

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**FILOGENIA MOLECULAR DE *Utricularia* sect. *Utricularia*
(LENTIBULARIACEAE) BASEADA EM DOIS *loci* NUCLEARES E
UM ESPAÇADOR CLOROPLASTIDIAL**

Guilherme Camara Seber

Agrônomo

2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**FILOGENIA MOLECULAR DE *Utricularia* sect. *Utricularia*
(LENTIBULARIACEAE) BASEADA EM DOIS *loci* NUCLEARES E
UM ESPAÇADOR CLOROPLASTIDIAL**

Guilherme Camara Seber

Orientador: Prof. Dr. Vitor Fernandes Oliveira de Miranda

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)

2016

S443f Seber, Guilherme Camara
Filogenia molecular de *Utricularia* sect. *Utricularia*
(Lentibulariaceae) baseada em dois *loci* nucleares e um espaçador
cloroplastidial / Guilherme Camara Seber. – – Jaboticabal, 2016
x, 64 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016
Orientador: Vitor Fernandes Oliveira de Miranda
Banca examinadora: Fábio Pinheiro, Alessandro de Mello Varani
Bibliografia

1. Lentibulariaceae. 2. *Utricularia*. 3. *Utricularia* sect. *Utricularia*. I.
Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 631.52:581.137.2

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 DA DISSERTAÇÃO: F I L O G E N I A M O L E C U L A R D E
Utricularia sect. *Utricularia* (LENTIBULARIACEAE) BASEADA EM
DOIS *loci* NUCLEARES E UM ESPAÇADOR CLOROPLASTIDIAL

AUTOR: GUILHERME CAMARA SEBER

ORIENTADOR: VITOR FERNANDES OLIVEIRA DE MIRANDA

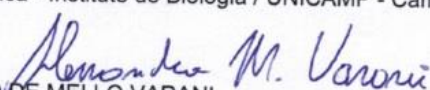
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em AGRONOMIA
(GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS), pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. VITOR FERNANDES OLIVEIRA DE MIRANDA
Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Prof. Dr. FÁBIO PINHEIRO
Departamento de Botânica - Instituto de Biologia / UNICAMP - Campinas/SP



Prof. Dr. ALESSANDRO DE MELLO VARANI
Departamento de Tecnologia / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 29 de julho de 2016

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Guilherme Camara Seber, nascido em 05/09/1991, possui graduação em Engenharia Agrônômica pela UNESP – Câmpus de Botucatu, onde realizou estágio acadêmico e adquiriu experiência na área de Melhoramento Genético de Grandes Culturas. Recebeu bolsa de iniciação científica (CNPq) atrelada ao projeto intitulado “Seleção Individual com Teste de Progênies em Crambe”. Realizou estágio curricular no IMA (Instituto Mato-grossense do Algodão), na área de Melhoramento Genético de plantas oleaginosas. Atualmente se encontra realizando o curso de Mestrado Acadêmico pela FCAV, UNESP de Jaboticabal, no Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas).

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, da qual sinto saudades constantemente e pela qual sou completamente apaixonado.

Agradeço profundamente ao meu círculo profissional, composto pelos integrantes do LSV (Laboratório de Sistemática Vegetal) da FCAV e pelo professor Vitor Miranda. Sou muito grato pelo intercâmbio de experiências, não apenas profissionais, mas culturais e pela construção de profundos laços de amizade.

O apoio dos meus amigos, com os quais divido não apenas um teto, mas segredos, momentos de descontração e boas gargalhadas também foi essencial.

Agradeço ao professor Lubomír Adamec pelas amostras biológicas de espécies de *Utricularia*, essenciais à realização do presente estudo.

Finalmente, sou grato ao CNPq e à FAPESP pelo financiamento do trabalho em questão.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

Introdução.....	1
Revisão de literatura.....	4
Lentibulariaceae.....	4
<i>Utricularia</i>	9
<i>Utricularia</i> sect. <i>Utricularia</i>	12
Material e Métodos.....	18
Obtenção de Material Vegetal e extrações de DNA.....	18
Prospecção de genes nucleares e desenvolvimento de <i>primers</i>	18
Reações de PCR e sequenciamento.....	20
Análises moleculares.....	22
Resultados e discussão.....	24
Clados bem suportados em <i>Utricularia</i> sect. <i>Utricularia</i>	39
Clado A: <i>Utricularia floridana</i> , <i>U. gibba</i> e <i>U. striata</i>	39
Clado B: <i>Utricularia breviscapa</i> e <i>U. radiata</i>	40
Clado C: <i>Utricularia aurea</i> , <i>U. inflexa</i> e <i>U. reflexa</i>	41
Clado D: <i>Utricularia foliosa</i> e <i>U. hydrocarpa</i>	41
Clado E: <i>Utricularia australis</i> , <i>U. bremii</i> , <i>U. dimorphanta</i> , <i>U. intermedia</i> , <i>U. machrorhiza</i> , <i>U. minor</i> , <i>U. ochroleuca</i> , <i>U. stygia</i> e <i>U. vulgaris</i>	42
Posicionamento de <i>Utricularia olivacea</i>	48
Conclusões.....	50
Referências.....	51

FILOGENIA MOLECULAR DE *Utricularia* sect. *Utricularia* (LENTIBULARIACEAE) BASEADA EM DOIS *loci* NUCLEARES E UM ESPAÇADOR CLOROPLASTIDIAL

RESUMO

Utricularia sect. *Utricularia* é uma das mais ricas do gênero *Utricularia*, com 35 espécies. A seção *Utricularia* possui distribuição cosmopolita, ocorrendo desde os trópicos até altas latitudes. Tratam-se de macrófitas aquáticas de padrão vegetativo muito semelhante. *U.* sect. *Utricularia* é um dos grupos mais derivados dentro do gênero *Utricularia*, o maior de Lentibulariaceae. A família comporta três gêneros de plantas carnívoras, com *Pinguicula* compondo um grupo irmão a *Genlisea* e *Utricularia*. As armadilhas de *Pinguicula* são as próprias folhas, que possuem uma mucilagem adesiva que captura principalmente insetos. As armadilhas de *Genlisea* e *Utricularia* são modificações foliares que possuem mecanismos bastante complexos para a captura de presas, destacando-se os utrículos, que possuem um mecanismo ativo de sucção de pequenos organismos e dão o nome ao gênero *Utricularia*. O presente estudo empregou dados moleculares para a reconstrução filogenética de 21 espécies de *U.* sect. *Utricularia*, utilizando-se como grupo externo outras onze espécies do mesmo gênero e três de *Genlisea*. Foram construídas matrizes a partir do alinhamento de sequências homólogas de dois genes nucleares, *RBP2* e *LEAFY*, bem como de um espaçador do DNA plastidial, *rpl20-rps12*. Os resultados convergem quanto à parafilia de *U.* sect. *Utricularia*, com *U. olivacea* alocando-se como grupo irmão de *Utricularia* sect. *Vesiculina*, evidenciando a necessidade de modificações taxonômicas e criação de uma nova seção. Os dados sugerem também a ocorrência de sucessivos eventos de hibridação entre alguns táxons da seção *Utricularia*. Determinados caracteres morfológicos suportam grupos de espécies, como as características florais, o padrão de deiscência das cápsulas, a estrutura morfológica das sementes, a ocorrência de dimorfismo acentuado nos ramos e a presença de flutuadores na base da inflorescência, e convergem com os resultados do presente estudo, que se basearam no DNA.

Palavras chave: *Utricularia* sect. *Utricularia*, Lentibulariaceae, plantas carnívoras, hibridação, filogenia.

MOLECULAR PHYLOGENY OF *Utricularia* sect. *Utricularia* (LENTIBULARIACEAE) BASED ON TWO NUCLEAR *loci* AND ONE CHLOROPLASTIDIAL SPACER

ABSTRACT

Utricularia sect. *Utricularia* is one of the richest in the genus *Utricularia*, with 35 species. The section *Utricularia* has worldwide distribution, occurring from the tropics to high latitudes. It is a group of aquatic plants with very similar vegetative patterns. *U.* sect. *Utricularia* is one of the most derivative group of the genus *Utricularia*, the biggest of Lentibulariaceae. The family comprises three genera of carnivorous plants, with *Pinguicula* as a sister group to *Genlisea* and *Utricularia* clade. The traps of *Pinguicula* are mucilaginous leaves, adapted to capture mainly insects. The traps of *Genlisea* and *Utricularia* are leaf modifications that have very complex mechanisms to capture prey, standing out the utricles, that have an active mechanism to suction small organisms and gave the origin of the name of genus *Utricularia*. This study used molecular data for phylogenetic reconstruction of 21 species of *U.* sect. *Utricularia*, using eleven other species of the same genus and three of *Genlisea* as outgroup. We constructed matrices from the alignment of homologous sequences of two nuclear genes, *RBP2* and *LEAFY*, and a spacer of cpDNA, *rpl20-rps12*. The results converge as the paraphyly of *U.* sect. *Utricularia*, with *U. olivacea* allocating up as a sister group of *Utricularia* sect. *Vesiculina*, highlighting the need for taxonomic modifications and the creation of a new section. The data also suggests the occurrence of successive hybridization events between some species of the section *Utricularia*. Some groups are also supported by the morphological pattern, with the same floral characteristics, the same pattern of dehiscence of the capsules, the same morphological structure of seeds, the occurrence of dimorphism pronounced in branches and the presence of floats at the base of inflorescences, and it converges with the results of this study, based on DNA.

Keywords: *Utricularia* sect. *Utricularia*, Lentibulariaceae, carnivorous plants, hybridization, phylogeny.

Introdução

A família Lentibulariaceae tem chamado a atenção de alguns grupos de pesquisa ao redor do mundo, devido a um conjunto de características genéticas, bioquímicas, ecológicas e estruturais. Os três gêneros que compõe a família, *Pinguicula*, *Genlisea* e *Utricularia*, tratam-se de plantas carnívoras com mecanismos distintos adaptados à captura de presas (JUNIPER et al., 1989; LLOYD, 1942). A família é monofilética e *Pinguicula* é um grupo irmão ao clado composto por *Genlisea* e *Utricularia* (fig. 1) (CIESLACK et al., 2005; JOBSON et al., 2003; MÜLLER; BORSCH, 2005; MÜLLER et al., 2000, 2004). *Pinguicula* possui armadilhas mais simples, compostas por folhas adesivas que capturam principalmente insetos (CASPER, 1966; HESLOP-HARRISON, 2004). *Genlisea* compreende pequenas plantas munidas de armadilhas subterrâneas, que formam forquilhas e são espiraladas ao longo da maior parte de sua extensão (FLEISCHMANN, 2012a). Essas estruturas possuem fendas onde microrganismos do solo se inserem, e acabam sendo digeridos (BARTHLOTT et al., 1998; FLEISCHMANN, 2012a). *Genlisea* destaca-se por possuir espécies nas quais são encontrados os menores genomas conhecidos em plantas (FLEISCHMANN et al., 2014). *Utricularia* é o gênero com a maior riqueza de espécies da família, bem como possui grande variação de configurações morfológicas, muitas vezes dentro da mesma espécie (GUISANDE et al., 2007; TAYLOR, 1989). Suas armadilhas são pequenas vesículas denominadas utrículos, que possuem um mecanismo ativo de sucção, acionado quando tricomas próximos à sua entrada são estimulados por pequenos organismos (POPPINGA et al., 2016). Os gêneros *Genlisea* e *Utricularia* possuem altas taxas de substituição de nucleotídeos em seus genomas, fenômeno que pode estar relacionado à diversificação e à plasticidade morfológica, com ênfase em *Utricularia* (JOBSON; ALBERT, 2002). O fato desses dois gêneros apresentarem espécies com os menores genomas conhecidos em plantas os tornam modelos interessantes para que mecanismos de contração genômica em vegetais sejam estudados (IBARRA-LACLETTE et al., 2011; IBARRA-LACLETTE et al., 2013, LEUSHKIN et al., 2013).

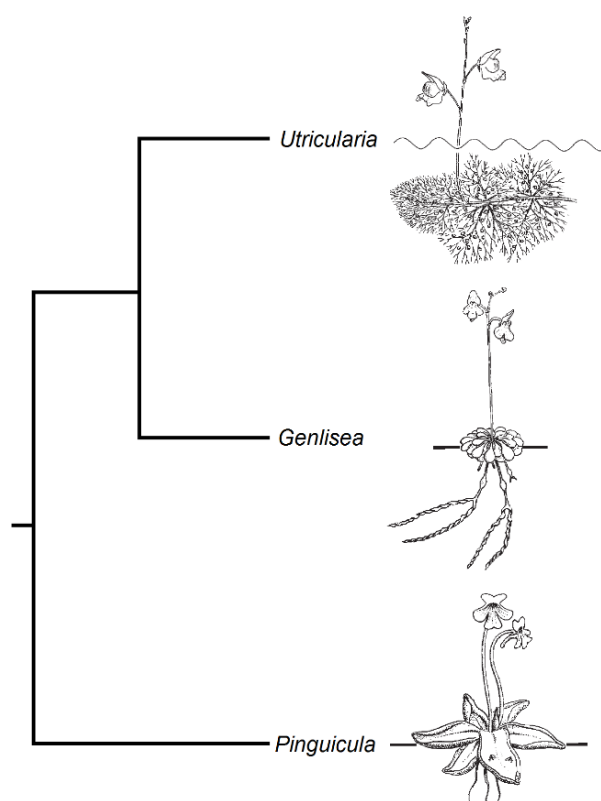


Fig. 1. Relações filogenéticas entre os gêneros da família Lentibulariaceae. Extraído e adaptado de Müller et al. (2006).

O gênero *Utricularia*, assim como as demais Lentibulariaceae, possui um histórico taxonômico controverso (BARNHART, 1916; DE CANDOLLE, 1844; KAMIÉNSKY, 1895; TAYLOR, 1989; VAHL, 1805), porém dados moleculares vêm corroborando a divisão seccional do gênero proposta por Taylor (1989), com algumas modificações (MÜLLER; BORSCH, 2005; JOBSON et al., 2003). *Utricularia* sect. *Utricularia* trata-se de uma das seções mais derivadas do gênero (MÜLLER; BORSCH, 2005; JOBSON et al., 2003), composta por plantas aquáticas com padrão morfológico dos órgãos vegetativos muito similar, e ampla distribuição pelo mundo (TAYLOR, 1989). Algumas características ocorrem com frequência nas espécies da seção *Utricularia*, como o dimorfismo dos ramos (ADAMEC, 2007), a ocorrência de turiões (ADAMEC, 2008), a presença de flutuadores na base da inflorescência (RUTISHAUSER, 1993; TAYLOR, 1989), a ocorrência de corola amarelada, folhas divididas em segmentos capilares ou ausentes, presença de estolões bem desenvolvidos e ocorrência de utrículos

dimórficos. Algumas espécies da seção *Utricularia* jamais frutificam, apesar de entrarem em florescimento (TAYLOR, 1989). A identificação taxonômica em *U. sect. Utricularia* através da morfologia dos órgãos vegetativos é muitas vezes dificultosa (ASTUTI, 2016). Foram constatadas irregularidades cromossômicas em algumas espécies estéreis da seção *Utricularia*, como no caso de *U. ochroleuca* (CASPER; MANITZ, 1975). Além das evidências morfológicas e citogenéticas, o emprego de marcadores moleculares confirmou a origem híbrida de alguns táxons de *U. sect. Utricularia*, em populações estéreis de *U. australis* (KAMEYAMA et al., 2005).

Os problemas referentes à delimitação taxonômica em *Utricularia sect. Utricularia*, assim como o desconhecimento das relações filogenéticas entre suas espécies, gera a necessidade de obtenção de dados moleculares para que a hipótese de monofilia do grupo seja testada, visto que Jobson et al. (2003), analisando marcadores do cpDNA, constataram que a seção *Utricularia* é parafilética.

O presente estudo teve como objetivo testar a monofilia de *Utricularia sect. Utricularia* e investigar as relações filogenéticas entre suas espécies, levando em conta as evidências que apontam a ocorrência de reticulação ao longo de sua evolução, com a possível origem hibridogênica de alguns táxons (ASTUTI, 2016; KAMEYAMA et al., 2005; PLACHNO; ADAMEC, 2007). Nesse contexto, o confronto de dados oriundos de diferentes compartimentos genômicos, de herança uniparental (cpDNA e mtDNA) e biparental (nDNA), se torna ideal (SOLTIS; SOLTIS, 1998). Genes nucleares de uma ou poucas cópias no genoma são pouco utilizados para a reconstrução filogenética em plantas quando em relação às sequências do DNA plastidial e do DNA nuclear ribossomal, devido a desvantagens relativas à dinâmica do genoma nuclear, passível de recombinação e duplicações que originam cópias parálogas. Além disso, esses marcadores possuem menos cópias por célula quando comparados às sequências plastidiais e do nrDNA, o que diminui o rendimento das reações de amplificação. No entanto, a ocorrência de maiores taxas mutacionais e o fato de genes nucleares possuírem herança biparental, resgatando a ancestralidade completa das linhagens, são vantagens quanto à sua utilização em estudos filogenéticos (SMALL et al., 2004), principalmente no caso de grupos onde a

ocorrência de hibridização gera um padrão reticulado nas relações filogenéticas das espécies envolvidas (LINDER; RIESEBERG, 2004). Portanto, foram empregados dois genes nucleares e um espaçador cloroplastidial para que fosse realizada a reconstrução filogenética de *Utricularia* sect. *Utricularia*.

Revisão de Literatura

Lentibulariaceae

As Lentibulariaceae (fig. 2) compreendem cerca de 340 espécies de plantas carnívoras, distribuídas em três gêneros: *Pinguicula*, *Genlisea* e *Utricularia* (FISHER et al., 2004; FLEISCHMANN, 2012a; FLEISCHMANN, 2012b; GUISANDE et al., 2007; HESLOP-HARRISON, 2004; LEGENDRE, 2000; TAYLOR, 1989).

Pinguicula conta com aproximadamente 85 espécies de herbáceas de distribuição mundial, porém bastante descontínua. Possuem folhas com tricomas glandulares, secretando uma mucilagem adesiva que captura suas presas, geralmente artrópodes (fig. 2B) (CASPER, 1966; HESLOP-HARRISON, 2004; LEGENDRE, 2000).

Genlisea compreende 29 espécies de plantas com folhas dispostas em pequenas rosetas (fig. 2D), distribuídas pela região neotropical e pela África (FLEISCHMANN, 2012a). Não possuem raízes, e suas armadilhas se inserem no substrato, fixando a planta. Tratam-se de modificações foliares que formam forquilhas, espiraladas ao longo da maior parte de sua extensão e com fendas onde as presas se inserem (fig. 2G). *Genlisea* possui um amplo espectro de presas, desde nematoides até protozoários, as quais ficam retidas em suas armadilhas devido à ocorrência de tricomas que se voltam contra a saída (fig. 2F). Assim, as presas são conduzidas até uma estrutura chamada ampola, rica

em enzimas digestivas (BARTHLOTT et al., 1998; PŁACHNO et al., 2007b, 2008).

Utricularia é o maior gênero dentre as Lentibulariaceae, contando com aproximadamente 230 espécies descritas até a atualidade, amplamente distribuídas pelo mundo com exceção de áreas desérticas, ilhas oceânicas e a Antártida (FLEISCHMANN, 2012b; GUISANDE et al., 2007; TAYLOR, 1989). Assim como em *Genlisea*, as raízes são ausentes, e suas armadilhas, ou utrículos, são consideradas por alguns autores os órgãos mais complexos encontrados no Reino Vegetal (JUNIPER et al., 1989; LLOYD, 1942), despertando o interesse de pesquisadores a séculos (DARWIN, 1888). Tratam-se de pequenas vesículas funcionais em meio aquoso, que possuem uma entrada rodeada por tricomas. Estes funcionam como gatilhos quando estimulados por pequenos organismos, desencadeando um rápido processo de expansão do utrículo, que gera uma diferença de pressão entre seu meio interno e externo e força a entrada de água. Assim, a presa é succionada, sendo então digerida no interior do utrículo (fig. 2J) (POPPINGA et al., 2016; REIFENRATH et al., 2006). Uma série de glândulas internas, bífidas e quadrífidas, participam da secreção de enzimas digestivas, como proteases, fosfatases ácidas e esterases (PLACHNO et al., 2006; SIROVÁ et al., 2003; VINTÉJOUX, 1976). O interior dos utrículos conta com uma rica comunidade microbiana, a qual não é digerida pelas plantas. Estes microrganismos, principalmente bactérias, auxiliam na digestão das presas via secreção enzimática (CARAVIERI et al., 2014; SIROVÁ et al., 2009).

Genlisea e *Utricularia* são gêneros irmãos, mais derivados e com mecanismos mais sofisticados de carnivoría quando em relação a *Pinguicula*. Possuem um ancestral comum onde ocorreu a perda do sistema radicular, ao passo que modificações foliares desenvolveram geotropismo positivo, inserindo-se no substrato para realizar a captura de presas e afixar as plantas (MÜLLER et al., 2006). Ambos os gêneros apresentam altos índices de substituição de nucleotídeos em seus genomas (JOBSON; ALBERT, 2002). Müller et al. (2006) mencionam ensaios comparando sequências do íntron *trnK* (cpDNA) em 375 espécies de angiospermas, onde foram encontradas altas taxas evolutivas em *Genlisea* e *Utricularia*, sendo os dois gêneros superados apenas por plantas

aquáticas de morfologia muito incomum, da família Podostemaceae. Existe uma correlação positiva entre altas taxas mutacionais e a ocorrência de especiação em angiospermas (BARRACLOUGH; SAVOLAINEN, 2001), o que pode explicar a diversificação ocorrida principalmente em *Utricularia*, bem como as peculiaridades de ordem morfológica que ocorrem no gênero (JOBSON; ALBERT, 2002).

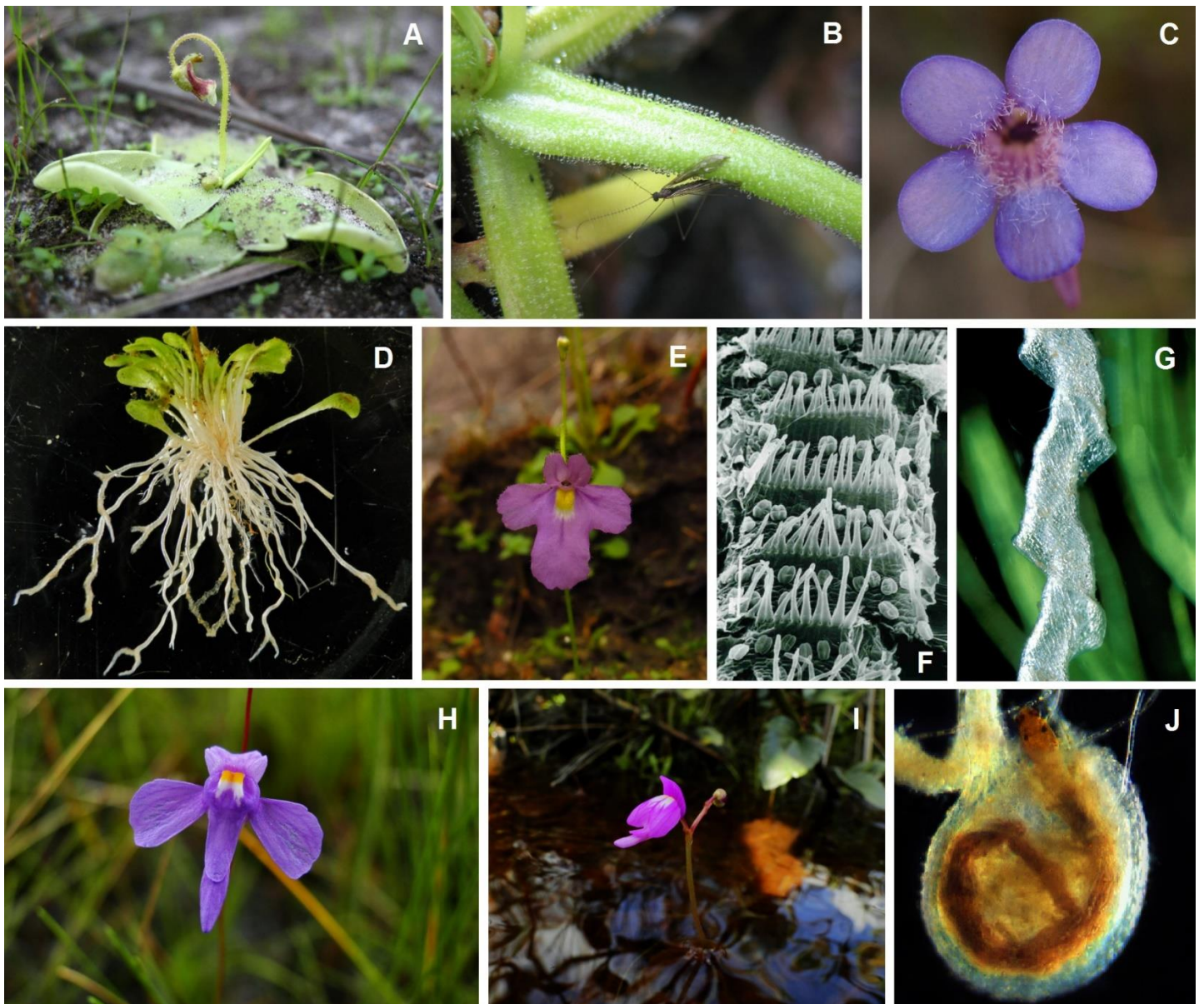


Fig. 2. Lentibulariaceae. A – *Pinguicula albida*. B – Díptero aderido a uma folha de *Pinguicula cubensis*. C – Flor de *Pinguicula filifolia*. D – Roseta e armadilhas de *Genlisea filiformis*. E – Flor de *Genlisea violacea* (Créditos: LSV). F – Tricomas que voltam-se contra a saída no interior das armadilhas de *Genlisea* (Créditos: W. Barthlott). G – Armadilhas helicoidais de *Genlisea* (Créditos: B. Rice). H – Flor de *Utricularia amethystina*. I – Flor de *Utricularia cucullata*. J – Utrículo com presa em *Utricularia reniformis* (Créditos: LSV).

