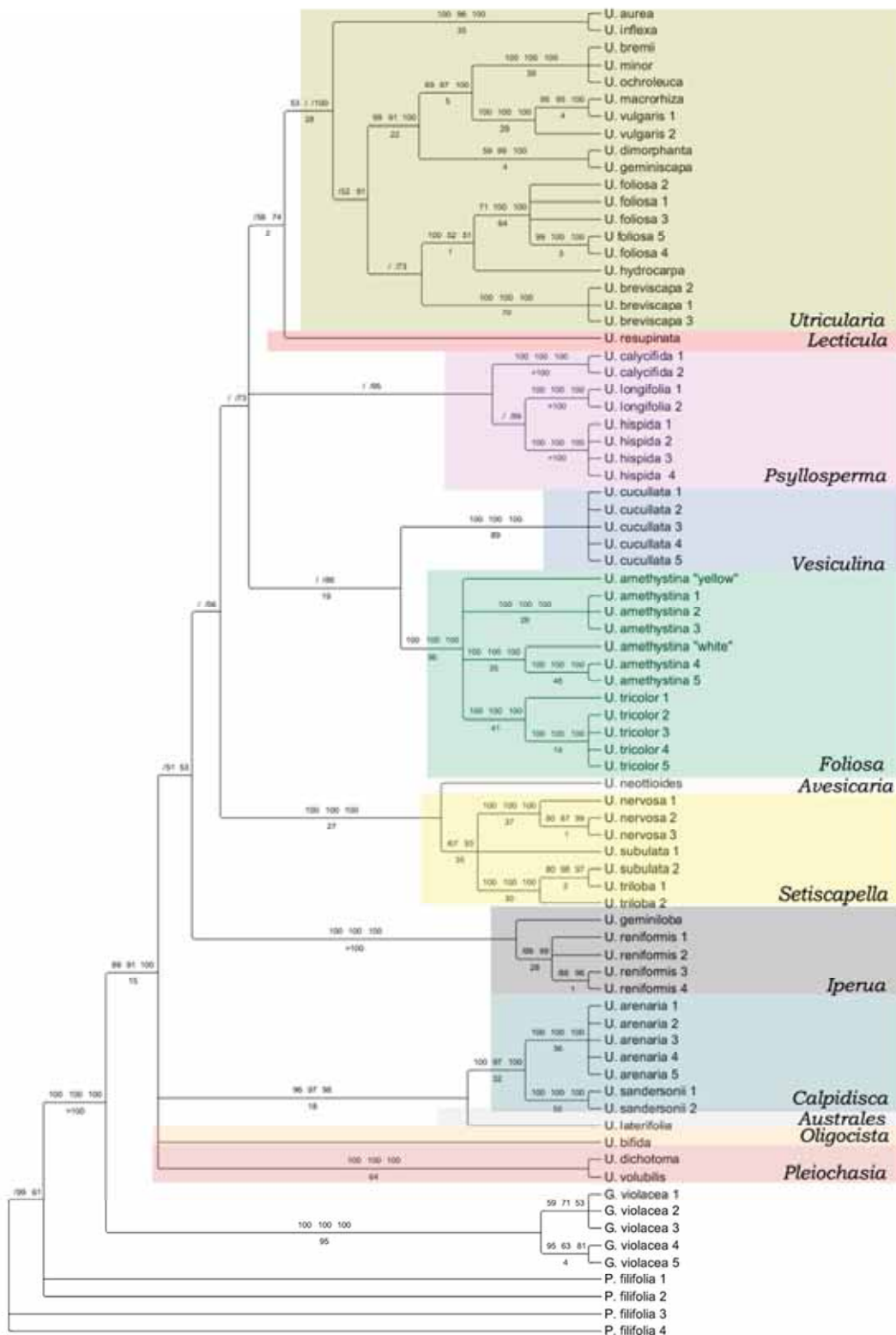


Figura 5. Filograma de análise bayesiana para Lentibulariaceae baseada na região ITS (rDNA nuclear). (Valores acima dos ramos: *bootstrap* de máxima parcimônia/*bootstrap* de máxima verossimilhança / probabilidade posterior; abaixo dos ramos: decay; *Pinguicula* e *Genlisea* empregados como grupo externo.)

Discussão

Características evolutivas e filogenéticas das diferentes sequências de DNA

A amostragem realizada com diversas sequências de DNA, tanto de compartimentos genômicos distintos (cloroplasto e núcleo) quanto de funções distintas no genoma [espaçadores (*rpl20-rps12*, ITS1, ITS2) vs. genes codificadores (*rbcl*, *matK*) vs. genes estruturais (5,8S)], permitiu avaliar as diferentes idiosincrasias intrínsecas a cada marcador em virtude de sua natureza e história evolutiva. Os genes codificadores *rbcl* e *matK* apresentaram uma proporção inferior de sítios variáveis (sendo o *rbcl* consideravelmente inferior ao *matK* nesse quesito), dada à importância metabólica para os mesmos já que codificam enzimas essenciais ao organismo, enquanto que quase 80% dos sítios da região ITS foram variáveis (Tabela 2), resultantes, principalmente dos espaçadores ITS1 e ITS2.

Quanto aos suportes obtidos para os cladogramas, o gene *rbcl* foi o que resultou em menor proporção de clados com suporte superior a 50%, sendo que a análise combinada, por outro lado, obteve proporções de clados com esse suporte superiores a 85% (até 90%). Entretanto, apesar desse resultado aparentemente negativo para o gene *rbcl*, é importante ressaltar que o mesmo obteve o maior valor de índice de retenção (IR) para os cladogramas obtidos, resultado indicativo de que essa sequência foi de importância por trazer sinapomorfias (mesmo que homoplásicas) mais pretéritas para o suporte de grandes clados. Quanto aos índices de consistências, os valores foram relativamente próximos para as diferentes sequências (entre 43 e 65%), destacando a região ITS com o menor valor (0,43%; Tabela 2). Entretanto isso era esperado, pois a região ITS abriga dois espaçadores intergênicos (ITS1 e ITS2) que ocupam a maior parte dessa sequência (HILLIS; DIXON, 1991).

