

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ORIGEM E INFLUÊNCIA DE ESPÉCIES REATIVAS DE
OXIGÊNIO EM LINHAGENS DE LENTIBULARIACEAE
(LAMIALES) COM IMPLICAÇÕES EVOLUTIVAS**

Guilherme Camara Seber

Agrônomo

2020

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ORIGEM E INFLUÊNCIA DE ESPÉCIES REATIVAS DE
OXIGÊNIO EM LINHAGENS DE LENTIBULARIACEAE
(LAMIALES) COM IMPLICAÇÕES EVOLUTIVAS**

Guilherme Camara Seber

Orientador: Prof. Dr. Vitor Fernandes Oliveira de Miranda

Coorientadora: Prof. Dra. Priscila Lupino Gratão

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

2020

S443o Seber, Guilherme Camara
Origem e influência de espécies reativas de oxigênio em linhagens de Lentibulariaceae (Lamiales) com implicações evolutivas / Guilherme Camara Seber. -- Jaboticabal, 2020
78 p. : tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientador: Vitor Fernandes Oliveira de Miranda
Coorientadora: Priscila Lupino Gratão

1. Evolução. 2. Filogenia. 3. Genética. 4. Genoma. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: EFEITO E ORIGEM DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO EM LINHAGENS DE LENTIBULARIACEAE (LAMIALES), COM IMPLICAÇÕES EVOLUTIVAS

AUTOR: GUILHERME CAMARA SEBER

ORIENTADOR: VITOR FERNANDES OLIVEIRA DE MIRANDA

COORIENTADOR: MARCOS TULIO DE OLIVEIRA

COORIENTADORA: PRISCILA LUPINO GRATÃO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor 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

Prof. Dr. DANIEL GUARIZ PINHEIRO (VIDEOCONFERÊNCIA)
Departamento de Tecnologia / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Prof. Dr. ROGÉRIO FALLEIROS CARVALHO (VIDEOCONFERÊNCIA)
Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal - UNESP

Profa. Dra. ANA PAULA MORAES (VIDEOCONFERÊNCIA)
Universidade Federal do ABC-Campus São Bernardo do Campo / São Bernardo do Campo/SP

Pesquisador Dr. DOUGLAS SILVA DOMINGUES (VIDEOCONFERÊNCIA)
Departamento de Botânica / IB / UNESP - Rio Claro

Jaboticabal, 16 de junho de 2020

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, adquirindo experiência na área de melhoramento genético de grandes culturas. Foi bolsista de iniciação científica (CNPq) junto ao projeto intitulado “Seleção Individual com Teste de Progênes em Crambe”. Realizou estágio curricular no IMA (Instituto Mato-grossense do Algodão), obtendo experiência com melhoramento genético de plantas oleaginosas. É Mestre em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) pelo Programa de Pós-Graduação homônimo, da UNESP – Câmpus de Jaboticabal. Trabalhou com a filogenia molecular de *Utricularia* sect. *Utricularia*, um grupo de distribuição mundial e classificação taxonômica complexa, obtendo experiência com filogenia e evolução de plantas. Atua nas áreas de biologia molecular e sistemática filogenética.

“A ciência atua na fronteira entre o conhecimento e a ignorância sem medo de admitir que não sabemos. Não há nenhuma vergonha nisso. A única vergonha é fingir que temos todas as respostas.” Neil deGrasse Tyson

Aos meus pais, Amanda Batista Camara Seber e Frederico Seber, pela estrutura básica sem a qual nada mais importa, pelo apoio durante toda a minha trajetória profissional e pelo exemplo de caráter, referência que sempre levarei comigo.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a toda a equipe do Laboratório de Sistemática Vegetal (LSV), pelas discussões produtivas que direcionaram esse trabalho. Sou especialmente grato ao meu orientador, Vitor Fernandes Oliveira de Miranda, que ao longo desses anos na Pós-Graduação foi para mim uma fonte de conhecimento preciosa. As experiências que obtive fazendo parte da equipe do LSV são uma base importante da minha formação profissional, tendo sido também marcantes do ponto de vista pessoal.

Agradeço à equipe do Laboratório de Fisiologia Vegetal, especialmente à professora Priscila Lupino Gratão, ao professor Rogério F. Carvalho, à professora Durvalina M. M. dos Santos e à técnica Sônia M. R. Carregari, que deram apoio importante à realização do trabalho, oferecendo a estrutura necessária aos ensaios e assistência técnica fundamental.

À professora Amanda L. P. M. Peticarrari, agradeço a assistência durante a realização das análises estatísticas, o que resultou em uma parceria bastante proveitosa.

Gostaria também de agradecer ao professor Marcos Túlio Oliveira, que foi colaborador do trabalho durante sua fase inicial, e nos trouxe ideias muito interessantes para que conseguíssemos responder as questões que embasaram o projeto.

Agradeço à professora Sandra H. U. Trevisoli, que nos forneceu espaço na casa de vegetação climatizada na qual parte dos ensaios foram realizados. Ao funcionário Osmar L. Trentin, agradeço pela prontidão, me ajudando a ter acesso à casa de vegetação.

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

Às agências de fomento, Fapespe, (FAPESP: 2013/05144-0) e CNPq, que também auxiliaram a realização do trabalho mediante apoio financeiro.

Sou muito grato à UNESP, como uma instituição que participou da minha construção profissional desde a graduação. Admiro a capilaridade desta em todos cantos do estado de São Paulo, possuindo uma proposta inclusiva, sendo peça fundamental na produção de conhecimento científico no Brasil e na formação de quadros técnicos para a atuação profissional. Defender a universidade pública se faz necessário principalmente na atual conjuntura, em que nos deparamos com o negacionismo da ciência, mesmo ela sendo a chave para a superação das crises de nossos tempos.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
2.1. Carnivoria em Lentibulariaceae.....	5
2.2. Evolução e sistemática de Lentibulariaceae.....	7
2.3. Taxas de substituição nucleotídica e contração genômica.....	11
3. OBJETIVOS.....	15
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
4.1. Mensuração de H ₂ O ₂ nos órgãos de espécies de Lentibulariaceae.....	15
4.1.1. Material vegetal.....	15
4.1.2. Mensurações de H ₂ O ₂	17
4.1.3. Análises estatísticas.....	17
4.2. Análises filogenéticas.....	20
4.2.1. Análise referente à possível relação entre o conteúdo de H ₂ O ₂ e o comprimento de ramos das linhagens.....	24
4.3. Ensaio relativo à detecção da origem do H ₂ O ₂ nos órgãos de <i>Utricularia foliosa</i>	25
4.3.1. Material vegetal.....	25
4.3.2. Instalação do experimento, coleta de dados e análises estatísticas.....	25

4.4. Ensaio relativo à averiguação da influência do ambiente aquático no conteúdo de H ₂ O ₂ em folhas de <i>Utricularia graminifolia</i>	28
4.4.1. Material vegetal.....	28
4.4.2. Instalação do experimento, coleta de dados e análises estatísticas.....	28
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
5.1. Conteúdo de H ₂ O ₂ nos órgãos de espécies de Lentibulariaceae.....	30
5.1.1. <i>Utricularia reniformis</i> e <i>U. foliosa</i>	30
5.1.2. <i>Genlisea violacea</i> e <i>G. repens</i>	32
5.1.3. <i>Pinguicula gigantea</i> e <i>P. agnata</i>	33
5.1.4. Comparação entre as espécies e importância do H ₂ O ₂	33
5.1.5. As folhas fotossintetizantes são os órgãos que mais acumulam H ₂ O ₂	38
5.2. Análises filogenéticas.....	39
5.3. Correlação entre o conteúdo de H ₂ O ₂ nas folhas e o comprimento de ramos.....	51
5.4. Origem do H ₂ O ₂ nos órgãos de <i>Utricularia foliosa</i>	54
5.5. Influência do hábito no acúmulo de H ₂ O ₂ nas folhas.....	57
6. CONCLUSÕES.....	59
7. REFERÊNCIAS.....	60

ORIGEM E INFLUÊNCIA DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO EM LINHAGENS DE LENTIBULARIACEAE (LAMIALES) COM IMPLICAÇÕES EVOLUTIVAS

RESUMO – Lentibulariaceae é uma família de plantas carnívoras composta por três gêneros, *Pinguicula*, *Genlisea* e *Utricularia*. *Pinguicula* é um grupo irmão do clado composto por *Genlisea* e *Utricularia*, possuindo características plesiomórficas como as armadilhas relativamente simples, sendo suas folhas cobertas por uma mucilagem adesiva que captura presas. *Genlisea* possui armadilhas subterrâneas, em formato de forquilha e helicoidais em suas porções terminais, com fendas por onde pequenos organismos do solo se inserem. Já *Utricularia* possui armadilhas em formato de vesícula, denominadas utrículos, funcionais em meio aquoso via sucção. Na literatura, é proposta uma possível relação entre a carnivoría e altas taxas de substituição nucleotídica que ocorrem no clado *Genlisea-Utricularia*, pois o mecanismo ativo de captura de presas encontrado nos utrículos demanda muita energia, fazendo com que esses órgãos tenham altas taxas respiratórias. Um metabolismo respiratório maior pode resultar em uma superprodução de espécies reativas de oxigênio (ERO), moléculas sabidamente mutagênicas que podem estar relacionadas às altas taxas de mutações encontradas nos genomas do clado *Genlisea-Utricularia*. Além disso, esse clado possui as espécies com os menores genomas encontrados em angiospermas, fenômeno que está relacionado à ocorrência de uma acelerada evolução molecular. Foi mensurado o conteúdo de H₂O₂, uma das principais ERO, em vários órgãos de seis espécies de Lentibulariaceae: *Pinguicula gigantea*, *P. agnata*, *Genlisea violacea*, *G. repens*, *Utricularia reniformis* e *U. foliosa*. Foram realizadas análises filogenéticas com oito sequências, oriundas de dois compartimentos genômicos (cloroplasto e núcleo), em 114 espécies de Lentibulariaceae, inclusive as empregadas no estudo em questão. Testou-se a possível correlação entre o conteúdo de H₂O₂ nas folhas e o comprimento de ramos das espécies analisadas, baseando-se nas análises moleculares. Constatou-se a existência de correlação positiva entre o comprimento de ramos nas filogenias e o conteúdo de H₂O₂ nas folhas das espécies. Foi discutida também a origem dessa ERO nos órgãos das espécies de Lentibulariaceae, e *U. foliosa* foi empregada em um ensaio com essa finalidade. A influência do hábito no conteúdo de H₂O₂ dos órgãos também foi analisada, empregando-se *U. graminifolia* como modelo. Nesse caso, evidenciou-se que espécies terrestres tendem a acumular mais H₂O₂ em seus órgãos do que as aquáticas, que podem perder essa substância por difusão no ambiente aquático, havendo possíveis implicações evolutivas nesse fenômeno.

Palavras chave: ERO, *Pinguicula*, *Genlisea*, *Utricularia*, plantas carnívoras, substituição nucleotídica

ORIGIN AND INFLUENCE OF REACTIVE OXYGEN SPECIES IN LINEAGES OF LENTIBULARIACEAE (LAMIALES) WITH EVOLUTIONARY IMPLICATIONS

ABSTRACT – Lentibulariaceae is a family of carnivorous plants composed by three genera, *Pinguicula*, *Genlisea* and *Utricularia*. *Pinguicula* is a sister group of the clade composed by *Genlisea* and *Utricularia*, possessing plesiomorphic characteristics such as the relatively simple traps, being its leaves covered by an adhesive mucilage that capture prey. *Genlisea* has underground, fork-shaped and helical traps, with slits where small soil organisms fit in. *Utricularia*, on the other hand, has vesicle-shaped traps, the utricles, which are functional in aqueous medium by suction. A possible relationship between carnivory and high rates of nucleotide substitution that occur in the *Genlisea-Utricularia* clade is discussed, because the active prey capture mechanism found in the utricles requires high energy, causing high respiratory rates in these organs. A higher respiratory metabolism can result in an overproduction of reactive oxygen species (ROS), molecules that are known to be mutagenic, and could be related with the high mutation rates found in the genomes of *Genlisea-Utricularia* clade. In addition, this clade has the species with the smallest genomes found in angiosperms, a phenomenon that is related with high molecular rates. The content of H₂O₂, one of the main ROS, was measured in several organs of six species of Lentibulariaceae: *Pinguicula gigantea*, *P. agnata*, *Genlisea violacea*, *G. repens*, *Utricularia reniformis* and *U. foliosa*. Phylogenetic analyzes were carried out with eight sequences, from two genomic compartments (chloroplast and nucleus), in 114 species of Lentibulariaceae, including those used in this study. The possible relationship between the content of H₂O₂ in leaves and the branch length of the analyzed species was tested, based on molecular estimates. It was found positive correlation between the trees branch lengths in phylogenies and the content of H₂O₂ in leaves. The origin of this ROS in the organs of Lentibulariaceae species was also discussed, and *U. foliosa* was used in an assay for this purpose. The influence of the habit in the accumulation of H₂O₂ in the organs was also analyzed, using *U. graminifolia* as a model. In this case, we demonstrate that terrestrial species accumulate more H₂O₂ in their organs than the aquatic ones, because they can lose this substance by diffusion in the aquatic environment, with possible evolutionary implications.

Keywords: ROS, *Genlisea*, *Pinguicula*, *Utricularia*, carnivorous plants, nucleotide substitution

1. INTRODUÇÃO

A família Lentibulariaceae Rich. (Lamiales) é composta por aproximadamente 350 espécies de plantas carnívoras distribuídas em três gêneros, sendo eles *Pinguicula* L., *Genlisea* A.St.-Hil. e *Utricularia* L. (MCPHERSON, 2010; ELLISON; ADAMEC, 2018; fig. 1). A família é monofilética, com *Pinguicula* compondo um grupo irmão ao clado composto por *Genlisea* e *Utricularia* (JOBSON et al., 2003; fig. 1). Cada gênero possui mecanismos específicos para capturar, matar e digerir presas, além absorver seus nutrientes (JUNIPER et al., 1989; LLOYD, 1942). A família vem chamando a atenção de vários grupos de pesquisa ao redor do mundo não apenas devido à carnivoría, mas por uma série de peculiaridades dos pontos de vista morfológico (PŁACHNO; ŚWIĄTEK, 2010; RUTISHAUSER, 1993; RUTISHAUSER; ISLER, 2001), fisiológico (ADAMEC, 2006; ADAMEC, 2008; SYDENHAM; FINDLAY, 1973), bioquímico (JOBSON et al., 2004; LAAKKONEN et al., 2006), ecológico (CARAVIERI et al., 2014; PŁACHNO et al., 2008; SIROVÁ et al., 2010), evolutivo (JOBSON et al., 2002; SILVA et al., 2018) e genômico (IBARRA-LACLETTE et al., 2011b; IBARRA-LACLETTE et al., 2013; SILVA et al. 2020). As espécies da família são herbáceas que ocorrem geralmente em solos distróficos e úmidos, apresentando como sinapomorfias a própria carnivoría (MCPHERSON, 2010), a ocorrência de flores zigomorfas, geralmente vistosas, munidas de dois estames e cálcara nectarífero (JUDD et al., 2002; CLIVATI et al., 2014; LUSTOFIN et al., 2020). No entanto, ocorreu uma grande diversificação quanto ao hábito principalmente no gênero *Utricularia*, no qual ocorrem espécies terrestres, que é o estado de caráter ancestral da família (MÜLLER et al., 2006), além de espécies aquáticas, epífitas e rupícolas (TAYLOR, 1989).

Pinguicula possui algumas características plesiomórficas da família, como armadilhas simples quando em relação aos demais gêneros, constituídas pelas próprias folhas que produzem mucilagem adesiva (HESLOP-HARRISON, 2004; LEGENDRE, 2000; fig. 1G), e são munidas de raízes, as quais foram perdidas ao longo da evolução pelo ancestral de *Genlisea* e *Utricularia* (MÜLLER et al.,

2006). Além disso, *Pinguicula* apresenta embriões típicos de uma angiosperma, possuindo radícula, hipocótilo, um ou dois cotilédones e um meristema apical, ao passo que em *Genlisea* e *Utricularia* os embriões são extremamente simplificados, sendo um conjunto de células indiferenciadas em algumas espécies de *Utricularia* (PŁACHNO; ŚWIĄTEK, 2010).

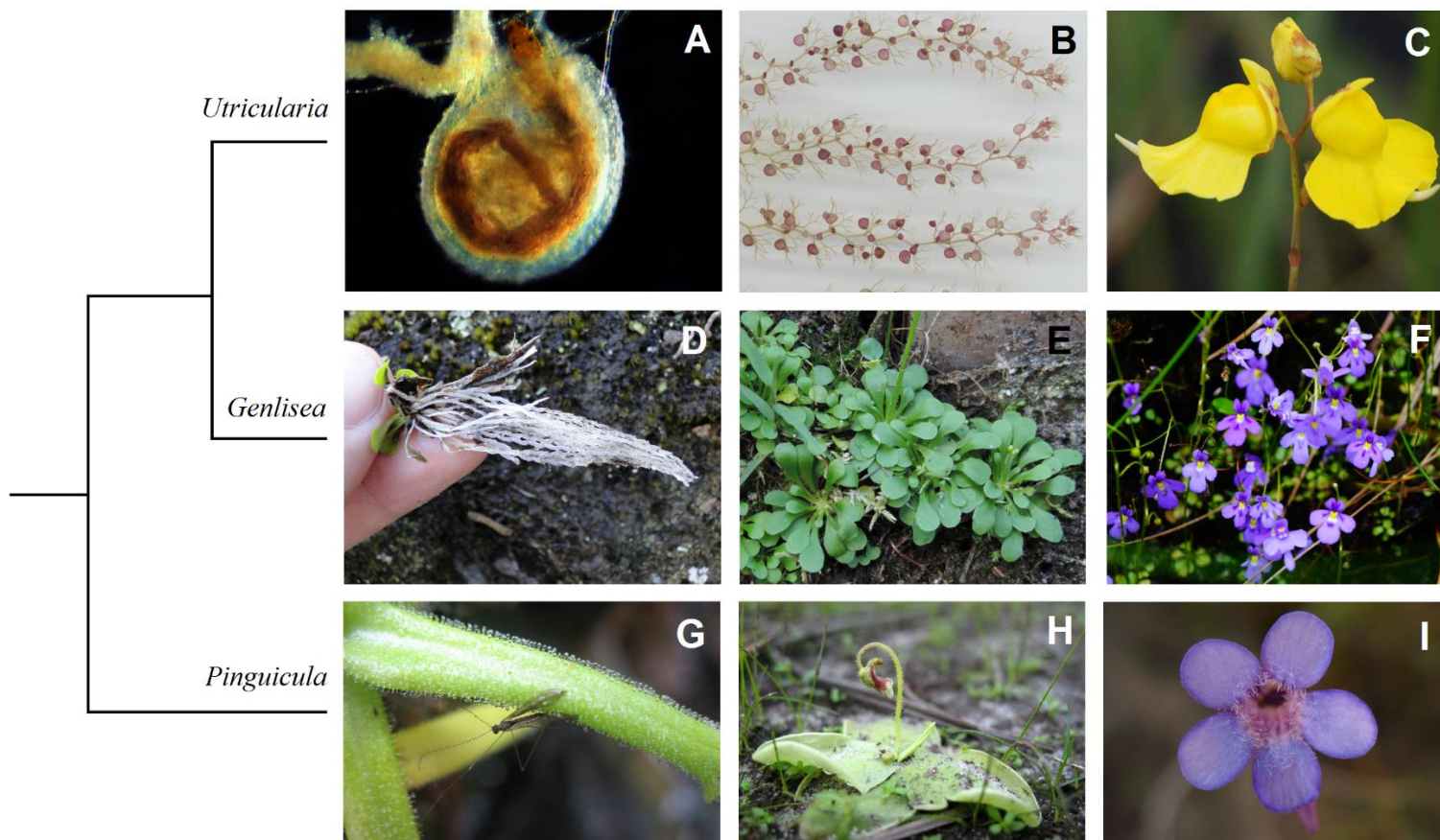


Fig. 1. Distribuição dos gêneros de Lentibulariaceae em uma perspectiva filogenética. A – Armadilha, ou utrículo, de *Utricularia reniformis* A.St.-Hil. B – Padrão vegetativo de *U. hydrocarpa* Vahl, uma espécie aquática. Créditos: L. Adamec. C – Inflorescência de *U. praelonga* A.St.-Hil. & Girard. D – Armadilhas de *Genlisea violacea* A.St.-Hil. em evidência, após serem desenterradas. E – Rosetas de *G. violacea*. F – Flores de *G. violacea*. G – Inseto capturado por folha adesiva de *Pinguicula cubensis* Urquiola & Casper. Créditos: Y. Domínguez. H – Roseta de *P. albida* C. Wright ex Griseb. entrando em florescimento. Créditos: Y. Domínguez. I – Flor de *P. filifolia* C.Wright ex Griseb. Créditos: Y. Domínguez.