Durante décadas acreditou-se que o menor genoma encontrado em vegetais era o de *Arabidopsis thaliana*, com aproximadamente 115 Mpb (BENNETT; LEITCH, 2012). A espécie foi a primeira planta a ter seu genoma sequenciado, em 2000, fazendo com que fosse amplamente utilizada como organismo modelo em estudos na área de genética (MICHAEL; JACKSON, 2013). No entanto, diversas espécies da família Lentibulariaceae possuem genomas menores, como *Utricularia gibba* e *Genlisea aurea*, com aproximadamente 88,3 Mpb e 63,6 Mpb, respectivamente (GREILHUBER et al., 2006; IBARRA-LACLETTE et al., 2011; IBARRA-LACLETTE et al., 2013, LEUSHKIN et al., 2013). Destaca-se *Genlisea tuberosa*, espécie na qual registrou-se um genoma de 61 Mpb, o menor conhecido em plantas atualmente (FLEISCHMANN et al., 2014).

De acordo com Müller et al. (2006), o modo alternativo com o qual *Genlisea* e *Utricularia* adquirem nutrientes pode ter diminuído a pressão de seleção pela estabilidade de certos trechos do genoma. Como exemplo, a absorção de aminoácidos oriundos da digestão de presas pode ter diminuído a importância de genes relacionados à assimilação do nitrogênio. Esses *loci* podem ter acumulado mutações, se pseudogenizado e finalmente podem ter sido perdidos, o que vai de acordo com a natureza do genoma de algumas espécies do grupo (LEUSHKIN et al., 2013). Em alguns grupos de plantas parasitas, a aquisição de fotoassimilados oriundos dos hospedeiros levou à contração do genoma plastidial, devido à perda de importância de genes que codificam produtos relacionados à fotossíntese (WICKE et al., 2013).

As peculiaridades quanto à aquisição de nutrientes vão além da carnivoría em Lentibulariaceae. Sirová et al. (2010) demonstraram que parte considerável do carbono fixado por algumas espécies de *Utricularia* é liberado no interior das armadilhas, possivelmente para nutrir a comunidade microbiana que se desenvolve no lúmen dos utrículos. Esses microrganismos participariam ativamente na transformação de diversos compostos químicos presentes nos utrículos, disponibilizando nutrientes para as plantas, o que configuraria uma relação mutualística (SIROVÁ et al., 2009; 2010). O processo seria análogo ao que ocorre na rizosfera de inúmeras plantas, que liberam exudatos que são logo aproveitados por microrganismos associados (WALKER et al., 2003). Por

possuírem mecanismos que permitem a reciclagem de nutrientes no interior dos utrículos, um sistema relativamente fechado, algumas espécies aquáticas do gênero (principalmente *Utricularia* sect. *Utricularia*) podem desenvolver-se livremente no ambiente aquático sem a necessidade de afixar-se, possuindo a vantagem de deixar de competir com macrófitas aquáticas dotadas de raízes (SIROVÁ et al., 2009).

Adamec (2006) constatou que as taxas respiratórias dos utrículos são de 75% a 200% mais elevadas do que nas estruturas tipicamente foliares em *Utricularia*, bem como observou uma baixa eficiência fotossintética nos utrículos. A grande demanda por energia das armadilhas relaciona-se ao restabelecimento destes órgãos, que envolve um mecanismo ativo de transporte de íons Cl^- , seguido pelo fluxo de água de seu meio interno para o ambiente externo, o que cria uma pressão negativa que os prepara para acionar seu mecanismo de sucção (SYDENHAM; FINDLAY, 1973). As taxas de movimentação iônica durante o restabelecimento dos utrículos são cerca de quatro vezes maiores do que em animais ou em outras plantas (SYDENHAM; FINDLAY, 1973). Cada utrículo pode ser acionado e restabelecido várias vezes ao longo do desenvolvimento da planta (ADAMEC, 2011).

As altas taxas respiratórias encontradas em *Utricularia* (ADAMEC, 2006) vêm sendo relacionadas a uma mutação encontrada no gene mitocondrial *coxI*, que codifica a subunidade principal da enzima citocromo c oxidase (JOBSON et al., 2004; LAAKKONEN et al., 2006). A citocromo c oxidase se trata de um complexo enzimático transmembranar crucial durante o processo de respiração. Recebe um elétron de cada molécula de citocromo c, e o transfere para uma molécula de oxigênio (O_2), o convertendo assim em duas moléculas de água. Nesse processo, quatro prótons são transportados, o que gera um gradiente eletroquímico que é utilizado na produção de ATP (WIKSTROM, 1977). Em *Utricularia*, bem como em uma espécie de *Genlisea*, encontra-se dois resíduos contíguos de cisteína, ausentes em 99,9% das sequências de *coxI* disponíveis nos bancos de dados, e selecionados positivamente na linhagem que originou *Utricularia* (JOBSON et al., 2004). Esse *motif* coincide com a região de acoplamento com a citocromo c, e provavelmente está relacionado às altas taxas respiratórias encontradas em *Utricularia*. Essa modificação em um gene

essencial teria ampliado a potência da respiração em um ancestral comum de *Genlisea* e *Utricularia*, a despeito de uma diminuição na eficiência respiratória, permitindo assim a evolução de um mecanismo ativo de sucção de presas, que possui alta demanda energética (JOBSON et al., 2004; LAAKKONEN et al., 2006). No entanto, esse acréscimo nas taxas respiratórias possuem consequências a nível celular, gerando um aumento expressivo na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), que possuem potencial mutagênico e podem estar relacionados às altas taxas de substituição nucleotídica encontradas em *Genlisea* e em *Utricularia* (ALBERT et al., 2010). Esse fenômeno também pode estar relacionado com a contração genômica que ocorreu ao longo da evolução de *Genlisea* e *Utricularia* (FLEISCHMANN et al., 2014; GREILHUBER et al., 2006; IBARRA-LACLETTE et al., 2011; IBARRA-LACLETTE et al., 2013, LEUSHKIN et al., 2013), com a diversificação ocorrida na linhagem que originou esses dois gêneros e com a disparidade existente entre a conformação morfológica do grupo quando em relação à maior parte das angiospermas (JOBSON; ALBERT, 2002).

Utricularia

Desde os primórdios da taxonomia, o gênero *Utricularia* é conhecido pelos botânicos. Linnaeus (1753) tratou sete espécies do gênero em seu *Species Plantarum*. Vahl (1805) descreveu 34 espécies, e propôs uma divisão seccional para o gênero. De Candolle (1844) propôs a divisão do gênero em cinco seções, convergindo em grande parte com Vahl (1805). Kamiénsky (1895) adotou a divisão de *Utricularia* em dois gêneros, *Polyphompholyx* e *Utricularia*, com o último subdividido em dez seções. Já Benhart (1916) dividiu *Utricularia* em 13 gêneros. O histórico taxonômico controverso é um reflexo da grande diversidade de conformações morfológicas encontradas em *Utricularia*, assim como a discrepância do gênero em relação ao padrão morfológico encontrado na maioria das angiospermas. Os órgãos não apresentam delimitação clara, apresentando-se com uma certa ambiguidade (fig. 3J), em um contexto conhecido como abordagem FAM (*Fuzzy Arberian Morphology*) (RUTISHAUSER; ISLER, 2001).

Além disso, as espécies do gênero não possuem raízes (TAYLOR, 1989) e algumas apresentam órgãos muito especializados, como turiões (ADAMEC, 2008) e flutuadores (RUTISHAUSER, 1993; TAYLOR, 1989) no caso de algumas espécies aquáticas (*Utricularia* sect. *Utricularia*), apressórios que se prendem a rochas submersas em espécies reofíticas (fig. 3E), como no caso de *U. neottiioides* (fig. 3D) (TAYLOR, 1989), dentre outras peculiaridades, como os próprios utrículos (POPPINGA et al., 2016; REIFENRATH et al., 2006).

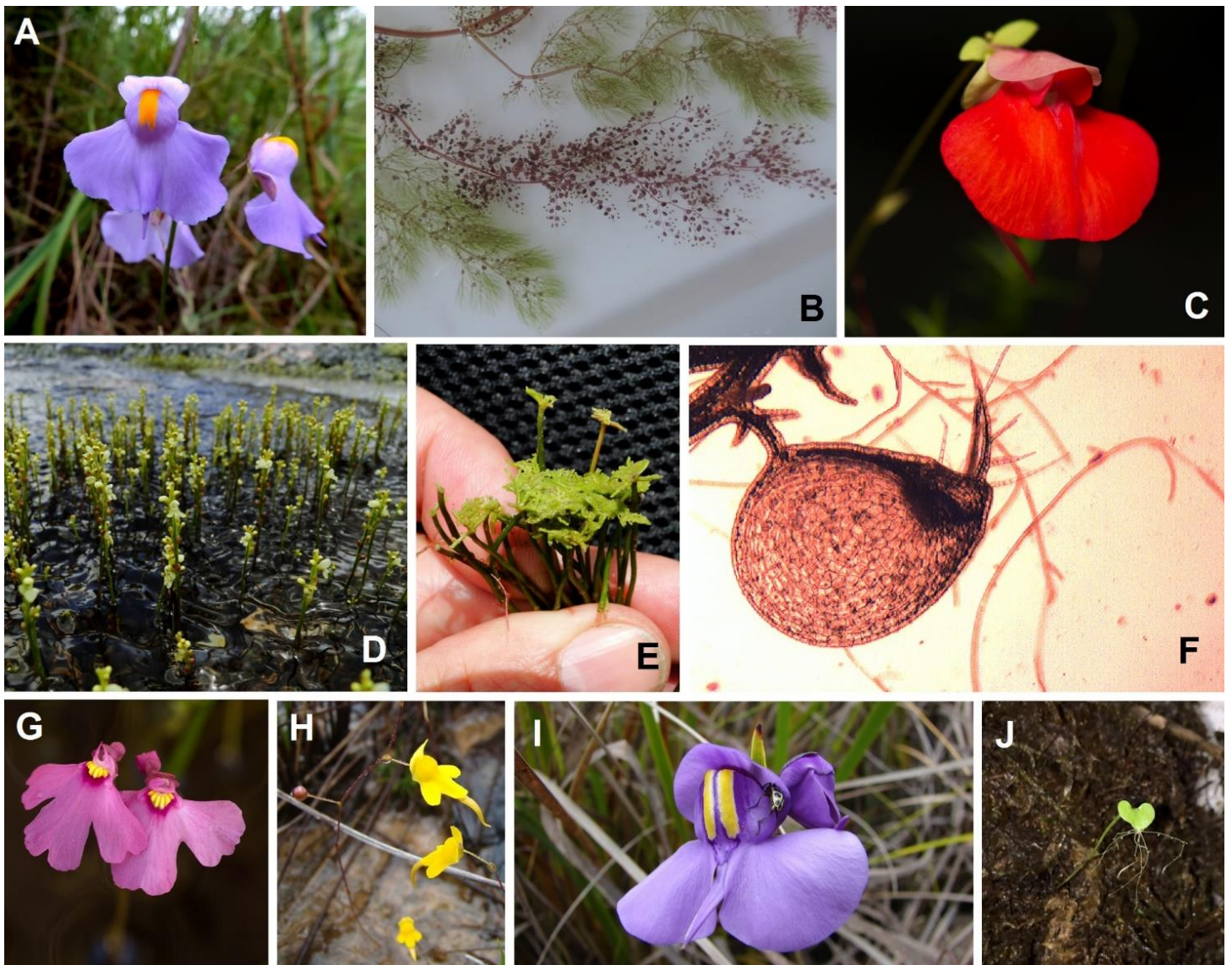


Fig. 3. *Utricularia*. A – *Utricularia longifolia*, uma espécie terrestre. B – *Utricularia foliosa*, de hábito aquático (Créditos: LSV). C – *Utricularia campbelliana*, uma espécie epífita (Créditos: M. Macháček). D – *Utricularia neottiioides*, uma espécie reofítica, e E – seus apressórios, com os quais fixam-se em rochas submersas. F – Utrículo de *U. gibba* (Créditos: LSV). G – *Utricularia multifida*, da seção *Polyphompholyx* (Créditos: B. Rice). H – Racemos de *Utricularia nigrescens* (Créditos: LSV). I – Flor de *Utricularia reniformis* sendo visitada por um coleóptero (Créditos: L. D. Lobo). J – Exemplo de morfologia FAM, com estolões repletos de utrículos desenvolvendo-se a partir da extremidade de uma folha em *U. reniformis* (Créditos: LSV).

Pouco se sabe sobre os mecanismos de atração de presas até a entrada dos utrículos. Cohn (1874) foi o primeiro autor a defender um mecanismo químico de sinalização. Darwin (1888) notou a semelhança entre a conformação dos utrículos em espécies aquáticas, cheios de reentrâncias e apêndices (fig. 3F), ao padrão morfológico de alguns microcrustáceos. Nesse caso, as plantas poderiam estar se utilizando de mimetismo para atrair presas, fato corroborado por ensaios que comprovaram a importância dos apêndices encontrados nos utrículos para a captura de presas, podendo sua atuação estar restrita à canalização das presas até a abertura das armadilhas (MEYERS, D. G.; STRICKLER, 1979).

A plasticidade morfológica de *Utricularia* coincide com o fato do gênero ser cosmopolita e apresentar uma grande diversidade de hábitos, possuindo espécies aquáticas livres, aquáticas afixadas, reofíticas, terrestres e epífitas (TAYLOR, 1989). A maior riqueza para o gênero ocorre nos Neotrópicos, e estudos empregando dados morfológicos e moleculares apontam a região como seu provável centro de origem (GUISANDE et al., 2007; JOBSON et al., 2003; MÜLLER; BORSCH, 2005). A região é seguida pela Austrália quanto ao número espécies (GUISANDE et al., 2007). Das cerca de 230 espécies conhecidas de *Utricularia*, 65 ocorrem no Brasil, e 16 são endêmicas (MIRANDA et al., 2016).

O mais amplo estudo taxonômico já proposto para *Utricularia* se trata da monografia de Taylor (1989), que baseando-se em dados morfológicos agrupou o gênero em 35 seções, distribuídas em dois subgêneros, *Polypompholyx* com duas seções, e *Utricularia* com as 33 restantes. Estudos que empregaram dados moleculares para resgatar a filogenia do grupo (JOBSON et al., 2003; MÜLLER; BORSCH, 2005) corroboraram em grande parte a divisão seccional de Taylor (1989). Müller e Borsch (2005) propuseram algumas alterações taxonômicas, com algumas seções sendo englobadas por outras devido à ocorrência de parafilia, e a inclusão do subgênero *Bivalvaria*, alocado como grupo irmão do subgênero *Utricularia*. Müller e Borsch (2005) recomendam a inclusão da seção *Pleiochasia* no subgênero *Polypompholyx*, que passaria a contar com três seções, a alocação de 11 seções em *Bivalvaria*, a maioria composta por

espécies terrestres, e a manutenção de oito seções no subgênero *Utricularia*, compostas em sua maioria por espécies aquáticas e epífitas.

Utricularia* sect. *Utricularia

A seção *Utricularia* (fig. 4, 5 e 6) é uma das mais ricas do gênero, com 34 espécies consideradas por Taylor (1989). *U* sect. *Utricularia* aloca-se como uma das mais derivadas, estando inclusa no subgênero *Utricularia* (MÜLLER; BORSCH, 2005). Todas as espécies possuem hábito aquático, podendo estar livres ou afixadas. A distribuição de *U*. sect. *Utricularia* é mundial, destacando-se sua ocorrência em regiões de altas latitudes no Hemisfério Norte, de clima temperado ou polar, o que é incomum no gênero. Contudo, mais da metade das espécies ocorrem nos trópicos (TAYLOR, 1989).

Existe uma grande semelhança no aspecto dos órgãos vegetativos entre as espécies de *Utricularia* sect. *Utricularia*, sendo a delimitação taxonômica uma tarefa difícil, problema agravado pelo fato de que algumas espécies raramente entram em florescimento (ASTUTI, 2016). Algumas características morfológicas são muito comuns entre as espécies da seção *Utricularia*, como o aspecto das folhas, divididas em segmentos capilares, algumas vezes muito reduzidas, e ausentes em algumas espécies (TAYLOR, 1989). É comum a ocorrência de dimorfismo nos ramos, sendo *U. intermedia* um exemplo dessa característica (fig. 6B) (ADAMEC, 2007). Nessa espécie, alguns estolões produzem folhas em abundância, dedicando-se à fotossíntese (fig. 5B), enquanto outros são aclorofilados e se inserem no lodo, afixando a planta e produzindo utrículos para a captura de presas (TAYLOR, 1989). A produção de turiões é comum principalmente nas espécies de climas temperados e polares (fig. 4N e 6E), tratando-se de propágulos que resistem ao congelamento do ambiente aquático no inverno, para que as plantas sejam regeneradas na primavera (ADAMEC, 2008).



Fig. 4. *Utricularia* sect. *Utricularia*. **A** – *U. australis* (Créditos: V. Bordin). **B** – *U. benjaminiana* (Créditos: B. Zimer). **C** – *U. punctata* (Créditos: H. Wakabayashi). **D** – *U. olivacea* (Créditos: LSV). **E** – *U. breinii* (Créditos: V. Grulich). **F** – *U. cymbantha* (Créditos: B. Zimer). **G** – *U. hydrocarpa* (Créditos: Carnivorous Plants Italia; <http://www.cpitalia.net/>). **H** – *U. poconensis* (Créditos: F. Ridavavia). **I** – *U. warmingii* (Créditos: M. Ferramosca). **J** – *U. inflexa* (Créditos: M. Schmidt). **K** – *U. vulgaris* (Créditos: S. Matson). **L** – *U. foliosa* (Créditos: LSV). **M** – *U. muelleri* (Créditos: G. Bourke). **N** – Turião de *U. macrorhiza* (Créditos: B. Rice).

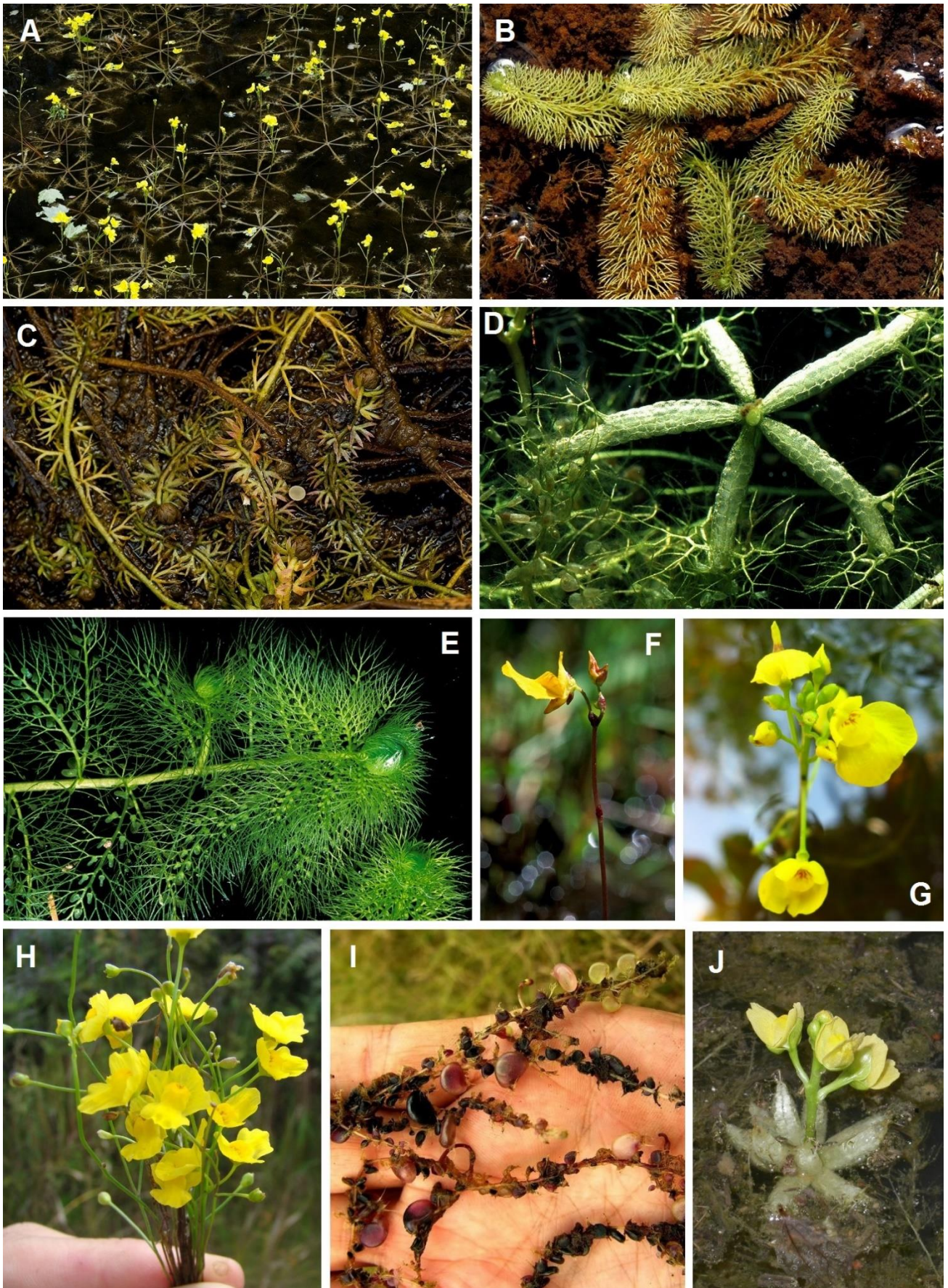


Fig. 5. *Utricularia* sect. *Utricularia*. **A** – *U. inflata*. **B** – *U. intermedia*. **C** – *U. minor*. **D** – *U. radiata*. **E** – *U. macrorhiza*. **F** – *U. ochroleuca* (Créditos: B. Rice). **G** – *U. aurea* (Créditos: B. Zimer). **H** – *U. gibba* (Créditos: LSV). **I** – *U. reflexa* (Créditos: F. Ridavavia) **J** – *U. stellaris* (Créditos: B. Zimer).