De acordo com as hipóteses filogenéticas obtidas (Figuras 2-5), a maioria dos resultados corroboram as delimitações seccionais, baseados somente em características morfológicas, propostas por Taylor (1989).

Os filogramas estimados, usando os métodos de máxima parcimônia (MP), máxima verossimilhança (ML), de probabilidade posterior (PP) e índice de decay (D), revelam que a monofilia do gênero é fortemente suportada tanto para sequências de

cpDNA quanto para de rDNA por todas as árvores (>80 MP, 100 ML e 100 PP; Figuras 2-5). Os resultados suportam que o subgênero *Polypompholyx* é mais basal e que *Utricularia* e *Bivalvaria* são grupos irmãos (Figura 2-6). Em estudos anteriores Jobson *et al.* (2003) encontraram forte suporte para parafilía dos subgêneros *Utricularia-Bivalvaria*, com o subgênero *Polypompholyx* como grupo irmão, no entanto, os dados de *trnK* de Müller *et al.* (2005) sugerem que o subgênero *Polypompholyx* seja incluído no subgênero *Bivalvaria*.

Relações filogenéticas entre os subgêneros e as seções de Utricularia

As relações de parentesco no interior do subgênero *Polypompholyx* ainda são motivam discussão. Trabalhos recentes de Reut e Jobson (2010) indicam que o subgênero é polifilético, contudo, apesar da baixa amostragem, dados desta pesquisa indicam que *Pleiochasia* forma dois clados monofiléticos que constituem grupo irmão com a seção *Polypompholyx* com suporte para *rbcl* (70ML; 100PP; 1D; Figura 2), *matK* (99MP; 99ML; 100PP; 11D; Figura 3), *rpl20-rps12* (100MP; 93ML; 100PP; 24D; Figura 4) e concatenada (100MP; 100ML; 100PP; Figura 6). Esses resultados corroboram com os dados da seção *Pleiochasia*, a qual poderia ser separada em dois clados distintos a partir da distribuição geográfica das espécies, sendo todas as espécies endêmicas da *Austrália*, exceto *U. dichotoma*, morfologia das armadilhas, a posição da boca do utrículo, e características relacionadas às flores, como cálice com quatro lobos (REUT; JOBSON, 2010).

O subgênero *Bivalvaria* foi estabelecido por Kurz (1874) juntamente com as seções *Oligocista*, *Phyllaria* (nomes ainda aceitos de acordo com Taylor, 1989) e *Lentibularia* (seção *Utricularia* em Taylor, 1989). Devido à monofilia encontrada nos trabalhos de filogenia o subgênero *Bivalvaria* foi reconsiderado (MÜLLER; BORSCH, 2005; MÜLLER *et al.*, 2006) com a inclusão da seção *Oligocista*. A espécie tipo *U. uliginosa* foi designada somente em Müller e Borsch (2005), já que Kurz (1874) não escolheu uma espécie tipo. De acordo com as filogenias propostas de Müller e Borsch (2005), Müller *et al.* (2006) e Reut e Jobson (2010), o subgênero *Bivalvaria* inclui as seções *Oligocista*, *Benjaminia*, *Avesicarioides*, *Stomoisia*, *Aranella*, *Calpidisca*, *Lloydia*, *Australes*, *Nigrescentes*, *Phyllaria* e *Eiskide*.

Dados referentes a todas as regiões estudadas e à matriz combinada revelam que a seção *Australes* é mais basal em relação à seção *Calpidisca* (*rbcL* (70ML; 89PP; 1D; Figura 2); *matK* (100MP; 99ML; 100PP; 14D; Figura 3); *rpl20-rps12* (95MP; 93ML; 100PP; 7D; Figura 4); ITS (96MP; 97ML; 98PP; 18D; Figura 5); combinada (100MP; 100ML; 100PP; Figura 6)). Contudo, para as filogenias previamente publicadas não há resolução entre as seções *Calpidisca*, *Lloydia* e *Australes*.

As hipóteses apresentadas neste trabalho indicam que ainda que para *rbcL* a seção *Lloydia* apareça como grupo mais basal em relação à seção *Australes* + *Calpidisca*, o suporte é baixo (53MP; 62ML; 56PP; Figura 2); já a região *matK* forma grupo de alto suporte parafilético à seção *Calpidisca* (100MP; 100ML; 100PP; 18D; Figura 3).

Com os resultados apresentados nesta pesquisa, sugere-se a inclusão de *U. pubescens* na seção *Calpidisca* (Figura 2-3). De acordo com o sistema de Taylor (1989), *Utricularia pubescens* faz parte da seção monotípica *Lloydia* a partir de características diagnósticas como as peculiares folhas peltadas, padrões morfológicos das brácteas, bractéolas e sementes. Entretanto Taylor (1989) também menciona que todas outras características morfológicas da planta, principalmente relacionada à morfologia dos utrículos, posicionam o grupo na seção *Calpidisca* (TAYLOR, 1989), corroborando os resultados dos dados moleculares e inclusão do gênero no grupo.

Os trabalhos de Muller *et al.* (2006) afirmam que se fossem inseridas mais espécies da seção *Aranella* nas análises filogenéticas, provavelmente a seção se revelaria polifilética. Contudo, os dados desta pesquisa indicam que *Aranella* é grupo irmão de todas as outras seções amostradas no subgênero *Bivalvaria* (Figura 3). O presente trabalho também sugere que seja incluída a seção *Australes* no subgênero, corroborando dados de Jobson *et al.* (2003) e Reut e Jobson (2010).