Outra característica plesiomórfica da família é o desenvolvimento rosetado associado ao hábito terrestre, que está presente na grande maioria das espécies de *Pinguicula* (LEGENDRE, 2000; fig. 1H). O desenvolvimento estolonífero surgiu em *Genlisea*, no caso de *G. repens* Benj. (FLEISCHMANN, 2012), e em várias

linhagens dentro do gênero *Utricularia*, o que permite uma rápida colonização clonal de alguns ambientes, inclusive nas espécies aquáticas (KAMEYAMA; OHARA, 2006; TAYLOR, 1989; fig. 1B). As armadilhas presentes no clado *Genlisea-Utricularia* são mais complexas do que em relação às de *Pinguicula*, sendo subterrâneas e tubulares no caso de *Genlisea* (FLEISCHMANN, 2012; fig. 1D) e vesículas funcionais por sucção em meio aquoso no caso de *Utricularia* (POPPINGA et al., 2016; fig. 1A). As armadilhas de *Utricularia* são consideradas os órgãos mais complexos do reino vegetal por alguns autores (JUNIPER et al., 1989; LLOYD, 1942).

O clado composto por *Genlisea* e *Utricularia* possui as espécies com os menores genomas conhecidos dentre as angiospermas (FLEISCHMANN et al., 2014; GREILHUBER et al., 2006; IBARRA-LACLETTE et al., 2011b; IBARRA-LACLETTE et al., 2013; LEUSHKIN et al., 2013; SILVA et al., 2020; VELEBA et al., 2014), e suas linhagens possuem taxas de substituição nucleotídica muito elevadas quando em relação a *Pinguicula* ou às demais angiospermas (IBARRA-LACLETTE et al., 2011b; MÜLLER et al., 2004). Isso pode ter relação com a diversificação de linhagens e hábitos que aconteceu principalmente em *Utricularia* (JOBSON et al., 2002). As altas taxas de substituição nucleotídica podem estar associadas à contração genômica que ocorreu durante a evolução de algumas linhagens de Lentibulariaceae (ALBERT et al., 2010), sendo possível que haja uma correlação entre os dois fenômenos (e.g. DUFRESNE et al., 2005).

O aumento nas taxas mutacionais vem sendo associado à carnivoría na linhagem *Genlisea-Utricularia*, pois as taxas respiratórias nas armadilhas de *Utricularia* são muito superiores às que ocorrem nos órgãos fotossintetizantes (ADAMEC, 2006). Discute-se a influência de uma mutação no gene mitocondrial *cox1*, relacionado à cadeia respiratória, com esse fenômeno, pois ocorreu seleção positiva desse polimorfismo na linhagem que originou *Genlisea* e *Utricularia* (JOBSON et al., 2004; LAAKKONEN et al., 2006). O aumento da demanda energética ocasionado pela carnivoría poderia ter causado uma pressão de seleção no sentido de um acréscimo nas taxas respiratórias, fenômeno que pode resultar na superprodução de espécies reativas de oxigênio (ERO), compostos mutagênicos que estariam relacionados às altas taxas de substituição nucleotídicas encontradas no clado *Genlisea-Utricularia* (ALBERT

et al., 2010; JOBSON et al., 2004). Nesse sentido, as modificações genômicas do grupo estariam sendo moduladas por alterações fisiológicas, relacionadas à alta demanda energética da carnivoría, que estariam causando a superprodução de ERO (ALBERT et al., 2010; IBARRA-LACLETTE et al., 2011a; IBARRA-LACLETTE et al., 2011b).

Assim, para testar a hipótese de que as ERO são um agente importante causador de acréscimo nas taxas mutacionais em linhagens de Lentibulariaceae, foi mensurado o conteúdo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), uma das principais ERO (SMIRNOFF et al., 2019), nos órgãos de seis espécies dos três gêneros de Lentibulariaceae (*Utricularia reniformis* A.St-Hil., *U. foliosa* L., *Genlisea violacea* A.St.-Hil., *G. repens*, *Pinguicula gigantea* Luhrs e *P. agnata* Casper), e foram realizadas análises moleculares referentes a oito sequências de DNA nucleares e plastidiais (*rbcL*, *matK*, *rps16*, *rps12-rpl20*, *trnL-F*, ITS, *LEAFY* e *RPB2*) para que fosse testada a possível correlação entre o conteúdo de H_2O_2 em órgãos homólogos e o comprimento de ramos nas árvores filogenéticas, relacionados à ocorrência de mutações nucleotídicas. Foi mensurado o conteúdo de H_2O_2 em diferentes órgãos (folhas fotossintetizantes, estolões e armadilhas em *Utricularia*, folhas fotossintetizantes e armadilhas em *Genlisea* e folhas fotossintetizantes em *Pinguicula* [nesse gênero as folhas fotossintetizantes são as próprias armadilhas]) para que se testar a hipótese de que as armadilhas são as principais fontes de ERO, pois em *Utricularia* esses órgãos apresentam taxas respiratórias muito elevadas quando em relação aos demais (ADAMEC, 2006).

Para testar se a respiração é de fato a principal fonte de ERO em *Utricularia*, a despeito da fotossíntese que é tida como uma fonte importante desses compostos em plantas (ASADA, 2006; DELPRATO et al., 2015), foram realizados ensaios submetendo *Utricularia foliosa* a 12 horas de luz e 12 horas de escuro, tendo o conteúdo de H_2O_2 mensurado nos órgãos ao final de cada um desses tratamentos.

No presente estudo, discutiu-se também a influência do hábito no acúmulo de ERO nos órgãos, pois *Utricularia* comporta espécies terrestres, aquáticas, epífitas e rupícolas (TAYLOR, 1989). Para que fosse testado se essas plantas podem perder esses compostos potencialmente danosos via difusão no ambiente aquático, uma espécie “anfíbia” - terrestre ou subaquática (TAYLOR,

1989) - foi empregada. Indivíduos de *U. graminifolia* Vahl foram cultivados em substrato úmido, como uma planta terrestre, e em submersão, como uma aquática, e o conteúdo de H₂O₂ foliar foi mensurado após ambos os tratamentos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Carnivoria em Lentibulariaceae

Lentibulariaceae está incluída na ordem Lamiales, na qual evoluíram independentemente ao menos outras três linhagens de plantas carnívoras ou protocarnívoras (MÜLLER et al., 2004; PEREIRA et al., 2012). Os três gêneros que compõe a família são compostos por herbáceas carnívoras, existindo grande diferença entre os mecanismos utilizados por cada gênero para a obtenção de presas (JUNIPER et al., 1989; LLOYD, 1942). Em *Pinguicula* as armadilhas são as próprias folhas, que secretam uma mucilagem adesiva na qual as presas, geralmente insetos, aderem-se e são subsequentemente digeridas (HESLOP-HARRISON, 2004; LEGENDRE, 2000; fig. 1G). As armadilhas encontradas em *Genlisea* possuem origem foliar e são longas, tubulares e subterrâneas, possuindo formato de forquilha (fig. 2J) e fendas em sua extensão terminal (fig. 2K) nas quais as presas se inserem, principalmente nematoides, pequenos artrópodes, protozoários, dentre outros pequenos organismos do solo (FLEISCHMANN, 2012). Também ocorrem inseridas nas armadilhas de *Genlisea* algas unicelulares comensais (PLACHNO; WOLOWSKI, 2008). Tais armadilhas tubulares conduzem as presas até um órgão denominado ampola (fig. 2L), dotado de glândulas secretoras de enzimas digestivas. Toda a extensão interna das armadilhas é coberta por tricomas que se voltam contra a saída, direcionando as presas até a ampola (FLEISCHMANN, 2012). Já no caso de *Utricularia*, as armadilhas possuem um mecanismo ativo de captura das presas, e são denominadas utrículos (fig. 2F). São vesículas de origem foliar funcionais em meio aquoso (WHITEWOODS et al., 2020), que possuem uma entrada rodeada por tricomas gatilho (FRIDAY et al., 1991; REIFENRATH et al., 2006;

ADAMEC, 2011). Ao serem acionados por alguma presa que se aproximou demais, promovem uma rápida expansão do utrículo, o que acaba por ocasionar a entrada de água por diferença de pressão e a sucção da presa (POPPINGA et al., 2016; BERG et al., 2020). A superfície interna dos utrículos é coberta por uma série de glândulas bífidas e quadrífidas, as quais participam da secreção de enzimas digestivas tais como proteases, fosfatases ácidas e esterases (ADAMEC et al., 2010; PLACHNO et al., 2006; SIROVÁ et al., 2003; VINTÉJOUX, 1976). As presas incluem cladóceros, copépodes, rotíferos, ciliados, larvas de insetos, além de algas unicelulares que possuem grande importância no espectro de presas de *Utricularia*, ocasionando uma discussão acerca da possibilidade dessas plantas serem mais “vegetarianas” do que “carnívoras” (ALKHALAF et al., 2009; PEROUTKA et al., 2008). Existe também uma rica comunidade microbiana no interior dos utrículos que não é digerida, principalmente bactérias, que inclusive auxiliam na digestão das presas via secreção enzimática (CARAVIERI et al., 2014; SIROVÁ et al., 2009). Sirová et al. (2010) constataram que parte do carbono fixado através da fotossíntese em algumas espécies de *Utricularia* é liberado no interior dos utrículos, provavelmente com a função de nutrir a comunidade microbiana que se desenvolve sem ser digerida em seu interior. Esses microrganismos participam da transformação de diversos compostos químicos no interior dos utrículos, tornando-os disponíveis para as plantas, existindo assim uma relação mutualística com o hospedeiro, que forneceria abrigo e carbono para os microrganismos, ao passo que estes participariam da ciclagem de nutrientes no interior dos utrículos, disponibilizando-os (SIROVÁ et al., 2009; 2010; 2018). Essa relação seria análoga à que ocorre na rizosfera das plantas, que liberam exudatos que são rapidamente aproveitados pela comunidade microbiana associada às raízes, ao passo que esta torna os nutrientes lábeis para as plantas (WALKER et al., 2003). Algumas espécies de *Utricularia* aquáticas livres (principalmente *Utricularia* sect. *Utricularia*) poderiam se beneficiar da ciclagem de nutrientes no interior dos utrículos, não possuindo a necessidade de se afixar em algum substrato e, portanto, não competindo com as macrófitas dotadas de raízes (SIROVÁ et al., 2009). Nesse contexto, pode-se dizer que as peculiaridades quanto à aquisição de nutrientes vão muito além da carnivorina no caso de *Utricularia* (SIROVÁ et al., 2010).

2.2. Evolução e sistemática de Lentibulariaceae

Pinguicula se posiciona como um grupo irmão ao clado *Genlisea-Utricularia* (JOBSON et al., 2003; fig. 1). Utilizando-se da abordagem do relógio molecular, Silva et al. (2018) dataram a origem do gênero *Pinguicula* há 16,39 milhões de anos, do clado *Genlisea-Utricularia* há 39,01 milhões de anos, e do gênero *Utricularia* há 30,35 milhões de anos. O estudo utilizou o gene *rbcl* nas análises moleculares com três pontos de calibração distintos, e não divergiram muito quando em comparação com os resultados de Ibarra-Laclette et al. (2013), com exceção da idade do gênero *Pinguicula*, que neste estudo foi datado em 9,87 milhões de anos.

Pinguicula apresenta uma série de plesiomorfias da família, notoriamente a presença de raízes, a disposição das folhas em rosetas e o hábito terrestre na grande maioria de suas espécies (MÜLLER et al., 2006). As armadilhas são relativamente simples, do tipo “papel pega mosca”, assim como as que ocorrem em outros gêneros de plantas carnívoras como *Drosera* (JUNIPER et al., 1989; LLOYD, 1942). Algumas espécies de *Pinguicula* possuem dois tipos de roseta, as de verão que produzem folhas maiores, fotossintéticas e que capturam presas, e as de inverno, mais densas, não carnívoras e adaptadas para sobreviver à aridez do inverno de certas regiões (LEGENDRE, 2000). A linhagem que originou o clado *Genlisea-Utricularia* perdeu as raízes, ao passo que desenvolveu tropismo negativo dos órgãos dedicados à carnivoría: as armadilhas tubulares e helicoidais de *Genlisea* (figs. 1D, 2J e 2K) e os estolões repletos de utrículos de *Utricularia* (fig. 1B), que se inserem no substrato para capturar presas (MÜLLER et al., 2006).

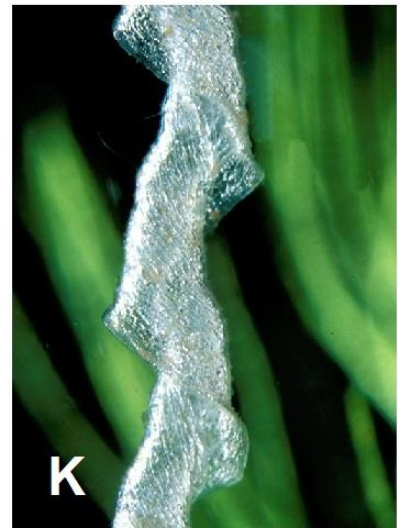
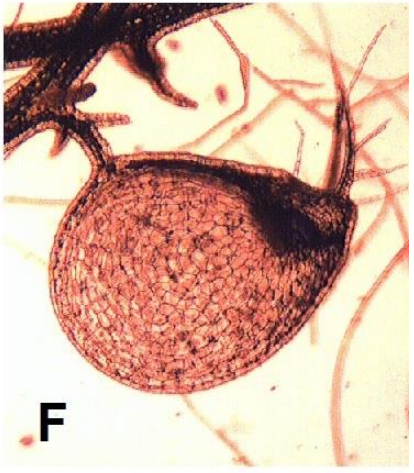
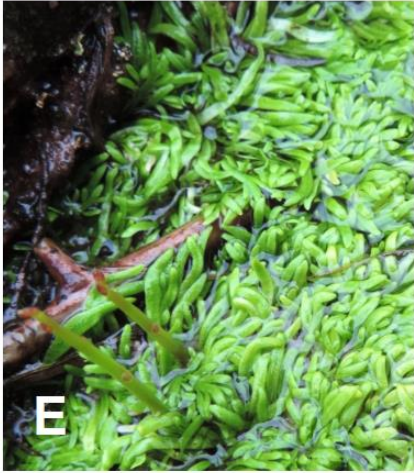
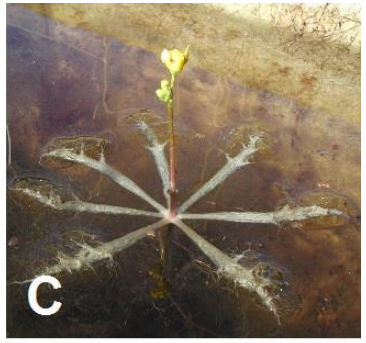
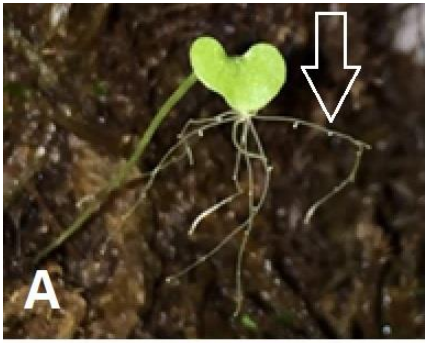


Fig. 2. Adaptações presentes em espécies de Lentibulariaceae. **A** – *Fuzzy Arberian Morphology*, em *Utricularia reniformis* A.St.-Hil. Nota-se o crescimento de estolões a partir da extremidade de uma folha, nos quais são visíveis o desenvolvimento de utrículos (seta). **B** – Turhões de *U. macrorhiza* Leconte. Créditos: L. Adamec. **C** – Flutuadores de *U. inflata* Walter, sustentando a inflorescência fora da água. Créditos: L. Adamec. **D** – Inflorescências de *U. neottioides* A.St.-Hil. & Girard, uma espécie reofítica, ou seja, que se prende a rochas em cursos de água de grande correnteza. **E** – Folhas de *U. flaccida* A.DC. se desenvolvendo em ambiente úmido. **F** – Utrículo de *U. gibba* L. **G** – Flores de *U. sandersonii* Oliv. **H** – *U. geminiloba* Benj. e seus tubérculos (seta). **I** – Flor de *U. menziesii* R.Br., espécie provavelmente polinizada por aves. Créditos: B. Rice. **J** – Roseta com folhas fotossintetizantes de *Genlisea violacea* A.St.-Hil., bem como as armadilhas aclorofiladas, que são subterrâneas. **K** – Detalhe das fendas em armadilha de *Genlisea* sp., nas quais microrganismos se inserem. Créditos: B. Rice. **L** – Ampola das armadilhas de *Genlisea* sp., para a qual as presas são direcionadas e digeridas. Créditos: B. Rice.

Casper (1966) dividiu o gênero *Pinguicula* em doze seções distribuídas em três subgêneros, sendo eles *Isoloba*, *Temnoceras* e *Pinguicula*. A classificação proposta por Casper (1966) considerava 48 espécies, porém esse número atualmente quase que dobrou, com cerca de 85 espécies descritas (FISHER et al., 2004; HESLOP-HARRISON, 2004; FLEISCHMANN; ROCCIA, 2018). Dados moleculares apontam que a maior parte das seções propostas por Casper (1966) é parafilética ou polifilética, com alguns clados formados que claramente refletem a distribuição geográfica das espécies (CIESLACK et al., 2005). O gênero possui ampla distribuição principalmente em regiões temperadas e polares do Hemisfério Norte, ocorrendo também na Flórida, Caribe, México, Andes e Himalaia (LEGENDRE, 2000).