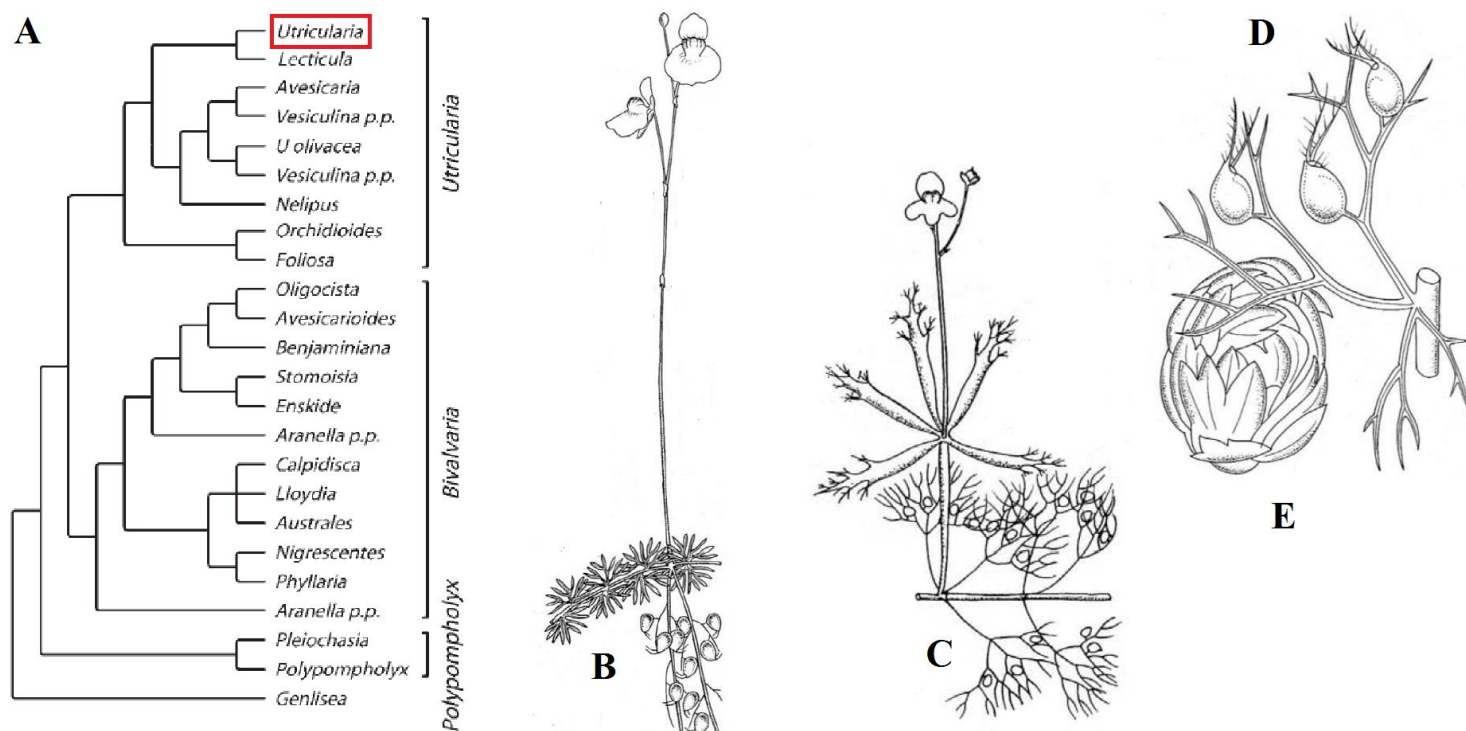


Fig. 6. **A** – Posicionamento de *Utricularia* sect. *Utricularia* em relação às demais seções do gênero, distribuídas em três subgêneros, tomando como base os resultados obtidos por Jobson et al. (2003) e Müller et al. (2004). O cladograma foi extraído de Müller et al. (2006). **B** – Dimorfismo de ramos, evidente em *Utricularia intermedia*, **C** – órgãos vegetativos e inflorescência sustentada por flutuadores em *Utricularia breviscapa*, **D** – folhas com utrículos, e **E** – turrão de *Utricularia minor*. As ilustrações encontradas em **B**, **C**, **D** e **E** foram extraídas e adaptadas de Taylor (1989).

Algumas espécies de *Utricularia* sect. *Utricularia* produzem flutuadores na base da inflorescência que irradiam-se para todas as direções, sustentando-a fora da água (fig. 4J, 4M, 5A, 5D, 5J e 6C) e permitindo que as flores entrem em contato com os polinizadores (RUTISHAUSER, 1993; TAYLOR, 1989). A maioria das espécies possuem flores com corola amarela, porém ocorrem flores brancas e em diferentes tonalidades de roxo e rosa. Os utrículos são relativamente homogêneos entre as espécies da seção *Utricularia*, sendo marcante a presença de duas antenas ramificadas próximas à entrada (fig. 6D) (TAYLOR, 1989). Em algumas espécies ocorrem utrículos dimórficos (fig. 5I), o que pode ampliar o espectro de presas (REIFENRATH et al., 2006; TAYLOR, 1989). Outras características comuns ao grupo são a presença de brácteas basifixas, a ausência de bractéolas e o padrão de deiscência equatorial das cápsulas, que ocorre na maioria das espécies (TAYLOR, 1989).

Assim como na maioria das macrófitas aquáticas, ocorre uma grande importância da reprodução clonal nas espécies de *Utricularia* sect. *Utricularia*

(PHILBRICK; LES, 1996). Algumas populações estéreis de *U. australis* (fig. 4A), de reprodução estritamente clonal, tiveram sua origem híbrida elucidada por Kameyama et al. (2005), através do uso marcadores AFLP e do cpDNA. Tais populações possuem dominância F1 e são originárias do cruzamento desigual entre *U. australis*, majoritariamente como parental feminino, e *U. macrorhiza* (fig. 5E), majoritariamente como parental masculino. As populações F1 estéreis são mais bem distribuídas que ambos os parentais, evidenciando as vantagens da heterose quanto à colonização de novos ambientes. Utilizando-se novamente de marcadores AFLP, Kameyama e Ohara (2006) também constataram que a maior parte da variabilidade genética existente em populações férteis de *U. australis* é oriunda de eventuais recombinações sexuais, a despeito de mutações somáticas.

Algumas espécies possuem cleistogamia de flores submersas, e algumas jamais produzem sementes ou frutificam, como no caso de *Utricularia bremii* (fig. 4E), *U. ochroleuca* (fig. 5F) e *U. stygia*, que se reproduzem apenas vegetativamente (TAYLOR, 1989; THOR, 1988). Esse fato soma-se à constatação de que tais espécies possuem altos índices de má formação polínica (BERETTA et al., 2014; TAYLOR, 1989), e de que *U. bremii* e *U. ochroleuca* apresentam desarranjos cromossômicos (CASPER; MANITZ, 1975), dando suporte à hipótese de que esses táxons possuem origem híbrida.

As relações filogenéticas em *Utricularia* sect. *Utricularia* permanecem incertas, e dados moleculares oriundos do íntron *rps16* e do espaçador *trnL-F*, ambos do cpDNA, sugerem a parafilia do grupo, devido ao fato de que *U. olivacea* (fig. 4D) agrupa-se com *Utricularia* sect. *Vesiculina* (fig. 6A) (JOBSON et al., 2003). As evidências morfológicas, citogenéticas e moleculares que apontam um padrão reticulado ao longo da evolução do grupo (ASTUTI, 2016; KAMEYAMA et al., 2005; PLACHNO; ADAMEC, 2007a; TAYLOR, 1989) demandam o emprego de marcadores moleculares oriundos de diferentes compartimentos genômicos, de herança uniparental (cpDNA e mtDNA) e biparental (nDNA), para que os dados sejam confrontados e possíveis incongruências possam indicar uma origem hibridogênica para algumas espécies (BAUMEL et al., 2002, SOLTIS; SOLTIS, 1998). Tradicionalmente, a reconstrução filogenética de plantas emprega marcadores do DNA plastidial e

do DNA nuclear ribossomal, sendo genes nucleares de poucas cópias menos utilizados (SMALL et al., 2004). O DNA nuclear conta com a vantagem de possuir taxas de evolução molecular mais aceleradas quando comparado ao cpDNA e ao mtDNA (WOLFE et al., 1987), o que pode aumentar o sinal e o poder discriminatório das análises filogenéticas (SMALL et al., 2004; ZIMMER; WEN, 2012). No entanto, marcadores nucleares de poucas cópias no genoma são amplificados com maior dificuldade, devido ao número reduzido de cópias por célula, o que demanda um emprego de maiores quantidades de DNA *template* por PCR (SMALL et al., 2004). Além disso, a dinâmica dos genomas nucleares faz com que esses marcadores contem com a possibilidade de sofrer recombinação, além de existir o risco de amplificação de cópias parálogas, problema comum principalmente em análises baseadas no DNA nuclear ribossomal, como a região ITS. O nrDNA possui várias cópias em *tandem* espalhadas pelo genoma de eucariotos, e é amplamente utilizado em estudos filogenéticos e de genética populacional (SMALL et al., 2004; ZIMMER; WEN, 2012). Os problemas referentes à amplificação das diferentes cópias parálogas do DNA ribossomal seriam teoricamente atenuados pela homogeneização dessas sequências, fenômeno conhecido como evolução em conserto (LINDER; RIESEBERG, 2004; MARULANDA, dados não publicados; SMALL et al., 2004).

Um dos principais problemas referentes à utilização de genes nucleares de uma ou poucas cópias no genoma de angiospermas decorre da frequente ocorrência de indivíduos poliploides em plantas, principalmente quando ocorrem altos índices de *loci* heterozigotos. Isso gera a possibilidade de sequenciamento de diferentes alelos de um mesmo gene, e nesse contexto os marcadores do DNA plastidial levam vantagem, por serem menos polimórficos (SMALL et al., 2004; ZIMMER; WEN, 2012). Apesar das desvantagens do ponto de vista metodológico, o fato de marcadores nucleares de uma ou poucas cópias possuírem índices de substituição nucleotídica relativamente maiores (WOLFE et al., 1987), possuírem herança biparental e de não contarem com problemas referentes ao grande número de cópias parálogas espalhadas pelo genoma, tornam a sua utilização essencial para a reconstrução de padrões de evolução reticulada, muito comum em plantas (LINDER; RIESEBERG, 2004).

Material e Métodos

Obtenção de material vegetal e extrações de DNA

Das 35 espécies descritas de *Utricularia* sect. *Utricularia*, 21 se encontram representadas no trabalho em questão. Como grupo externo, foram utilizadas mais onze espécies de *Utricularia*, das seções *Iperua*, *Vesiculina*, *Setiscapella*, *Avesicaria*, *Oligocista*, *Aranella*, *Calpidisca* e *Lecticula*, bem como três espécies de *Genlisea*. Foram adquiridas amostras de tecido das espécies que ocorrem no Brasil através de viagens de coleta em diversas localidades (Autorização Sisbio/MMA números 26938, 43985 e 48516), e foram recebidas amostras de espécies que não ocorrem no país por intermédio do pesquisador Lubomír Adamec, da Academia de Ciências da República Checa (tab. 1). Amostrou-se espécies que ocorrem em todos os continentes com exceção da Antártida, bem como os principais grupos morfológicos de *U.* sect. *Utricularia* caracterizados por Taylor (1989) foram representados. O DNA das amostras foi extraído através do método CTAB (Doyle e Doyle, 1987), com modificações descritas por Lodhi et al. (1994).

Prospecção de genes nucleares e desenvolvimento de *primers*

Foi realizada a prospecção de marcadores nucleares que geralmente ocorrem em uma ou poucas cópias no genoma de angiospermas (ZIMMER; WEN, 2012). Foram selecionadas sequências anotadas de dez genes da base nt no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), tomando-se o cuidado de escolher espécies o mais próximo possível de Lentibulariaceae (tab. 2).

Tab. 1. Espécies e indivíduos amostrados (gêneros *Genlisea* e *Utricularia*), classificação infragenérica, origem das amostras e marcadores para os quais a amostra teve sequências produzidas. Os indivíduos coletados a campo contam com o local onde foi realizada a amostragem, a despeito dos obtidos em parceria com o professor Lubomír Adamec. "X" indica o sequenciamento do referido marcador para a amostra.

Spp. e indivíduos	Classificação	Origem da amostra	rpl20-rps12	RPB2	LEAFY
<i>G. aurea</i> A.St.-Hil.	<i>G. subgen. Genlisea</i>	Sequência obtida no CoGe (M569_08783)	-	X	X
<i>G. filiformis</i> A.St.-Hil.	<i>G. subgen. Genlisea</i>	Brasil. GO. Pq. Nac. da Chapada dos Veadeiros	X	-	-
<i>G. violacea</i> A.St.-Hil.	<i>G. subgen. Tayloria</i>	Brasil. MG. Capitólio	X	-	-
<i>U. reniformis</i> A.St.-Hil.	<i>U. sect. Iperua</i>	Brasil. SP. Salesópolis	X	-	-
<i>U. geminiloba</i> Benj.	<i>U. sect. Iperua</i>	Brasil. RJ. Petrópolis	X	-	-
<i>U. cucullata</i> A.St.-Hil. & Girard	<i>U. sect. Vesiculina</i>	Brasil. GO. Pq. Nac. da Chapada dos Veadeiros	X	-	X
<i>U. purpurea</i> Walter	<i>U. sect. Vesiculina</i>	Coleção viva – Lubomír Adamec	X	-	-
<i>U. subulata</i> L.	<i>U. sect. Setiscapella</i>	Brasil. SP. Mogi das Cruzes	X	-	X
<i>U. neottioides</i> Luetzelb.	<i>U. sect. Avesicaria</i>	Brasil. GO. Pq. Nac. da Chapada dos Veadeiros	X	-	-
<i>U. laciniata</i> St.-Hil & Girard	<i>U. sect. Aranella</i>	Brasil. MG. Capitólio	X	-	-
<i>U. arenaria</i> A.DC.	<i>U. sect. Calpidisca</i>	Coleção viva – Lubomír Adamec	X	-	-
<i>U. uliginosa</i> Vahl	<i>U. sect. Oligocista</i>	Coleção viva – Lubomír Adamec	X	-	-
<i>U. resupinata</i> B.D.Greene ex Bigelow	<i>U. sect. Lenticula</i>	Coleção viva – Lubomír Adamec	X	X	-
<i>U. gibba</i> L. 1	<i>U. sect. Utricularia</i>	Brasil. SP. Mogi das Cruzes	X	X	-
<i>U. gibba</i> L. 2	<i>U. sect. Utricularia</i>	Brasil. SP. Sertãozinho	X	X	X
<i>U. gibba</i> L. 3	<i>U. sect. Utricularia</i>	Brasil. SP. Sertãozinho	X	X	X
<i>U. striata</i> Leconte ex Torr.	<i>U. sect. Utricularia</i>	Coleção viva – Lubomír Adamec	X	X	X
<i>U. floridana</i> Nash	<i>U. sect. Utricularia</i>	Coleção viva – Lubomír Adamec	X	X	X
<i>U. vulgaris</i> L.	<i>U. sect. Utricularia</i>	Coleção viva – Lubomír Adamec	X	X	X
<i>U. macrorhiza</i> Leconte 1	<i>U. sect. Utricularia</i>	Coleção viva – Lubomír Adamec	X	X	X
<i>U. macrorhiza</i> Leconte 2	<i>U. sect. Utricularia</i>	Coleção viva – Lubomír Adamec	-	X	-
<i>U. australis</i> R.Br. 1	<i>U. sect. Utricularia</i>	Coleção viva – Lubomír Adamec	X	X	-
<i>U. australis</i> R.Br. 2	<i>U. sect. Utricularia</i>	Coleção viva – Lubomír Adamec	X	X	X
<i>U. intermedia</i> Hayne	<i>U. sect. Utricularia</i>	Coleção viva – Lubomír Adamec	X	X	-
<i>U. ochroleuca</i> R.W.Hartm.	<i>U. sect. Utricularia</i>	Coleção viva – Lubomír Adamec	X	X	-
<i>U. breinii</i> Heer	<i>U. sect. Utricularia</i>	Coleção viva – Lubomír Adamec	X	X	X
<i>U. minor</i> L.	<i>U. sect. Utricularia</i>	Coleção viva – Lubomír Adamec	X	X	-
<i>U. dimorphanta</i> Makino	<i>U. sect. Utricularia</i>	Coleção viva – Lubomír Adamec	X	X	X
<i>U. aurea</i> Lour.	<i>U. sect. Utricularia</i>	Coleção viva – Lubomír Adamec	X	X	-
<i>U. inflexa</i> Forssk.	<i>U. sect. Utricularia</i>	Coleção viva – Lubomír Adamec	X	-	X
<i>U. reflexa</i> Oliv. 1	<i>U. sect. Utricularia</i>	Coleção viva – Lubomír Adamec	X	X	-
<i>U. reflexa</i> Oliv. 2	<i>U. sect. Utricularia</i>	Coleção viva – Lubomír Adamec	X	-	-
<i>U. hydrocarpa</i> Vahl 1	<i>U. sect. Utricularia</i>	Brasil. RN. Rio do Fogo	X	X	X
<i>U. hydrocarpa</i> Vahl 2	<i>U. sect. Utricularia</i>	Coleção viva – Lubomír Adamec	-	X	X
<i>U. radiata</i> Small	<i>U. sect. Utricularia</i>	Coleção viva – Lubomír Adamec	X	X	-
<i>U. breviscapa</i> Wright ex Griseb.	<i>U. sect. Utricularia</i>	Brasil. SP. Mogi das Cruzes	X	X	X
<i>U. benjaminiana</i> Oliv.	<i>U. sect. Utricularia</i>	Brasil. RN. Nísia Floresta	X	X	-
<i>U. foliosa</i> L.	<i>U. sect. Utricularia</i>	Brasil. SP. Mogi das Cruzes	X	X	X
<i>U. olivacea</i> C.Wright ex Griseb. 1	<i>U. sect. Utricularia</i>	Brasil. SP. Cajuru	X	X	X
<i>U. olivacea</i> C.Wright ex Griseb. 2	<i>U. sect. Utricularia</i>	Brasil. BA. Pq. Nac. da Chapada Diamantina	X	-	-
<i>U. stygia</i> G.Thor	<i>U. sect. Utricularia</i>	Coleção viva – Lubomír Adamec	X	X	X

Os genes nucleares selecionados para serem empregados como marcadores no trabalho em questão foram utilizados com êxito para a reconstrução filogenética de vários grupos de angiospermas (BENNETT; MATHEWS, 2006; CLARKSON et al., 2010; FORD et al., 2006; FUKUDA et al., 2005; HOWARTH; BAUM, 2002; KIM et al., 2010; MATHEWS et al., 2002; OXELMAN et al., 2004; RONSTED et al., 2008; SMITH et al., 2004). Utilizando-se o BLASTN (ALTSCHUL et al., 1990) na base CoGe (LYONS et al., 2008), foi localizada a sequência de maior identidade com os genes previamente selecionados, no genoma disponibilizado de *Utricularia gibba* (IBARRA-LACLETTE et al., 2013), espécie pertencente à *Utricularia* sect. *Utricularia*. Em seguida, foram desenvolvidos de dois a oito pares de *primers* por gene selecionado (tab. 3), utilizando-se o aplicativo Primer3 (UNTERGASSER et al., 2012). Foram empregados também os *primers* *rpl20* e *rps12*, objetivando a amplificação do do espaçador cloroplastidial *rpl20-rps12*, conforme a descrição de Hamilton (1999).

Tabela 2. Genes nucleares prospectados, espécies utilizadas como modelo e código de acesso das sequências anotadas no GenBank.

Gene	Espécie modelo	Código de acesso
<i>Cycloidea gene (CYC)</i>	<i>Antirrhinum molle</i>	AF146844.1
<i>Chloroplast-expressed glutamine synthetase (ncpGS)</i>	<i>Sinningia gerdiana</i>	AJ459607.1
<i>GAPDH/G3PDH</i>	<i>Plectranthus amboinicus</i>	KC347565.1
<i>LEAFY (LFY)</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	EF598404.1
<i>Nitrate reductase (NIA)</i>	<i>Olea paniculata</i>	EF177404.1
<i>PgiC</i>	<i>Helianthus annuus</i>	DQ504033.1
<i>Phytochrome gene (PHYA)</i>	<i>Mannagettaea hummelii</i>	KC542190.1
<i>Phytochrome gene (PHYB)</i>	<i>Aeginetia indica</i>	KC542196.1
<i>RPB2</i>	<i>Mimulus guttatus</i>	AJ565937.1
<i>Alcohol dehydrogenase (ADH)</i>	<i>Plastemon laetus</i>	KF429092.1

Reações de PCR e sequenciamento

Foram realizados testes referentes à amplificação de cada marcador nuclear prospectado, aplicando-se um gradiente de possíveis temperaturas e tempos de desnaturação, anelamento e extensão. Os reagentes das reações de

amplificação foram testados em várias concentrações, bem como foram realizadas diluições fracionadas no DNA *template* até que fosse atingida uma concentração ótima. Foi testada também a adição dos adjuvantes dimetil sulfóxido (DMSO) e albumina de soro bovino (BSA), em concentrações que variaram de 1% a 5% (MIRANDA et al., 2010).

Tabela 3. Pares de *primers* desenvolvidos ao longo do trabalho em questão, constando o gene alvo, as sequências *forward* e *reverse*, a temperatura de Melting (T_m) de cada *primer* e o tamanho esperado dos *amplicons*.