A seção *Benjaminia* é monotípica e inclui a espécie *U. nana*. Estudos filogenéticos revelam incongruência sobre sua posição. Jobson *et al.* (2003) afirmam que a seção *Oligocista* é parafilética, pois inclui a seção *Benjaminia*. Contudo, Müller *et al.* (2005) e Müller e Borsch (2006) posicionam o grupo como irmão de *Oligocista* + *Avesicarioides*. Os dados apresentados por esse estudo alicerçam a hipótese de

Jobson *et al.* (2003) para todas as regiões com alto suporte [*rbcL* (63MP;94ML; 90PP;2D); *matK* (96MP;100ML;100PP;9D); *rpl20-rps12* (87MP; 100ML; 100PP; 37D)], inclusive para a análise combinada (100MP;100ML;100PP). Ademais, Komiya (1973) propôs um novo subgênero denominado *Simplicirostra* contendo as seções *Orchidioides* DC., *Stomoisia* (Raf.) Komiya, que em Taylor (1989) é a seção *Oligocista*, e a seção *Avesicarioides* Komiya. Fundamentado principalmente nos caracteres relacionados ao hábito, armadilhas, e morfologia das características reprodutivas. Apesar de claramente não haver relação com a seção *Orchidioides* (Figura 3), nas análises realizadas para a região *matK*, a seção *Oligocista* também é parafilética à seção *Avesicarioides*, representada pela espécie *U. rigida* (espécie tipo para a seção), com altos valores de suporte para o clado *Oligocista* (61MP, 99ML, 95PP, 1D), apesar da relação com baixo suporte do clado interno.

Por definição de Muller *et al.* (2004), as seções restantes das demais já discutidas dentro do gênero *Utricularia* pertencem ao subgênero *Utricularia*. De acordo com os dados existentes nesta pesquisa para todas as regiões (Figuras 2-5) e para matriz combinada (Figura 6), o subgênero é monofilético [*rbcL* (60PP); *matK* (89ML;100PP;2D); *rpl20-rps12* (93ML; 100PP; 7D) ITS (51ML;53PP); combinada (100MP;97ML;87PP)].

Para as regiões cloroplastidiais estudadas (Figuras 2-5), *U. triloba* e *U. subulata* exibem serem grupos irmãos [*matK* (100MP; 100ML; 100PP; 5D); *rpl20-rps12* (100PP)], contudo para a região ITS as espécies apresentam parafilía entre com alto suporte (100MP;100ML;100PP;30D). As espécies são morfologicamente semelhantes separadas por poucas características morfológicas, como cálice com nervuras proeminente. Isso possivelmente ocorre devido a sua recente cladogênese, aliada a um possível processo de coalescência e introgressão, já que essa relação é só observada quando analisada a região ITS que provém de herança biparental. Ademais, as flores são muito similares entre si, além das populações ocorrem em simpatria, não sendo difícil supor a possibilidade de hibridização entre as duas espécies já que a os polinizadores de *Utricularia* geralmente não são específicos (HOBBAHN; KÜCHMEISTER; POREMBSKI, 2006; CLIVATI *et al.*, 2013).

Os resultados aqui apresentados indicam que, para a região ITS, as espécies da seção *Psyllosperma* amostradas formam um grupo monofilético, contudo os cladogramas possuem baixo suporte (Figura 5), coerente com as análises feitas por Taylor (1989). Para a região *matK* há incongruência entre os dados, já que *Psyllosperma* forma um clado parafilético, uma vez que a espécie *U. calycifida* (*Psyllosperma*) aparece no clado das espécies da seção *Foliosa* (Figura 3), também com baixo suporte, corroborando dados de Müller *et al.* (2004). Portanto a relação entre as seções ainda permanecem obscuras.

A seção *Iperua* é parafilética à seção *Orchidioides* (Figura 3) para o gene *matK*, regiões em que ambas as seções foram amostradas, corroborando com dados de filogenias anteriores (MULLER *et al.*, 2004; MULLER; BORSCH, 2005), sugerindo que a seção *Orchidioides* seja incluída na seção *Iperua*. De acordo com Taylor (1989), para as características morfológicas a afinidade entre as seções não é clara, contudo o cálice e o padrão morfológico dos utrículos são similares, corroborando com os dados encontrados.

As filogenias até hoje construídas sugerem que a seção *Vesiculina* esteja proximamente relacionada com *Setiscapella*. Contudo, para os dados apresentados (Figuras 2-4), a seção *Vesiculina* é dada como grupo irmão de *Setiscapella* + *Avesicaria* em nas regiões em que a seção foi amostrada (*rbcL* (50MP;60ML;96PP); *rpl20-rps12* (99MP;100ML;100PP;11D)), exceto para a região ITS em que a seção *Vesiculina* forma grupo irmão com *Foliosa*, contudo o suporte só é corroborado pela análise bayesiana (86PP; Figura 4).

A seção *Setiscapella* é parafilética para a região *matK*, como para os dados de Jobson *et al.* (2003), contudo essa ocorrência não pode ser confirmada por outras regiões; dado que *U. flaccida* não foi amostrada para todas as regiões.

Relações entre as espécies da seção Utricularia

A seção *Utricularia* é a maior em número de espécies (mais de 30), das quais o presente trabalho representou 22; sendo assim é a maior amostragem para a seção já apresentada quando comparada àquelas dos estudos de prévios de filogenia.

É grupo irmão da seção *Lecticula* (Figura 2, 4-5), corroborando em dados de Jobson *et al.* (2003) e, de acordo com Taylor (1989), características morfológicas comuns incluem a morfologia das armadilhas, ovoides, com dois apêndices simples nas laterais na região da boca, das sementes, sendo elas prismáticas com testa isodiamétricas e grãos de pólen oblato, 9-13 colporado.

Está subdividida em dois grandes clados, sendo as espécies mais basais, *U. gibba*, *U. floridana* e *U. striata* (clado I) e demais utriculárias da seção no clado II para todas as regiões em que estão amostradas (Figuras 2-4).