O gênero *Genlisea* possui aproximadamente 22 espécies e está dividido em dois subgêneros com claras distinções morfológicas (FISCHER et al., 2000; FLEISCHMANN et al., 2010). O subgênero *Tayloria* possui deiscência das cápsulas em um corte longitudinal, dividindo-as em duas, e o subgênero *Genlisea* possui uma deiscência espiralada das cápsulas (FLEISCHMANN et al., 2010). Características polínicas também sustentam a separação dos dois subgêneros, com as o subgênero *Genlisea* possuindo grãos de pólen tri ou tetracolpados com sincolpismo, e as do subgênero *Tayloria* possuindo os grãos de pólen tetracolpados com um anel equatorial estreito (FROMM-TRINTA, 1981;

TAYLOR, 1989). O subgênero *Genlisea* se originou de uma linhagem que se dispersou do centro de origem do gênero, a América do Sul, para a África, ocorrendo várias espécies neste continente, inclusive em Madagascar. Uma segunda dispersão no sentido inverso, da África para a América do Sul, originou uma linhagem com várias espécies sul-americanas do subgênero *Genlisea*. O subgênero *Tayloria* restringe-se à América do Sul (FLEISCHMANN et al., 2010).

Utricularia foi dividido por Taylor (1989) em 35 seções distribuídas em dois subgêneros, *Polypompholyx* com duas seções e *Utricularia* com as restantes. Baseados em dados moleculares, Müller e Borsch (2005) propuseram algumas alterações na classificação seccional proposta por Taylor (1989), com algumas seções sendo englobadas por outras devido à ocorrência de parafilia, e com a criação de mais um subgênero, *Bivalvaria*. No entanto, a grande maioria das seções propostas por Taylor (1989), baseando-se em dados morfológicos, se mostrou monofilética à luz de dados moleculares (MÜLLER; BORSCH, 2005; SILVA et al., 2018). *Utricularia* é o gênero mais rico dentre as Lentibulariaceae, possuindo cerca de 240 espécies (FLEISCHMANN, 2015), o que corresponde a aproximadamente 30% das espécies de plantas carnívoras conhecidas, sendo o maior gênero de plantas carnívoras conhecido (KRÓL et al., 2011). Possui distribuição mundial, com exceção da Antártida e algumas ilhas oceânicas muito isoladas, além de possuir uma grande diversidade de hábitos, ocorrendo espécies terrestres, aquáticas, epífitas e rupícolas (SILVA et al., 2018; TAYLOR, 1989).

Essa grande diversidade de hábitos em *Utricularia* coincide com uma grande plasticidade morfológica. O desenvolvimento é geralmente estolonífero, com folhas fotossintetizantes que variam muito quanto à forma e ao tamanho, podendo ser ausentes em algumas espécies. A delimitação entre os órgãos é confusa em *Utricularia*, não ficando muito claro onde termina um órgão e começa o outro, principalmente quando em relação às folhas e caules. Esse padrão morfológico peculiar guarda semelhanças com Podostemaceae, um grupo de herbáceas aquáticas (TAYLOR, 1989). Rutishauser e Isler (2001) discutem esse padrão morfológico ambíguo, utilizando uma abordagem conhecida com *Fuzzy Arberian Morphology* (FAM; fig. 2A).

Algumas espécies de *Utricularia* possuem órgãos bastante especializados, como os tubérculos presentes principalmente nas espécies epífitas da seção *Orchidioides* (RODRIGUES et al., 2018; fig. 2H), os apressórios presentes em *U. neottioides* A.St.-Hil. & Girard, espécie reofítica que se prende a rochas no fundo de riachos de grande correnteza (fig. 2D), ou como as adaptações presentes em algumas espécies aquáticas da seção *Utricularia*. Algumas possuem turiões (fig. 2B) que resistem ao congelamento do ambiente aquático no inverno, regenerando-se em novas plantas na primavera, e flutuadores que se irradiam para todas as direções, sustentando a inflorescência fora da água (TAYLOR, 1989; fig. 2C).

2.3. Taxas de substituição nucleotídica e contração genômica

O clado *Genlisea-Utricularia* possui espécies com os menores genomas encontrados entre as angiospermas (FLEISCHMANN et al., 2014; GREILHUBER et al., 2006; IBARRA-LACLETTE et al., 2011b; IBARRA-LACLETTE et al., 2013; LEUSHKIN et al., 2013; SILVA et al. 2020; VELEBA et al., 2014), especialmente no caso de *Genlisea*. O gênero possui uma grande variação quanto ao tamanho dos genomas, ocorrendo espécies com genomas que não fogem muito da média de uma angiosperma, como no caso de *G. lobata* Fromm (*G.* subg. *Tayloria* – $\cong 1722$ Mpb), que possui o maior genoma no gênero. Ocorrem também espécies com genomas mínimos, como no caso de *G. aurea* A.St.-Hil. (*G.* subg. *Genlisea* – $\cong 67$ Mpb) e *G. tuberosa* Rivadavia, Gonella & A.Fleischm. (*G.* subg. *Genlisea* – $\cong 61$ Mpb), esta última possuindo o menor genoma conhecido dentre as angiospermas (FLEISCHMANN et al., 2014). Ao longo da evolução, ocorreu uma tendência à contração genômica apenas em algumas linhagens dentro do subgênero *Genlisea*, enquanto em algumas linhagens dentro desse subgênero e no subgênero *Tayloria* ocorreu uma tendência ao aumento dos genomas. Em *Utricularia*, existe também uma grande heterogeneidade quanto ao tamanho dos genomas e às tendências que as diferentes linhagens sofreram ao longo da evolução (VELEBA et al., 2014).

A tendência à contração genômica que ocorreu em algumas linhagens do clado *Genlisea-Utricularia* coincide com a ocorrência de taxas de substituição nucleotídicas muito aceleradas no mesmo, muito superiores quando em relação a *Pinguicula* ou às demais angiospermas (IBARRA-LACLETTE et al., 2011b; MÜLLER et al., 2004). Essa acelerada evolução molecular vem sendo associada a altas taxas respiratórias encontradas em *Utricularia* (ADAMEC, 2006; ALBERT et al., 2010; JOBSON et al., 2004).

As taxas respiratórias encontradas nos utrículos de algumas espécies aquáticas de *Utricularia* são entre 75% e 200% superiores às das folhas fotossintetizantes, e isso se explica devido à alta demanda energética desses órgãos (ADAMEC, 2006). Os utrículos podem ser acionados e restabelecidos várias vezes ao longo do ciclo de vida da planta, permitindo assim uma grande eficiência quanto à captura de presas (ADAMEC, 2011). Para serem restabelecidos, os utrículos dependem de um mecanismo ativo de transporte de íons Cl^- , que é seguido do transporte de água de seu interior para o ambiente externo. As taxas de transporte iônico nos utrículos são cerca de quatro vezes superiores às que ocorrem em animais ou em outras plantas (SYDENHAM; FINDLAY, 1973). É preciso que ocorra esse “esvaziamento” dos utrículos para que se crie a diferença de pressão necessária para que ocorra a sucção das presas, assim que estas acionam os tricomas gatilho próximos à entrada (POPPINGA et al., 2016). A alta demanda energética dos utrículos vem sendo relacionada a uma mutação no gene mitocondrial *cox1*, que codifica a subunidade principal da enzima citocromo *c* oxidase, ou complexo IV da cadeia respiratória (JOBSON et al., 2004; LAAKKONEN et al., 2006). Esse complexo enzimático está inserido na membrana interna das mitocôndrias e participa das reações de transporte de elétrons da cadeia respiratória. O complexo IV recebe um elétron de cada molécula de citocromo *c*, transferindo-o em seguida para uma molécula de gás oxigênio (O_2) para que esta seja transformada em duas moléculas de água (H_2O). Ao longo desse processo, quatro prótons (H^+) são bombeados da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas, criando o gradiente eletroquímico necessário para a produção de ATP, com o retorno desses prótons para a matriz mitocondrial através da ATP sintase, ou complexo V da cadeia respiratória (WIKSTROM, 1977).

Modificações em enzimas da cadeia respiratória podem estar relacionadas aos mecanismos que permitiram uma alta demanda energética nos utrículos. Em *Utricularia* e em uma espécie de *Genlisea* ocorrem dois resíduos contíguos de cisteína nas posições 113 e 114 da cadeia de aminoácidos da subunidade I do complexo VI, ausentes em 99,9% das sequências dessa enzima presentes nos bancos de dados. Esse *motif* sofreu seleção positiva na linhagem que originou *Utricularia* e coincide exatamente com a região de acoplagem do complexo VI com seu substrato, a citocromo *c*. Assim, essa mutação pode ter permitido um aumento na capacidade respiratória e possibilitado a evolução do mecanismo de transporte iônico necessário ao restabelecimento dos utrículos, resultando no mecanismo de carnivoría extremamente complexo encontrado em *Utricularia* (JOBSON et al., 2004; LAAKKONEN et al., 2006).

As reações de transporte de elétrons que ocorrem na cadeia respiratória e na fotossíntese, nas mitocôndrias e nos cloroplastos respectivamente, ocasionam a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), compostos altamente reativos que podem danificar proteínas, membranas celulares e o DNA, causando mutações (FAROOQ et al., 2019; FOYER; NOCTOR, 2003; SHU-HSIEN et al., 2005). As ERO podem reagir com resíduos de guanina, gerando 8-oxoguaninas (8-oxodG) que frequentemente catalisam a incorporação errônea da adenina ao invés da citosina na cadeia complementar pela DNA polimerase, ocasionando mutações específicas no DNA (G:C → T:A). Esse é o principal agente causador de mutações nos genomas devido ao dano oxidativo, porém as ERO também podem causar mutações de outras maneiras (HSU et al., 2004; LINDAHL, 1993; SAKAI et al. 2007). Além de mutações pontuais, podem ocorrer quebras cromossômicas (KARANJAWALA et al., 2002).

As ERO são naturalmente produzidas, inclusive possuindo um importante papel como moléculas sinalizadoras de mecanismos fisiológicos de resposta a estresses bióticos e abióticos (FAROOQ et al., 2019; PITZSCHKE et al., 2006; ZURBRIGGEN et al., 2010). Seu efeito deletério ocorre em situações específicas, nas quais sua superprodução é modulada (GARG; MANCHANDA, 2009). Existe uma série de mecanismos enzimáticos e não enzimáticos, em plantas e em animais, dedicados ao controle dos níveis de ERO nas células (FOYER; NOCTOR, 2003; GARG; MANCHANDA, 2009; HUANG et al., 2019). A

maioria das ERO é convertida rapidamente em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) após sua formação em plantas, como um mecanismo para evitar maiores danos às células. O H_2O_2 é uma ERO mais estável e de menor toxicidade do que as demais, sendo uma molécula sinalizadora de grande importância (SHU-HSIEN et al., 2005; SMIRNOFF; ARNAUD, 2019).

Como as reações de transporte de elétrons da cadeia respiratória podem resultar na produção de ERO, que são compostos mutagênicos, as altas taxas respiratórias encontradas em *Utricularia* vêm sendo associadas às altas taxas de substituição nucleotídica que ocorrem no grupo (ALBERT et al., 2006). Ibarra-Laclette et al. (2011) sugerem uma relação entre a possível superprodução de ERO em *Utricularia*, resultante da alta demanda energética dos utrículos, à dinâmica evolutiva peculiar que ocorre nos genomas dessas espécies. Uma maior ocorrência de mutações nos genomas dessas linhagens poderia estar sendo modulada pelas ERO (ALBERT et al., 2010), explicando a contração genômica que ocorreu ao longo da evolução do clado *Genlisea-Utricularia*, visto que existe uma correlação entre altas taxas de substituição nucleotídica e contração genômica (DUFRESNE et al., 2005).

Nesse contexto, a investigação da possível relação entre as taxas de substituição nucleotídica, através da análise de dados oriundos de sequências nucleotídicas, e o conteúdo de ERO nos órgãos de um conjunto representativo de linhagens de Lentibulariaceae se faz necessária para uma melhor compreensão dos mecanismos fisiológicos e evolutivos que levam à miniaturização de genomas. Além disso, a origem desses compostos deve ser melhor elucidada, visto que na maioria das plantas as ERO são majoritariamente produzidas pela fotossíntese, fotorrespiração e reações redox que ocorrem no espaço apoplástico (ASADA et al., 2006; DELPRATO et al., 2015; FOYER; NOCTOR, 2003; MILLER et al., 2010). Ademais, há estudos que propõem a possível superprodução desses compostos por decorrência das altas taxas respiratórias encontradas nos utrículos (ADAMEC, 2006; ALBERT et al., 2006). Outra questão pertinente é a influência do hábito no acúmulo de ERO nos órgãos, pois *Utricularia* conta com espécies terrestres e aquáticas (TAYLOR, 1989), e o ambiente aquático pode auxiliar as plantas a perder esses compostos

potencialmente tóxicos por difusão (COLLÉN; PEDERSÉN, 1996), com possíveis implicações evolutivas.

3. OBJETIVOS

O trabalho teve como objetivo investigar a possível influência de ERO nos processos evolutivos em *Lentibulariaceae*. Para isso, testou-se a existência de correlação positiva entre o comprimento de ramos na filogenia, relacionado à ocorrência de mutações, com o conteúdo de H_2O_2 nos órgãos em um conjunto representativo de espécies da família.

Com o objetivo de se discutir a importância da fotossíntese na produção do H_2O_2 mensurado nos órgãos das plantas, realizou-se um ensaio com *U. foliosa*, sob dois tratamentos: exposição à luz para indução à fotossíntese e exposição ao escuro, para que esta não ocorresse.

Objetivou-se também testar a hipótese de que o hábito aquático auxilia as plantas na perda de H_2O_2 por difusão, empregando-se *U. graminifolia* como modelo. Cultivou-se indivíduos em submersão e sob substrato úmido e depois mensurou-se o H_2O_2 nas folhas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Mensuração de H_2O_2 nos órgãos de espécies de *Lentibulariaceae*

4.1.1. Material vegetal

Foram empregadas seis espécies de *Lentibulariaceae* nos ensaios de mensuração de H_2O_2 (Tabela 1). Após a coleta dos indivíduos em seu habitat

natural, os órgãos a serem analisados foram separados e acondicionados a -80°C. As espécies de *Utricularia* tiveram o conteúdo de H₂O₂ mensurado em folhas fotossintetizantes, estolões e armadilhas, enquanto as de *Genlisea* tiveram mensurações apenas das folhas fotossintetizantes e das armadilhas, por não possuírem desenvolvimento estolonífero vigoroso (*G. repens* possui estolões muito pequenos para que a mensuração do conteúdo de H₂O₂ fosse viável), e as de *Pinguicula* tiveram mensurações apenas das folhas fotossintetizantes, que nesse gênero têm a função de armadilhas, sem que ocorra desenvolvimento estolonífero. As duas espécies não nativas do Brasil (*Pinguicua gigantea* e *P. agnata*) foram adquiridas comercialmente, sendo posteriormente cultivadas em casa de vegetação climatizada a 28°C durante seis meses. Todas as coletas, tanto em ambiente natural quanto na casa de vegetação, ocorreram entre 12 h e 15 h.

Tab. 1. Espécies empregadas no estudo, classificação intragenérica (seção ou subgênero), *n* amostral, dados da coleta e órgãos empregados para cada espécie. *Data da amostragem de material vegetal das espécies que foram cultivadas em casa de vegetação.

Espécies	Classificação intragenérica	<i>n</i>	Local de coleta	Data da coleta / amostragem	Folhas fotossintetizantes	Estolões	Armadilhas
<i>U. reniformis</i> A.St-Hil.	<i>U. sect. Iperua</i>	15	Salesópolis – SP	07/06/2017	0,2 g	0,8 g	0,8 g
<i>U. foliosa</i> L.	<i>U. sect. Utricularia</i>	10	Ubarana – SP	18/11/2017	0,8 g	0,8 g	0,8 g
<i>G. violacea</i> A.St.-Hil.	<i>G. subg. Tayloria</i>	13	Capitólio – MG	17/05/2018	0,8 g		0,8 g
<i>G. repens</i> Benj.	<i>G. subg. Genlisea</i>	16	Delfinópolis – MG	14/12/2019	0,4 g		0,8 g
<i>P. gigantea</i> Luhrs	<i>P. sect. Agnata</i>	14	Plantas sob cultivo	*05/11/2019	1,8 g		
<i>P. agnata</i> Casper	<i>P. sect. Agnata</i>	15	Plantas sob cultivo	*05/11/2019	1,2 g		

4.1.2. Mensurações de H₂O₂

Foi quantificado o conteúdo de H₂O₂ em µmol/g de tecido fresco, com a metodologia de Alexieva et al. (2001). A quantidade de material vegetal utilizada para cada espécie (tab. 1) foi definida após vários testes, para que se obtivesse um intervalo de leitura ótimo no espectrofotômetro, ocorrendo em seguida a correção das distorções em uma curva padrão que considera os valores de leitura e quantidade de tecido. O material vegetal foi homogeneizado após a aplicação de nitrogênio líquido com 2 mL de ácido tricloracético (TCA – 0,1 %) e 0,1 g de polivinilpolipirrolidona (PVPP), sendo em seguida transferido para microtubos e centrifugado a 10.000 rpm por 15 min. a 4° C. Foi pipetado 200 µL do sobrenadante, que foi misturado com 200 µL de tampão fosfato de potássio (100 mM – pH 7,5) e 800 µL de solução a 1 M de iodeto de potássio (KI). Foi obtido um branco por meio da mistura de 200 µL de TCA, 200 µL do tampão fosfato de potássio e 800 µL da solução de KI. Os microtubos foram acondicionados no gelo e deixados por uma hora em repouso. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro Perkin Elmer – Lambda 40 a 390 nm. Todas as amostras foram lidas em triplicatas.

4.1.3. Análises estatísticas

Foi realizada uma análise fatorial (2 x 3) para as espécies do gênero *Utricularia*, sendo o fator A as espécies empregadas (*U. foliosa* e *U. reniformis*) e o fator B os órgãos que tiveram o conteúdo de H₂O₂ mensurado (folhas fotossintetizantes, estolões e armadilhas). Para as espécies do gênero *Genlisea*, foi realizada uma análise fatorial (2 x 2) na qual o fator A foram as espécies (*G. violacea* e *G. repens*) e o fator B os órgãos (folhas fotossintetizantes e armadilhas). Para as espécies do gênero *Pinguicula*, foi comparado o conteúdo de H₂O₂ nas folhas fotossintetizantes das duas espécies empregadas (*P. gigantea* e *P. agnata*). Nesse gênero, as folhas são as próprias armadilhas. Foi realizada também uma análise comparando o conteúdo de H₂O₂ nas folhas

fotossintetizantes das seis espécies empregadas, visto que esse é o único órgão para o qual se obteve dados de todas as espécies. Após a avaliação dos pressupostos de normalidade e homocedasticidade em todos os conjuntos de dados, foi realizada a transformação destes através da aplicação do logaritmo natural (Ln) para que fossem conduzidas as análises de variância. Realizou-se a comparação de médias pelo teste de Tukey. Todos os delineamentos utilizados foram inteiramente casualizados (DIC), pois as espécies para as quais os indivíduos foram obtidos em seu hábitat (*U. foliosa*, *U. reniformis*, *G. violacea* e *G. repens*) foram coletados aleatoriamente, e as espécies não nativas foram cultivadas em casas de vegetação, com vasos dispostos ao acaso. Utilizou-se o pacote Stats v3.6.2 inserido na plataforma R (R CORE TEAM, 2013) para a realização das análises.