Gene (Primers)	Forward primer 5' - 3' (T _m)	Reverse primer 5' - 3' (T _m)	Tamanho dos amplicons em pb
<i>Cycloidea</i> (1)	AGGGAAGAAGGAGGGGTCTG (60,05°C)	CTTGTCTCTCCCTAGCCCT (60,03°C)	590
<i>Cycloidea</i> (2)	AAGGGAAGAAGGAGGGGTCT (59,50°C)	TCCCTTGTCTCTCCCTAGC (60,03°C)	594
<i>Cycloidea</i> (3)	GTGAGGCTCTCCATTGGCAT (60,11°C)	CGTTGATTGAGGGTTGCTG (59,56°C)	559
<i>ncpGS</i> (1)	AGAATCTCCAAGAACGCGGG (60,11°C)	AGCAGCTCGGAACCTTTTGT (60,18°C)	471
<i>ncpGS</i> (2)	CGCCGTTCAATCTGAAAGCA (60,81°C)	CGCTCTTTTGGAGCAAGGTG (59,75°C)	440
<i>ncpGS</i> (3)	GCGGGAGATGCGAATCTGTT (60,81°C)	TGTTAGTCGGGATTGGCAGG (59,75°C)	439
<i>ncpGS</i> (4)	CCAATGGTGAGGTGATGCCT (60,03°C)	TTCAGTATCACGGCCCACAC (60,04°C)	401
<i>ncpGS</i> (5)	GGAATCGAAGCTGGGGATCA (59,53°C)	TTCTGCAAGCAATCCGGTCA (60,25°C)	429
<i>ncpGS</i> (6)	TACAGAACAAGCTGGCGTGG (60,60°C)	AGCTTCCAGTGTTGGTTCCC (60,18°C)	429
<i>PHYA</i> (1)	CCGGCACAGTGCAAGAATAC (59,55°C)	GCAAGGATTGCAAGCGAGAG (59,90°C)	596
<i>PHYA</i> (2)	TCTCAACCAGCTCACTCGAC (59,40°C)	ACTACCTGTGACCCGATGGA (59,96 °C)	519
<i>PHYA</i> (3)	TGAGTGCCTATCTGCACCAG (59,46°C)	AGCAGGATAATGCAAGCCCA (59,74 °C)	614
<i>PHYA</i> (4)	TGAACTGACGTTGTGTGGCT (60,11°C)	CCGCCTCTTGACAATTCCA (60,25°C)	763
<i>PHYA</i> (5)	ATGGGGTCTAGTTGTGTGCC (59,67°C)	AGACTCCGCCTCTTGACAAC (59,68°C)	603
<i>PHYA</i> (6)	GAAGTACGTTGTGTGGCTC (59,42°C)	CCAAAGCCCCAGGATAACCA (59,67 °C)	568
<i>PHYA</i> (7)	CAGCAGGCACTTCACCTTCA (60,54°C)	CAGGCTAATCCCATCCTCCG (59,68°C)	621
<i>PHYA</i> (8)	ATGGATGGGGAAGAGGCTGT (60,63°C)	TTGGCCGATACCGAAACCTG (60,39°C)	539
<i>GAPDH</i> (1)	TGGAGCTTGTCGCTGTCAAT (50°C)	AATGAGGCAGCTCTTCCACC (55°C)	535
<i>GAPDH</i> (2)	CGTCTGGTTGCTAGGGTTGC (61,30°C)	TCCACCTCTCCAGTCCTTCAT (59,92°C)	558
<i>PgiC</i> (1)	ATGCTGAATGCACGGAAGTCT (59,75°C)	ATCCGGCTGTGCAAAGAAGT (60,25°C)	657
<i>PgiC</i> (2)	GAGTTTCCTTGGCCCTCTGT (59,60°C)	GTTGCTGACTCTGCACAACC (59,69°C)	779
<i>RPB2</i> (1)	CTCCTGAAGACGTGCAAGGT (59,97°C)	CCACGGGAGTGGATCTTGTC (60,11°C)	568
<i>RPB2</i> (2)	CGGGATCACAGCACAAGTCT (60,04°C)	ACGTGATCGTCCTTCAGCAG (60,11°C)	570
<i>NIA</i> (1)	CCACCTCCAAGCTCCAGAAG (60,04°C)	CTGCTCAGACTGCGTACTCC (60,18°C)	253
<i>NIA</i> (2)	TTCTCCGGCTGCGTATTGAG (60,18°C)	GGGCTACGCCTATTCTGGTG (60,25°C)	304
<i>LEAFY</i> (1)	GGCGAGAGATACGGCATCAA (59,97°C)	TGGTGGGACATTTTTCGCCT (60,18°C)	511
<i>LEAFY</i> (2)	AATTGCAGAGCTTGGCTTCAC (59,73°C)	GAGCTACTTCACCAGGCTCG (60,18°C)	509
<i>ADH</i> (1)	CCGCTGGTGATTGAAGAGGT (60,04°C)	AAAGTCAGTGACGCCGAAGT (59,90°C)	669
<i>ADH</i> (2)	ACCGGAGAGTGCAAGGAATG (60,04°C)	TGCGTCGTCTTTGTTGGGTA (59,90°C)	624
<i>PHYB</i> (1)	GGGATGCCTGGGGAAGTAAC (60,11°C)	TAAGCCGACAACAAGTCCA (60,18°C)	672
<i>PHYB</i> (2)	GCATATGCATCCCCGTTCCCT (60,25°C)	AATTTGTCAAGTCATCGGGC (59,47°C)	821

Após a bateria de testes, as reações de amplificação dos marcadores nucleares foram padronizadas em 25 µL, empregando-se 20 mM de MgCl₂, 100 mM de dNTPs (100mM), 10 mM de cada *primer*, 1 U de *Dream Taq polymerase*

(Fermentas), e em média 50 ng de gDNA. O perfil térmico das reações de amplificação dos genes nucleares foi 1' a 94°C; trinta ciclos de 40'' a 94°C, 40'' a 48°C e 40'' a 72°C; e 5' de extensão final a 72°C. Para a amplificação de *rps20-rps12*, foram utilizados os mesmos volumes e concentrações de reagentes citados anteriormente, sem a necessidade de adição de adjuvantes e com o DNA *template* menos concentrado (de 5 a 50 ng por reação). O perfil térmico foi 3' a 94°C; trinta ciclos de 40'' a 92°C, 50'' a 50°C e 1' a 72°C; e uma extensão final de 10' a 72°C. As reações nas quais o produto apresentou banda única compatível ao tamanho da região alvo após eletroforese em gel de agarose (0,8%) tiveram seus *amplicons* precipitados com isopropanol (100%) e purificados com etanol (70%), tendo suas fitas *forward* e *reverse* sequenciadas pelo método de Sanger em um sequenciador automático modelo 3730xl ABI (*Applied Biosystems*). Os eletroferogramas de ambas as fitas de cada amostra foram verificados quanto à sua qualidade e editados manualmente, para que erros de sequenciamento fossem corrigidos e máscaras fossem adicionadas aos sítios ambíguos, utilizando-se o programa BioEdit 7.5.0.2 (Hall, 1999). A identidade com a região alvo foi verificada através do aplicativo BLASTN (ALTSCHUL et al., 1990).

Análises moleculares

Dos dez marcadores nucleares testados, dois foram sequenciados com sucesso para um grande número de espécies, sendo eles *RPB2* e *LEAFY*. O espaçador *rpl20-rps12* foi sequenciado com relativa facilidade. As sequências homólogas foram alinhadas através do aplicativo MAFT *version 7* (KATO et al., 2002). Os alinhamentos tiveram as extremidades cortadas, com a posterior adição de *missing data* (“?”). Espécies nas quais o sequenciamento de algum dos *loci* não obteve êxito foram adicionadas à matriz com *missing data* para o marcador em questão (tab. 1) (WIENS, 2006). Foram realizadas análises filogenéticas de máxima parcimônia no *software* PAUP* 4b10 (SWOFFORD, 2003), através de busca heurística de 3.000 réplicas e adição aleatória de

sequências, com o algoritmo TBR (*tree bisection and reconnection*). Os valores de *bootstrap* foram obtidos através do emprego e 2.000 réplicas, com adição aleatória e busca heurística de 100 réplicas. O melhor modelo de substituição nucleotídica para cada marcador foi obtido no programa jModelTest versão 2.1.1 (DARRIBA et al., 2012), seguindo o critério de informação de Akaike corrigido, ou AICc (AKAIKE, 1973; SUGIURA, 1978). Para *rpl20-rps12* o melhor modelo de substituição nucleotídica foi TVM+G, para *RPB2* foi TIM1+G, para *LEAFY* foi GTR+G e para a concatenação dos dados o melhor modelo foi TIM1+I+G. As análises de máxima verossimilhança foram conduzidas no *software* RAxML (STAMATAKIS et al., 2008), que disponibiliza os valores de *bootstrap* dos clados. Foram conduzidas também análises bayesianas com o aplicativo MrBayes versão 3.2.2 (HUELSENBECK; RONQUIST, 2001). Foram produzidas 3×10^7 de gerações, e as probabilidades posteriores foram calculadas através do algoritmo MCMC (*Markov Chain Monte Carlo*), com o emprego de quatro cadeias quentes. Foram amostradas árvores a cada 100 gerações, com descarte de 25% das árvores iniciais (*burnin*). Além das análises individuais, baseadas nos alinhamentos de cada marcador, foram realizadas análises de matriz concatenada.

Realizou-se a construção de redes haplotípicas para cada marcador, com o emprego do algoritmo *Mendian Joining* (BANDELT et al., 1999) nos *softwares* DnaSP v. 5 (LIBRADO; ROZAS, 2009) e NETWORK 5.0.0.0 (POLZIN; DANESHMAND, 2004), para que fossem verificados grupos de espécies compartilhando o mesmo haplótipo, devido à coalescência (TEMPLETON et al., 1992) ou à reticulação ocasionada pela possível origem hibridogênica de algumas espécies de *Utricularia* sect. *Utricularia*. Foi construída também uma rede filogenética utilizando-se uma matriz concatenada dos marcadores empregados, utilizando-se o *software* SplitsTree4 (HUSON; BRYANT, 2006). Essa análise evidencia as incongruências existente entre os diferentes conjuntos de dados, o que pode trazer informações referentes à reticulação que ocorreu ao longo da evolução de *Utricularia* sect. *Utricularia*. Foi utilizado o método *Neighbour-Net* (BRYANT; MOULTON, 2002), com emprego do modelo de substituição nucleotídica GTR, e utilização do algoritmo “RECOMB2007” (HUSON; KLÖPPER, 2007).

Resultados e discussão

Dos dez marcadores nucleares para os quais foram desenvolvidos *primers*, três apresentaram amplificação inespecífica ou não exibiram sinais de amplificação após eletroforese em gel de agarose, sendo eles *ncpGS* (fig. 7), *PHYA* e *PHYB* (fig. 8).

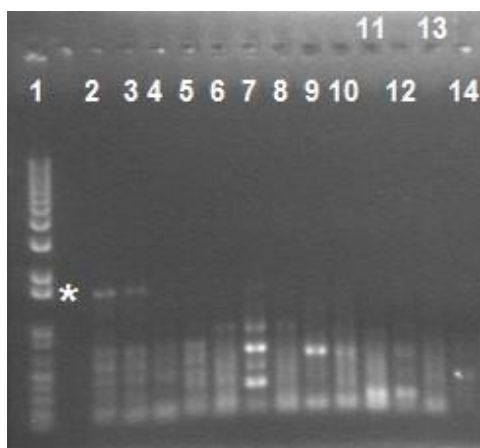


Fig. 7. Gel de agarose (0,8%) com *amplicons* de *ncpGS*, de várias espécies de *Lentibulariaceae*. Os *primers* utilizados foram *ncpGS* (1), e ocorreu grande incidência de amplificação inespecífica. 1 – Ladder. *1650 pb. 2 – *U. geminiloba* 1. 3 – *U. geminiloba* 2. 4 – *U. geminiloba* 3. 5 – *U. geminiloba* 4. 6 – *U. gibba* 1. 7 – *U. foliosa*. 8 – *U. gibba* 2. 9 – *G. violacea*. 10 – *U. breviscapa*. 11 – *U. olivacea*. 12 – *U. benjaminiana*. 13 – *U. hydrocarpa*. 14 – Controle negativo.

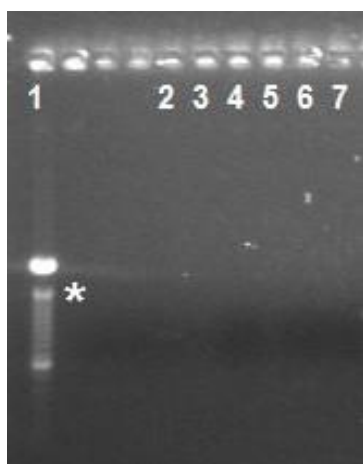


Fig. 8. Gel de agarose (0,8%) após eletroforese do produto de PCR de algumas espécies de *Utricularia*. Os *primers* utilizados foram *PHYB* (2), e nada foi amplificado. 1 – Ladder. *600 pb 2 – *U. gibba*. 3 – *U. foliosa*. 4 – *U. breviscapa*. 5 – *U. olivacea*. 6 – *U. benjaminiana*. 7 – Controle negativo.

O produto das reações referentes à amplificação dos genes *GAPDH* (fig. 9) e *PgiC* (fig. 10A) apresentaram banda única compatível às dimensões das sequências alvo. Após a precipitação, purificação e sequenciamento de *amplicons* desses *loci* para que sua viabilidade fosse testada, observou-se uma grande sobreposição de picos nos eletroferogramas, provavelmente devido à amplificação de cópias parálogas desses genes (fig. 11). Para a amostra de *Utricularia bremii* referente à amplificação do gene *GAPDH*, notou-se a presença de duas bandas muito próximas na fotografia do gel após eletroforese, compatíveis às dimensões da sequência alvo do marcador em questão. Essas bandas quase sobrepostas possivelmente são correspondentes a cópias parálogas desse *locus*, ou apontam um indivíduo heterozigoto (fig. 9). *U. bremii* é uma espécie estéril, apresentando desarranjos cromossômicos (CASPER; MANITZ, 1975) e pólen inviável (BERETTA et al., 2014; TAYLOR, 1989), e essa sobreposição de bandas de um mesmo marcador pode estar relacionada à origem híbrida desse táxon, caso tenham sido amplificadas as sequências de ambos os possíveis parentais. O sequenciamento de *GAPDH* obteve êxito para *Utricularia inflexa* e *U. reflexa*. Foram produzidas sequências de *PgiC* para *U. reflexa*, *U. hydrocarpa* e *U. foliosa*. As reações que visaram a amplificação do gene *ADH* (fig. 10B) produziram *amplicons* de peso molecular maior do que o esperado. Foi realizado o sequenciamento de algumas amostras, e em alguns casos observou-se eletroferogramas com picos bem definidos, porém as sequências não apresentaram similaridade com nenhum organismo no banco de dados do NCBI.

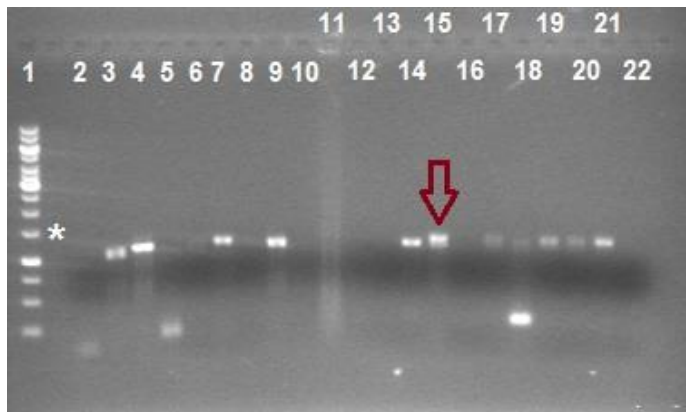


Fig 9. Gel de agarose (0,8%) com amplicons de GAPDH, de várias espécies de *Utricularia*. Os primers utilizados foram GAPDH (2). 1 – Ladder. *500 pb. 2 – *U. gibba* 1. 3 – *U. gibba* 2. 4 – *U. foliosa*. 5 – *U. breviscapa*. 6 – *U. olivacea*. 7 – *U. benjaminiana*. 8 – *U. hydrocarpa* 1. 9 – *U. hydrocarpa* 2. 10 – *U. intermedia*. 11 – *U. striata*. 12 – *U. inflexa*. 13 – *U. geminiscapa*. 14 – *U. reflexa*. 15 – *U. bremii*. 16 – *U. floridana*. 17 – *U. stygia*. 18 – *U. radiata*. 19 – *U. vulgaris*. 20 – *U. australis*. 21 – *U. dimorphanta*. 22 – Controle negativo. Note a sobreposição de bandas que ocorre na amostra 15, referente a *U. bremii*, sugerindo a ocorrência de diferentes amplicons do gene GAPDH.

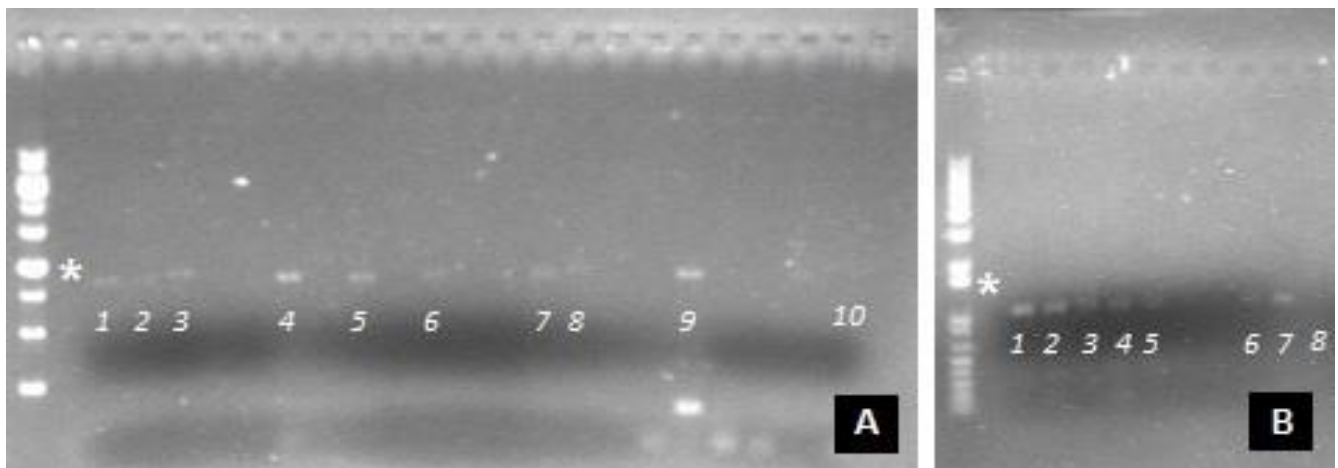


Fig. 10. Bandas fotografadas após eletroforese em gel de agarose (0,8%). **A** – Amplicons de diversas espécies de *Utricularia*, tendo sido empregado os primers PgiC (1). *500 pb. 1 – *U. gibba* 1. 2 – *U. gibba* 2. 3 – *U. foliosa*. 4 – *U. benjaminiana*. 5 – *U. hydrocarpa*. 6 – *U. striata*. 7 – *U. reflexa*. 8 – *U. bremii*. 9 – *U. radiata*. 10 – Controle negativo. **B** – Amplicons de diversas espécies de *Utricularia*, tendo sido utilizados os primers ADH (2). * 1650 pb. 1 – *U. gibba* 1. 2 – *U. gibba* 2. 3 – *U. foliosa*. 4 – *U. breviscapa*. 5 – *U. benjaminiana*. 6 – *U. radiata*. 7 – *U. dimorphanta*. 8 – Controle negativo.

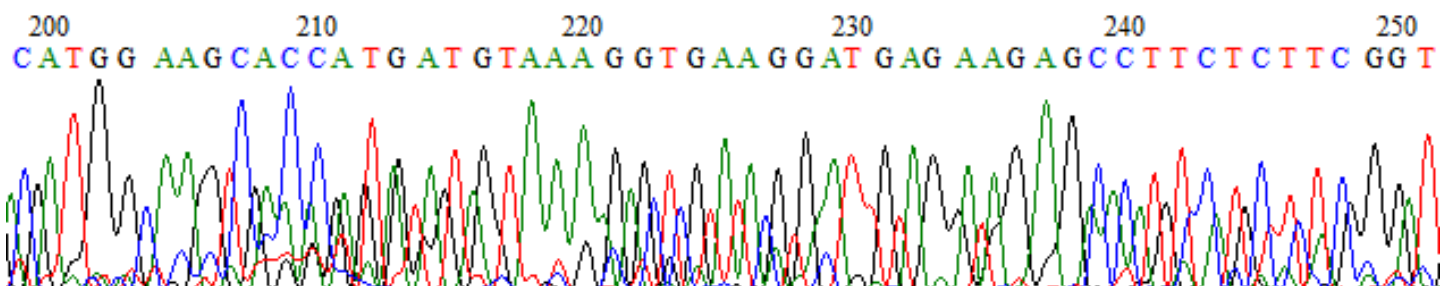


Fig. 11. Eletroferograma gerado a partir de amplicons oriundos do primer GAPDH (2), com DNA template de *Utricularia foliosa*. A sobreposição de picos pode ser um indicio da amplificação de cópias parálogas do gene em questão.

O gene *NIA* aparentemente foi amplificado em *Utricularia gibba* e *U. floridana* (fig. 12), espécies muito próximas filogeneticamente como ficou constatado no trabalho em questão (fig. 18). Como os *primers* foram desenvolvidos a partir do genoma de *U. gibba*, é possível que mutações nas regiões de anelamento tenham impedido a amplificação nas demais espécies empregadas no presente estudo.

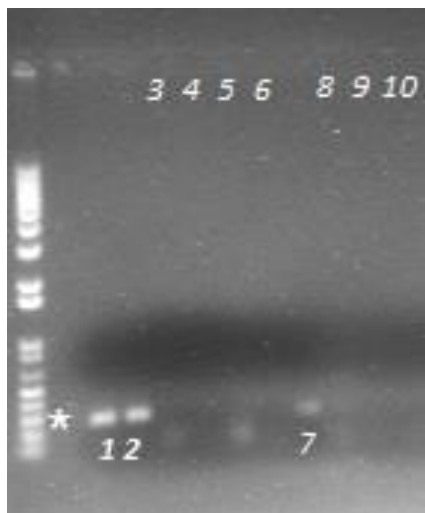


Fig. 12. Gel de agarose (0,8%) após eletroforese dos produtos de PCR de várias espécies de *Utricularia*. Os *primers* utilizados foram *NIA* (1). *300 pb. 1 – *U. gibba* 1. 2 – *U. gibba* 2. 3 – *U. foliosa*. 4 – *U. breviscapa*. 5 – *U. benjaminiana*. 6 – *U. hydrocarpa*. 7 – *U. floridana*. 8 – *U. radiata*. 9 – *U. dimorphanta*. 10 – Controle negativo.

O gene *Cycloidea*, que relaciona-se à simetria floral em plantas (ALMEIDA et al., 1997) e geralmente se encontra em cópia única no genoma de angiospermas (ZIMMER; WEN, 2012) foi amplificado e sequenciado com facilidade apenas no clado composto por *Utricularia gibba*, *U. floridana* e *U. striata*. Nas demais espécies, os *primers* se mostraram pouco específicos. Foram produzidas sequências de *U. foliosa* e *U. benjaminiana*, com eletroferogramas bem definidos, porém constatou-se que não se tratava do gene alvo após a verificação da identidade no BLASTN (ALTSCHUL et al., 1990). Foi aplicado um teste filogenético com as sequências produzidas (fig. 13), condizente com a reconstrução filogenética baseada nos demais marcadores (figs. 15, 16, 17 e 18).

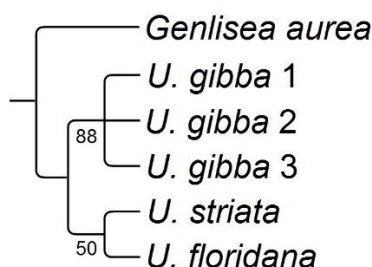


Fig 13. Cladograma de análise bayesiana baseada no gene *CYC* do nDNA. As probabilidades posteriores de cada clado são indicadas junto aos nós.

Os genes nucleares *RPB2* e *LEAFY* apresentaram os resultados mais promissores quanto ao seu emprego como marcadores para a sistemática molecular de *Utricularia*. *RPB2* codifica uma das subunidades da enzima RNA Polimerase II em eucariotos, responsável pela transcrição do mRNA e estando diretamente ligada à expressão gênica. O gene ocorre geralmente em cópia única nas plantas, porém pode estar duplicado em algumas linhagens (LUO et al., 2007). Já *LEAFY* codifica um fator de transcrição que relaciona-se ao desenvolvimento de meristemas florais (WEIGEL et al., 1992) nas angiospermas, bem como relaciona-se às primeiras divisões mitóticas do zigoto após a fertilização em musgos, evidenciando uma neofuncionalização do gene em questão ao longo da evolução das embriófitas (TANAHASHI et al., 2005). Ambos os *loci* foram amplificados e sequenciados com relativa facilidade. O sucesso na amplificação de *RPB2* representou 40,6% dos ensaios, enquanto que essa proporção foi de 17,8% no caso de *LEAFY*. Utilizaram-se diferentes combinações de *primers* para a amplificação de *RPB2*, tanto o par *RPB2* (1) quanto uma combinação entre o *RPB2* (2)F com o *RPB2* (1)R. Para *LEAFY*, tanto o par *LEAFY* (1) quanto o *LEAFY* (2) foram efetivos para sua amplificação. Devido ao menor número de cópias por célula, genes nucleares de poucas cópias no genoma tendem a ser amplificados com mais dificuldade do que marcadores plastidiais por exemplo, os quais ocorrem em centenas de cópias por célula. Devido a isso, Small et al. (2004) recomendam o uso de DNA *templates* com concentrações superiores a 20 ng/μL. Os marcadores nucleares utilizados no trabalho em questão apresentaram um rendimento de amplificação muito menor quando comparados a marcadores plastidiais (fig. 14).