A espécie *U. gibba* tem extremo polimorfismo morfológico. Entretanto, Taylor (1989) cita que a espécie tem morfologia similar às espécies *U. floridana* e *U. striata* – que por sua vez têm morfologia similar entre si -, sendo somente diferenciadas pelas folhas dimórficas e morfologia das sementes, corroborando a monofilia das espécies do clado I (Figura 2). Já o clado II está subdividido em dois subclados, sendo o mais basal formado pelas espécies *U. aurea*, *U. inflexa* e *U. reflexa* (Figura 4).

As espécies *U. foliosa*, *U. breviscapa*, *U. radiata* e *U. hydrocarpa*, formam um grupo monofilético de alto suporte (*rpl20-rps12* (71MP; 100ML; 100PP; 5D); ITS (73PP); Figuras 4-5).

No geral as espécies *U. minor*, *U. australis*, *U. bremii*, *U. macrorhiza*, *U. ochroleuca*, *U. vulgaris*, *U. intermedia*, *U. stygia*, *U. stellaris* e *U. dimorphanta* da seção *Utricularia* formam um clado monofilético contendo vários subclados politômicos e/ou parafiléticos (Figuras 2-5). A maioria dos clados parafiléticos ou politômicos inclui as espécies *U. macrorhiza* e *U. vulgaris*. Estudos feitos por Kameyama *et al.* (2005), com os espaçadores cloroplastidiais *trnT-trnL* e *trnQ-trnS* para avaliar o hibridismo entre essas espécies, indicam que *U. australis* f. *australis* é originada a partir da hibridização entre *U. australis* f. *tenuicaulis* e *U. macrorhiza*. Assim, esses dados evidenciam a proximidade entre as espécies.

As espécies europeias já não efetuam polinização cruzada, devido à esterilidade das espécies, portanto a forma de propagação da espécie se dá predominantemente por reprodução clonal, diminuindo a variabilidade genética, o que possivelmente acarreta a politomia observada entre as espécies (TAYLOR, 1989).

A seção *Utricularia* é parafilética para a região *rbcL* (Figura 2), sendo *U. geminiscapa* mais basal em relação as espécies das seções *Vesiculina*, *Avesicaria* e *Setiscapella*, com nenhuma relação morfológica aparente. Contudo para o espaçador *rpl20-rps12* e a região ITS a espécie está inserida em sua respectiva seção (Figuras 4-5). Também, o gene *rbcL* revela que a espécie endêmica do Brasil *U. biovularioides* tem relação próxima à seção *Oligocista*, e apesar do baixo suporte (53PP), é possivelmente integrante do subgênero *Bivalvaria*, e não *Utricularia* como é historicamente posicionada (Taylor, 1989).

Evolução das formas de vida e habitat

As espécies de *Utricularia* colonizam os mais diferentes tipos ambientes, desde os terrestres (com espécies terrícolas, litófitas e epífitas) até os aquáticos (com espécies aquáticas afixadas, aquáticas livres, reofíticas e epífitas – nesse último caso, em tanques de bromélias, como é o caso de *Utricularia nelumbifolia* Gardner). Algumas podem ocupar diferentes ambientes e assim podem ser classificadas em diferentes categorias (como é o caso de *Utricularia alpina* Jacq. que pode ser terrestre e epífita, *U. reniformis* A.St.-Hil., que podem ser terrestres, litófitas ou mesmo epífitas e, ainda, *U. gibba* L., que é aquática e comumente encontrada apoiando-se nas folhas emersas e submersas de *Salvinia* spp., uma pteridófita macrófita comum em lagoas, podendo assim ser enquadrada como epífita). Assim, apesar desse polimorfismo não ser propriamente generalizado para as espécies de *Utricularia*, esse fato pode ser um fator complicador para uma avaliação e categorização discreta (já que na verdade é possível notar um contínuo) para o caráter forma de vida. Assim, com o objetivo de simplificar as análises e buscar por possíveis formas ancestrais (Figura 7), optou-se para esse estudo simplificar as categorias, não fazendo distinção entre os diferentes hábitos aquáticos (e.g. espécies aquáticas livres e aquáticas afixadas foram consideradas apenas aquáticas).

De acordo com as diversas hipóteses filogenéticas (Figuras 2-7), o hábito terrestre é plesiomórfico para a família Lentibulariaceae, sendo a forma rosetada com folhas adesivas, como em *Pinguicula*, o padrão mais primitivo para a família. Com a cladogênese que formou o clado *Genlisea+Utricularia*, esse padrão de forma

foi herdado para ambos os gêneros (Figura 7), mantendo-se como a forma de vida mais comum para as diversas linhagens de *Utricularia* – desde os subgen. *Polypompholyx*, *Bivalvaria* até mesmo o subgen. *Utricularia*. As espécies com esse padrão são geralmente encontradas em ambientes turfosos, arenosos ou mesmo litofíticos, porém todas necessitam de elevada umidade para o desenvolvimento (TAYLOR, 1989).

Talvez uma das formas mais intrigantes seja a reofítica. Esse biótipo é caracterizado em plantas adaptadas à vida ao longo de rios e corredeiras (FONT QUER, 1953) e que apresentam folhas coriáceas e caules escandentes ou rizomas densamente radicantes (GONÇALVES; LORENZI, 2007). Esse hábito, estudado extensivamente por Steenis (1987), é bastante raro para *Utricularia*, ocorrendo apenas poucas seções, das quais *Avesicaria* (com as espécies neotropicais *U. neottioides* A.St.-Hil. e *U. oliveriana* Steymer) e *Avesicarioides* (com as espécies africanas *U. rigida* Benj. e *U. tetraloba* P.Taylor) foram incluídas no presente trabalho. Taylor (1986) formalmente já tratou ambas as seções como sendo uma seção única, porém as hipóteses filogenéticas apresentadas nesse estudo (Figuras 2-5) e por estudos prévios (MÜLLER *et al.*, 2004) não suportam essa postura. Do ponto de vista filogenético, o hábito reofítico surgiu pelo menos duas vezes na história evolutiva de *Utricularia*, uma vez para a linha da seção *Avesicarioides* (representada nesse estudo por *U. rigida*) e outra para a seção *Avesicaria* (*U. neottioides*; Figura 7). Assim, é possível verificar dois processos homoplásticos de paralelismo, ambos tendo como condição ancestral a forma terrestre (Figura 7).