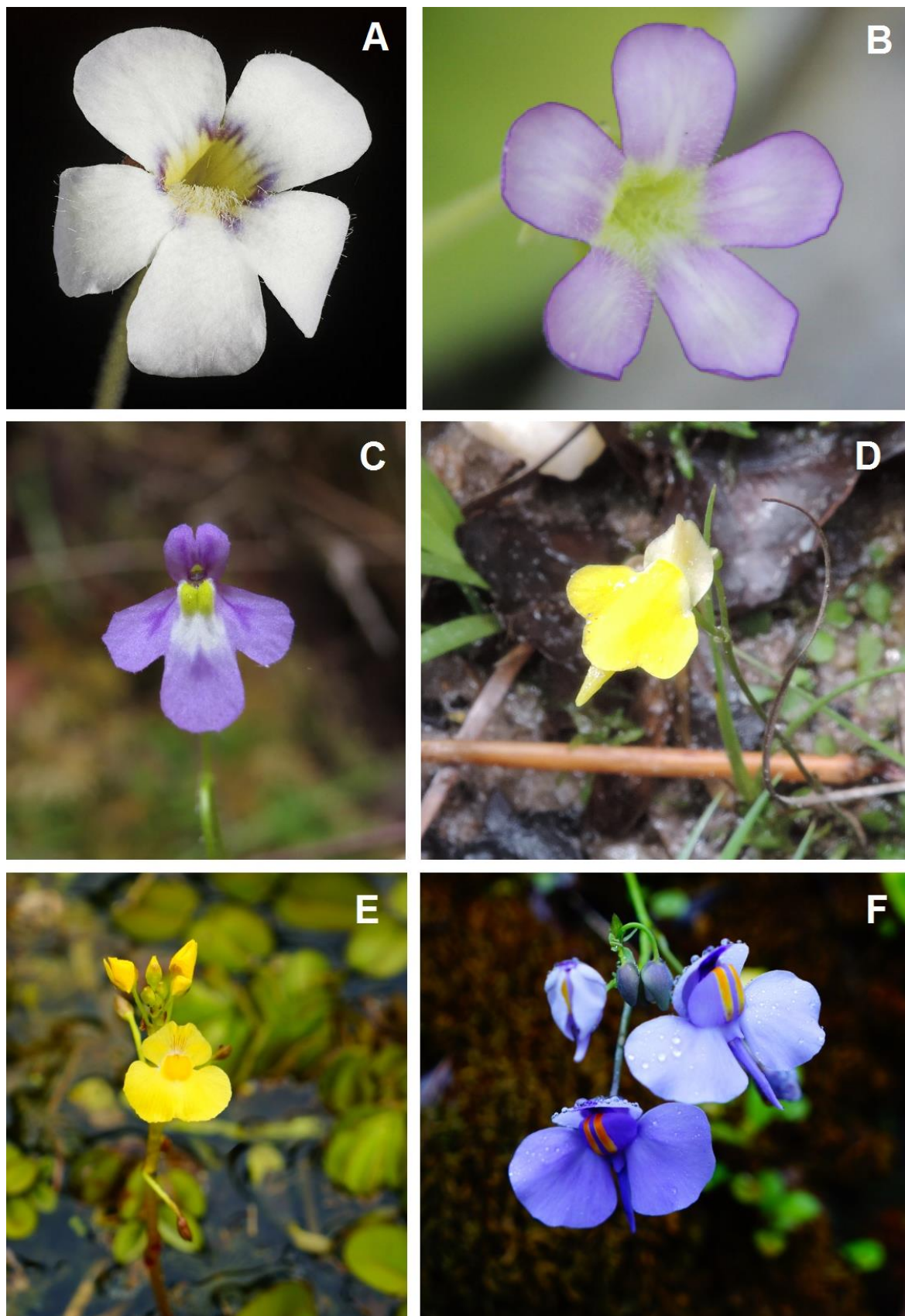


Fig. 3. Espécies utilizadas no estudo. **A** – *Pinguicula agnata* Casper. Créditos: B. Rice. **B** – *P. gigantea* Luhrs. Créditos: Y. Domínguez. **C** – *Genlisea violacea* A.St.-Hil. **D** – *G. repens* Benj. **E** – *Utricularia foliosa* L. **F** – *U. reniformis* A.St.-Hil.

4.2. Análises filogenéticas

Foram realizadas análises filogenéticas com dados referentes a oito sequências de DNA de dois compartimentos genômicos, sendo elas: *rbcL*, *matK*, *rps16*, *rps12-rpl20* e *trnL-F* (cpDNA); ITS, *LEAFY* e *RPB2* (nDNA). Os números de acesso no GenBank das sequências utilizadas e as 114 espécies de Lentibulariaceae empregadas estão disponíveis na tabela 2. Como grupo externo, utilizaram-se três espécies do gênero *Solanum* (Solanaceae): *S. melongena* L., *S. lycopersicum* L. e *S. tuberosum* L. Os dados referentes ao grupo externo também foram obtidos no GenBank (*matK* [EF439076.1, EF438886.1 e KX258752.1]; *rbcL* [MH722375.1, MH722385.1 e MH722378.1]; *rps16* [FN641751.1, KC495039.1 e KC495047.1]; *trnL-F* [AY099703.1]; ITS [KC213749.1, KF022370.1 e MH283747.1]; *LEAFY* [AF197936.1 e EO371047.1] e *RPB2* [AJ565936.1]). Foram realizadas oito análises individuais, a partir de matrizes de cada sequência, duas análises referentes a cada compartimento genômico, com uma concatenação das sequências do cpDNA (*rbcL*, *matK*, *rps16*, *rps12-rpl20* e *trnL-F*) e uma das do nDNA (ITS, *LEAFY* e *RPB2*), e uma análise concatenada de todos os marcadores. O alinhamento das sequências foi obtido utilizando-se o MAFFT versão 7 (KATO et al., 2002), tendo posteriormente as extremidades não informativas cortadas, com adição de *missing data* (“?”) manualmente, utilizando-se o BioEdit 7.5.0.2 (Hall, 1999). Dados referentes a cada alinhamento de sequências foram obtidos utilizando-se o programa PAUP* 4b10 (SWOFFORD, 2003). O melhor modelo evolutivo (*best-of-fit*) para cada alinhamento foi obtido utilizando-se o MEGA versão 10.1.8 (KUMAR et al., 2018), seguindo o critério de informação de Akaike corrigido, o AICc (AKAIKE, 1973; SUGIURA, 1978). As análises de máxima verossimilhança de cada matriz foram realizadas utilizando-se o programa RAxML (STAMATAKIS et al., 2008).

Tab. 2. Espécies de Lentibulariaceae empregadas nas análises e sequências de DNA utilizadas. Os números de acesso no GenBank de cada sequência encontra-se disponível para cada espécie. As espécies que não possuíam dados de determinada sequência foram incluídas nas análises concatenadas com *missing data*, sendo a ausência dos dados representada por um “-”. O “X” se refere à sequência do gene *rbcL* de *U. biovularioides* (Kuhl.) P. Taylor, disponível no banco de dados do Laboratório de Sistemática Vegetal (LSV – FCAV/UNESP), mas não disponibilizada no GenBank.

Espécies	Sequências							
	<i>rbcL</i>	<i>matK</i>	<i>rps16</i>	<i>rps12-rpl20</i>	<i>trnL-F</i>	ITS	<i>LEAFY</i>	<i>RPB2</i>
<i>G. aurea</i> A.St.-Hil.	AUSU01000124.1	AF531814.1	FN641746.1	NC_037078.1	AF482614.1	-	-	-
<i>G. filiformis</i> A.St.-Hil.	MF991463	FN641690.1	FN641749.1	MG027787	-	-	-	-
<i>G. guianensis</i> N.E.Br.	AY128631.1	-	AF482541.1	-	AF482615.1	-	-	-
<i>G. lobata</i> Fromm	-	FN641711.1	-	-	-	-	-	-
<i>G. repens</i> Benj.	-	FN641689.1	FN641751.1	-	-	AB212115.1	-	-
<i>G. violacea</i> A.St.-Hil.	MF991467	FN641716.1	AF482542.1	MG027788	AF482616.1	MG027712	-	-
<i>P. agnata</i> Casper	AY128627.1	AF531782.1	AF482543.1	-	AF482617.1	MG310267.1	-	-
<i>P. antarctica</i> Vahl	-	DQ010653.1	-	-	-	-	-	-
<i>P. caerulea</i> Walter	L01942.2	-	AF482545.1	-	AF482619.1	-	-	-
<i>P. ehlersiae</i> Speta & F.Fuchs	AF482523.1	-	AF482547.1	-	AF482621.1	-	-	-
<i>P. filifolia</i> C.Wright ex Griseb.	MF991471	AF531786.1	-	MG027784	-	MG027708	-	-
<i>P. gigantea</i> Luhrs	-	AF531789.1	-	-	-	AB199761.1	-	-
<i>P. gracilis</i> Zamudio	AF482524.1	-	AF482548.1	-	AF482622.1	-	-	-
<i>P. grandiflora</i> Lam.	AF482525.1	-	AF482549.1	-	AF482623.1	-	-	-
<i>P. gypsicola</i> Brandegees	AF482526.1	-	AF482550.1	-	AF482624.1	-	-	-
<i>P. lusitanica</i> L.	JN893189.1	DQ010661.1	AF482551.1	-	AF482625.1	-	-	-
<i>P. moranensis</i> Kunth	-	-	AF482552.1	-	AF482626.1	-	-	-
<i>P. primuliflora</i> C.E.Wood & R.K.Godfrey	-	DQ010666.1	-	-	-	AB212110.1	-	-
<i>P. villosa</i> L.	JN965726	-	-	-	GQ245257.1	-	-	-
<i>P. vulgaris</i> L.	KC483448.1	-	-	-	GQ245258.1	-	-	-
<i>U. adpressa</i> Salzm. ex A.St.-Hil. & Girard	AF482527.1	-	AF482555.1	-	AF482628.1	-	-	-
<i>U. alpina</i> Jacq.	AF482528.1	AF531822.1	AF482556.1	-	AF482629.1	-	-	-
<i>U. amethystina</i> Salzm. ex A.St.-Hil. & Girard	MF991574	-	AF482557.1	MG027791	AF482630.1	MG027717	-	-
<i>U. arenaria</i> A.DC.	MF991476	KX604173	-	MG027794	-	MG027729	-	-
<i>U. asplundii</i> P.Taylor	-	-	AF482558.1	-	AF482631.1	-	-	-
<i>U. aurea</i> Lour.	MF991481	KX604176	AF482559.1	MG027807	AF482632.1	MG027742	-	MH937530
<i>U. australis</i> R.Br.	JN893443.1	AF531823.1	AF482560.1	MG027808	AF482633.1	-	MH937517	MH937531
<i>U. benjaminiana</i> Oliv.	-	-	-	-	-	-	-	MH937533
<i>U. bifida</i> L.	MF991483	-	-	MG027855	-	MG027739	-	-
<i>U. biflora</i> Lam.	L13190.2	-	-	-	-	-	-	-

<i>U. biloba</i> R.Br.	–	FN773562.1	AF482561.1	–	AF482634.1	–	–	–
<i>U. biovularioides</i> (Kuhlm.) P.Taylor	X	–	–	–	–	–	–	–
<i>U. bisquamata</i> Schrank	–	–	AF482562.1	–	AF482635.1	–	–	–
<i>U. blanchetii</i> A.DC.	–	AF531841.1	–	–	–	–	–	–
<i>U. breinii</i> Heer	MF991484	KX604177	–	MG027809	–	MG027744	MH937518	MH937534
<i>U. breviscapa</i> C.Wright ex Griseb.	MF991485	KX604191	–	MG027821	–	MG027755	MK089585	MK089590
<i>U. caerulea</i> L.	–	–	AF482563.1	–	AF482636.1	–	–	–
<i>U. calycifida</i> Benj.	MF991489	AF531824.1	–	–	–	MG027740	–	–
<i>U. chrysantha</i> R.Br.	–	–	–	–	AF482637.1	–	–	–
<i>U. cornuta</i> Michx.	–	–	AF482564.1	–	AF482638.1	–	–	–
<i>U. costata</i> P.Taylor	AY128628.1	–	AF482565.1	–	AF482639.1	–	–	–
<i>U. cucullata</i> A.St.-Hil. & Girard	MF991491	–	AF482566.1	MG027829	AF482640.1	MG027768	MK089586	–
<i>U. delicalatula</i> Cheeseman	–	–	–	–	AF488530.1	–	–	–
<i>U. dichothoma</i> Labill.	AY128632	AF531826.1	AF482567.2	MG027800	AF482641.1	MG027737	–	–
<i>U. dimorphantha</i> Makino	MF991495	KX604186	–	MG027812	–	MG027749	MH937519	MH937535
<i>U. endresii</i> Rchb.f.	–	–	–	–	AF482642.1	–	–	–
<i>U. erectiflora</i> A.St.- Hil. & Girard	–	–	AF482568.1	–	AF482643.1	–	–	–
<i>U. flaccida</i> A.DC.	–	AF531830.1	AF482569.1	–	AF482644.1	–	–	–
<i>U. floridana</i> Nash	MF991496	KX604192	–	MG027804	–	–	MH937520	MH937536
<i>U. foliosa</i> L.	MF991497	KX604188	MG027706	MG027825	MF765564.1	MG027750	MK089587	MK089591
<i>U. foveolata</i> Edgew.	–	AF531850.1	AF482570.1	–	AF482645.1	–	–	–
<i>U. geminiloba</i> Benj.	–	–	–	–	AF482646.1	MG027775	–	–
<i>U. geminiscapa</i> Benj.	MF991501.1	–	AF482571.1	MG027813	AF482647.1	EF526399.1	–	–
<i>U. gibba</i> L.	L13190.2	NC_021449.1	AF482572.1	NC_021449.1	AF482648.1	–	MH937521	MH937537
<i>U. graminifolia</i> Vahl	–	–	AF482573.1	–	AF482649.1	–	–	–
<i>U. hispida</i> Lam.	MF991503	AF531829.1	–	–	–	MG027780	–	–
<i>U. humboldtii</i> R.H.Schomb.	–	AF531836.1	–	–	–	–	–	–
<i>U. huntii</i> P.Taylor	–	–	AF482574.1	–	AF482650.1	–	–	–
<i>U. hydrocarpa</i> Vahl	MF991508	KX604190	–	MG027827	–	MG027758	MK089588	MK089592
<i>U. inflata</i> Walter	–	–	AF488525.1	–	AF488531.1	–	–	–
<i>U. inflexa</i> Forssk.	MF991509	–	–	MG027819	–	MG027743	MH937524	–
<i>U. intermedia</i> Hayne	JN966055.1	AF531839.1	AF482575.1	–	AF482651.1	–	–	MH937540
<i>U. juncea</i> Vahl	AY128630.1	AF531832.1	AF482576.1	–	AF482652.1	–	–	–
<i>U. laciniata</i> A.St.-Hil. & Girard	MF991511	–	AF482577.1	MG027802	AF482653.1	–	–	–
<i>U. laterifolia</i> R.Br.	MF991514	KX604175	AF482578.1	MG027799	AF482654.1	–	–	–
<i>U. laxa</i> A.St.-Hil. & Girard	MF991568	–	–	–	–	–	–	–
<i>U. leptoplecta</i> F.Muell.	–	–	AF488526.1	–	AF488532.1	–	–	–
<i>U. livida</i> E.Mey.	MF991569	AF531833.1	AF482579.1	MG027797	AF482655.1	–	–	–

<i>U. longifolia</i> Gardner	MF991515	AF531834.1	AF482580.1	–	AF482656.1	MG027773	–	–
<i>U. macrorhiza</i> Leconte ex Torr.	MF991501	AF531835.1	AF482581.1	MG027814	AF482657.1	MG027747	MH937525	MH937541
<i>U. menziesii</i> R.Br.	MF991573	–	–	–	–	–	–	–
<i>U. meyeri</i> Pilg.	MF991570	KX604231	AF482582.1	MG027856	AF482658.1	–	–	–
<i>U. minor</i> L.	KC484305.1	JN894028.1	–	MG027811	GU169706.1	MG027745	–	MH937543
<i>U. monanthos</i> Hook.f. 1	MF991519	–	–	–	–	–	–	–
<i>U. monanthos</i> Hook.f. 2	–	–	GQ478686.1	–	–	–	–	–
<i>U. multifida</i> R.Br.	MF991571	AF531848.1	AF482583.1	MG027801	AF482659.1	–	–	–
<i>U. myriocista</i> A.St.- Hil. & Girard	–	–	AF482584.1	–	AF482660.1	–	–	–
<i>U. nana</i> A.St.-Hil. & Girard	MF991520	AF531837.1	AF482585.1	MG027857	AF482661.1	–	–	–
<i>U. nelumbifolia</i> Fromm	MF991521	KX604217	AF482586.1	MG027850	AF482662.1	–	–	–
<i>U. neottioides</i> A.St.- Hil. & Girard	MF991522	KX604193	–	MG027833	AF482663.1	MG027737	–	–
<i>U. nephrophylla</i> Benj.	–	AF531827.1	AF482588.1	–	AF482664.1	–	–	–
<i>U. nervosa</i> Weber ex Benj.	MF991524	KX604199	–	MG027837	–	MG027760	–	–
<i>U. ochroleuca</i> R.W.Hartm.	MF991528	–	–	MG027818	–	MG027746	–	MH937544
<i>U. olivacea</i> C.Wright ex Griseb.	MF991567	AF531840.1	AF482589.1	–	AF482665.1	–	MK089589	MK089593
<i>U. oliveriana</i> Steyerm.	–	–	AF482590.1	–	AF482666.1	–	–	–
<i>U. parthenopipes</i> P.Taylor	–	AF531842.1	–	–	–	–	–	–
<i>U. praelonga</i> A.St.- Hil. & Girard	MF991572	AF531843.1	AF482591.1	–	AF482667.1	–	–	–
<i>U. prehensilis</i> E.Mey.	–	–	AF482592.1	–	AF482668.1	–	–	–
<i>U. pubescens</i> Sm.	AY128629.1	AF531844.1	AF482593.1	–	AF482669.1	–	–	–
<i>U. purpurea</i> Walter	MF991530	AF531845.1	–	MG027830	–	–	–	–
<i>U. purpureocaerulea</i> A.St.-Hil. & Girard	–	–	AF482594.1	–	AF482670.1	–	–	–
<i>U. pusilla</i> Vahl	MF991532	–	–	–	–	–	–	–
<i>U. quelchii</i> N.E.Br.	–	AF531846.1	–	–	–	–	–	–
<i>U. radiata</i> Small	MF991533	KX604185	–	MG027824	–	–	–	MH937545
<i>U. reflexa</i> Oliv.	MF991534	KX604189	–	MG027817	–	–	–	MH937546
<i>U. reniformis</i> A.St.- Hil.	MF991536	AF531828.1	AF482595.1	MG027851	AF482671.1	MG027776	–	–
<i>U. resupinata</i> B.D.Greene ex Bigelow	MF991540	–	AF488527.1	MG027828	AF488533.1	MG027767	–	MH937547
<i>U. rigida</i> Benj.	–	AF531838.1	–	–	–	–	–	–
<i>U. sandersonii</i> Oliv.	MF991541	AF531847.1	AF482596.1	MG027798	AF482672.1	MG027734	–	–
<i>U. simulans</i> Pilg.	MF991543	–	AF482597.1	–	AF482674.1	–	–	–