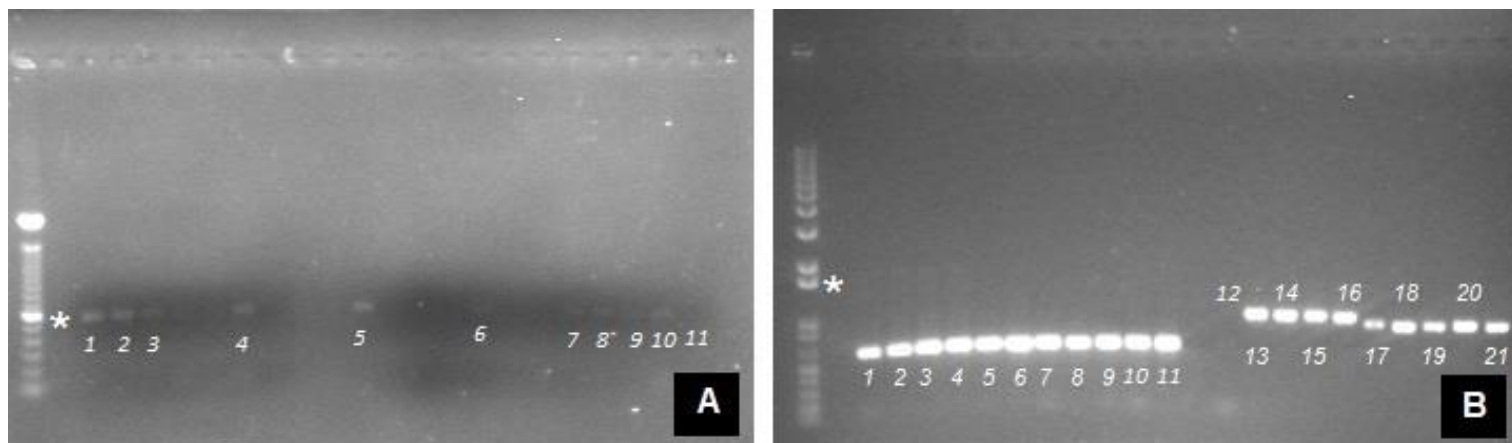


Fig. 14. Comparação entre o rendimento de amplificação de um marcador nuclear de poucas cópias no genoma (A) e marcadores cloroplastidiais (B). **A** - Amplicons de diversas espécies de *Uricularia*, tendo sido empregado os primers *RPB2* (1). *600 pb. 1 – *U. gibba* 1. 2 – *U. gibba* 2. 3 – *U. foliosa*. 4 – *U. benjaminiana*. 5 – *U. striata*. 6 – *U. breinii*. 7 – *U. radiata*. 8 – *U. vulgaris*. 9 – *U. australis*. 10 – *U. dimorphanta*. 11 – Controle negativo. **B** - Amplicons de diversas espécies de Lentibulariaceae, referentes ao gene *rbcL* (do 2 ao 12) e ao espaçador *rpl20-rps12* (do 15 ao 23). *1650 pb. 1 – *U. geminiloba* 1. 2 – *U. geminiloba* 2. 3 – *U. geminiloba* 3. 4 – *U. geminiloba* 4. 5 – *U. gibba* 1. 6 – *U. foliosa*. 7 – *U. gibba* 2. 8 – *G. violacea*. 9 – *U. breviscapa*. 10 – *U. olivacea*. 11 – *U. benjaminiana*. 12 – Controle negativo. 13 – *U. geminiloba* 1. 14 – *U. geminiloba* 2. 15 – *U. geminiloba* 3. 16 – *U. geminiloba* 4. 17 – *U. gibba* 1. 18 – *U. foliosa*. 19 – *U. gibba* 2. 20 – *G. violacea*. 21 – *U. olivacea*.

Dos três marcadores utilizados, o que se mostrou mais conservado foi *RPB2*, possivelmente devido à importância da maquinaria transcricional para as células, sendo um gene de grande importância metabólica. O espaçador *rpl20-rps12*, do cpDNA, revelou-se intermediário, enquanto o gene nuclear *LEAFY* apresentou uma porcentagem maior de sítios variáveis (tab. 4). O gene em questão possui domínios altamente conservados em angiospermas (MAIZEL et al. 2005), devido à sua importância central na transição entre a fase vegetativa e reprodutiva (WEIGEL et al., 1992). No entanto, o gene possui trechos menos conservados (MAIZEL et al. 2005), além de íntrons que têm sido utilizados com êxito na reconstrução filogenética de plantas (GROB et al., 2004; HOOT; TAYLOR; 2001). Todos os marcadores resultaram em altos índices de consistência e retenção (>70%; tab. 4), sendo o espaçador *rpl20-rps12* o que apresenta maior índice de retenção, indicando uma alta concentração de transformações sinapomórficas.

Tab. 4. Informações referentes às análises filogenéticas de cada marcador, bem como da análise concatenada. IC = Índice de consistência, e IR = Índice de retenção, pp = probabilidades posteriores (análise bayesiana).

Matriz	Nº de terminais	Total de caracteres do alinhamento	Sítios variáveis em pb (%)	Caracteres parcimoniosamente informativos	Clados com suporte (pp) superior a 75% em n° (%)	IC	IR
<i>rpl20-rps12</i>	39	1047	435 (41,54%)	240	30 (90%)	0,7358	0,7940
<i>RPB2</i>	27	576	192 (33,68%)	107	22 (100%)	0,7032	0,7618
<i>LEAFY</i>	19	843	374 (44,36%)	186	15 (80 %)	0,7702	0,7079
<i>rpl20-rps12+ RPB2+ LEAFY</i>	41	2452	929 (37,88%)	507	38 (92,10%)	0,7381	0,7695

As reconstruções filogenéticas baseadas nos diferentes marcadores convergem de maneira geral em relação aos agrupamentos da maioria das espécies (fig. 15, 16 e 17), e a análise de evidência total apresentou índices de suporte geralmente altos (fig. 18, 19 e 20).

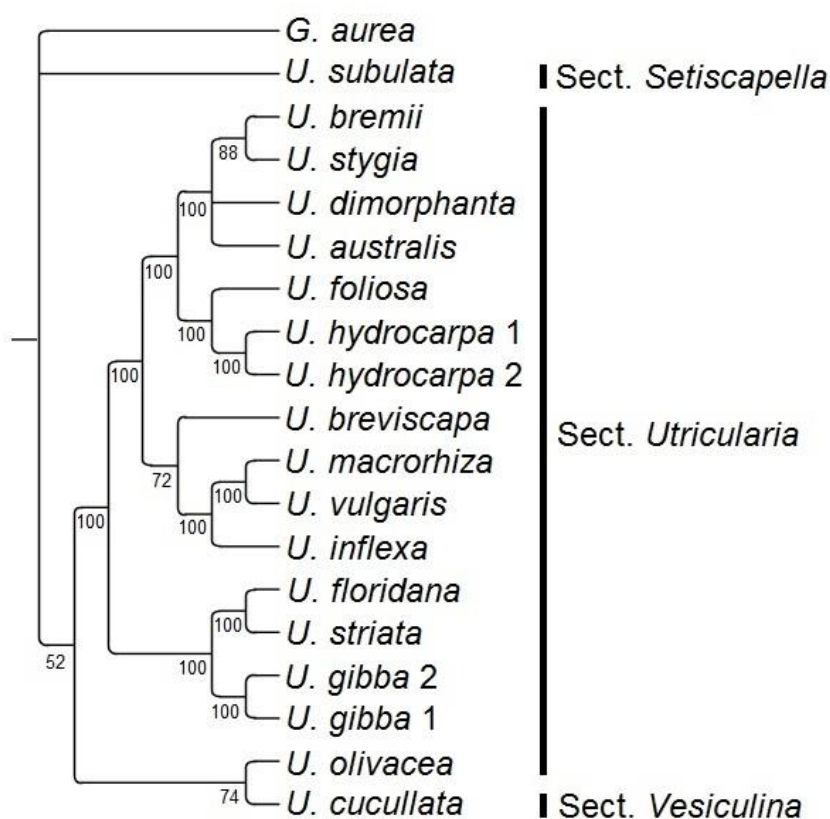


Fig. 15. Cladograma de análise bayesiana baseada no gene *LEAFY* do nDNA. As probabilidades posteriores de cada clado são indicadas junto aos nós, e a classificação infragenérica (*sensu* TAYLOR, 1989) é exibida à direita.

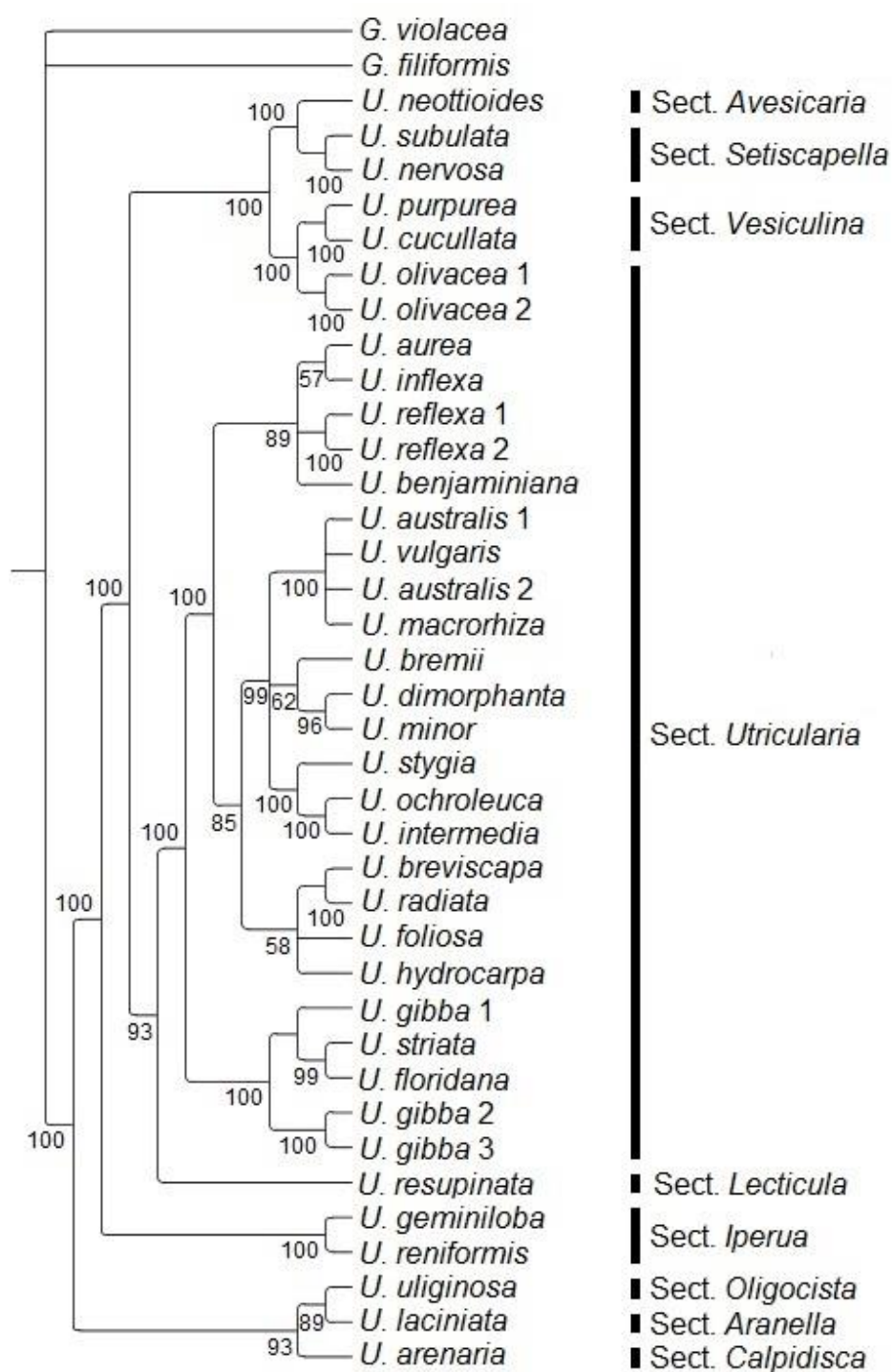


Fig. 16. Cladograma de análise bayesiana baseada no espaçador *rpl20-rps12* do cpDNA. As probabilidades posteriores de cada clado são indicadas junto aos nós, e a classificação infragenérica (*sensu* TAYLOR, 1989) é exibida à direita.

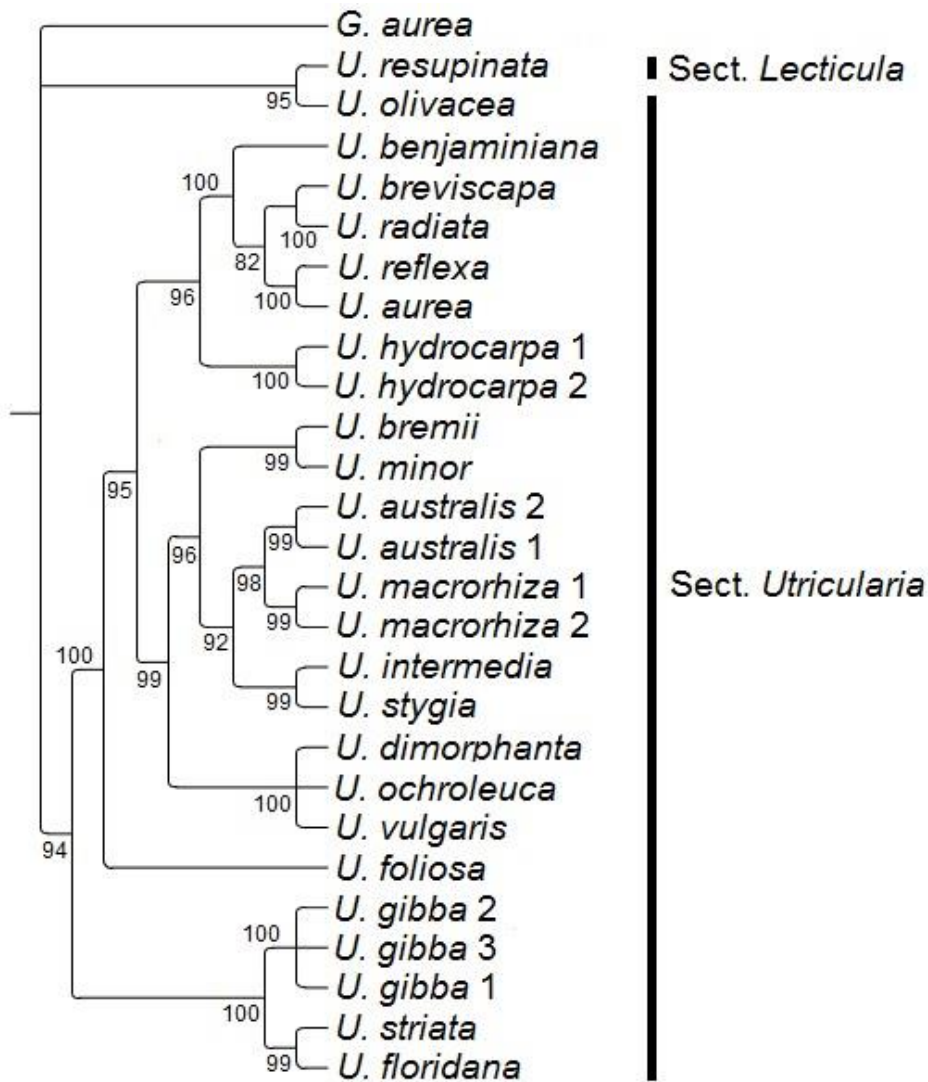


Fig. 17. Cladograma de análise bayesiana baseada no gene *RPB2* do nDNA. As probabilidades posteriores de cada clado são indicadas junto aos nós, e a classificação infragenérica (*sensu* TAYLOR, 1989) é exibida à direita.

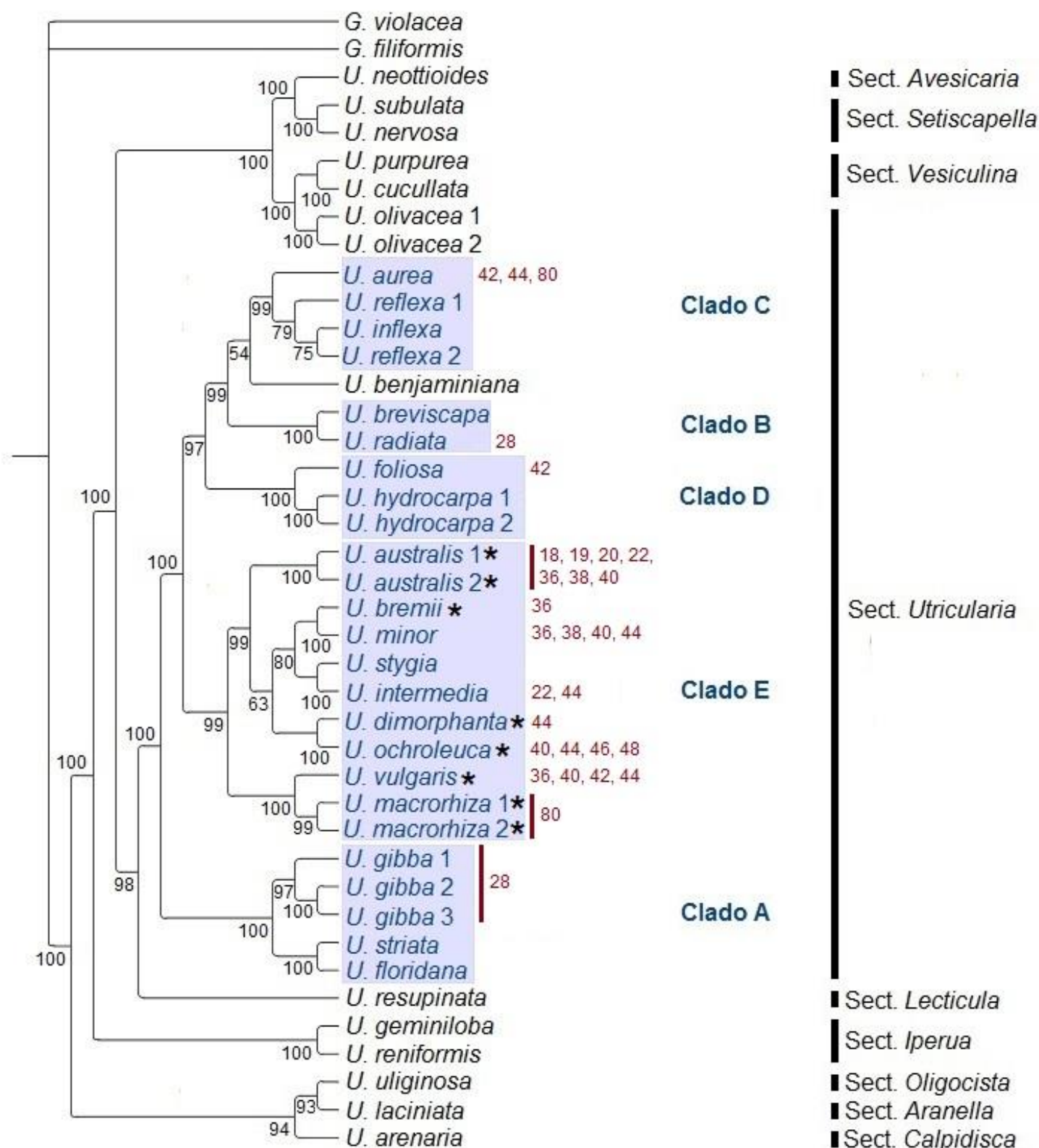


Fig. 18. Cladograma de análise bayesiana baseado em uma matriz concatenada dos marcadores *rpl20-rps12* (cpDNA), *RPB2* e *LEAFY* (nDNA). As probabilidades posteriores de cada clado são indicadas junto aos nós, e a classificação infragenérica (*sensu* TAYLOR, 1989) é exibida à direita. Espécies alocadas inconsistentemente em filogenias baseadas em diferentes marcadores estão indicadas com um asterisco. Os números em vermelho indicam contagens cromossômicas na fase esporofítica, disponíveis na literatura científica para algumas das espécies.

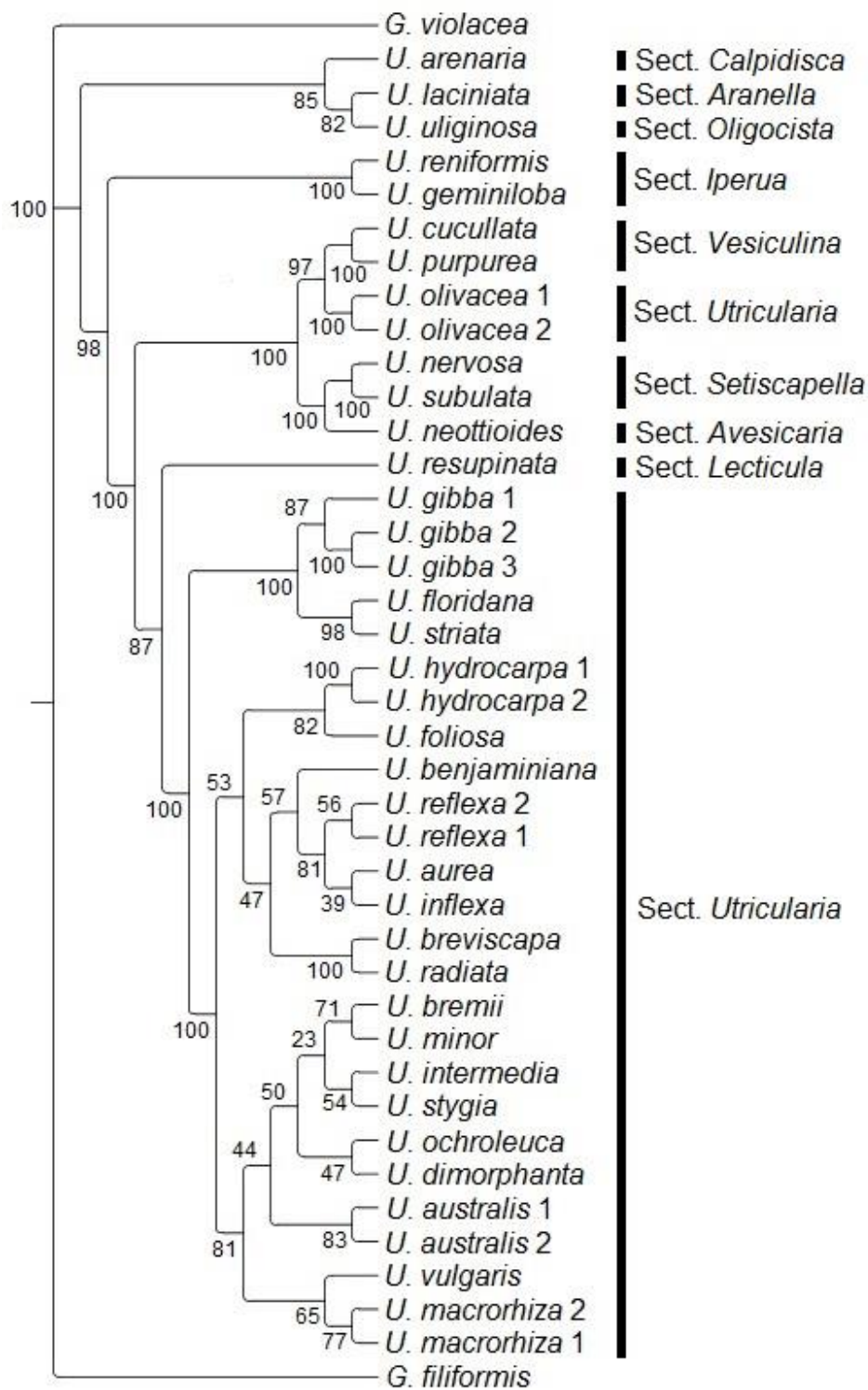


Fig. 19. Cladograma de máxima verossimilhança baseado em uma matriz concatenada dos marcadores *rpl20-rps12* (cpDNA), *RPB2* e *LEAFY* (nDNA). Os valores de *bootstrap* de cada clado são indicados junto aos nós, e a classificação infragênica (*sensu* TAYLOR, 1989) é exibida à direita.