A forma epífita, por sua vez, evoluiu pelo menos duas vezes a partir de espécies terrestres nas seções *Iperua* e *Orchidioides*. De acordo com resultados da filogenia amostrada, a seção *Orchidioides* deve ser inserida na seção *Iperua*, já que ambos formam um clado monofilético (Figuras 2-3).

De acordo com os resultados apresentados neste trabalho, a forma de vida aquática, apesar de bastante comum para o gênero (é o segundo hábito mais frequente ao gênero, perdendo apenas para o terrestre; GUISANDE *et al.*, 2007), para a maioria das espécies aquáticas é uma condição homóloga (Figura 7). Da mesma forma como ocorrido para os hábitos terrestre e epífito, a forma aquática é derivada da forma terrestre. Esse cenário corrobora a hipótese de colonização (em

mais de uma vez) a esse ambiente, o que deve ter sido facilitado dada a plasticidade fenotípica de *Utricularia* e pelo fato de as armadilhas funcionarem com água (JUNIPER; ROBINS; JOEL, 1989; TAYLOR, 1989).

Biogeografia de Utricularia

As seções de *Utricularia* tendem a se agrupar geograficamente (Figura 7). Atualmente ainda não se sabe exatamente a origem geográfica do gênero. Estudos anteriores discutem a respeito de uma possível origem Neotropical, com posterior dispersão para a região Afrotropical e Australásia, e posteriormente para os demais dos continentes (TAYLOR, 1989; JOBSON *et al.*, 2003; MULLER; BORSCH, 2005).

As análises apresentadas nesta pesquisa (Figuras 2-5) indicam que os ancestrais de *Utricularia* provieram da América do Sul, com posterior dispersão e/ou vicariância de ancestral similar ao subgênero *Polypompholyx* para a Austrália (Figura 7). Apesar de a hipótese vicariante ser bastante plausível, ocorrências históricas de dispersão são muito verossímeis, principalmente quando consideradas as sementes diminutas de *Utricularia*, *Genlisea* e *Pinguicula*, classificadas como “dust seeds” (MENEZES *et al.*, aceito).

Provavelmente a colonização através de migração para a América Central foi posterior e aconteceu diversas vezes, cerca de nove vezes, como revela o a hipótese filogenética, com posterior colonização para a América do Norte, Europa e Ásia, corroborando com dados de Jobson *et al.* (2003). A colonização da América do Sul para a América Central e do Norte deve ter sido facilitada com a posterior formação do Istmo do Panamá, que deve ter ocorrido entre 2-6 m.a.a. ou mesmo antes (CODY *et al.*, 2010).