<i>U. simplex</i> R.Br.	–	–	–	–	AF482673.1	–	–	–
<i>U. spiralis</i> Sm.	–	AF531851.1	–	–	–	–	–	–
<i>U. stellaris</i> L.f.	MF991545	KX604182	–	MG027815	–	–	–	–
<i>U. striata</i> ex Torr.	MF991546	–	–	MG027806	–	–	MH937526	MK095917
<i>U. striatula</i> Sm.	–	–	AF482598.1	–	AF482675.1	–	–	–
<i>U. stygia</i> G.Thor	JN890776.1	JN894027.1	–	MG027816	–	–	–	MH937548
<i>U. subulata</i> L.	MF991548	AF531821.1	AF482599.1	MG027842	AF482676.1	MG027763	MH937528	–
<i>U. tricolor</i> A.St.-Hil.	MF991554	KX604209	AF482600.1	–	AF482677.1	MG027724	–	–
<i>U. tridentata</i> Sylvén	MF991566	AF531825.1	–	–	–	–	–	–
<i>U. triloba</i> Benj.	AF482530.1	KX604204	AF482601.1	MG027846	AF482678.1	MG027765	–	–
<i>U. uliginosa</i> Vahl	MF991562	AF531849.1	AF482602.1	MG027858	AF482679.1	–	–	–
<i>U. uniflora</i> R.Br.	MF991563	–	GQ478698.1	–	–	–	–	–
<i>U. violacea</i> R.Br.	–	–	AF482603.1	–	AF482680.1	–	–	–
<i>U. volubilis</i> R.Br.	MF991564	–	–	–	–	MG027738	–	–
<i>U. vulgaris</i> L.	JN890555.1	AF531831.1	–	MG027810	JQ728994.1	EF526385.1	MH937529	MH937549

4.2.1. Análise referente à possível relação entre o conteúdo de H₂O₂ e o comprimento de ramos das linhagens

A partir das análises filogenéticas de máxima verossimilhança, foi calculado o valor de comprimento de ramos de cada uma das espécies alvo do estudo (*Utricularia reniformis*, *U. foliosa*, *Genlisea violacea*, *G. repens*, *Pinguicula gigantea* e *P. agnata*) no filograma baseado na matriz de todos os dados concatenados, no filograma baseado na matriz dos dados do cpDNA e no filograma baseado na matriz dos dados do nDNA. O comprimento de ramos em uma filogenia nos indica a quantidade de transformações nucleotídicas que ocorreram ao longo da evolução em determinado terminal, ou espécie empregada (MATIOLI; FERNANDES, 2012). A partir daí, utilizando regressão linear simples, foi feita uma modelagem do comprimento de ramos (eixo Y) dos três filogramas utilizados (dados concatenados, cpDNA e nDNA) baseada no conteúdo de H₂O₂ das folhas fotossintetizantes de todos os indivíduos amostrados de cada uma das seis espécies (eixo X). O modelo foi do tipo:

$$Y_{Compr.Ram.} = \beta_0 + X_{it.cpDNA}\beta_{t.cpDNA} + X_{it.nDNA}\beta_{t.nDNA} + X_{iH_2O_2}\beta_{H_2O_2} + X_{it.cpDNA}X_{iH_2O_2}\beta_{t.cpDNA:H_2O_2} + X_{it.nDNA}X_{iH_2O_2}\beta_{t.nDNA:H_2O_2}$$

Onde $Y_{Compr.Ram.}$ é um vetor numérico que indica os valores de todos os comprimentos de ramos, o $X_{iH_2O_2}$ indica a quantidade de H_2O_2 nas folhas daquele indivíduo e os outros X_{ij} indicam variáveis *dummies* que nos contam qual foi a forma de medição do comprimento de ramos daquele indivíduo. Os β_j indicam o efeito de determinado X_{ij} no modelo. É importante ressaltar que esse modelo é completo com interação. A regressão linear foi realizada utilizando-se o pacote Stats v3.6.2 inserido na plataforma R (R CORE TEAM, 2013).

4.3. Ensaio relativo à detecção da origem do H_2O_2 nos órgãos de *Utricularia foliosa*

4.3.1. Material vegetal

Foram coletados 15 indivíduos de *Utricularia foliosa*, uma espécie aquática, no dia 18/02/2020, no Município de Ubarana (SP). Os indivíduos foram acondicionados em bandejas (35cm X 50cm X 10 cm) preenchidas com água. Os cinco indivíduos maiores foram acondicionados em uma bandeja cada, enquanto que dez indivíduos menores foram dispostos, dois a dois, em uma mesma bandeja, a fim de que fossem utilizadas dez bandejas e fosse possível a instalação do ensaio devido às dimensões do espaço disponível (fig. 4).

4.3.2. Instalação do experimento, coleta de dados e análises estatísticas

As bandejas foram mantidas em ambiente controlado, a 23 °C, sob a iluminação de lâmpadas LED tubulares de luz branca, a 102 $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{-1}$ de irradiação, medida por espectroradiômetro modelo Spectra Pen (Photon System Instruments). As plantas foram mantidas nessas condições por 12 horas, tendo posteriormente amostras de três órgãos de cada um dos 15 indivíduos coletadas:

folhas fotossintetizantes (fig. 5A), estolões (fig. 5C) e armadilhas, ou utrículos (fig. 5B). As amostras foram armazenadas em freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após essa primeira amostragem, os indivíduos foram mantidos em ambiente controlado, a $23\text{ }^{\circ}\text{C}$, em escuro absoluto durante 12 horas. Passado esse tempo, ocorreu nova coleta de amostras dos mesmos órgãos citados anteriormente, de cada um dos 15 indivíduos, sendo as amostras posteriormente armazenadas em freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Essa última coleta de amostras foi realizada sob luz verde para evitar a ocorrência da fotossíntese. Ocorreu posteriormente a mensuração do conteúdo de H_2O_2 de todas as amostras, segundo o protocolo de Alexieva et al. (2001). Foi utilizado 0,8 g de tecido de cada um dos órgãos coletados para que fosse seguido o protocolo. Comparou-se, portanto, o conteúdo de H_2O_2 nos órgãos de *Utricularia foliosa* após 12 horas de atividade fotossintética, e após 12 horas de escuro, para que se investigasse a influência da fotossíntese na produção desse composto. Foi realizada a transformação dos dados em Ln para garantir os pressupostos de normalidade e homocedasticidade. Realizou-se uma ANOVA (DIC) para comparar o conteúdo de H_2O_2 nos três diferentes órgãos, sob os dois tratamentos, com $n = 15$ para cada um deles. Houve comparação de médias por teste de Tukey. As análises foram realizadas utilizando-se o pacote Stats v3.6.2 inserido na plataforma R (R CORE TEAM, 2013).

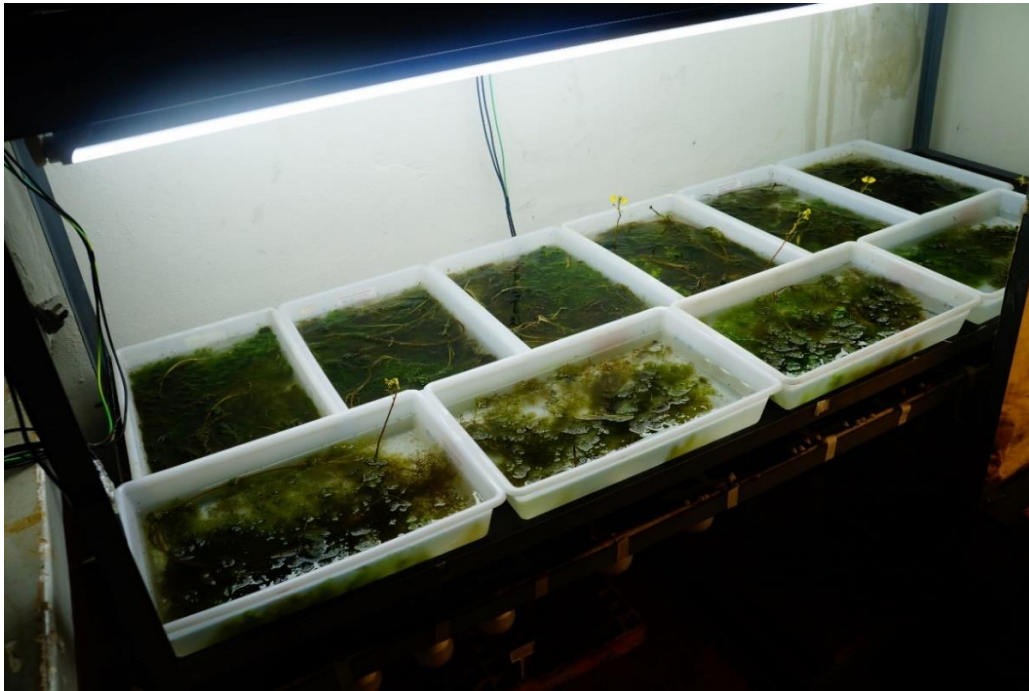


Fig. 4. Ambiente controlado no qual os indivíduos foram mantidos para que houvesse indução à fotossíntese.

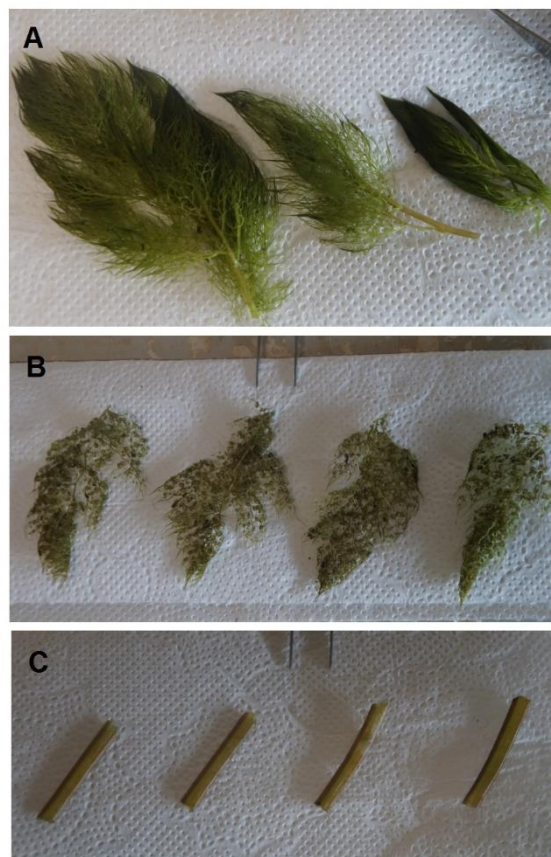


Fig. 5. Órgãos amostrados de *Utricularia foliosa*. **A** – Folhas fotossintetizantes. **B** – Ramos com armadilhas, ou utrículos. **C** – Estolões.

4.4. Ensaio relativo à averiguação da influência do ambiente aquático no conteúdo de H₂O₂ em folhas de *Utricularia graminifolia*

4.4.1. Material vegetal

Foi adquirida comercialmente uma amostra inicial de *Utricularia graminifolia*, uma espécie exótica que ocorre em vários países da Ásia (TAYLOR, 1989). Esse indivíduo inicial foi dividido em duas porções e cultivado em duas bandejas de plástico (35 cm X 50 cm X 10 cm). As bandejas foram furadas, preenchidas com uma camada de 2 mm de areia lavada ao fundo e com uma camada superficial de 3 cm de *Sphagnum*, para que as plantas pudessem ser acondicionadas. Ambas as bandejas foram transportadas para uma casa e vegetação, sendo as plantas cultivadas a 28° C ao longo de 120 dias, o suficiente para que ambas as bandejas ficassem repletas de plantas, pois o desenvolvimento vegetativo de *U. graminifolia* é bastante acelerado. *U. graminifolia* é uma espécie terrestre ou subaquática (TAYLOR, 1989), ou seja, pode ser cultivada tanto sobre algum substrato úmido, quanto em submersão, como uma planta aquática.

4.4.2. Instalação do experimento, coleta de dados e análises estatísticas

Assim que se obteve material vegetal suficiente, cada uma das duas bandejas teve seu conteúdo dividido em 5 partes iguais, que foram dispostas em frascos de vidro arredondados, com 20 cm de diâmetro e 40 cm de altura. Antes da transferência das plantas para os frascos, estes tiveram uma camada de 5 mm de areia lavada depositada no fundo, sobre a qual foi depositada uma camada de 5 cm de *Sphagnum*. Foram preparados, portanto, 10 frascos de vidro,

que foram cultivados em casa de vegetação a 28° C por 30 dias. Após esse período, cinco dos 10 frascos tiveram seu conteúdo vazio preenchido com água destilada, para que as plantas fossem cultivadas como sendo aquáticas, enquanto as restantes foram cultivadas como plantas terrestres. Conduziu-se esse ensaio por mais 30 dias, com os frascos dispostos aleatoriamente (fig. 6). Após esse período, foram coletadas 3 amostras das folhas de *Utricularia graminifolia* por frasco, sendo 15 amostras oriundas das plantas cultivadas em submersão (fig. 7B), e 15 oriundas das plantas cultivadas sobre o substrato (fig. 7A). As amostras foram armazenadas em freezer a -80°C, para que tivessem seu conteúdo de H₂O₂ mensurado posteriormente, segundo o protocolo de Alexieva et al. (2001). Utilizou-se 0,8 g de tecido por amostra para a realização do protocolo. Investigou-se, portanto, a influência da submersão no acúmulo de H₂O₂ nas folhas de *U. graminifolia*, com implicações sobre a influência do hábito na presença dessa substância. O delineamento foi inteiramente casualizado (DIC), com cinco repetições por tratamento (5 frascos de vidro; $n = 5$), tendo sido coletadas três amostras por vidro, totalizando 15 amostras de cada tratamento. Foi realizada uma ANOVA comparando o conteúdo de H₂O₂ nas folhas sob os dois diferentes tratamentos. A comparação de médias ocorreu por teste de Tukey. As análises foram realizadas utilizando-se o pacote Stats v3.6.2 inserido na plataforma R (R CORE TEAM, 2013).



Fig. 6. Ensaio com *Utricularia graminifolia* sendo cultivada em submersão e sobre um substrato úmido, em recipientes aleatorizados.

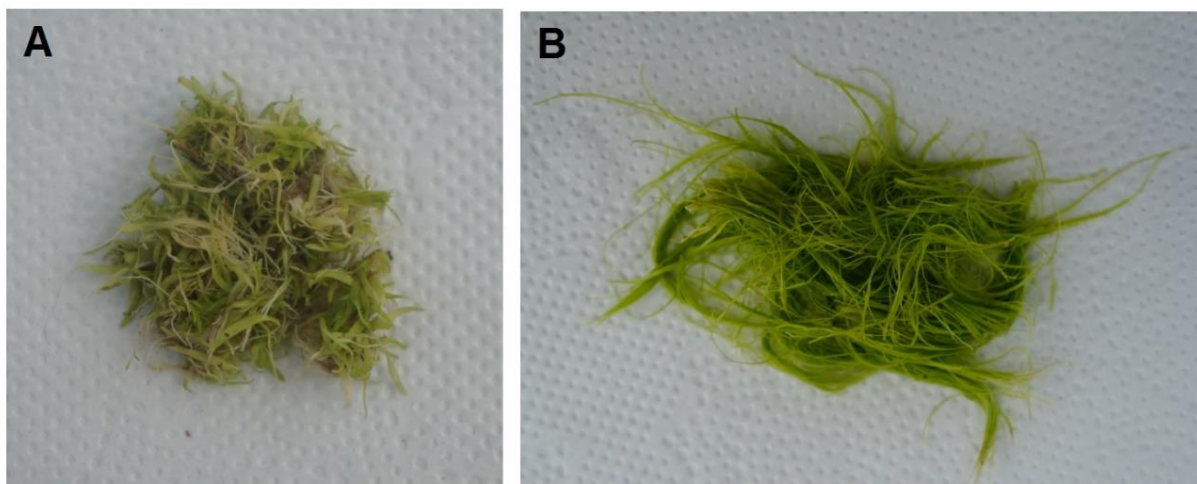


Fig. 7. Folhas amostradas de *Utricularia graminifolia*. A – Cultivadas sobre o substrato úmido. **B** – Cultivadas em submersão.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Conteúdo de H_2O_2 nos órgãos de espécies de Lentibulariaceae

5.1.1. *Utricularia reniformis* e *U. foliosa*

Rejeitou-se H_0 em favor de H_1 (teste F significativo; nível de significância $\alpha = 0,01\%$), indicando diferenças entre os tratamentos. As folhas fotossintetizantes de *Utricularia reniformis* acumularam mais H_2O_2 do que os mesmos órgãos em *U. foliosa*, porém houve um acúmulo maior dessa substância nos utrículos e nos estolões de *U. foliosa* quando em relação a *U. reniformis* (tab. 3). Quando a comparação é feita entre os órgãos dentro da mesma espécie, constata-se que em ambas as folhas fotossintetizantes acumulam mais H_2O_2 , sendo seguidas pelos utrículos, que possuem um acúmulo intermediário, e os estolões acumulam quantidades menores dessa substância (tab. 3). O coeficiente de variação foi de 8,29%.

Tab. 3. Acúmulo de H₂O₂ de duas espécies de *Utricularia*, em três órgãos distintos. Médias seguidas de mesmas letras (minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal) não diferiram entre si, com nível de significância $\alpha = 0,05$. Médias comparadas por teste de Tukey. *U. foliosa* – $n = 10$ / *U. reniformis* – $n = 15$.

Fator B: Órgãos			
Fator A:	B1: Folhas	B2: Estolões	B3: Utrículos
Espécies	fotossintetizantes		
A1: <i>U. foliosa</i>	5,57 ^{ba}	4,32 ^{aC}	4,80 ^{aB}
A2: <i>U. reniformis</i>	7,51 ^{aA}	3,69 ^{bC}	4,03 ^{bB}

A constatação de que em ambas as espécies ocorre um acúmulo maior de H₂O₂ nas folhas fotossintetizantes está de acordo com o fato de que as reações de transporte de elétrons nos cloroplastos, durante a fotossíntese, são uma das principais fontes de ERO nas células vegetais (ASADA et al., 2006; DELPRATO et al., 2015). No entanto, esses resultados não corroboram a hipótese que relaciona as altas taxas de substituição nucleotídicas encontradas em *Utricularia* com uma possível superprodução de ERO nos utrículos (ALBERT et al., 2010; IBARRA-LACLETTE et al., 2011a; IBARRA-LACLETTE et al., 2011b), resultante da alta demanda energética destes e das altas taxas respiratórias que possuem (ADAMEC, 2006; SYDENHAM, FINDLAY, 1973). Os presentes resultados sugerem que a origem dessas ERO em *Utricularia* spp. é majoritariamente fotossintética. Outra evidência nesse sentido é o fato de que os estolões e utrículos de *U. foliosa* acumulam mais H₂O₂ do que os mesmos órgãos de *U. reniformis*. *U. foliosa* é uma espécie aquática livre, que flutua próximo ao leito de rios e lagos (TAYLOR, 1989), possuindo estolões e utrículos clorofilados, que contribuem do ponto de vista fotossintético (figs. 5B e 5C). Já no caso de *U. reniformis*, uma espécie terrestre (TAYLOR, 1989), esses dois órgãos são subterrâneos e não pigmentados. *U. reniformis* acumula mais H₂O₂ nas folhas fotossintetizantes quando em relação à *U. foliosa*, e esse resultado pode estar relacionado ao hábito. Sabe-se que macrófitas e algas podem perder H₂O₂ via difusão no ambiente aquático, protegendo-se da potencial toxicidade dessa substância (COLLÉN; PEDERSÉN, 1996).