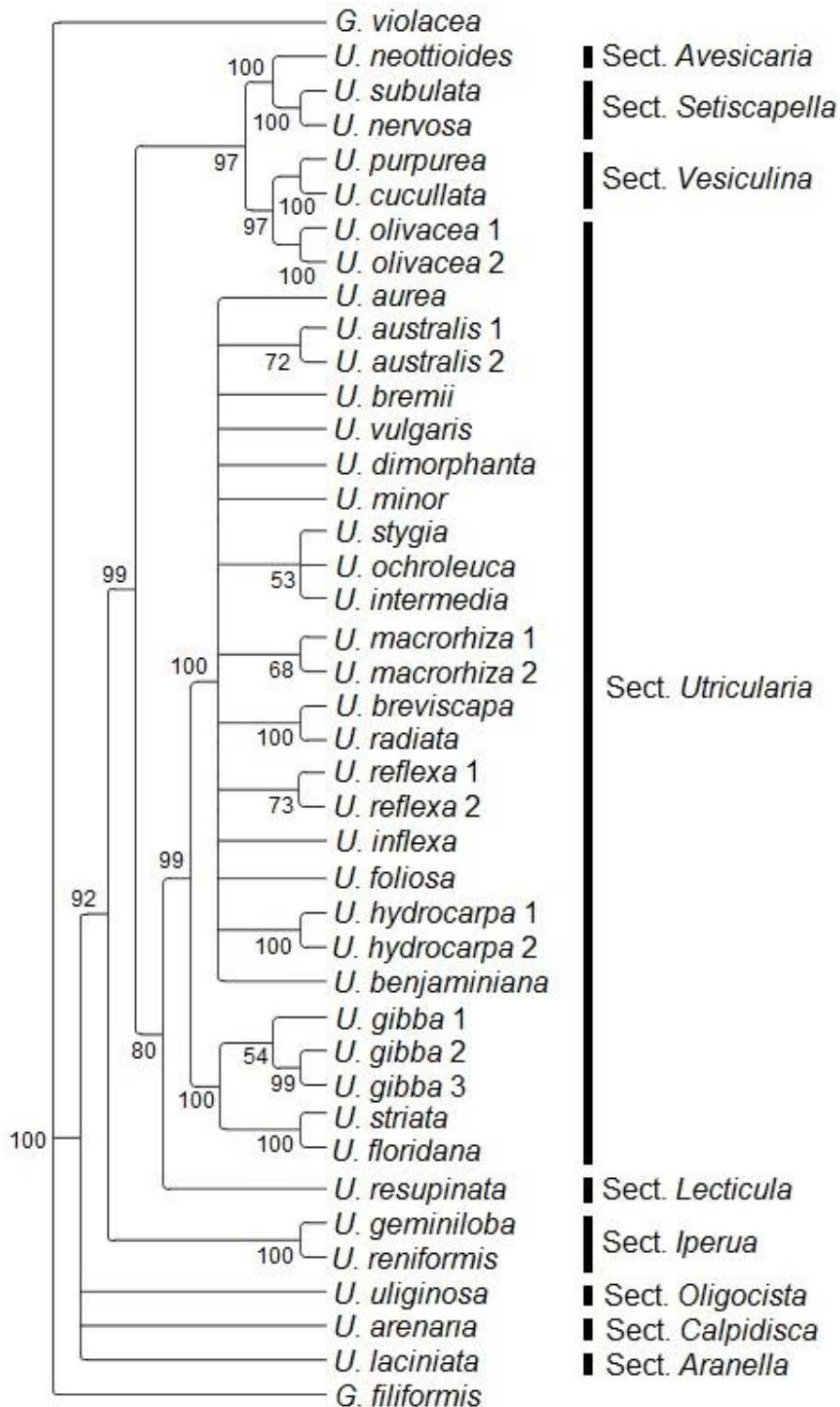


Fig. 20. Cladograma de consenso das 50 reconstruções filogenéticas mais parcimoniosas, baseado em uma matriz concatenada dos marcadores *rpl20-rps12* (cpDNA), *RPB2* e *LEAFY* (nDNA). Os valores de *bootstrap* de cada clado são indicados junto aos nós, e a classificação infragenérica (*sensu* TAYLOR, 1989) é exibida à direita.

Espécies alocadas muito inconsistentemente em análises filogenéticas baseadas em diferentes marcadores, principalmente os de herança biparental, possivelmente passaram por processos pretéritos de hibridação (BAUMEL et al., 2002), como no esquema exemplificado na figura 21. Os dados de cariótipo disponíveis na literatura para *Utricularia* sect. *Utricularia* indicam a ocorrência de desbalanço cromossômico, como no caso de *U. australis*, e poliploidização, como em *U. aurea* e em *U. intermedia* (tab. 5). Algumas espécies alocaram-se inconsistentemente nas filogenias baseadas nos diferentes marcadores, como *U. australis*, *U. bremii*, *U. dimorphanta*, *U. machrorhiza*, *U. ochroleuca* e *U. vulgaris*. Nesse contexto, o fato de *U. australis*, *U. bremii* e *U. ochroleuca* possuírem desarranjos nos cromossomos (CASPER; MANITZ) bem como a esterilidade apresentada por *U. bremii*, *U. ochroleuca* e *U. stygia* e a grande semelhança morfológica apresentada por algumas espécies da seção *Utricularia* (TAYLOR, 1989), sugerem um padrão de evolução reticulada para o grupo.

A reconstrução filogenética, principalmente em plantas, nem sempre assume o perfil topológico tradicionalmente empregado em estudos evolutivos, com um padrão de cladogêneses dicotômico a partir de um ancestral comum. A evolução das plantas conta com diversos eventos de reticulação, como no caso de aloploidos ou grupos nos quais ocorreu introgressão pós hibridação (LINDER; RIESEBERG, 2004). Portanto, pode-se considerar que nem toda espécie é um grupo monofilético, e que a história evolutiva dos organismos pode assemelhar-se mais a uma rede do que a uma árvore filogenética (DOOLITTLE, 1999). A importância da hibridação no processo de especiação vem se tornando cada vez mais evidente na atualidade, e acredita-se que tais eventos tenham originado entre 2 e 7% das espécies de plantas vasculares (MALLET, 2007), inclusive com grande influência das atividades antropogênicas, devido à introdução de espécies em novos ambientes (VALLEJO-MARÍN; HISCOCK; 2016).

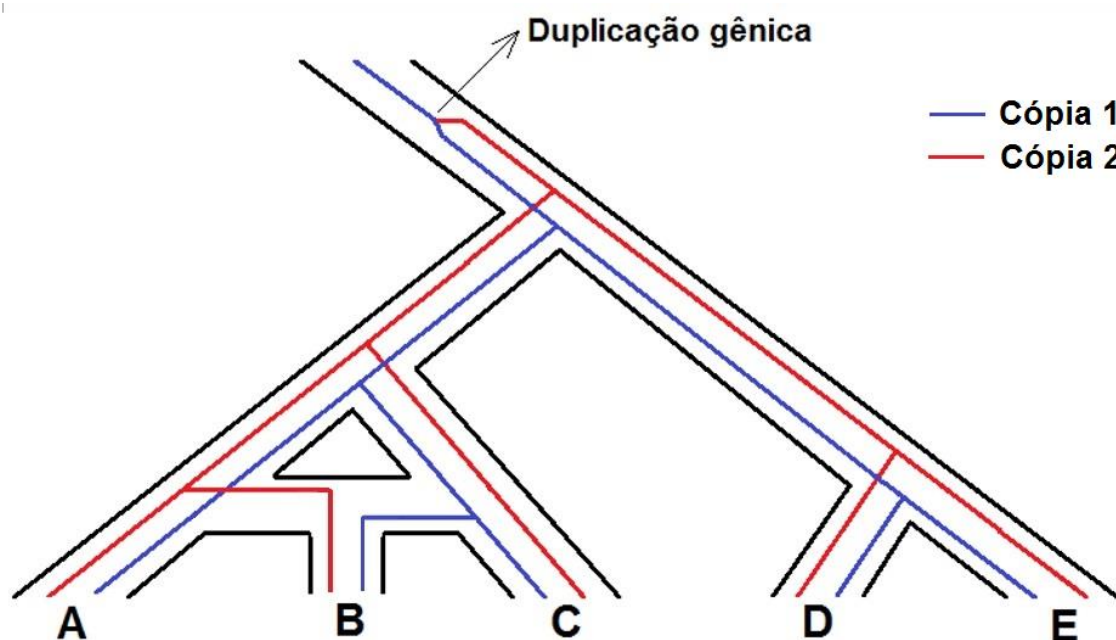


Fig. 21. Esquematização de uma filogenia de genes x espécies. As linhas negras representam a filogenia de um grupo hipotético de espécies (A, B, C, D e E), sendo que a espécie B originou-se da hibridação entre grupos ancestrais de A e C. Ocorreu a duplicação de um gene em um ancestral comum de todas as espécies envolvidas, originando duas cópias parálogas. As linhas azuis representam a filogenia da cópia 1, e as linhas vermelhas a filogenia da cópia 2. As cópias 1 desse gene presentes em todas as espécies são ortólogos entre si, o mesmo valendo para as cópias 2. No caso da espécie B, a reconstrução filogenética irá agrupá-la junto a A, caso os ortólogos da cópia 2 sejam sequenciados, ou irá agrupá-la junto a C, caso os ortólogos da cópia 1 sejam sequenciados. Os dados dos dois marcadores são incongruentes, e a filogenia gerada não iria resgatar a real história evolutiva das espécies envolvidas, pois ocorreu um evento de reticulação devido à especiação hibridogênica.

Tab. 5. Espécies de *Utricularia* sect. *Utricularia* para as quais existem registros de contagem de cromossomos na literatura científica.

Espécie	Contagem(s) de cromossomos na fase gametofítica	Contagem(s) de cromossomos na fase esporofítica	Referência
<i>U. aurea</i>		80	TANAKA, R.; UCHIYAMA, H. Chromosomes of four species of <i>Utricularia</i> in Japan. J. Jap. Bot. 63: 219–223, 1988.
<i>U. aurea</i>		42, 44, 80	SIDDIQUI. Sci. & Cult. 25:319 – CPDatabase, 1959.
<i>U. australis</i>		22, 18, 19, 20	CASPER, S. J.; MANITZ, H. Beitrage zur Taxonomie und Chorologie der mitteleuropaischen <i>Utricularia</i> -Arten. 2. Androsporogenese, Chromosomenzahlen und Pollenmorphologie. Feddes Repert. 86: 211-232, 1975.
<i>U. australis</i>		36, 38, 40	CASPER, S. J.; MANITZ, H. Ber.Dt.Bot.Ges. 64:250, Feddes Repert.86:218 (1975) – CPDatabase, 1952.
<i>U. breinii</i>		36	RAHMAN, M. O.; ADAMEC, L.; KONDO, K. Chromosome numbers of <i>Utricularia breinii</i> and <i>Utricularia dimorphanta</i> (Lentibulariaceae). Chromosome Sci. 5: 105–108, 2001.
<i>U. dimorphanta</i>		44	RAHMAN, M. O.; ADAMEC, L.; KONDO, K. Chromosome numbers of <i>Utricularia breinii</i> and <i>Utricularia dimorphanta</i> (Lentibulariaceae). Chromosome Sci. 5: 105–108, 2001.
<i>U. foliosa</i>		42	KONDO, K. Chromos.Inform.Serv.15:33 (1973) - CPDatabase
<i>U. gibba</i>		28	KONDO, K. Phyton (Buenos Aires) 30:47 (1972) - CPDatabase

<i>U. inflata</i>	9	18	LEWIS, W. H.; DAVIS, S. A. Cytological observations of polygala in Eastern North America. Rhodora 64: 102-109, 1962.
<i>U. inflata</i>		36	LEWIS, W. H.; DAVIS, S. A. Cytological observations of polygala in Eastern North America. Rhodora 64: 102-109, 1962.
<i>U. intermedia</i>		44	LOVE, A; LOVE, D. In: A Löve (ed.), IOPB chromosome number reports LXXV. Taxon 31(2): 344–360, 1982.
<i>U. intermedia</i>		44	JANKUN, A. Further studies in chromosome numbers of Polish angiosperms. Part XXII. Acta Biol. Cracov., Ser. Bot. 31: 1–17, 1989.
<i>U. intermedia</i>		44	POGAN, E.; JANKUN, A.; SAWICKA, Z. Further studies in chromosome numbers of Polish angiosperms, part 22. Acta Biol. Cracov., Ser. Bot. 31: 1–17, 1990.
<i>U. intermedia</i>		22	CASPER, S. J.; MANITZ, H. Beiträge zur Taxonomie und Chorologie der mitteleuropäischen Utricularia-Arten. 2. Androsporogenese, Chromosomenzahlen und Pollenmorphologie. Feddes Repert. 86: 211-232, 1975.
<i>U. macrorrhiza</i>		80	LOVE. Vegetatio 5-6:212 – CPDatabase, 1954.
<i>U. ochroleuca</i>		40	REESE, G. Ergainzende Mitteilungen fiber die Chromosomenzahlen mitteleuro- paiseher Gefiisspflanzen. I. Ber. Dtsch. Bot. Ges. 64: 240-255, 1951.
<i>U. ochroleuca</i>		40	REESE. Ber.Dt.Bot.Ges.64:250 – CPDatabase, 1952.
<i>U. ochroleuca</i>		44, 46,48	CASPER, S. J.; MANITZ, H. Feddes Repert. 86:218 – CPDatabase, 1975.
<i>U. minor</i>		44	LOVE, A; LOVE, D. In: A Löve (ed.), IOPB chromosome number reports LXXV. Taxon 31(2): 344–360, 1982.
<i>U. minor</i>		36	LOVE, A; LOVE, D. In: IOPB chromosome number reports L. Taxon 24: 671-678, 1975.
<i>U. minor</i>	18	36	REESE, G. Ergainzende Mitteilungen fiber die Chromosomenzahlen mitteleuro- paiseher Gefiisspflanzen. I. Ber. Dtsch. Bot. Ges. 64: 240-255, 1951.
<i>U. minor</i>	20	40	REESE, G. Ergainzende Mitteilungen fiber die Chromosomenzahlen mitteleuro- paiseher Gefiisspflanzen. I. Ber. Dtsch. Bot. Ges. 64: 240-255, 1951.
<i>U. minor</i>		40	LOVE, A; LOVE, D. Cytotaxonomiical conspectus of the Icelandic Flora. Aeta Hort. Gotob. 20: 65-290, 1956.
<i>U. minor</i>		36, 38, 40	REESE, G. Ber.Dt.Bot.Ges. 64:250 – CPDatabase, 1952.
<i>U. minor</i>		44	CASPER, S. J.; MANITZ, H. Feddes Repert. 86:218 – CPDatabase, 1975.
<i>U. ochroleuca</i>	22, 23, 24		BOTANISKA NOTISER 1857(2): 30–31. (Bot. Not.), 1857.
<i>U. radiata</i>		28	KONDO, K. Phyton (Buenos Aires) 30:47 – CPDatabase, 1972.
<i>U. stellaris</i>	20		SARKAR, A. K.; DATTA, N.; CHATTERJEE, U. In Chromosome number reports LXVII. Taxon 29: 360-361, 1980.
<i>U. stellaris</i>		42	SIDDIQUI. Sci. & Cult. 29:319 – CPDatabase, 1959.
<i>U. australis</i>		40	TANAKA, R.; UCHIYAMA, H. Chromosomes of four species of Utricularia in Japan. J. Jap. Bot. 63: 219–223, 1988.
<i>U. vulgaris</i>		44	POGAN, E., JANKUN, A.; TURASLA-SZYBOWSKA K. Further studies in chromosome numbers of Polish angiosperms. Part XX. Acta Biol. Cracov., Ser. Bot. 29: 1–17, 1987.
<i>U. vulgaris</i>		36	MURIN, A.; ZABORSKY, J. In IOPB chromosome number reports LIII. Taxon 25: 483-500, 1976.
<i>U. vulgaris</i>	22		CASPER, S. J.; MANITZ, H. Beiträge zur Taxonomie und Chorologie der mitteleuropäischen Utricularia-Arten. 2. Androsporogenese, Chromosomenzahlen und Pollenmorphologie. Feddes Repert. 86: 211-232, 1975.
<i>U. vulgaris</i>	18		REESE, G. Ergainzende Mitteilungen fiber die Chromosomenzahlen mitteleuro- paiseher Gefiisspflanzen. I. Ber. Dtsch. Bot. Ges. 64: 240-255, 1951.
<i>U. vulgaris</i>	20		REESE, G. Ergainzende Mitteilungen fiber die Chromosomenzahlen mitteleuro- paiseher Gefiisspflanzen. I. Ber. Dtsch. Bot. Ges. 64: 240-255, 1951.
<i>U. vulgaris</i>		36	HUSAK. Kvetena CR 6:522 – CPDatabase, 2000.
<i>U. vulgaris</i>		40, 42, 44	TANAKA, R.; UCHIYAMA, H. Chromosomes of four species of Utricularia in Japan. J. Jap. Bot. 63: 219–223, 1988.

As análises concatenadas de consenso das 50 árvores mais parcimoniosas (fig. 20), a de máxima verossimilhança (fig. 19) e a de inferência bayesiana (fig. 18) produziram 23, 38 e 38 clados respectivamente. No consenso das 50 árvores mais parcimoniosas, 78,26% dos clados apresentaram *bootstrap* superior a 75%, sendo que no cladograma de máxima verossimilhança esse valor foi de 68,42%. A análise bayesiana apresentou os melhores índices de suporte, com 92,10% dos clados apresentando probabilidades posteriores superiores a 75%.

Tanto as análises baseadas nos marcadores individuais quanto a concatenação dos dados sustentam a parafilia de *Utricularia* sect. *Utricularia*, com *U. olivacea* agrupando-se como grupo irmão de *U.* sect. *Vesiculina*, corroborando a hipótese de Jobson et al. (2003). Nesse contexto, uma nova seção é proposta, englobando *U. olivacea* e *U. biovularioides*. A última espécie não foi amostrada no trabalho em questão, contudo é morfologicamente muito similar a *U. olivacea*, sendo a delimitação taxonômica entre ambas suportada por um pequeno conjunto de características. Os principais clados formados e suas sinapomorfias são discutidos na sequência, baseando-se principalmente em Taylor (1989).

Clados bem suportados em *Utricularia* sect. *Utricularia*

Clado A: *U. floridana*, *U. gibba* e *U. striata*

O clado composto por *Utricularia floridana*, *U. gibba* (fig. 5H) e *U. striata* se manteve em todas as análises realizadas, alocando-se como um grupo irmão às demais espécies de *Utricularia* sect. *Utricularia*. *U. floridana* e *U. striata* são grupos irmãos, compartilhando características como dimorfismo pronunciado dos ramos e o padrão enrugado das sementes. *U. gibba* aloca-se como um grupo

irmão de *U. floridana* e *U. striata*. De acordo com Taylor (1989), o padrão morfológico das flores é similar nas três espécies, com corola amarela e uma protuberância no lábio inferior que apresenta nervuras avermelhadas. O lábio superior da corola é maior do que o inferior, e as cápsulas são lateralmente bivalvadas. *U. gibba* possui distribuição pantropical, porém *U. floridana* e *U. striata* possuem distribuição restrita à América do Norte. Taylor (1989) relata uma grande diversidade de morfotipos em *U. gibba* nos Estados Unidos, sugerindo uma origem norte americana para o grupo.

Clado B: *U. breviscapa* e *U. radiata*

As reconstruções filogenéticas baseadas em *rpl20-rps12* (fig. 16) e em *RPB2* (fig. 17), assim como a concatenação de todos os dados (fig. 18), convergem em relação ao posicionamento dessas duas espécies como grupos irmãos com altos índices de suporte. A característica mais marcante do grupo é a presença de frutuadores na base da inflorescência que se irradiam para todas as direções (fig. 5A e 6C). Os lobos do cálice são ligeiramente arredondados, e a corola é amarelada em ambas as espécies, ocorrendo manchas marrons na base do lábio inferior em *Utricularia radiata* e marrom avermelhado em *U. breviscapa*. As duas espécies possuem o lábio superior da corola ligeiramente arredondado, sendo o lábio inferior trilobado (TAYLOR, 1989). A ocorrência de *U. breviscapa* engloba as Antilhas e as Américas Central e do Sul, enquanto *U. radiata* ocorre na América do Norte. *U. platensis*, *U. inflata* e *U. incisa*, espécies não amostradas no trabalho em questão, são apontadas por Taylor (1989) como próximas ao grupo, todas possuindo flutuadores na base da inflorescência e com ocorrência restrita às Américas, sugerindo uma origem americana para o grupo. Taylor (1989) cita a semelhança entre *U. breviscapa* e formas reduzidas de *U. radiata*, dando ênfase ao fato de que a cleistogamia é comum apenas na primeira espécie.

Clado C: *U. aurea*, *U. inflexa* e *U. reflexa*

As espécies em questão possuem como sinapomorfias o hábito aquático suspenso e livre, folhas numerosas e dicotomicamente divididas, utrículos dimórficos, presença de uma protuberância bilobada no lábio inferior da corola e sementes prismáticas e aladas. Uma característica marcante, comum às três espécies, é o fato de que a flor se mantém ereta durante a antese, curvando-se para baixo após a fecundação e o desenvolvimento do fruto. Em *U. aurea* (fig. 5G) e *U. inflexa* (fig. 4J), o cálice desenvolve-se após a polinização, envolvendo a cápsula. *U. aurea* distribui-se pelo sudeste asiático e a Oceania, *U. inflexa* ocorre na África e na Índia e *U. reflexa* (fig. 5I) é restrita à África (TAYLOR, 1989). O fato de uma das populações de *U. reflexa* ter se agrupado com *U. inflexa*, a despeito da outra que se alocou como um grupo irmão desse clado (fig. 18), pode se tratar de um indício de hibridização, dada a área de ocorrência comum entre as duas espécies. Taylor (1989) trata da grande heterogeneidade morfológica encontrada em populações de *U. reflexa*, inclusive citando a possibilidade desse táxon se tratar de um complexo interespecífico.

Clado D: *U. foliosa* e *U. hydrocarpa*

Ambas as espécies possuem folhas numerosas e divididas dicotomicamente, sendo os últimos segmentos capilares. As armadilhas são numerosas e dimórficas nos dois táxons, porém em *U. foliosa* (fig. 3B e 4L) ocorre dimorfismo de ramos, sendo alguns munidos de armadilhas e outros repletos de folhas, sem utrículos. As duas espécies possuem os lobos do cálice desiguais, sendo o inferior levemente maior que o superior. Apesar da corola de *U. hydrocarpa* (fig. 4G) ser roxa, esta possui uma mancha amarelada na base do lábio inferior, sendo que em *U. foliosa* a corola é amarela e em alguns indivíduos ocorrem nervuras arroxeadas (TAYLOR, 1989). O estado plesiomórfico para a cor da corola em *Utricularia* sect. *Utricularia* é

desconhecido, bem como os mecanismos genéticos que os controla. As duas espécies possuem o lábio inferior da corola bilobado. A distribuição de *U. hydrocarpa* restringe-se à América tropical, enquanto *U. foliosa* é encontrada tanto em regiões tropicais da América quanto da África (TAYLOR, 1989).