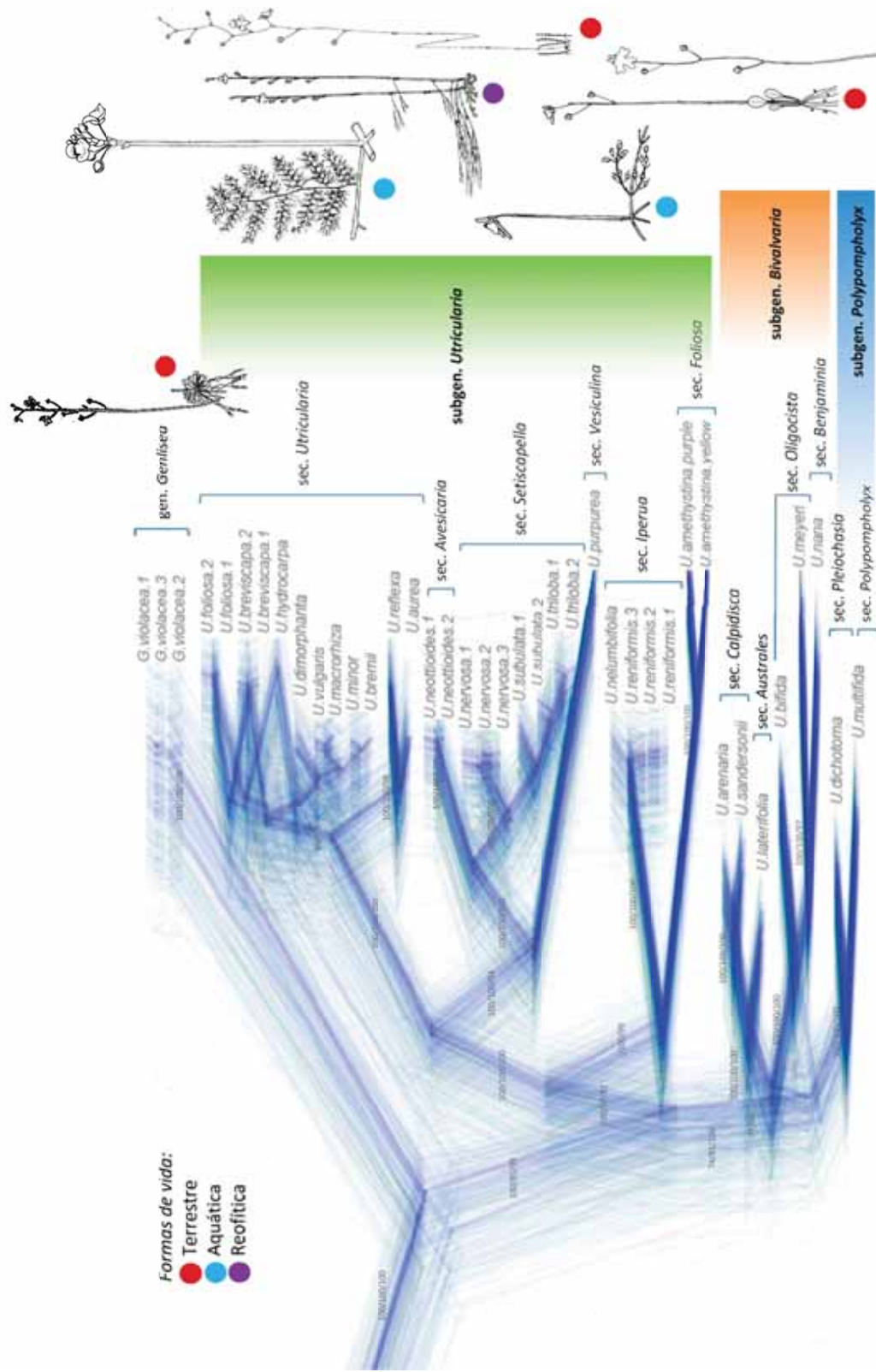


Figura 6. Cloudograma com dados combinados de todas as regiões cloroplastidiais (*rbcl*, *matK* e *rp120-rps12*) e nuclear (ITS) em comparação com as formas de vida para *Utricularia* L. (Lentibulariaceae).

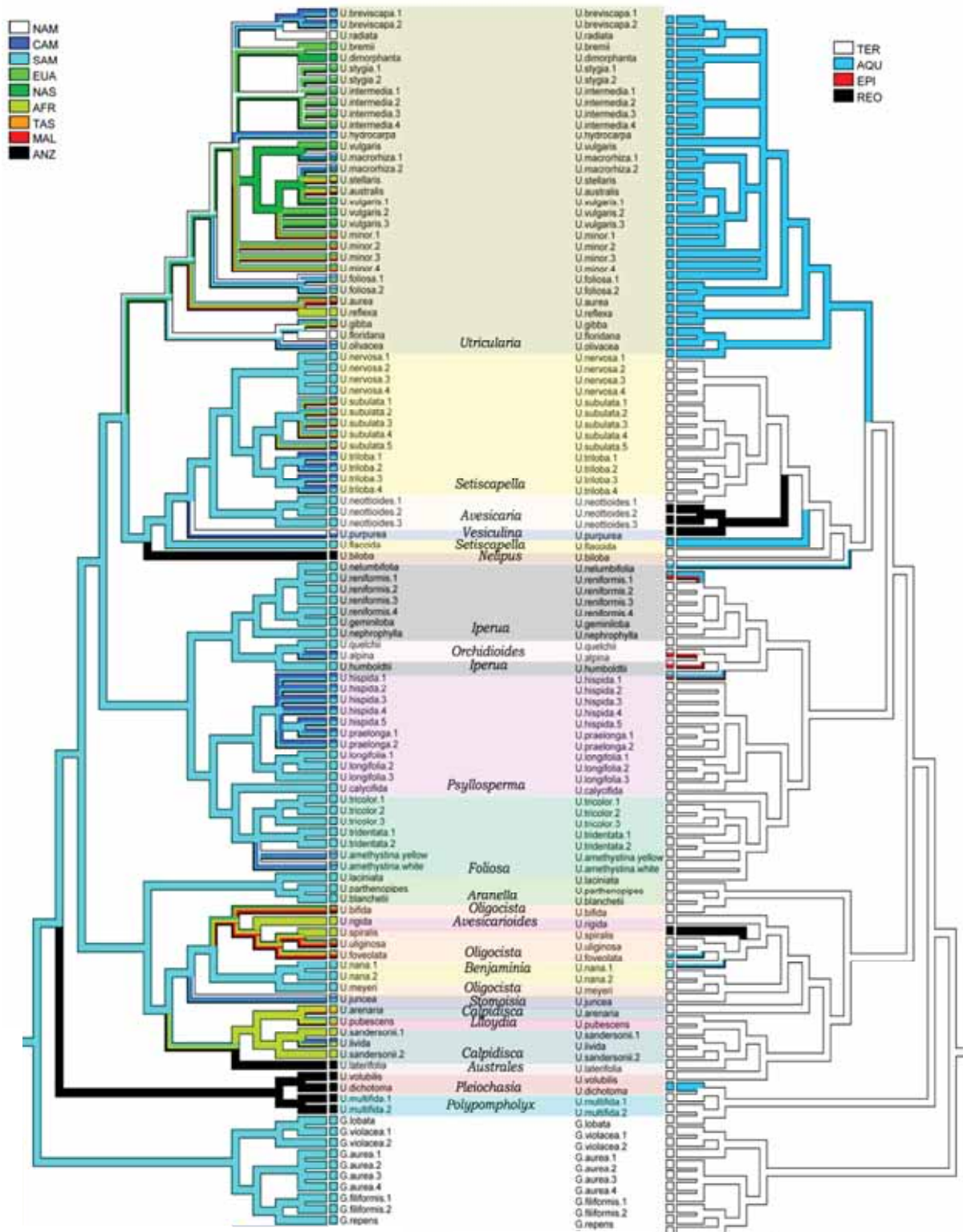


Figura 7. Filograma de análise bayesiana para o gene *matK* (cpDNA) de *Utricularia* L. com as otimizações para as formas de vida e distribuição geográfica. (NAM: América do Norte; CAM: América Central; SAM: América do Sul; EUA: Europa, norte da África; NAS: norte da Ásia; AFR: África; TAS: Ásia tropical; MAL: Malásia; ANZ: Austrália, Nov Zelândia e Nova Caledônia.)