5.1.2. *Genlisea violacea* e *G. repens*

Foi rejeitada H_0 em favor de H_1 (teste F significativo; nível de significância $\alpha = 0,01\%$), indicando diferenças entre os tratamentos. Em ambas as espécies de *Genlisea*, as folhas fotossintetizantes acumulam mais H_2O_2 do que as armadilhas. Além disso, os acúmulos dessa substância nas folhas fotossintetizantes não diferiram entre as duas espécies (tab. 4). *G. repens* acumula mais H_2O_2 em suas armadilhas do que *G. violacea* (tab 4). O coeficiente de variação foi de 6,86%.

Tab. 4. Acúmulo de H_2O_2 de duas espécies de *Genlisea*, em dois órgãos distintos. Médias seguidas de mesmas letras (minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal) não diferiram entre si, com nível de significância $\alpha = 0,05$. Médias comparadas por teste de Tukey. *G. repens* – $n = 16$ / *G. violacea* – $n = 13$.

Fator B: Órgãos		
Fator A: Espécies	B1: Folhas fotossintetizantes	B2: Armadilhas
A1: <i>G. repens</i>	6,0611 ^{aA}	5,4308 ^{aB}
A2: <i>G. violacea</i>	5,8693 ^{aA}	4,9766 ^{bB}

Assim como ocorreu com as espécies de *Utricularia* (tab. 3), em ambas as espécies de *Genlisea* empregadas o acúmulo de H_2O_2 nas folhas fotossintetizantes foi maior quando em relação às armadilhas. Tais resultados sugerem uma maior importância da fotossíntese na produção de H_2O_2 nos órgãos de *Genlisea*, assim como ocorre nos demais grupos de plantas (ASADA et al., 2006; DELPRATO et al., 2015).

5.1.3. *Pinguicula gigantea* e *P. agnata*

Não houve diferença significativa entre o acúmulo de H₂O₂ nas folhas fotossintetizantes das espécies de *Pinguicula*, único órgão que teve o conteúdo dessa substância mensurado no gênero (teste F não significativo; nível de significância $\alpha = 0,5\%$; tab. 5). O coeficiente de variação foi de 9,61%.

Tab. 5. Acúmulo de H₂O₂ nas folhas de duas espécies de *Pinguicula*. Médias seguidas de mesmas letras não diferiram entre si, com nível de significância $\alpha = 0,05$. Médias comparadas por teste de Tukey. *P. gigantea* – $n = 14$ / *P. agnata* – $n = 15$.

Espécies	Médias	Grupos
<i>P. gigantea</i>	4,0654	a
<i>P. agnata</i>	3,9192	a

5.1.4. Comparação entre as espécies e importância do H₂O₂

O único órgão passível de comparação entre as seis espécies de Lentibulariaceae empregadas, seguindo o critério de homologia, são as folhas fotossintetizantes. Foi constatada uma superioridade na concentração de H₂O₂ nas folhas de *Utricularia reniformis* quando em comparação às demais espécies, com *Genlisea repens*, *G. violacea* e *U foliosa* possuindo valores intermediários, e *Pinguicula gigantea* e *P. agnata* possuindo uma inferioridade no acúmulo dessa substância nas folhas (teste F significativo; nível de significância $\alpha = 0,01\%$; tab. 6). O coeficiente de variação foi de 7,32%.

Tab. 6. Acúmulo de H₂O₂ nas folhas de seis espécies de Lentibulariaceae. Médias seguidas de mesmas letras não diferiram entre si, com nível de significância $\alpha = 0,05$. Médias comparadas por teste de Tukey. *U. foliosa* – $n = 10$ / *U. reniformis* – $n = 15$ / *G. repens* – $n = 16$ / *G. violacea* – $n = 13$ / *P. gigantea* – $n = 14$ / *P. agnata* – $n = 15$.

Espécies	Médias	Grupos
<i>U. reniformis</i>	7,5089	a
<i>G. repens</i>	6,0611	b
<i>G. violacea</i>	5,8693	bc
<i>U. foliosa</i>	5,5737	c
<i>P. gigantea</i>	4,0654	d
<i>P. agnata</i>	3,9192	d

Foi possível constatar uma superioridade no acúmulo de H₂O₂ nas folhas do clado *Genlisea-Utricularia* quando em relação a *Pinguicula*, gênero que compõe um grupo irmão ao clado em questão (JOBSON et al., 2003). As taxas de substituição nucleotídica que ocorrem no clado *Genlisea-Utricularia* são muito superiores quando comparadas a *Pinguicula* ou às demais angiospermas (IBARRA-LACLETTE et al., 2011b; MÜLLER et al., 2004), podendo existir uma relação entre a superioridade no acúmulo de H₂O₂ nas folhas e a ocorrência de mais mutações nos genomas, pois as ERO são mutagênicas (FOYER; NOCTOR, 2003; SHU-HSIEN et al., 2005; STAVREVA, GICHNER, 2002). O H₂O₂ pode ser considerado um parâmetro para que se tenha uma ideia da produção das demais ERO, pois as células possuem um aparato enzimático que rapidamente as converte H₂O₂, uma ERO relativamente menos tóxica (SHU-HSIEN et al., 2005). Existem vários tipos de ERO resultantes das reações redox que ocorrem durante o metabolismo celular, em plantas e animais. Essas moléculas podem se formar devido à excitação da molécula estável de ³O₂ tripleto, gerando o ¹O₂ singlete reativo, ou devido a sucessivas adições de elétrons ao O₂ molecular, gerando o radical superóxido (O₂⁻), o radical hidroperóxido (HO₂⁻) ou peróxido de hidrogênio (H₂O₂), e o radical hidroxila (OH⁻) (BARBOSA et al., 2014).

Os organismos vivos dependem da ocorrência de reações redox, redutivas e anabólicas quando é necessário o armazenamento de energia, oxidativas e

catabólicas quando a energia precisa ser utilizada. Sinais redox são a forma mais usual de sinalização em organismos fotossintéticos, controlando o crescimento ou a eventual morte (FOYER; NOCTOR, 2003). O estresse oxidativo é um mecanismo importante para que ocorra a reação de hipersensibilidade (RH) em plantas, quando ocorre o contato com um patógeno e as moléculas elicitoras relacionadas a este, por exemplo. Nesses casos, ocorre o acúmulo de ERO nas células infectadas, com o objetivo de isolamento do sítio de infecção através de morte celular programada (MCP) (ZURBRIGGEN et al., 2010). A MCP também é importante para que ocorra o isolamento e remoção de tecidos danificados por estresses abióticos, causados por falta de água, luz excessiva, temperaturas extremas, excesso de radiação UV, exposição a herbicidas, alta salinidade, além de outras condições estressantes às quais as plantas estão expostas devido à forma de vida sésil (PETROV et al., 2015).

Devido à toxicidade das ERO, as células possuem um complexo sistema antioxidante capaz de prevenir a oxidação descontrolada, aos quais se incluem enzimas como a superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), que é a primeira linha de defesa, dismutando O_2^- , gerando H_2O_2 e O_2 ; glutathione redutase (GR, EC 1.6.4.2), catalase (CAT, 1.11.1.6), glutathione peroxidase (GSH-Px, EC 1.11.1.9), ascorbate peroxidase (APX, EC 1.11.1.11) e outras peroxidases, que agem contra o H_2O_2 produzido pela SOD e/ou por outros processos do metabolismo. Mecanismos não enzimáticos também podem operar nesta defesa, incluindo antioxidantes como o ascorbate (AsA) e a glutathione (GSH), assim como vitaminas e carotenóides (JALEEL et al., 2009; KAPOOR et al., 2019).

Os cloroplastos e as mitocôndrias são importantes sítios produtores de ERO, devido ao intenso transporte de elétrons que ocorre entre suas membranas internas, e a geração de H_2O_2 ocorre principalmente por meio da dismutação do radical superóxido (O_2^-) nessas organelas. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é uma molécula de grande importância para o desenvolvimento e sinalização em plantas, estando envolvido com o fechamento dos estômatos (CHEN; GALLIE, 2004), com o alongamento celular, autofagia de organelas, resposta a estresses bióticos e abióticos, sendo seu acúmulo importante para a ocorrência de MCP, além de outros processos (PETROV; VAN BREUSEGEM, 2012; SMIRNOFF;

ARNAUD, 2019). Um sítio bastante importante de produção de H_2O_2 são os peroxissomos, como resposta à fotorrespiração e à oxidação de ácidos graxos durante a germinação, por exemplo (QUEVAL et al., 2007; SCHRADER; FAHIMI, 2006). A fotorrespiração é uma resposta à fixação do 2-fosfoglicolato, uma molécula com dois carbonos que não é fisiologicamente assimilada pelas plantas, ao invés da fixação do 3-fosfoglicerato, que é uma molécula com três carbonos e é utilizada pelas plantas de ciclo fotossintético C3 para a fixação do carbono oriundo do CO_2 . A fixação desfavorável do 2-fosfoglicolato ocorre quando a enzima ribulose-1,5-biofosfato carboxilase oxidase (RuBisCO) se associa com o O_2 ao invés de se associar ao CO_2 , devido à ocorrência de certas condições como altas temperaturas ou níveis muito baixos de CO_2 (EHLERINGER; CERLING, 2002). Além de fotorrespiração, esse fenômeno pode ser chamado de ciclo fotossintético C2, e tem como finalidade recuperar uma molécula de 3-fosfoglicerato a partir de duas moléculas de 2-fosfoglicolato, com a perda fotorrespiratória de um carbono dos quatro presentes nas duas moléculas de 2-fosfoglicolato iniciais (BAUWE et al., 2010). A reciclagem do 2-fosfoglicolato em 3-fosfoglicerato acontece através da conversão de glicolato em glioxilato, por meio de enzimas glicolato oxidases (GOXs, E.C. 1.1.3.4), reação que ocorre nos peroxissomos e possui H_2O_2 como subproduto (FOYER; NOCTOR, 2003; HOFMANN, 2011). Por causa disso, os peroxissomos possuem uma alta atividade da CAT, que neutraliza os efeitos tóxicos do H_2O_2 convertendo-o em H_2O e O_2 (WILLEKENS et al., 1997). Essa resposta à fotorrespiração com o objetivo de recuperar carbonos possui um alto custo energético para as plantas, e envolve principalmente peroxissomos e cloroplastos (FOYER; NOCTOR, 2003). Sabe-se que a presença de peroxissomos em células vegetais está associada à presença de cloroplastos (TOLBERT, 1971), portanto os tecidos fotossintéticos tendem a possuir uma incidência maior dessas organelas. Além da produção de H_2O_2 oriunda da fotorrespiração, que ocorre nos peroxissomos, existe produção dessa substância nos cloroplastos (SMIRNOFF; ARNAUD, 2019), e o maior acúmulo de H_2O_2 constatado nos órgãos fotossintetizantes das espécies estudadas neste trabalho (tab. 3 e tab. 4) estão de acordo com esses dados da literatura.

Nos cloroplastos ocorre a formação do radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) devido à transferência direta de elétrons à moléculas de O_2 , então essa ERO é transformado em H_2O_2 por ação da SOD (GARG; MANCHANDA, 2009). A produção de H_2O_2 nos peroxissomos é mais expressiva quando ocorre resposta à fixação do 2-fosfoglicolato em condições ambientais estressantes, como temperaturas muito altas, secas e níveis muito baixos de CO_2 . As reações de transporte de elétrons que ocorrem nos cloroplastos e mitocôndrias são mais importantes como fonte de H_2O_2 apenas em condições específicas, como temperaturas muito baixas (FOYER; NOCTOR, 2003). A produção ativa de H_2O_2 acontece majoritariamente no espaço apoplástico, e é importante para que ocorra a resposta oxidativa que compõe a reação de hipersensibilidade à patógenos por exemplo, porém é também um pré-requisito para que ocorra o desenvolvimento normal da planta, com crescimento, desenvolvimento e morte celular (MILLER et al., 2010). Nesse sítio, a principal fonte de H_2O_2 é uma classe de enzimas oxidase dependentes de NADPH da membrana celular, homólogas à oxidase de explosão respiratória (Rboh), que são reguladas por um grupo de proteínas Rho, conhecidas como ROPs (*Rho-related GTPases from plants*) (AGRAWAL et al., 2003), além de enzimas peroxidases associadas à parede celular (BOLWELL et al., 2002). Nesse sítio, a produção de H_2O_2 é dependente do pH, sendo maior quando o pH é levemente básico (PEDRENO et al., 1989). Outro sítio de produção de H_2O_2 nas células é retículo endoplasmático (SMIRNOFF; ARNAUD, 2019).

O conteúdo de H_2O_2 nos órgãos em plantas é dependente principalmente das condições ambientais, e esse tema carece de estudos mais aprofundados, principalmente no ambiente natural (CHEESEMAN, 2006; JANA; CHOUDHURI, 1982). Existe uma grande quantidade de métodos disponíveis para detecção do H_2O_2 através de corantes que são oxidados, e métodos de quantificação do H_2O_2 nos órgãos de plantas (ALEXIEVA et al., 2001; BARCELÓ et al., 1998; GAY et al., 1999; KRISTIANSEN et al., 2009; LIU et al., 2014; OROZCO-CARDENAS et al., 1999; ŠNYRYCHOVÁ et al., 2009; THORDAL-CHRISTENSEN et al., 1997; WEI et al., 2002; WINTERBOURN, 2014). Por ser mais estável que as demais ERO, possuir menor toxicidade e se difundir facilmente entre os tecidos, é uma molécula sinalizadora de grande importância e é utilizada por pesquisadores

como um parâmetro para que se determine o nível de estresse oxidativo (PETROV; VAN BREUSEGEM, 2012; SMIRNOFF; ARNAUD, 2019).

5.1.5. As folhas fotossintetizantes são os órgãos que mais acumulam H₂O₂

Albert et al. (2010) hipotetizaram que ocorre uma superprodução de ERO principalmente nos utrículos em *Utricularia*, como resultado das altas taxas respiratórias que esses órgãos apresentam (ADAMEC, 2006), estando a produção dessas substâncias, portanto, relacionada principalmente às mitocôndrias. Diversos autores discutem a possível relação entre a alta demanda energética dos utrículos com a ocorrência de seleção positiva em trechos do DNA (JOBSON et al., 2004; LAAKKONEN et al., 2006), produção de ERO e ocorrência de altas taxas de substituição nucleotídica nos genomas do clado *Genlisea-Utricularia* (ALBERT et al., 2010; IBARRA-LACLETTE et al., 2011a; IBARRA-LACLETTE et al., 2011b), o que explicaria a tendência à miniaturização dos genomas que ocorreu ao longo da evolução de algumas linhagens de Lentibulariaceae (FLEISCHMANN et al., 2014; GREILHUBER et al., 2006; IBARRA-LACLETTE et al., 2011b; IBARRA-LACLETTE et al., 2013; LEUSHKIN et al., 2013; SILVA et al. 2020; VELEBA et al., 2014). De fato, existe uma associação entre maiores taxas de evolução molecular e diminuição de genomas (DRAKE, 1991; DRAKE et al., 1998; DUFRESNE et al., 2005; LYNCH et al., 2006).

Os resultados obtidos no presente estudo não corroboram a hipótese de que ocorre uma superprodução de ERO em *Utricularia* devido às altas taxas respiratórias dos utrículos, pois os órgãos que mostraram maior acúmulo de H₂O₂, tanto em duas espécies de *Utricularia* (tab. 3) quanto em duas de *Genlisea* (tab. 4) foram as folhas fotossintetizantes, a despeito dos utrículos e estolões em *Utricularia* e das longas armadilhas helicoidais de *Genlisea*. Portanto, se descarta a importância da carnivoría quanto ao acúmulo de ERO.

Como o aparato enzimático celular logo converte outras ERO em H_2O_2 após sua formação (SHU-HSIEN et al., 2005), pode-se dizer que existe proporcionalidade entre o conteúdo de H_2O_2 nos órgãos e a produção total de ERO nestes. Diversos estudos relacionam o conteúdo de H_2O_2 nos órgãos ao estresse oxidativo em plantas, associado a fatores bióticos ou abióticos (ALVES et al., 2020a; ALVES et al., 2020b; DESMOND et al., 2008; SHETTY et al., 2007). Segundo os resultados do presente trabalho, os órgãos fotossintetizantes são os que mais acumulam ERO nas espécies de Lentibulariaceae.

5.2. Análises filogenéticas

Foram realizadas 11 análises de máxima verossimilhança, uma para cada sequência isolada (*rbcL*, *matK*, *rps16*, *rps12-rpl20* e *trnL-F* do cpDNA; ITS, *LEAFY* e *RPB2* do nDNA), uma de matriz concatenada de todas as sequências plastidiais, uma de matriz concatenada de todas as sequências nucleares e uma de matriz concatenada das oito sequências. Os dados referentes a cada alinhamento encontram-se na tabela 7. As figuras 9 a 19 exibem os resultados das análises filogenéticas, com ênfase nas seis espécies de Lentibulariaceae empregadas nas análises relativas ao conteúdo de H_2O_2 nos órgãos (*Utricularia reniformis*, *U. foliosa*, *Genlisea violacea*, *G. repens*, *Pinguicula gigantea* e *P. agnata*).

Tab. 7. Informações referentes às análises filogenéticas de cada sequência, bem como das três matrizes concatenadas. AICc = Melhor modelo de substituição nucleotídica, segundo critério de informação de Akaike corrigido. IC = Índice de consistência. IR = Índice de retenção.