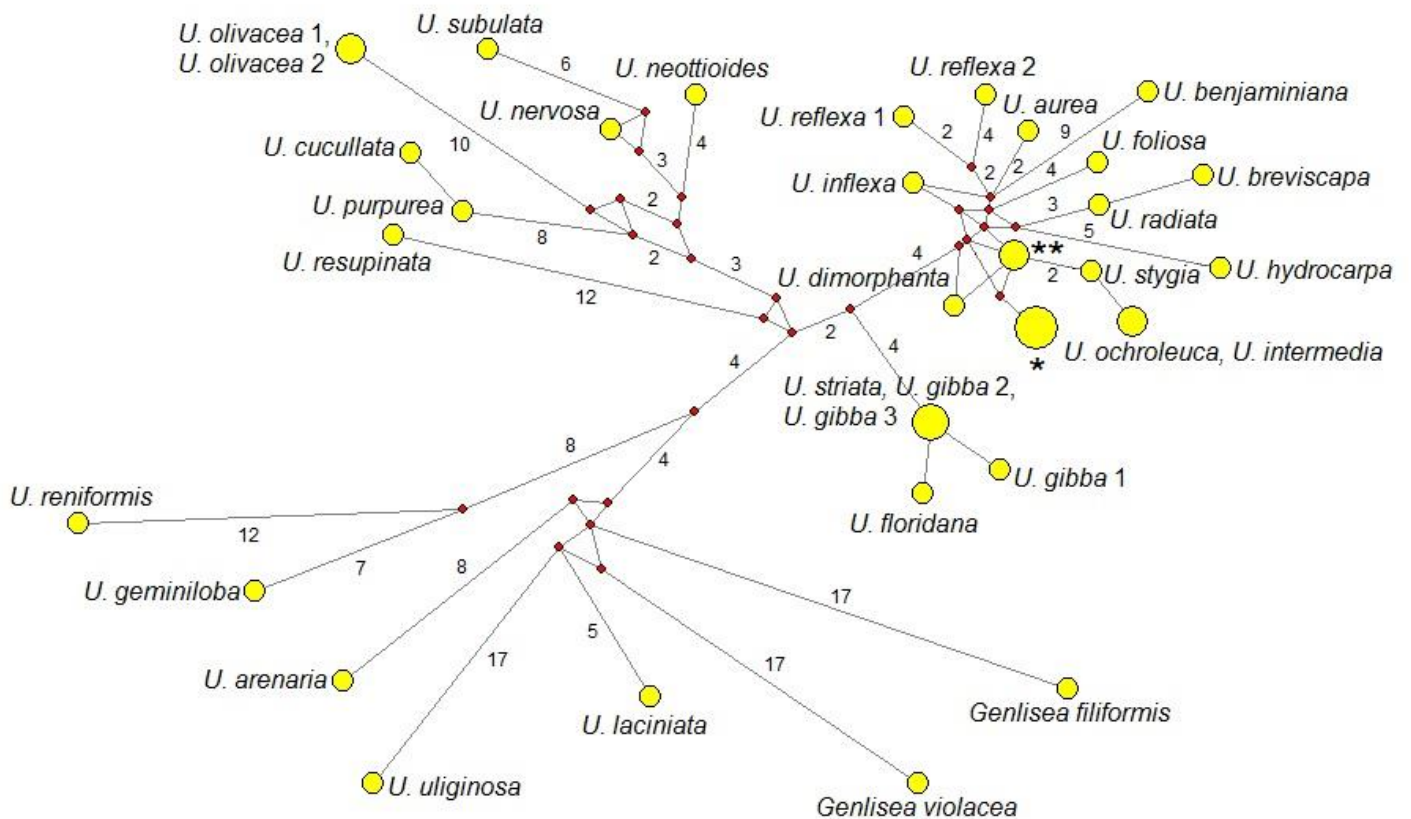
Clado E: *U. australis*, *U. bremii*, *U. dimorphanta*, *U. intermedia*, *U. machrorhiza*, *U. minor*, *U. ochroleuca*, *U. stygia* e *U. vulgaris*

Este grupo engloba espécies distribuídas principalmente pela Eurásia, ocorrendo inclusive em regiões de altas latitudes, de climas temperados e polares (TAYLOR, 1989; THOR, 1988). A discussão dessas espécies em conjunto justifica-se devido a fortes indícios que apontam para a ocorrência frequente de fluxo gênico entre esses táxons. Kameyama et al. (2005) demonstrou através de ferramentas moleculares que *U. australis* (fig. 4A) se hibridizou naturalmente com *U. macrorhiza* (fig. 4N e 5E), originando populações F1 estéreis de *U. australis* que se reproduzem vegetativamente com grande vigor. Dentre as espécies do grupo, *U. bremii* (fig. 4E), *U. stygia* e *U. ochroleuca* (fig. 5F) não frutificam e possuem má formação polínica (BERETTA et al., 2014; TAYLOR, 1989; THOR, 1988), bem como ocorrem irregularidades cromossômicas em *U. australis*, *U. ochroleuca* e *U. bremii*, como aneuploidia e disploidia (CASPER; MANITZ, 1975). São sinapomorfias do grupo a presença de turiões, a ocorrência de sementes prismáticas e aladas, a corola amarelada com uma protuberância dotada de manchas avermelhadas na base do lábio inferior e a ocorrência de curvatura do pedúnculo floral após a polinização, com os frutos voltando-se para baixo ao longo de seu desenvolvimento, nas espécies férteis. Outra característica comum a todas as espécies desse clado é a presença de folhas denticuladas nas margens (TAYLOR, 1989). Astuti (2016) e Thor (1988) utilizaram esses dentes e as glândulas internas dos utrículos como um instrumento de diferenciação taxonômica entre *U. intermedia* (fig. 5B e 6B), *U. ochroleuca* e *U. stygia*, espécies morfologicamente muito parecidas.

A delimitação taxonômica baseada na morfologia dos órgãos vegetativos de alguns grupos interespecíficos contidos no clado em questão, como *U. australis* e *U. vulgaris*; *U. minor* e *U. bremii* ou *U. intermedia*, *U. ochroleuca* e *U. stygia* é dificultosa mesmo para especialistas. Além disso, a abordagem molecular baseada em DNA *Barcoding* mostrou-se falha para Astuti (2016) nesses três grupos, dando ênfase ao provável intercâmbio genético que provavelmente ocorreu ao longo da evolução dessas espécies. Nesse contexto, a própria delimitação específica se torna vaga (MALLET, 2007). De acordo com o conceito biológico de espécie, o qual enfatiza o isolamento reprodutivo, assim como o conceito filogenético de espécie, onde a monofilia é uma premissa (DE QUEIROZ, 2007), as espécies contidas no clado E se comportariam como uma exceção, configurando um complexo interespecífico onde a hibridização e a introgressão poderia aumentar a variabilidade genética das populações, aumentando as chances de adaptação a novos nichos e ambientes (RIESEBERG; WENDEL, 1993). O fato de algumas espécies do clado E serem adaptadas a condições climáticas rigorosas, uma exclusividade para o gênero (TAYLOR, 1989), pode estar relacionado à maior capacidade adaptativa proporcionada pela reticulação.

Para dar ênfase à discussão sobre a hibridização recorrente dentro desse clado, foram desenvolvidas redes haplotípicas para cada marcador, apesar do fato de que esse tipo de abordagem é mais comum em genética populacional. Observou-se o compartilhamento de um mesmo haplótipo de *rpl20-rps12* em *U. gibba* e *U. striata*; *U. australis*, *U. vulgaris* e *U. macrorhiza*; *U. intermedia* e *U. ochroleuca*; e entre *U. minor* e *U. bremii* (fig. 22). *U. bremii*, *U. australis* 2, *U. dimorphanta*, *U. ochroleuca*, *U. intermedia*, *U. stygia* e *U. minor* compartilharam um mesmo haplótipo de *RPB2* (fig. 23). Para *LEAFY*, *U. bremii*, *U. dimorphanta* e *U. stygia* compartilharam um mesmo haplótipo, assim como *U. floridana*, *U. striata* e *U. hydrocarpa* 2 (fig. 24). Esses haplótipos compartilhados por diversas espécies, principalmente nas análises baseadas em *RPB2* e *LEAFY* podem ser explicados pela teoria da coalescência (TEMPLETON et al., 1992), apresentando características ancestrais como posicionamento central na rede, no entanto podem somar-se aos demais indícios que apontam para o fluxo gênico frequente entre algumas espécies de *Utricularia* sect. *Utricularia*. A rede

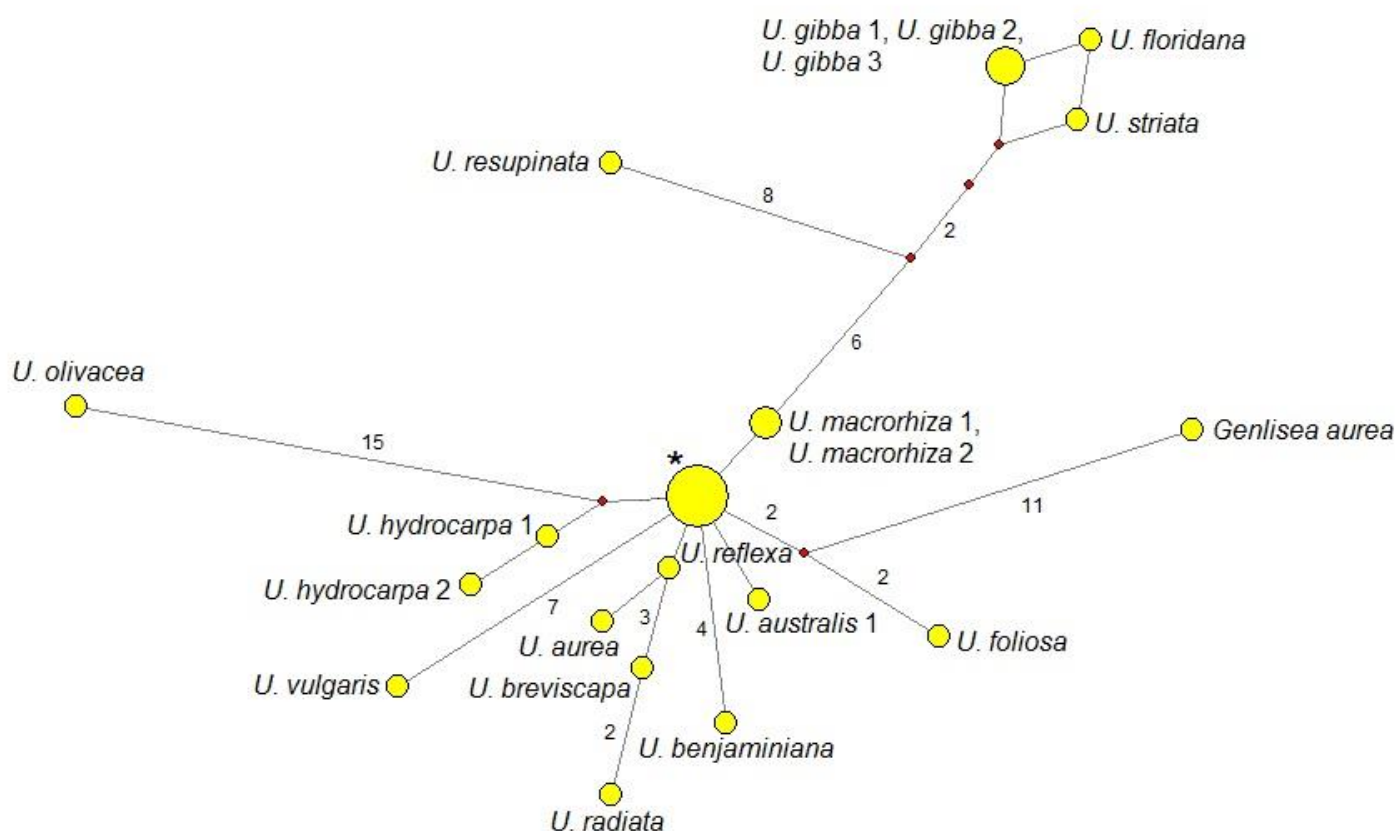
filogenética desenvolvida a partir de uma matriz dos três marcadores concatenados (fig. 25) aponta diversos eventos de reticulação ao longo da evolução da seção *Utricularia*, principalmente entre as espécies que compõe o clado E.



* *U. australis* 1, *U. australis* 2, *U. vulgaris*, *U. macrorrhiza*

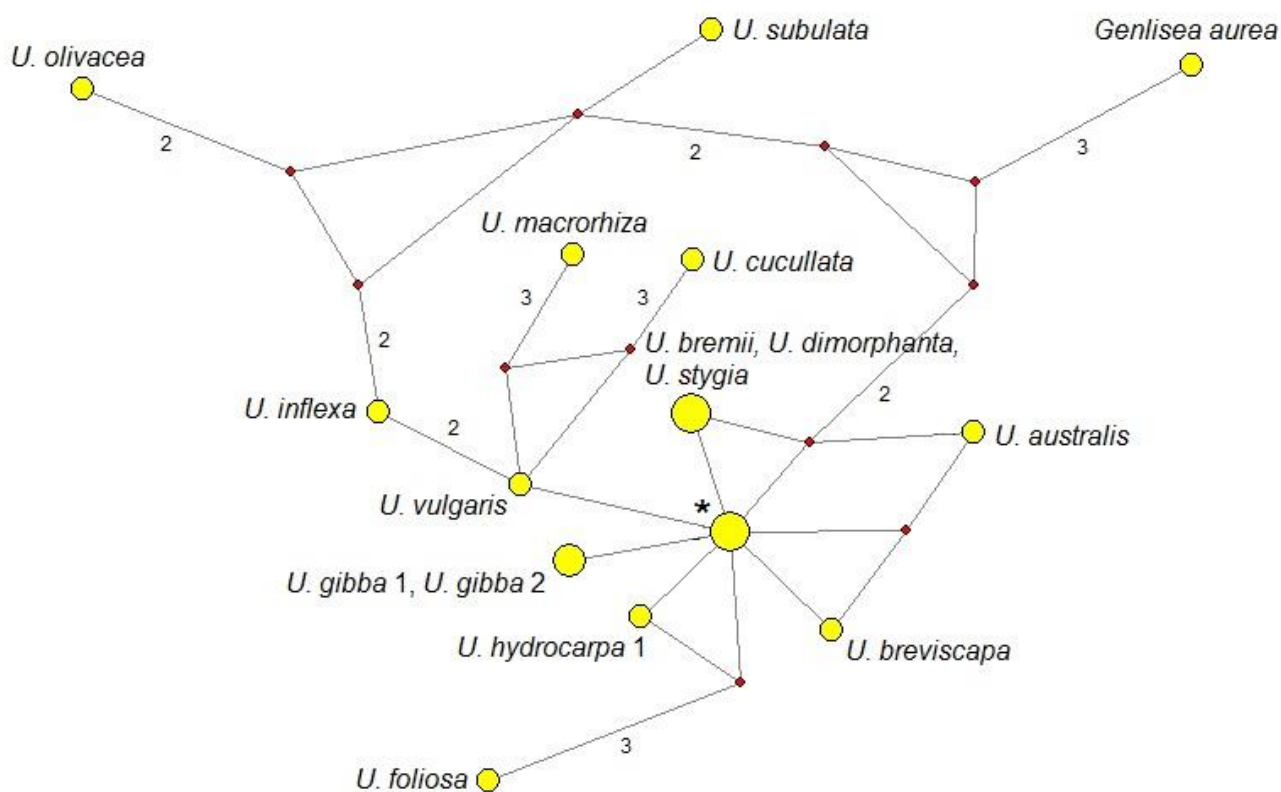
** *U. minor*, *U. bremii*

Fig. 22. Rede de haplótipos do espaçador cloroplastidial *rp120-rps12*, construída a partir do algoritmo *Median Joining*. Os pequenos círculos avermelhados se tratam de haplótipos não amostrados ou extintos, e os números entre os haplótipos representa a quantidade de passos mutacionais entre eles. Haplótipos separados por um passo mutacional não possuem número entre si. N° de amostras = 39. N° de haplótipos = 31. Diversidade haplotípica = 0,9838.



* *U. bremii*, *U. australis* 2, *U. dimorphanta*, *U. ochroleuca*, *U. intermedia*, *U. stygia*, *U. minor*

Fig. 23. Rede de haplótipos do gene *RPB2*, construída a partir do algoritmo *Mendian Joining*. Os pequenos círculos avermelhados se tratam de haplótipos não amostrados ou extintos, e os números entre os haplótipos representa a quantidade de passos mutacionais entre eles. Haplótipos separados por um passo mutacional não possuem número entre si. N° de amostras = 27. N° de haplótipos = 18. Diversidade haplotípica = 0,9288.



* *U. floridana*, *U. striata*, *U. hydrocarpa* 2

Fig. 24. Rede de haplótipos do gene *LEAFY*, construída a partir do algoritmo *Median Joining*. Os pequenos círculos avermelhados se tratam de haplótipos não amostrados ou extintos, e os números entre os haplótipos representa a quantidade de passos mutacionais entre eles. Haplótipos separados por um passo mutacional não possuem número entre si. N° de amostras = 19. N° de haplótipos = 14. Diversidade haplotípica = 0,9591.

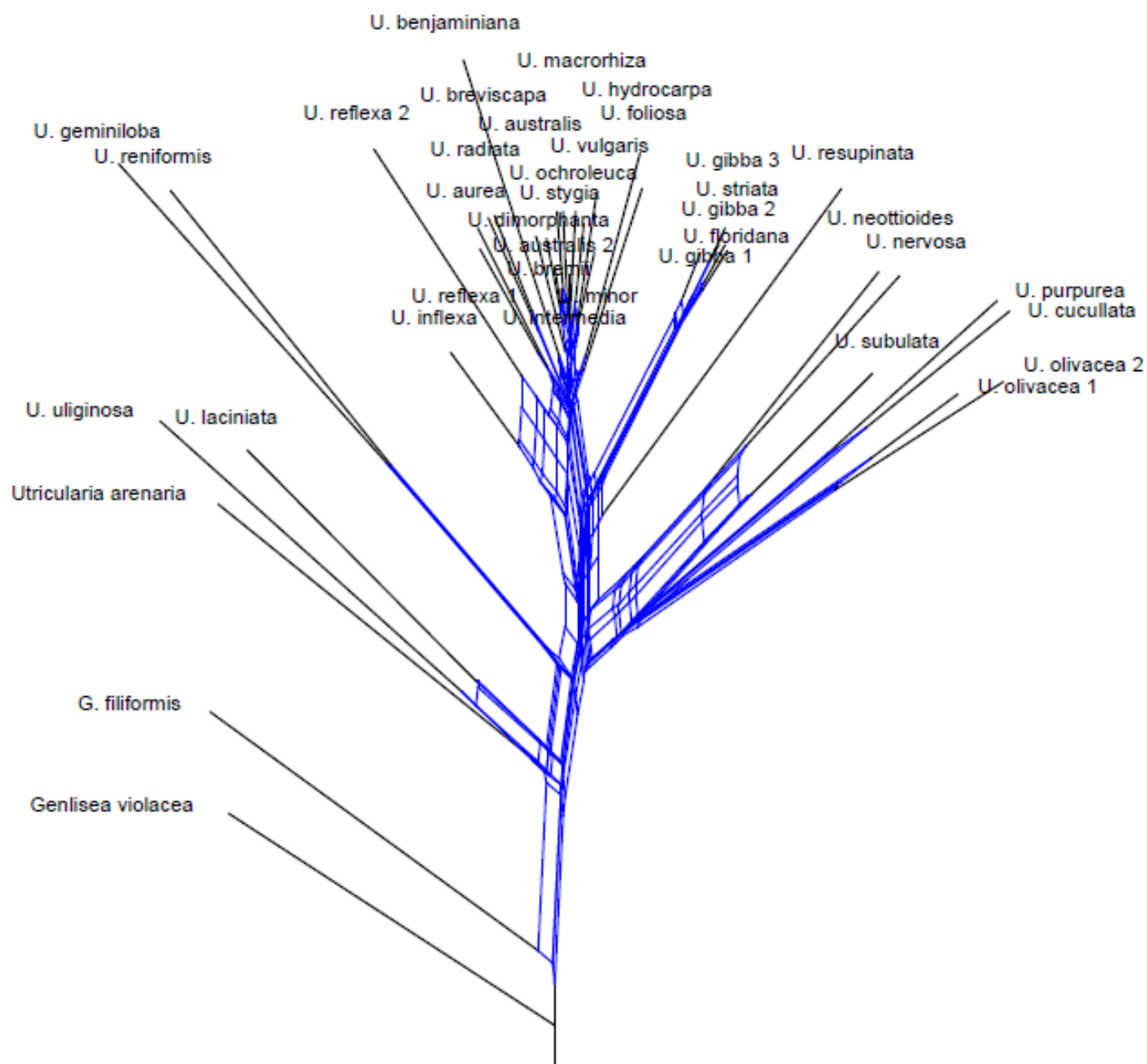


Fig. 25. Rede filogenética construída a partir de uma matriz mista de dados moleculares (*rpl20-rps12* + *RPB2* + *LEAFY*). As linhas negras representam os ancestrais das espécies envolvidas, e as linhas azuladas representam eventos de reticulação que ocorreram entre as linhagens ancestrais, sugerindo a ocorrência frequente de especiação hibridogênica em *Utricularia* sect. *Utricularia*.

Posicionamento de *Utricularia olivacea*

Kamiénsky (1890) propôs a criação do gênero *Biovularia*, enumerando algumas características que o tornaria distinto de *Utricularia*, como a presença de apenas dois óvulos nos ovários, e a ocorrência de frutos indeiscentes, onde apenas uma semente se desenvolve. O gênero comportaria apenas uma espécie, *Biovularia olivacea*. Benhart (1916) manteve o gênero criado por Kamiénsky (1890), juntamente com os outros 12 gêneros nos quais dividiu *Utricularia*. Taylor (1989) rejeitou essa delimitação, adotando uma divisão seccional do gênero *Utricularia*, mantendo inclusive o nome de vários gêneros propostos por Benhart (1916) em suas seções. *Utricularia olivacea* (fig. 4D) (anteriormente descrita como *Biovularia olivacea* por Kamiénsky) foi alocada em *Utricularia* sect. *Utricularia*, juntamente com *Utricularia biovularioides*, táxon morfológicamente próximo, como o nome sugere. Jobson et al. (2003), no entanto, constataram que *U. olivacea* aloca-se como grupo irmão de *U. sect. Vesiculina*, baseando-se em marcadores moleculares do cpDNA. Esse resultado é convergente com o presente estudo, que se baseou em dados oriundos dos DNAs plastidial e nuclear. *U. olivacea* e *U. biovularioides* possuem hábito aquático suspenso, e dimensões muito reduzidas, uma das menores encontradas em angiospermas (BEAL, 1968). Algumas características comuns ao grupo são a ausência de folhas, ocorrência de estolões capilares bem ramificados, a presença de armadilhas abundantes e munidas de dois apêndices longos e ramificados, a presença de pequenas flores solitárias com corola branca, lobos do cálice arredondados e a ocorrência de sementes elipsoides não aladas (TAYLOR, 1989). Características distintivas entre as duas espécies são encontradas na tabela 6.

U. olivacea ocorre desde a costa leste dos Estados Unidos até o Sul do Brasil, tendo sido observada pela primeira vez em Cuba no ano de 1860, por Wright (BEAL, 1968; TREVISAN; MOÇO, 2011). Sua ocorrência está associada à costa do Oceano Atlântico nas Américas, sendo sua dispersão relacionada a pássaros migratórios (BEAL, 1968). *U. biovularioides* trata-se de uma espécie bastante rara, existindo poucos registros de sua ocorrência que se restringem ao

Brasil (MIRANDA et al., 2016). Poucos estudos foram empregados sobre as espécies em questão. O posicionamento taxonômico controverso dessas espécies é um reflexo dessa ausência de conhecimento. Nesse contexto, baseando-se em dados moleculares oriundos de dois *loci* nucleares e um plastidial, bem como em dados de estudos prévios (JOBSON et al., 2003) a segregação de *U. olivacea* e *U. biovularioides* em uma seção própria é recomendada à luz dos resultados oriundos do presente trabalho, resolvendo a parafilia de *Utricularia* sect. *Utricularia*.

Tab. 6. Características distintivas entre *Utricularia olivacea* e *U. biovularioides*, de acordo com Taylor (1989).

<i>U. olivacea</i> C.Wright ex Griseb.	<i>U. biovularioides</i> (Kuhlm.) P.Taylor
Presença de apenas dois óvulos por ovário	Presença de um a 10 óvulos por ovário
Ramificações irregulares	Ramificações sempre alternadas nos estolões
Durante o desenvolvimento do fruto, o cálice se torna denticulado, envolvendo-o	Não ocorrem modificações no cálice

Conclusões

A delimitação de *Utricularia* sect. *Utricularia* baseada na obra de Taylor (1989) torna o grupo parafilético devido à incorporação de *U. olivacea*, espécie que aloca-se como grupo irmão de *U. sect. Vesiculina*. Devido a isso, o presente estudo propõe a criação de uma nova seção, que englobaria essa espécie e *U. biovularioides*, morfologicamente relacionada.