Referências

ADAMEC L.; SIROVÁ D.; VRBA J. Contrasting growth effects of prey capture in two aquatic carnivorous plant species. **Fundamental Applied Limnology**, v. 176, n. 2, p. 153–160, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1127/1863-9135/2010/0176-0153>>

AKAIKE, H. Information theory and an extension of the maximum likelihood principle. In: Petrov BN, Csaki F. eds. **Second International Symposium on Information Theory**. Budapest: Akademiai Kiado, p. 267–281. 1973.

BOUCKAERT, R. R. DensiTree: making sense of sets of phylogenetic trees **Bioinformatics**, v. 26, n. 10, p. 1372-1373, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btq110>>

BURNHAM, K. P.; ANDERSON, D. R. **Model Selection and Multimodel Inference: A Practical Information-Theoretic Approach (2nd ed.)**, Springer-Verlag: Nova York, 2002.

CASTRESANA, J. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. **Molecular Biology and Evolution** v. 17, n. 4, p. 540-552, 2000.

CODY, S.; RICHARDSON, J. E.; RULL, V.; ELLIS, C.; PENNINGTON, R. T., "The Great American Biotic Interchange revisited", **Ecography**, v. 33, n. 18, p. 326-332; 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0587.2010.06327.x>>.

CLIVATI, D; CORDEIRO, G. D.; PŁACHNO, B. J.; MIRANDA, V. F. O. Reproductive biology and pollination of *Utricularia reniformis* A.St.-Hil. (Lentibulariaceae). **Plant Biology**. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/plb.12091>>

DARRIBA, D.; TABOADA, G.L.; DOALLO, R.; POSADA, D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature Methods** v. 9, n. 772, p. 772–772, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.2109>>

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation method for small quantities of fresh tissues. **Phytochemical Bulletin of Botanical Society of America** v. 19, n. 1, p. 11-15, 1987.

FELSENSTEIN, J. Phylogenies and the comparative method. **American Naturalist** v. 125, n. 1, p. 1-15, 1985.

FONT QUER, P. **Diccionario de botánica**. Ed. Labor: Barcelona, 1953. p.459.

GEYER, C. J. Markov chain Monte Carlo maximum likelihood. In: **Keramidas EM. ed. Computing Science and Statistics: Proceedings of the 23rd Symposium on the Interface**. Fairfax Station: Interface Foundation, p.156–163, 1991.

GONÇALVES, E. G.; LORENZI, H. **Morfologia vegetal: organografia e dicionário ilustrado de morfologia das plantas vasculares**. Plantarum, Nova Odessa, 2007. p. 237.

GOLOBOFF, P.; FARRIS, J.; NIXON, K. **T.N.T.: Tree Analysis Using New Technology**, 2003. Disponível em: <<http://www.cladistics.org/tnt.html>> Acesso em: 12 de maio de 2013.

GOUVEIA-OLIVEIRA R.; SACKETT P. W.; PEDERSEN A. G. MaxAlign: maximizing usable data in an alignment **BMC Bioinformatics** v. 8, n. 312, p.312, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-8-312>>

GUISANDE, C.; GRANADO-LORENCIO, C.; ANDRADE-SOSSA, C.; DUQUE, S. R. Bladderworts. **Functional Plant Science and Biotechnology**, v. 1, n. 1, p. 58-68, 2007.

GREILHUBER, J.; BORSCH, T.; MÜLLER, K.; WORBERG, A.; POREMBSKI, S.; BARTHLOTT, W. Smallest angiosperm genomes found in Lentibulariaceae, with chromosomes of bacterial size. **Plant Biology**, v. 8, n. 6, p. 770-777, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1055/s-2006-924101>>

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 1, n. 41, p. 95-98, 1999. Disponível em: <<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>>. Acesso em 12 de junho de 2013.

HAMILTON, M. B. Four primer pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraspecific variation. **Molecular Ecology** v. 8, n. 3, p. 521-523, 1999.

HOBBAHN N.; KUCHMEISTER H.; POREMBSKI S. Pollination biology of mass flowering terrestrial *Utricularia* species (Lentibulariaceae) in the Indian Western Ghats. **Plant Biology**, v. 8, n. 6, p. 791-804, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1055/s-2006-924566>>

HUELSENBECK, J. P.; RONQUIST, F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. **Bioinformatics** v. 17, p. 754–755, 2001. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/17.8.754>>.

IBARRA-LACLETTE, E., ALBERT, V. A., & PEREZ-TORRES, C. A. Transcriptomics and molecular evolutionary rate analysis of the Bladderwort (*Utricularia*), a Carnivorous Plant with a Minimal Genome Transcriptomics and rate analysis of the Bladderwort (*Utricularia*), a Carnivorous Plant with a Minimal Genome. **BMC Plant Biology**. v. 101, n. 11, p. 1-15, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/1471-2229-11-101>>

IBARRA-LACLETTE, E.; LYONS, E., HERNÁNDEZ-GUZMÁN, G.; PÉREZ-TORRES, C.; CARRETERO-PAULET, L.; CHANG, T.-H.; LAN, T.; WELCH, A.; JUÁREZ, M.; SIMPSON, J.; FERNÁNDEZ-CORTÉS, A.; ARTEAGA-VÁZQUEZ, M.; GÓNGORA-CASTILLO, E.; ACEVEDO-HERNÁNDEZ, G.; SCHUSTER, S.; HIMMELBAUER, H.; MINOCHE, A.; XU, S.; LYNCH, M.; OROPEZA-ABURTO, A.; CERVANTES-PÉREZ, S.; de JESÚS ORTEGA-ESTRADA, M.; CERVANTES-LUEVANO, J.; MICHAEL, T.; MOCKLER, T.; BRYANT, D.; HERRERA-ESTRELLA, A.; ALBERT, V.; HERRERA-ESTRELLA, L. Architecture and evolution of a minute plant genome. **Nature**, v. 498, n. 7452, p. 94–8, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/10.1038/nature12132>>

JOBSON, R. W.; PLAYFORD, J.; CAMERON, K. M.; ALBERT, V. Molecular Phylogenetics of Lentibulariaceae Inferred from Plastid *rps16* Intron and *trnL-F* DNA sequences: Implications for Character Evolution and Biogeography. **Systematic Botany**, v. 28, n. 1, p. 157-171, 2003. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1043/0363-6445-28.1.157>>

JUNIPER, B. E.; ROBINS, R. J.; JOEL, D. M. **The Carnivorous Plants**. Academic Press: London, 1989. p. 156-175.