Matriz	N° de terminais	Total de caracteres do alinhamento	Sítios variáveis (%)	Caracteres parcimoniosamente informativos	AICc	IC	IR
Dados concatenados	118	8765	4318 (49,26%)	3010	GTR+G+I	0,5056	0,6425
cpDNA	117	5222	2748 (52,62%)	1921	GTR+G+I	0,5256	0,7056
nDNA	51	3543	1570 (44,31%)	1089	GTR+G+I	0,4815	0,5155
<i>matK</i>	71	943	602 (63,83%)	469	GTR+G+I	0,5521	0,7930
<i>rbcL</i>	81	608	139 (22,86%)	105	T92+G+I	0,5463	0,8431
<i>rps12-rpl20</i>	45	1086	458 (42,17%)	284	GTR+G	0,6959	0,8109
<i>rps16</i>	71	1273	781 (61,35%)	550	GTR+G	0,4767	0,6156
<i>trnL-F</i>	74	1312	770 (58,68%)	513	GTR+G+I	0,5170	0,6561
ITS	40	1136	825 (72,62%)	642	GTR+G+I	0,4030	0,4856
<i>LEAFY</i>	19	1307	525 (40,15%)	319	GTR+G	0,7597	0,6870
<i>RPB2</i>	24	1100	221 (20,09%)	128	T92+G	0,6836	0,6478

Os genes *rbcL* e *RPB2* apresentaram as menores porcentagens de sítios variáveis (22,86% e 20,09%, respectivamente; tab. 7), pois codificam proteínas de grande importância metabólica, logo, acumulam menos mutações devido ao efeito deletério destas quando ocorrem em uma sequência codificante (MATIOLI; FERNANDES, 2012). O gene nuclear *RPB2* codifica uma das subunidades da enzima RNA Polimerase II em eucariotos, responsável pela síntese do RNA mensageiro, estando, portanto, diretamente relacionada à expressão gênica (KHURANA et al., 2014). Já o gene plastidial *rbcL* codifica a enzima ribulose-1,5-biofosfato carboxilase oxidase (RuBisCO), de grande importância fotossintética, com o gene *rbcL* tendendo a ser bastante conservado em plantas, com exceção de algumas linhagens de plantas parasitas nas quais ocorreu acúmulo de mutações e pseudogenização (e.g. WOLFE; PAMPHILIS, 1998). Os genes plastidiais *matK* e *rps16*, bem como o nuclear *LEAFY*, apresentaram uma porcentagem elevada de sítios variáveis (63,83%, 61,35% e 40,15%, respectivamente; tab. 7). O gene *matK* codifica uma maturase de íntrons do tipo II, e apesar da codificação de proteínas, possui taxas de substituição nucleotídica

bastante aceleradas, o que levanta uma discussão acerca da função de seu produto (BARTHET; HILU, 2007). A alta porcentagem de sítios variáveis deve estar relacionada a essas características da sequência em questão. Já o gene *rps16* codifica a proteína S16, uma das que compõe a subunidade menor dos ribossomos, e pode acumular mutações e se pseudogenizar nos cloroplastos de plantas devido à existência de cópias desse mesmo gene no genoma nuclear (KELLER et al., 2017). Dessa maneira, a cópia nuclear se mantém íntegra para que sua função essencial seja assegurada, enquanto a cópia plastidial pode ser mais polimórfica, como observamos no caso de Lentibulariaceae. O gene nuclear *LEAFY* codifica um fator de transcrição que está relacionado ao surgimento de meristemas florais em plantas (WEIGEL et al., 1992). Sua sequência possui trechos pouco conservados e íntrons que vêm sendo bastante usuais para a reconstrução filogenética de plantas (GROB et al., 2004; LI et al., 2020; MAIZEL et al., 2005), daí a alta porcentagem de sítios variáveis encontrada na sequência utilizada neste trabalho. As demais sequências utilizadas (*rps12-rpl20* e *trnL-F* do cpDNA; ITS do nDNA), que não codificam proteínas, demonstraram um grande acúmulo de mutações, possuindo sempre uma porcentagem de sítios variáveis maior do que 40% (tab. 7).

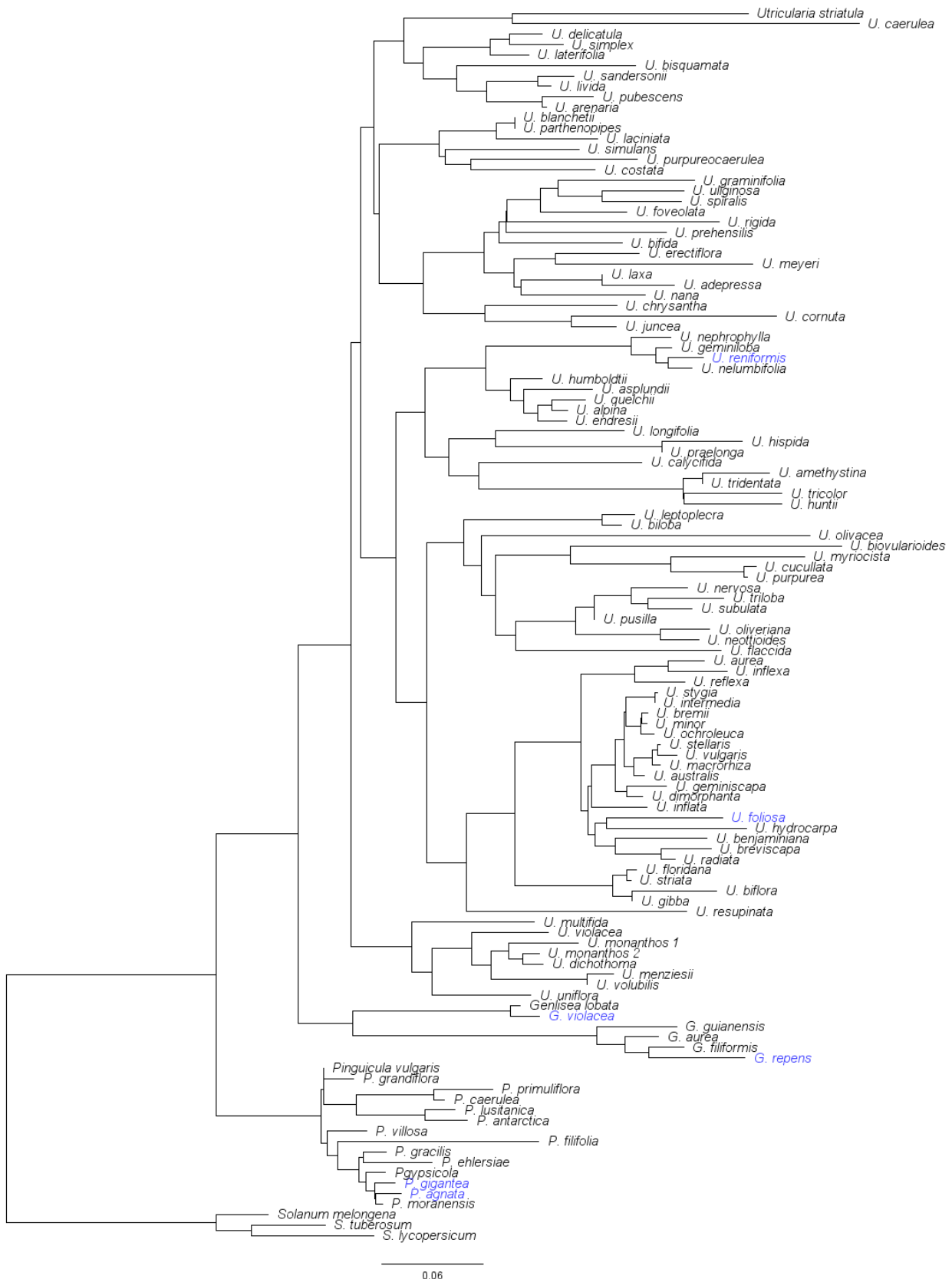


Fig. 9. Filograma de máxima verossimilhança baseado em uma matriz concatenada dos oito marcadores empregados (*rbcl*, *matK*, *rps16*, *rps12-rpl20*, *trnL-F*, ITS, *LEAFY* e *RPB2*). Os comprimentos dos ramos correspondem ao número de substituições nucleotídicas que ocorreu ao longo da evolução de cada terminal. As espécies empregadas nos ensaios relativos à mensuração do conteúdo de H₂O₂ nos órgãos estão destacadas em azul.



Fig. 10. Filograma de máxima verossimilhança baseado nos dados do cpDNA (*rbcL*, *matK*, *rps16*, *rps12-rpl20* e *trnL-F*). Os comprimentos dos ramos correspondem ao número de substituições nucleotídicas que ocorreu ao longo da evolução de cada terminal. As espécies empregadas nos ensaios relativos à mensuração do conteúdo de H₂O₂ nos órgãos estão destacadas em azul.

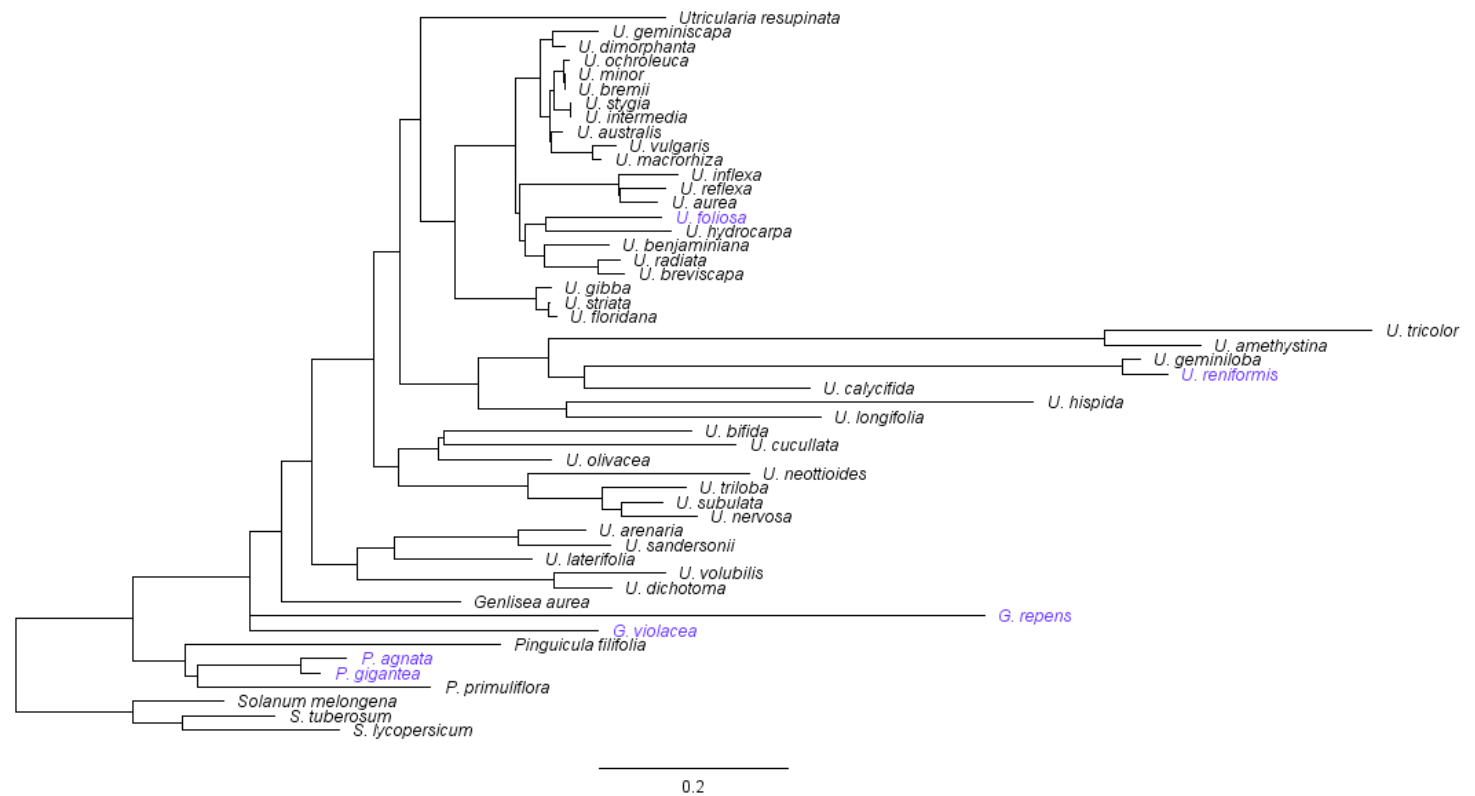


Fig. 11. Filograma de máxima verossimilhança baseado nos dados do nDNA (ITS, *LEAFY* e *RPB2*). Os comprimentos dos ramos correspondem ao número de substituições nucleotídicas que ocorreu ao longo da evolução de cada terminal. As espécies empregadas nos ensaios relativos à mensuração do conteúdo de H_2O_2 nos órgãos estão destacadas em azul.

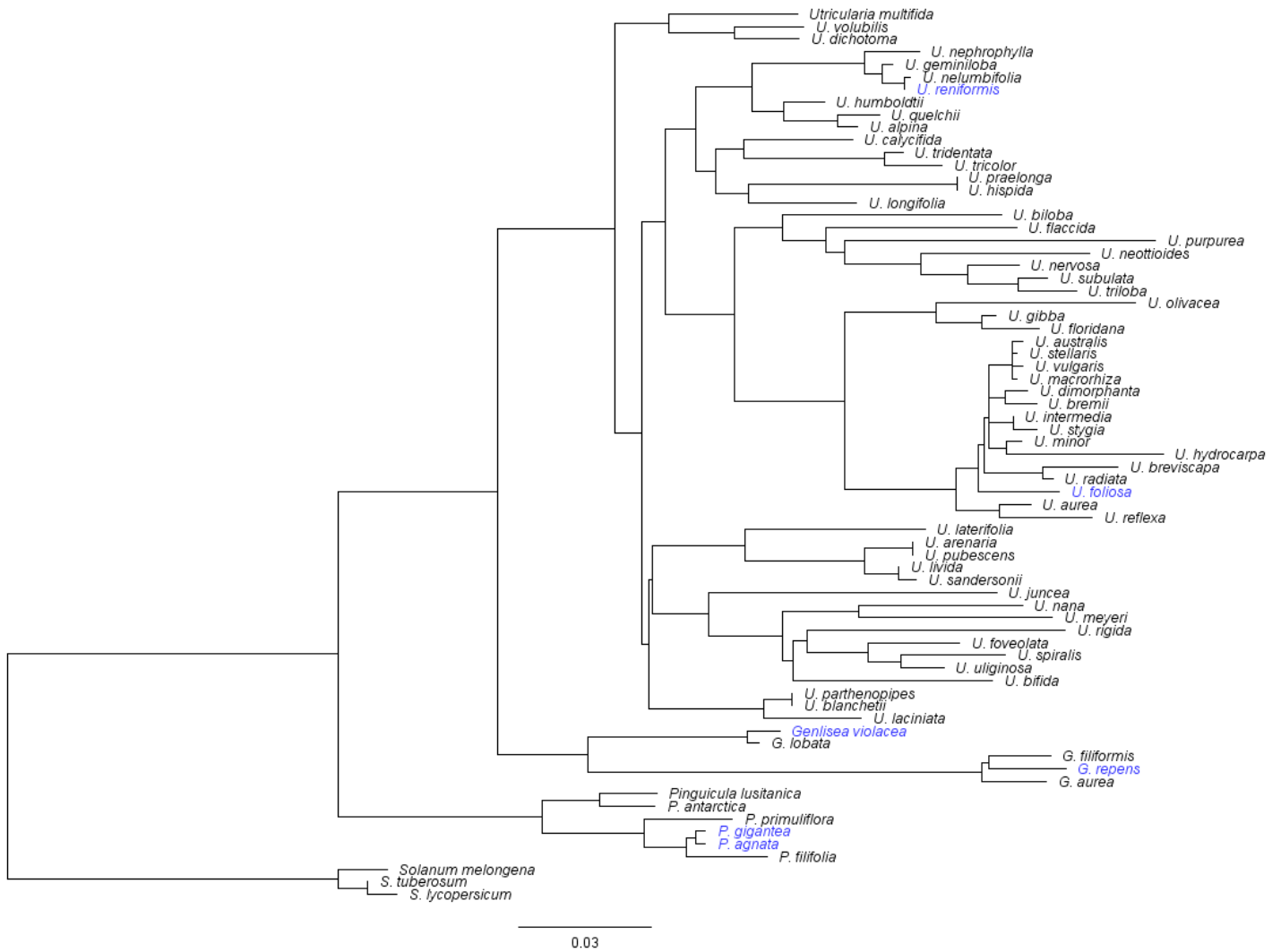


Fig. 12. Filograma de máxima verossimilhança baseado no gene plastidial *matK*. Os comprimentos dos ramos correspondem ao número de substituições nucleotídicas que ocorreu ao longo da evolução de cada terminal. As espécies empregadas nos ensaios relativos à mensuração do conteúdo de H_2O_2 nos órgãos estão destacadas em azul.

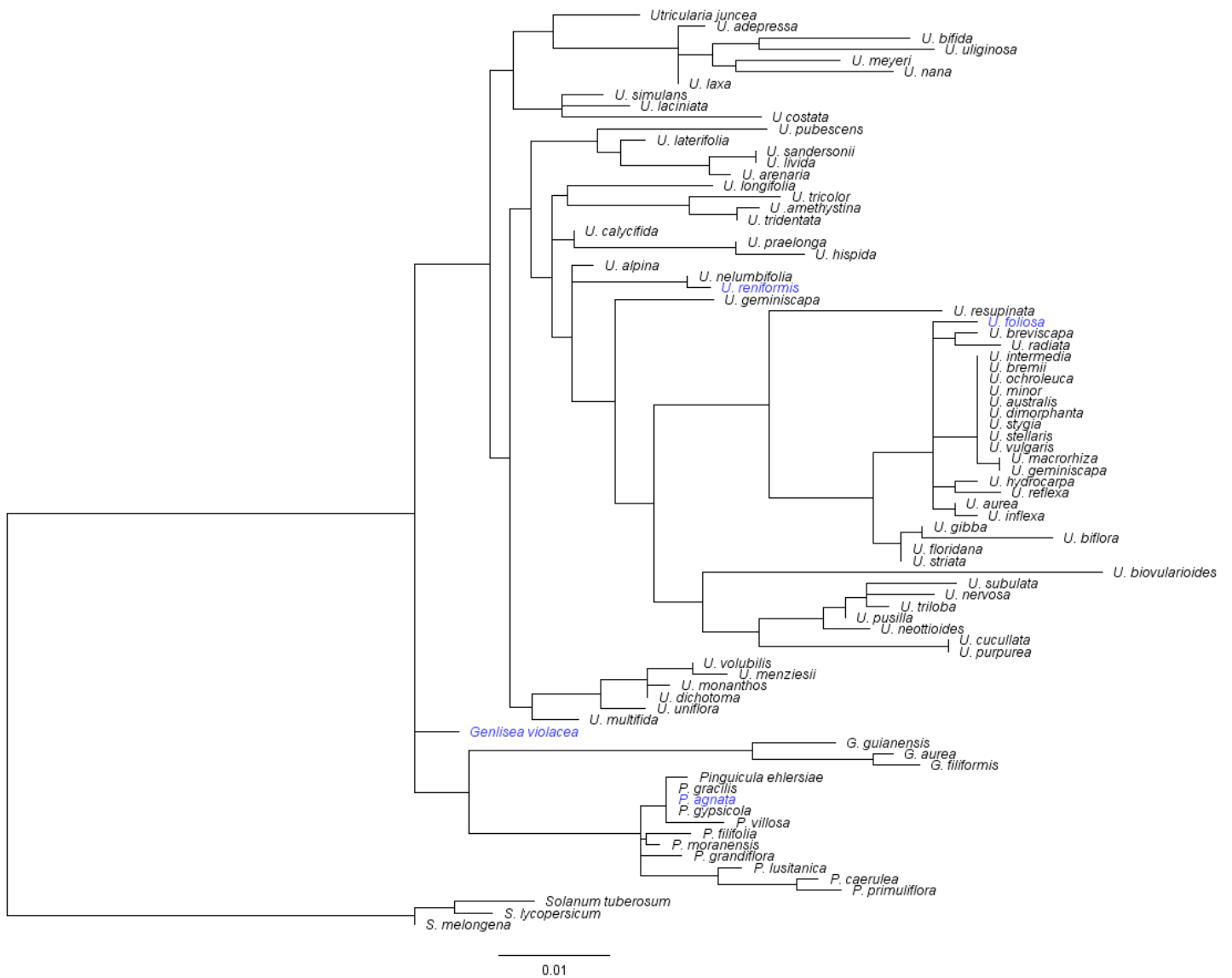


Fig. 13. Filograma de máxima verossimilhança baseado no gene plastidial *rbcL*. Os comprimentos dos ramos correspondem ao número de substituições nucleotídicas que ocorreu ao longo da evolução de cada terminal. As espécies empregadas nos ensaios relativos à mensuração do conteúdo de H_2O_2 nos órgãos estão destacadas em azul.