A reconstrução filogenética de *Utricularia* sect. *Utricularia* baseada em dois genes nucleares e um espaçador cloroplastidial pôde detectar clados majoritários dentro do grupo, sendo eles: *U. floridana*, *U. gibba* e *U. striata*; *U. breviscapa* e *U. radiata*; *U. aurea*, *U. inflexa* e *U. reflexa*; *U. foliosa* e *U. hydrocarpa*; e finalmente *U. australis*, *U. bremii*, *U. minor*, *U. stygia*, *U. intermedia*, *U. dimorphanta*, *U. ochroleuca*, *U. vulgaris* e *U. machrorhiza*, com o último clado sendo composto por espécies que provavelmente se hibridizaram frequentemente ao longo da sua história evolutiva.

Finalmente, o emprego dos genes nucleares de poucas cópias no genoma de angiospermas, *RPB2* e *LEAFY*, se mostrou metodologicamente viável, podendo ser utilizados como bons marcadores em estudos subsequentes.

Referências

- ADAMEC, L. Investment in carnivory in *Utricularia stygia* and *U. intermedia* with dimorphic shoots. **Preslia**, v. 79, n. 2, p. 127-139, 2007.
- ADAMEC, L. Respiration and photosynthesis of bladders and leaves of aquatic *Utricularia* species. **Plant Biology**, v. 8, n. 06, p. 765-769, 2006.
- ADAMEC, L. Respiration of turions and winter apices in aquatic carnivorous plants. **Biologia**, v. 63, n. 4, p. 515-520, 2008.
- ADAMEC, L. The comparison of mechanically stimulated and spontaneous firings in traps of aquatic carnivorous *Utricularia* species. **Aquatic Botany**, v. 94, n. 1, p. 44-49, 2011.
- AKAIKE, H. Information theory and an extension of the maximum likelihood principle. In: Petrov, B.N. & Csaki, F. (Eds). **Second International Symposium on Information Theory**. Budapest: Akademiai Kiado. pp. 267–281, 1973.
- 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.
- ALMEIDA, J.; ROCHETA, M.; GALEGO, L. Genetic control of flower shape in *Antirrhinum majus*. **Development**, v. 124, n. 7, p. 1387-1392, 1997.
- 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.
- ASTUTI, G. Biosystematics of European species of carnivorous genus *Utricularia* (Lamiales, Angiosperms). 2016. 114p. Tese (Doutorado em Biologia) – Universidade de Pisa, Pisa, 2014.

BANDELT, H-J; FORSTER, P; RÖHL, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular biology and evolution**, v. 16, n. 1, p. 37-48, 1999.

BARTHLOTT, W.; POREMBSKI, S.; FISCHER, E.; GEMMEL, B. First protozoa-trapping plant found. **Nature**, 392, 447, 1998.

BARNHART, J. H. **Segregation of genera in Lentibulariaceae**. New York Botanical Garden, 1916.

BARRACLOUGH, T. G.; SAVOLAINEN, V. Evolutionary rates and species diversity in flowering plants. **Evolution**, 55, 677-683, 2001.

BAUMEL, A.; AINOUCHE, M. L., BAYER, R. J., AINOUCHE, A. K.; MISSET, M. T. Molecular phylogeny of hybridizing species from the genus *Spartina* Schreb. (Poaceae). **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 22, n. 2, p. 303-314, 2002.

BEAL, E. O. **A review of *Utricularia olivacea* Wright ex Grisebach (Lentibulariaceae)**. 1968.

BENNETT, J. R.; MATHEWS, S. Phylogeny of the parasitic plant family Orobanchaceae inferred from phytochrome A. **American Journal of Botany**, v. 93, n. 7, p. 1039-1051, 2006.

BENNETT, M. D.; LEITCH, I. J. Nuclear DNA amounts in angiosperms: targets, trends and tomorrow. **Annals of Botany**, v. 107, n. 3, p. 467-590, 2011.

BERETTA, M.; RODONDI, G.; ADAMEC, L.; ANDREIS, C. Pollen morphology of European bladderworts (*Utricularia* L., Lentibulariaceae). **Review of Palaeobotany and Palynology**, v. 205, p. 22-30, 2014.

BRYANT, D.; MOULTON, V. NeighborNet: An agglomerative method for the construction of planar phylogenetic networks. In: **International Workshop on Algorithms in Bioinformatics**. Springer Berlin Heidelberg, 2002. p. 375-391.

CARAVIERI, F. A.; FERREIRA, A. J.; FERREIRA, A.; CLIVATI, D.; MIRANDA, V. F. O.; ARAÚJO, W. L. Bacterial community associated with traps of the carnivorous plants *Utricularia hydrocarpa* and *Genlisea filiformis*. **Aquatic Botany**, v. 116, p. 8-12, 2014.

CASPER, S. J., MANITZ, H. Beiträge zur Taxonomie und Chorologie der mitteleuropäischen *Utricularia* - Arten 2. Androsporenese, Chromosomenzahlen und Pollenmorphologie. Feddes Repertorium, v. 86, n. 4, p. 211-232, 1975.

CASPER, S. J. Monographie der Gattung *Pinguicula* L. **Bibliotheca Botanica**, 1–209, 1966.

CIESLACK, T.; POLEPALLI, J. S.; WHITE, A.; MÜLLER, K.; BORSCH, T.; BARTHLOTT, W.; STEIGER, J.; MARCHAND, A.; LEGENDRE, L. Phylogenetic analysis of *Pinguicula* (Lentibulariaceae): chloroplast DNA sequences and morphology support several geographically distinct radiations. **American Journal of Botany**, 92, 1723–1736, 2005.

CLARKSON, J. J.; KELLY, L. J.; LEITCH, A. R.; KNAPP, S.; CHASE, M. W. Nuclear glutamine synthetase evolution in *Nicotiana*: phylogenetics and the origins of allotetraploid and homoploid (diploid) hybrids. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 55, n. 1, p. 99-112, 2010.

COHN, Ferdinand. Über die Funktion der Blasen von *Aldrovanda* und *Utricularia*. **Beiträge zur Biologie der Pflanzen** 1, 71–92, 1874.

DARRIBA, D.; TABOADA, G. L.; DOALLO, R.; POSADA, D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat Meth* v.9, p. 772–772. doi: 10.1038/nmeth.2109, 2012.

DARWIN, C. **Insectivorous plants**. J. Murray, 1888.

DE CANDOLLE, A. P. Lentibularieae in De Candolle, A. P., **Prodromus Systematis Naturalis Regni vegetabilis**, Paris, 1844.

DE QUEIROZ, K. Species concepts and species delimitation. **Systematic biology**, v. 56, n. 6, p. 879-886, 2007.

DOOLITTLE, W .F.. Phylogenetic classification and the universal tree. *Science*, v. 284, n. 5423, p. 2124-2128, 1999.

DOYLE, J. J. E DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation method for small quantities of fresh tissues. **Phytochem Bull.** v. 19, p. 11-15, 1987.

FISHER, E.; BARTHLOTT, W.; SEINE, R.; THEISEN, I. Lentibulariaceae. In: KUBITZKI, K et al. **The Families and Genera of Vascular Plants**, Berlin: Springer, 2004.

FLEISCHMANN, A.; MICHAEL, T. P.; RIVADAVIA, F.; SOUZA, A.; WANG, M.; TEMSH E. M.; HEUBL, G. Evolution of genome size and chromosome number in the carnivorous plant genus *Genlisea* (Lentibulariaceae), with a new estimate of the minimum genome size in angiosperms. **Annals of botany**, 2014.

FLEISCHMANN, A. **Monograph of the genus *Genlisea***. Redfern Natural History Productions, 2012a.

FLEISCHMANN, A. The new *Utricularia* species described since Peter Taylor's monograph. **Carnivorous Plant Newsletter**, v. 41, n. 2, p. 67-76, 2012b.

FORD, V. S.; LEE, J.; BALDWIN, B. G.; GOTTLIEB, L. D. Species divergence and relationships in *Stephanomeria* (Compositae): PgiC phylogeny compared to prior biosystematic studies. **American journal of botany**, v. 93, n. 3, p. 480-490, 2006.

FUKUDA, T.; YOKOYAMA, J.; NAKAMURA, T.; SONG, I-J.; ITO, T.; OCHIAI, T.; KANNO, A.; TOSHIKI, K.; MAKI, M. Molecular phylogeny and evolution of alcohol dehydrogenase (Adh) genes in legumes. **BMC plant biology**, v. 5, n. 1, p. 1, 2005.

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**, 8, 770-777, 2006.

GROB, G. B. J.; GRAVENDEEL, B.; EURLINGS, M. C. M. Potential phylogenetic utility of the nuclear FLORICAULA/LEAFY second intron: comparison with three chloroplast DNA regions in *Amorphophallus* (Araceae). **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 30, n. 1, p. 13-23, 2004.

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

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.

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

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

HOOT, S. B.; TAYLOR, W. C. The utility of nuclear ITS, a LEAFY homolog intron, and chloroplast atpB-rbcL spacer region data in phylogenetic analyses and species delimitation in *Isoetes*. **American Fern Journal**, v. 91, n. 3, p. 166-177, 2001.

HOWARTH, D. G.; BAUM, D. A. Phylogenetic utility of a nuclear intron from nitrate reductase for the study of closely related plant species. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 23, n. 3, p. 525-528, 2002.

HUELSENBECK, J. P.; RONQUIST, F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. **Bioinformatics**, v. 17, p. 754–755, 2001.

HUSON, D. H.; BRYANT, D. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. **Molecular biology and evolution**, v. 23, n. 2, p. 254-267, 2006.

HUSON, D. H.; KLÖPPER, T. H. Beyond galled trees-decomposition and computation of galled networks. In: **Annual International Conference on Research in Computational Molecular Biology**. Springer Berlin Heidelberg, 2007. p. 211-225.

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. **BMC Plant Biology**. doi:10.1186/1471-2229-11-101, 2011.

IBARRA-LACLETTE, E.; LYONS, E.; HERNÁNDEZ-GUZMÁN, G.; PÉREZ-TORRES, C. A.; CARRETERO-PAULET, L.; CHANG, T.-H.; HERRERA-ESTRELLA, L. Architecture and evolution of a minute plant genome. **Nature**, p. 1–6, 2013. doi:10.1038/nature12132, 2013.

LYONS, E.; FREELING, M. How to usefully compare homologous plant genes and chromosomes as DNA sequences. **The Plant Journal**, 53, 4, 661-673, 2008.

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

JOBSON, R. W.; LAAKKONEN, L.; WIKSTRÖM, M.; ALBERT, V. A. Adaptive evolution of cytochrome c oxidase: infrastructure for a carnivorous plant radiation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 52, p. 18064-18068, 2004.

JOBSON, R. W.; PLAYFORD, J.; CAMERON, K. M.; ALBERT, V. A. Molecular phylogenetics of Lentibulariaceae inferred from plastid rps16 intron and trnL-F DNA sequences: implications for character evolution and biogeography. **Systematic Botany**, 28, 157–171, 2003.

JUNIPER, B. E.; ROBINS, R. J.; JOEL, D. M. **The carnivorous plants**. London: Academic Press, 1989.

KAMEYAMA, Y.; OHARA, M. Predominance of clonal reproduction, but recombinant origins of new genotypes in the free-floating aquatic bladderwort *Utricularia australis* f. *tenuicaulis* (Lentibulariaceae). **Journal of Plant Research**, Tokyo, v. 119, p. 357-362, 2006.

KAMEYAMA, Y.; TOYAMA, M.; OHARA, M. Hybrid origins and F1 dominance in the free-floating, sterile bladderwort, *Utricularia australis* f. *australis* (Lentibulariaceae). **American journal of botany**, v. 92, n. 3, p. 469-476, 2005.

KAMIÉNSKI, F. Lentibulariaceae in Engler, A. e Plantl, K. A. E., **Die naturalischen Pflanzenfamilien IV**, 3b, Leipzig, 1895.

KAMIÉNSKI, F. **Recherches sur la famille Lentibulariacées (Utriculariacées)**. Zap Novorossiisk. Estestvoisp. Obshch. 12: 179-210, 1890.

KATOH, K.; MISAEAL, K.; KUMA, K. I.; MIYATA, T.. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. **Nucleic acids research**, v. 30, n. 14, p. 3059-3066, 2002.

KIM, C.; SHIN, H.; CHANG, Y. T.; CHOI, H. K. Speciation pathway of *Isoëtes* (Isoëtaceae) in East Asia inferred from molecular phylogenetic relationships. **American journal of botany**, v. 97, n. 6, p. 958-969, 2010.

LAACKONEN, L.; JOBSON, R. W.; ALBERT, V. A. A new model for the evolution of carnivory in the bladderwort plant (*Utricularia*): adaptive changes in cytochrome c oxidase (COX) provide respiratory power. **Plant Biology**, v. 8, n. 06, p. 758-764, 2006.

LEGENDRE, L. The genus *Pinguicula* L. (Lentibulariaceae): an overview. *Acta Botanica Gallica*, v. 147, n. 1, p. 77-95, 2000.

LEUSHKIN, E. V.; SUTORMIN, R. A.; NABIEVA, E. R.; PENIN, A. A.; KONDRASHOV, A. S.; LOGACHEVA, M. D. The miniature genome of a carnivorous plant *Genlisea aurea* contains a low number of genes and short non-coding sequences. **BMC genomics**, v. 14, n. 1, p. 1, 2013.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, v. 25, n. 11, p. 1451-1452, 2009.

LINDER, C. R.; RIESEBERG, L. H. Reconstructing patterns of reticulate evolution in plants. **American journal of botany**, v. 91, n. 10, p. 1700-1708, 2004.

LINNAEUS, C. V. *Species plantarum*, vol. 1. Laurentii Salvii, Stockholm, 1753.

LLOYD, F. E. **The Carnivorous Plants**. The Ronald Press Company, New York, 1942.

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.

LUO, J.; YOUSHIKAWA, N.; HODSON, M. C.; HALL, B. D. Duplication and paralog sorting of RPB2 and RPB1 genes in core eudicots. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 44, n. 2, p. 850-862, 2007.

MAIZEL, A.; BUSCH, M. A.; TANAHASHI, T.; PERKOVIC, J.; KATO, M.; HASEBE, M.; WEIGEL, D. The floral regulator LEAFY evolves by substitutions in the DNA binding domain. **Science**, v. 308, n. 5719, p. 260-263, 2005.

MALLET, J. Hybrid speciation. **Nature**, v. 446, n. 7133, p. 279-283, 2007.

MATHEWS, S.; SPANGLER, R. E.; MASON-GAMER, R. J.; KELLOGG, E. A. Phylogeny of Andropogoneae inferred from phytochrome B, GBSSI, and ndhF. **International Journal of Plant Sciences**, v. 163, n. 3, p. 441-450, 2002.

MEYERS, D. G.; STRICKLER, J. R. Capture enhancement in a carnivorous aquatic plant: function of antennae and bristles in *Utricularia vulgaris*. **Science**, v. 203, n. 4384, p. 1022-1025, 1979.

MICHAEL, T. P.; JACKSON, S. The first 50 plant genomes. **The Plant Genome**, v. 6, n. 2, 2013.

MIRANDA, V. F. O.; MARTINS, V. G.; FURLAN, A.; BACCI JR; M. 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.

MIRANDA, V. F. O.; MENEZES, C. G.; SILVA, S. R.; DÍAZ, Y. C. A.; RIVADAVIA, F. Lentibulariaceae in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://www.floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB8570>>. Acesso em: 12 jun. 2016.

MÜLLER, K.; BORSCH, T. Phylogenetics of *Utricularia* (Lentibulariaceae) and molecular evolution of the trnK intron in a lineage with high substitutional rates. **Plant Systematics and Evolution**, 250.1-2: 39-67, 2005.

MÜLLER, K.; BORSCH, T.; LEGENDRE, L.; POREMBSKY, S.; BARTHLOTT, W. A phylogeny of Lentibulariaceae based on sequences of matK and adjacent non-coding regions. **American Journal of Botany**, 87, 145–146, 2000.

MÜLLER, K.; BORSCH, T.; LEGENDRE, L.; POREMBSKY, S.; BARTHLOTT, W. Recent progress in understanding the evolution of carnivorous Lentibulariaceae (Lamiales). **Plant Biology**, v. 8, n. 06, p. 748-757, 2006.

MÜLLER, K.; BORSCH, T.; LEGENDRE, L.; POREMBSKY, S.; THEISEN, I.; BARTHLOTT, W. Evolution of carnivory in Lentibulariaceae and the Lamiales. **Plant Biology**, 6, 477–490, 2004.

OXELMAN, B.; YOSHIKAWA, N.; MCCONAUGHY, B. L.; LUO, J.; DENTON, A. L.; HALL, B. D. RPB2 gene phylogeny in flowering plants, with particular emphasis on asterids. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 32, n. 2, p. 462-479, 2004.

PHILBRICK, C. T., LES, D. H. Evolution of Aquatic Angiosperm Reproductive Systems. What is the balance between sexual and asexual reproduction in aquatic angiosperms? **Bioscience**, v. 46, n. 11, p. 813-826, 1996.

PLACHNO, B. J., ADAMEC, L. Differentiation of *Utricularia ochroleuca* and *U. stygia* populations in Trebon Basin, Czech Republic, on the basis of quadrifid glands. **Carniv. Pl. Newsl**, v. 36, p. 87-95, 2007a.

PLACHNO, B. J.; ADAMEC, L.; LICHTSCHEIDL, I. K.; PEROUTKA, M.; ADLASSNIG, W.; VRBA, J. Fluorescence labelling of phosphatase activity in digestive glands of carnivorous plants. **Plant Biology**, 8, 813-820, 2006.

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

PŁACHNO, B. J.; KOZIERADZKA-KISZKURNO, M.; ŚWIĄTEK, P. Functional ultrastructure of *Genlisea* (Lentibulariaceae) digestive hairs. **Annals of botany**, v. 100, n. 2, p. 195-203, 2007b.

POLZIN, T.; DANESHMAND, S. V. NETWORK 5.0.0.0. **Fluxus Technology Ltd Steiner (MP) algorithm**, 2004.

POPPINGA, S.; WEISSKOPF, C.; WESTERMEIER, A. S.; MASSELTHER, T.; SPECK, T. Fastest predators in the plant kingdom: functional morphology and biomechanics of suction traps found in the largest genus of carnivorous plants. **AoB Plants**, v. 8, p. plv140, 2016.

REIFENRATH, K.; THEISEN, I.; SCHNITZLER, J.; POREMBSKI, S.; BARTHLOTT, W. Trap architecture in carnivorous *Utricularia* (Lentibulariaceae). **Flora**, 201, 597- 605, 2006.

RIESEBERG, L. H.; WENDEL, J. F. Introgression and its consequences in plants. **Hybrid zones and the evolutionary process**, p. 70-109, 1993.

RONSTED, N.; WEIBLEN, G. D.; CLEMENT, W. L.; ZEREGA, N. J. C.; SAVOLAINEN, V. Reconstructing the phylogeny of figs (*Ficus*, Moraceae) to reveal the history of the fig pollination mutualism. **Symbiosis (Rehovot)**, v. 45, n. 1, p. 45, 2008.

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.

RUTISHAUSER, R. The developmental plasticity of *Utricularia aurea* (Lentibulariaceae) and its floats. *Aquatic botany*, v. 45, n. 2, p. 119-143, 1993.

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**, 90, 129-136, 2009.

SIROVÁ, D.; BOROVEC, J.; SANTRUCKOVÁ, H.; VRBA, J.; ADAMEC, L. *Utricularia* carnivory revisited: plants supply photosynthetic carbon to traps. **Journal of Experimental Botany**, v. 61, n. 1, p. 99-103, 2010.

SMALL, R. L.; CRONN, R. C.; WENDEL, J. F. LAS J. Review N° 2. Use of nuclear genes for phylogeny reconstruction in plants. **Australian Systematic Botany**, v. 17, n. 2, p. 145-170, 2004.

SMITH, J. F.; DRAPER, S. B.; HILEMAN, L. C.; BAUM, D. A. A phylogenetic analysis within tribes Gloxinieae and Gesnerieae (Gesnerioideae: Gesneriaceae). **Systematic Botany**, v. 29, n. 4, p. 947-958, 2004.

SOLTIS, D. E., SOLTIS, P. S. Choosing an approach and an appropriate gene for phylogenetic analysis. In: **Molecular systematics of plants II**. Springer US, p. 1-42, 1998.

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.

SUGIURA, N. Further analysis of the data by Akaike's Information Criterion and the finite corrections. **Communications in Statistics, Theory and Methods** A7: 13-26, 1978.

SWOFFORD D. PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 10. Sinauer, Sunderland, 2003.

SYDENHAM, P. H.; FINDLAY, G. P. Solute and water transport in the bladders of *Utricularia*. **Ion Transport in Plants.**, p. 583-587, 1973.

TANAHASHI, T.; SUMIKAWA, N.; KATO, M.; HASEBE, M. Diversification of gene function: homologs of the floral regulator FLO/LFY control the first zygotic cell division in the moss *Physcomitrella patens*. **Development**, v. 132, n. 7, p. 1727-1736, 2005.

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

TEMPLETON, A. R.; CRANDALL, K. A.; SING, C. F. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. **Genetics**, v. 132, n. 2, p. 619-633, 1992.

THOR, G. The genus *Utricularia* in the Nordic countries, with special emphasis on *U. stygia* and *U. ochroleuca*. **Nordic journal of botany**, v. 8, n. 3, p. 213-225, 1988.

TREVISAN, R.; MOÇO, M. C. C. Ocorrência de *Utricularia olivacea* C.Wright ex Griseb.(Lentibulariaceae) no Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 9, n. 2, 2011.

UNTERGASSER, A.; CUTCUTACHE, I.; KORESSAAR, T.; YE, J.; FAIRCLOTH, B. C.; REMM, M.; ROZEN, S. G. Primer3 - New capabilities and interfaces. **Nucleic acids research**, 40, 15, e115-e115, 2012.

VAHL, M. Enumeratio plantarum, 1. Copenhagen, 1805.

VALLEJO-MARÍN, M.; HISCOCK, S. J. Hybridization and hybrid speciation under global change. **New Phytologist**, 2016.

VINTÉJOUX, C. Ultrastructural and cytochemical observations on the digestive glands of *Utricularia neglecta* L. (Lentibulariaceae). Distribution of protease and acid phosphatase activities. **Port. Acta Biol., ser. A**, v. 14, p. 463-73, 1976.

WALKER, T. S.; BAIS, H. P.; GROTEWOLD, E.; VIVANCO, J. M. Root exudation and rhizosphere biology. **Plant physiology**, v. 132, n. 1, p. 44-51, 2003.

WIENS, J. J. Missing data and the design of phylogenetic analyses. **Journal of biomedical informatics**, v. 39, n. 1, p. 34-42., 2006.

WIKSTROM, M. K. F. Proton pump coupled to cytochrome c oxidase in mitochondria. **Nature**, v. 266, n. 5599, p. 271-273, 1977.

WOLFE, K. H.; LI, W-H.; SHARP, P. M. Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs. **Proceedings of the Natural Academy of Sciences of the United States of America**. 84, 9054- 9058, 1987.

WEIGEL, D.; ALVAREZ, J.; SMYTH, D. R.; YANOFSKY, M. F.; MEYEROWITZ, E. M. LEAFY controls floral meristem identity in *Arabidopsis*. **Cell**, v. 69, n. 5, p. 843-859, 1992.

WICKE, S.; MÜLLER, K. F; PAMPHILIS, C. W.; QUANDT, D.; WICKETT, N. J.; YAN, Z.; RENNER, S. S.; SCHNEEWEISSA, G. M. Mechanisms of functional and physical genome reduction in photosynthetic and nonphotosynthetic parasitic plants of the broomrape family. **The Plant Cell**, v. 25, n. 10, p. 3711-3725, 2013.

ZIMMER, E. A.; WEN, J. Using nuclear gene data for plant phylogenetics: Progress and prospects. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 65, p. 774 – 785, 2012.