KATOH, K.; MISAWA, K.; KUMA, K.; MIYAVA, T. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. **Nucleic Acid Resources** n. 30, p. 3059-3066, 2002. Disponível em: <<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>> Acesso em: 14 de junho de 2013.

KOMIYA, S. New subdivision of the Lentibulariaceae. **Journal of Japan Botany** v. 48, p. 147-153, 1973.

KRESS, W. J.; ERICKSON, D. L. A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcL* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region. **PLoS ONE**, v. 2, n. 6, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0000508>>.

KRÓL, E.; PŁACHNO, B. J.; ADAMEC, L.; STOLARZ, M.; DZIUBIŃSKA, H.; TREBACZ, K. Quite a few reasons for calling carnivores “the most wonderful plants in the world”. **Annals of Botany**, v. 109, n. 1, p.47–64, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1093/aob/mcr249>>.

KURZ, S. Description of *Utricularia nivea*. **British and foreign Journal of botany**. v. 12, n.1, p. 53-54, 1874.

LODHI M. A.; YE G. N.; WEEDEN N. F.; REISCH B. I. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *vitis* species. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 12, n. 1, p. 6-13, 1994. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/BF02668658>>

MADDISON, W. P.; MADDISON, D. R. **Mesquite: a modular system for evolutionary analysis**. Version 2.75, 2011. Disponível em: <<http://mesquiteproject.org/mesquite/download/download.html>> Acesso: 25 de novembro de 2013

MENEZES, C. G.; GASPARINO, E. C.; BALEEIRO, P. C.; MIRANDA, V. F. O. de. Seed morphology of bladderworts: a survey on *Utricularia* (sect. *Foliosa* and sect. *Psyllosperma*: Lentibulariaceae) with taxonomic and ecological implications. **Phytotaxa**, In press, 2014.

MILLER, M. A.; PFEIFFER, W.; SCHWARTZ, T. "Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees" in **Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)**, New Orleans, LA p. 1 - 8. Disponível em: <<http://www.phylo.org/>>. Acesso em: 25 de novembro de 2013.

MÜLLER K. T.; BORSCH L.; LEGENDRE S.; POREMBSKI; W. BARTHLOTT. A phylogeny of Lentibulariaceae based on sequences of *matK* and adjacent non-coding

regions. **American Journal of Botany**, v.87, n. 10, p.145-146, 2000. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3732/ajb.92.10.1723>>

MÜLLER, K.; BORSCH, T.; LEGENDRE, L.; POREMBSKI, S.; THEISEN, I. & BARTHLOTT, W. Evolution of carnivory in Lentibulariaceae and the Lamiales. **Plant Biology**, v. 6, n. 4, p. 477-490, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1055/s-2004-817909>>

MÜLLER, K.; BORSCH, T. Phylogenetics of *Utricularia* and molecular evolution of the *trnK* intron in a lineage with high substitutional rates. **Plant Systematic and Evolution**, v. 250, n. 1, p. 39-67, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00606-004-0224-1>>

REUT, M.S.; JOBSON, R. W. A phylogenetic study of subgenus *Polypompholyx*: a parallel radiation of *Utricularia* (Lentibulariaceae) throughout Australasia. **Australian Systematic Botany**, v. 23, n. 3, p. 152-161, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1071/SB0905>>

RUTISHAUSER, R.; ISLER, B. Developmental genetics and morphological evolution of flowering plants, especially bladderworts (*Utricularia*): fuzzy arberian morphology complements classical morphology. **Annals of Botany** v. 88, n. 6, p.1173–1202, 2001. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1006/anbo.2001.1498>>

SIROVÁ D.; ADAMEC L.; VRBA J. Enzymatic activities in traps of four aquatic species of the carnivorous genus *Utricularia*. **New Phytologist**. v. 159, p. 669-675, 2003.

SIROVÁ D.; BOROVEC J.; ČERNÁ B.; REJMÁNKOVÁ E.; ADAMEC L.; VRBA J. Microbial community development in the traps of aquatic *Utricularia* species. **Aquatic Botany**, v. 90, p. 129-136, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquabot.2008.07.007>>

STAMATAKIS, A.; HOOVER, P.; ROUGEMONT, J. A Rapid Bootstrap Algorithm for the RAxML Web-Servers, **Systematic Biology**, v. 75, n. 5, p. 758-771, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/10635150802429642>>.

SWOFFORD D. **PAUP***. **Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods)**. Version 10. Sinauer, Sunderland, 2003. Disponível em: <<http://paup.csit.fsu.edu/>> Acesso em 14 de junho de 2013.

STÖVER B. C.; MÜLLER K. F. TreeGraph 2: Combining and visualizing evidence from different phylogenetic analyses. **BMC Bioinformatics** v. 11, n. 7, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-11-7>>

TALAVERA, G.; CASTRESANA, J. Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. **Systematic Biology**, v. 56, n. 4, p. 564-577, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/10635150701472164>>.

TAYLOR, P. **The Genus *Utricularia* – A Taxonomic Monograph**. Kew Bulletin Additional Series XIV. Royal Botanic Gardens, Kew: London, 1989.

WHITE T. J.; BRUNS T.; LEE S.; TAYLOR J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: **PCR Protocols: a guide to methods and applications**. (Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J., White T. J., eds). Academic Press: New York, USA p.315–322, 1990.