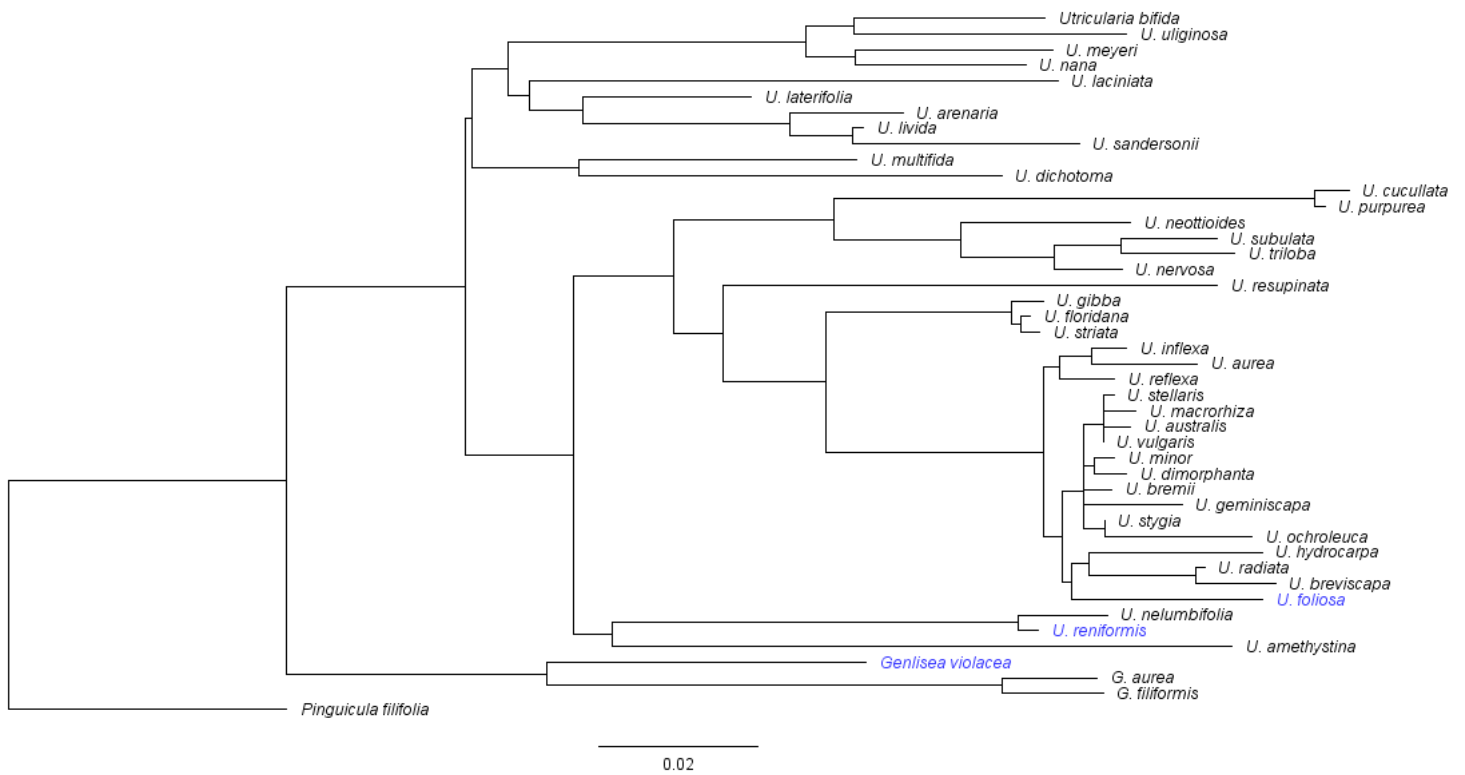


Fig. 14. Filograma de máxima verossimilhança baseado no espaçador plastidial *rpl12-rpl20*. Os comprimentos dos ramos correspondem ao número de substituições nucleotídicas que ocorreu ao longo da evolução de cada terminal. As espécies empregadas nos ensaios relativos à mensuração do conteúdo de H_2O_2 nos órgãos estão destacadas em azul.

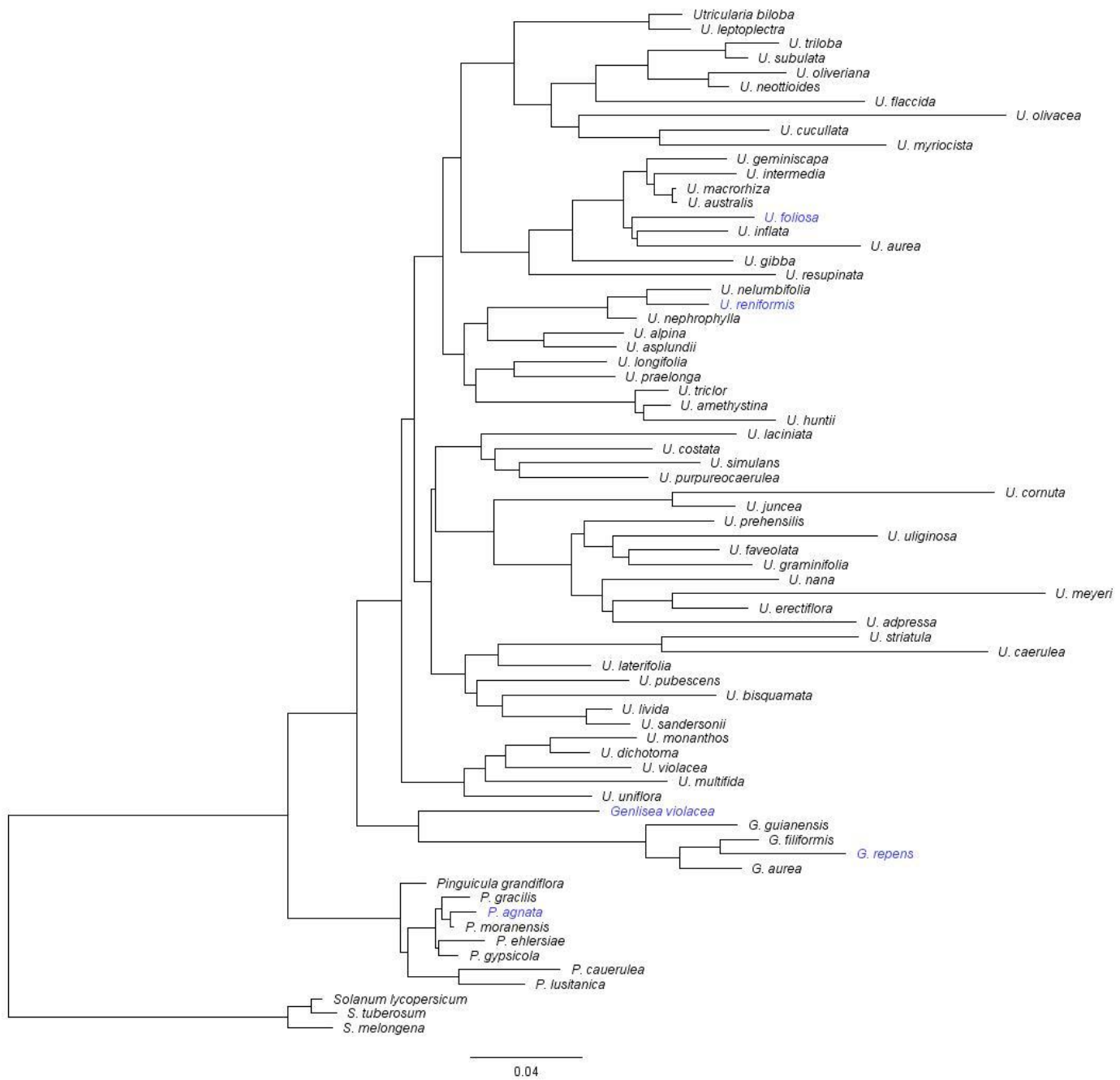


Fig. 15. Filograma de máxima verossimilhança baseado no íntron plastidial *rps16*. Os comprimentos dos ramos correspondem ao número de substituições nucleotídicas que ocorreu ao longo da evolução de cada terminal. As espécies empregadas nos ensaios relativos à mensuração do conteúdo de H_2O_2 nos órgãos estão destacadas em azul.



Fig. 16. Filograma de máxima verossimilhança baseado no espaçador plastidial *trnL-F*. Os comprimentos dos ramos correspondem ao número de substituições nucleotídicas que ocorreu ao longo da evolução de cada terminal. As espécies empregadas nos ensaios relativos à mensuração do conteúdo de H_2O_2 nos órgãos estão destacadas em azul.

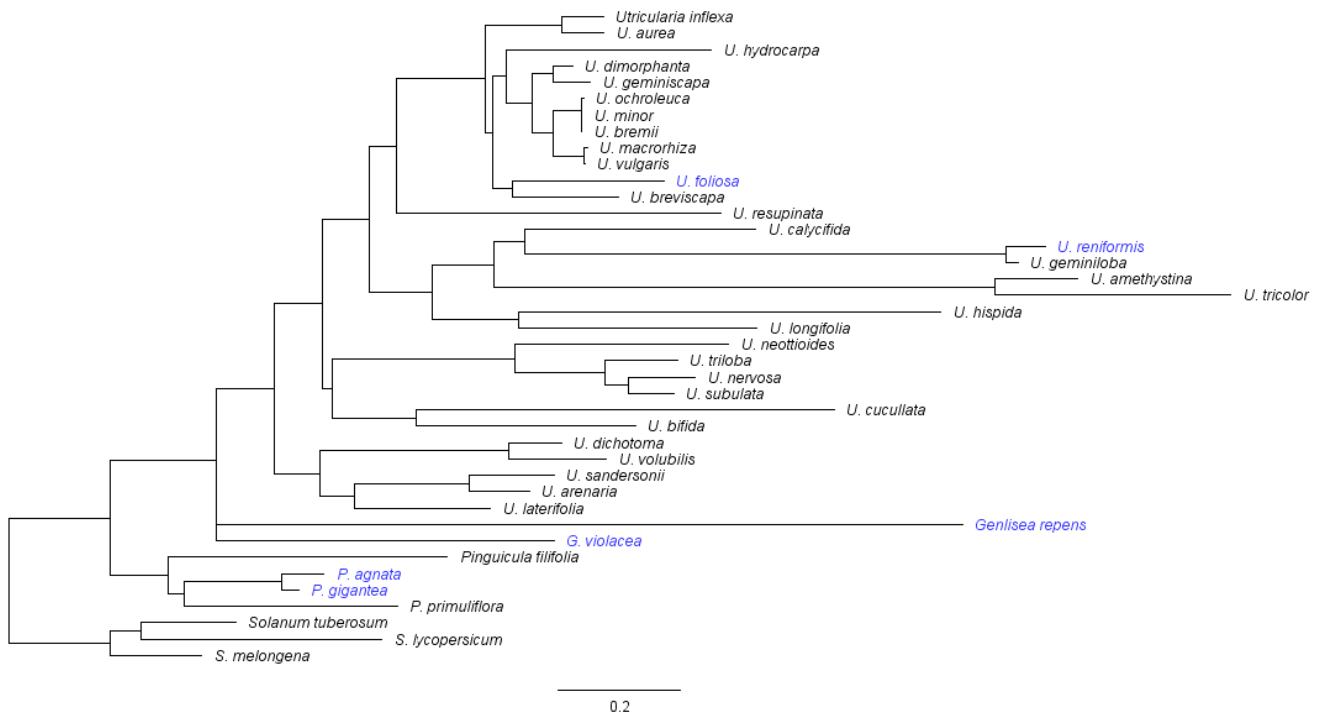


Fig. 17. Filograma de máxima verossimilhança baseado na região ITS do nDNA. Os comprimentos dos ramos correspondem ao número de substituições nucleotídicas que ocorreu ao longo da evolução de cada terminal. As espécies empregadas nos ensaios relativos à mensuração do conteúdo de H_2O_2 nos órgãos estão destacadas em azul.

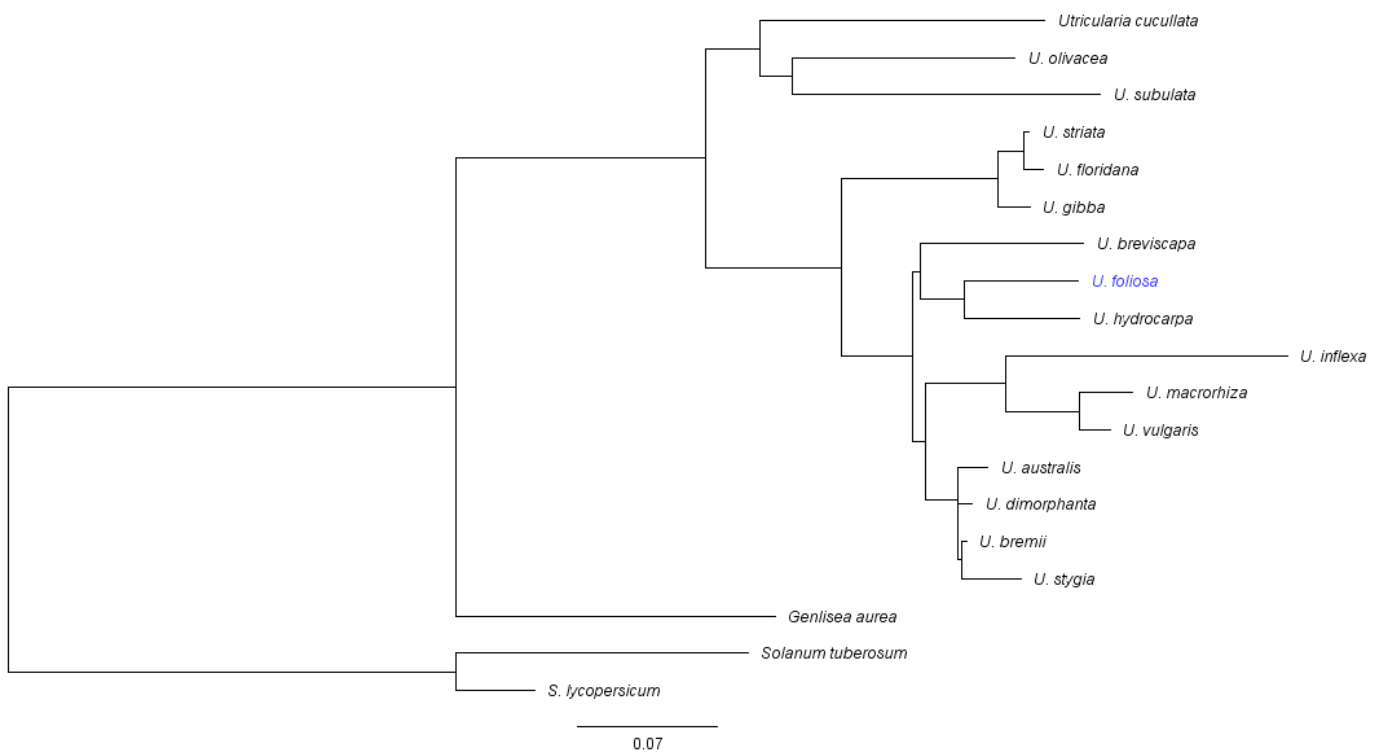


Fig. 18. Filograma de máxima verossimilhança baseado no gene nuclear *LEAFY*. Os comprimentos dos ramos correspondem ao número de substituições nucleotídicas que ocorreu ao longo da evolução de cada terminal. As espécies empregadas nos ensaios relativos à mensuração do conteúdo de H_2O_2 nos órgãos estão destacadas em azul.

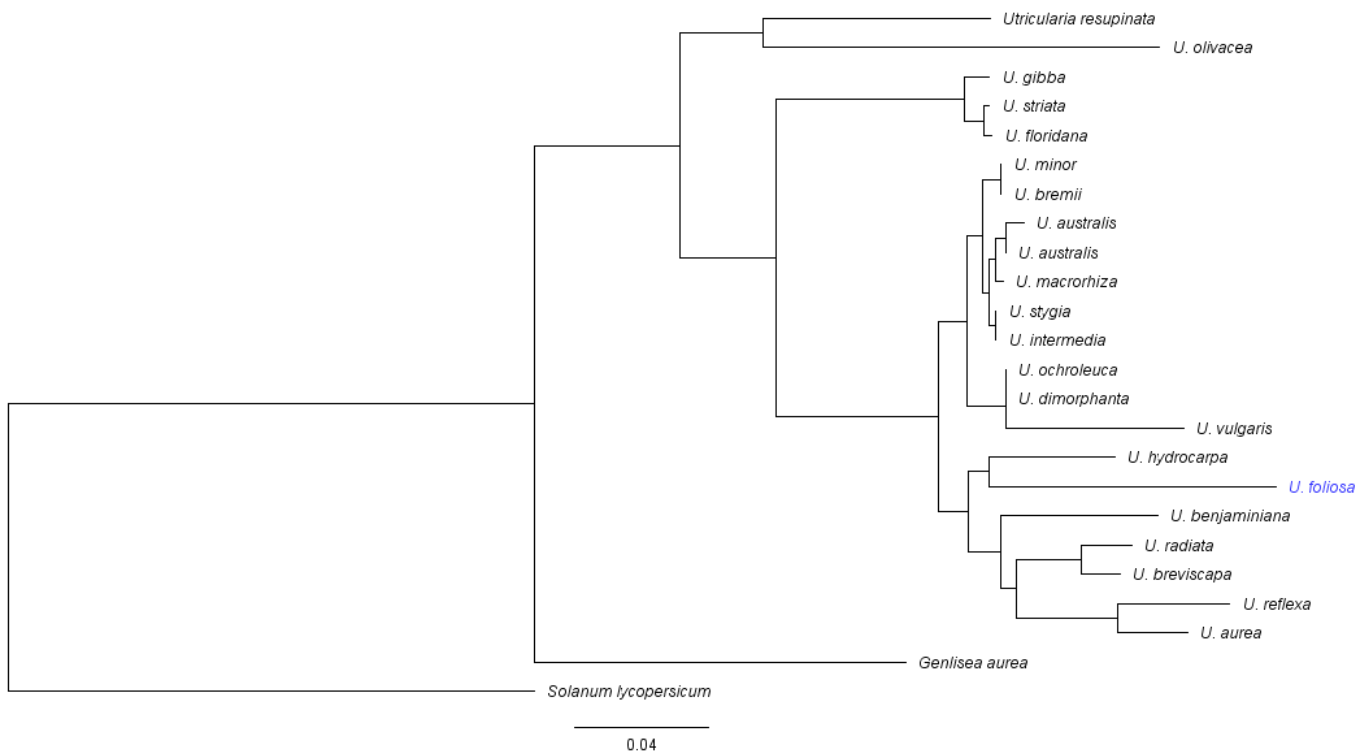


Fig. 19. Filograma de máxima verossimilhança baseado no gene nuclear *RPB2*. Os comprimentos dos ramos correspondem ao número de substituições nucleotídicas que ocorreu ao longo da evolução de cada terminal. As espécies empregadas nos ensaios relativos à mensuração do conteúdo de H_2O_2 nos órgãos estão destacadas em azul.

5.3. Correlação entre o conteúdo de H_2O_2 nas folhas e o comprimento de ramos

Foi produzido um gráfico que representa o conjunto de dados, após modelagem utilizando regressão linear (fig. 20). Obteve-se um $R^2_a = 0,766$, indicando que o modelo consegue explicar 76,6% dos dados.

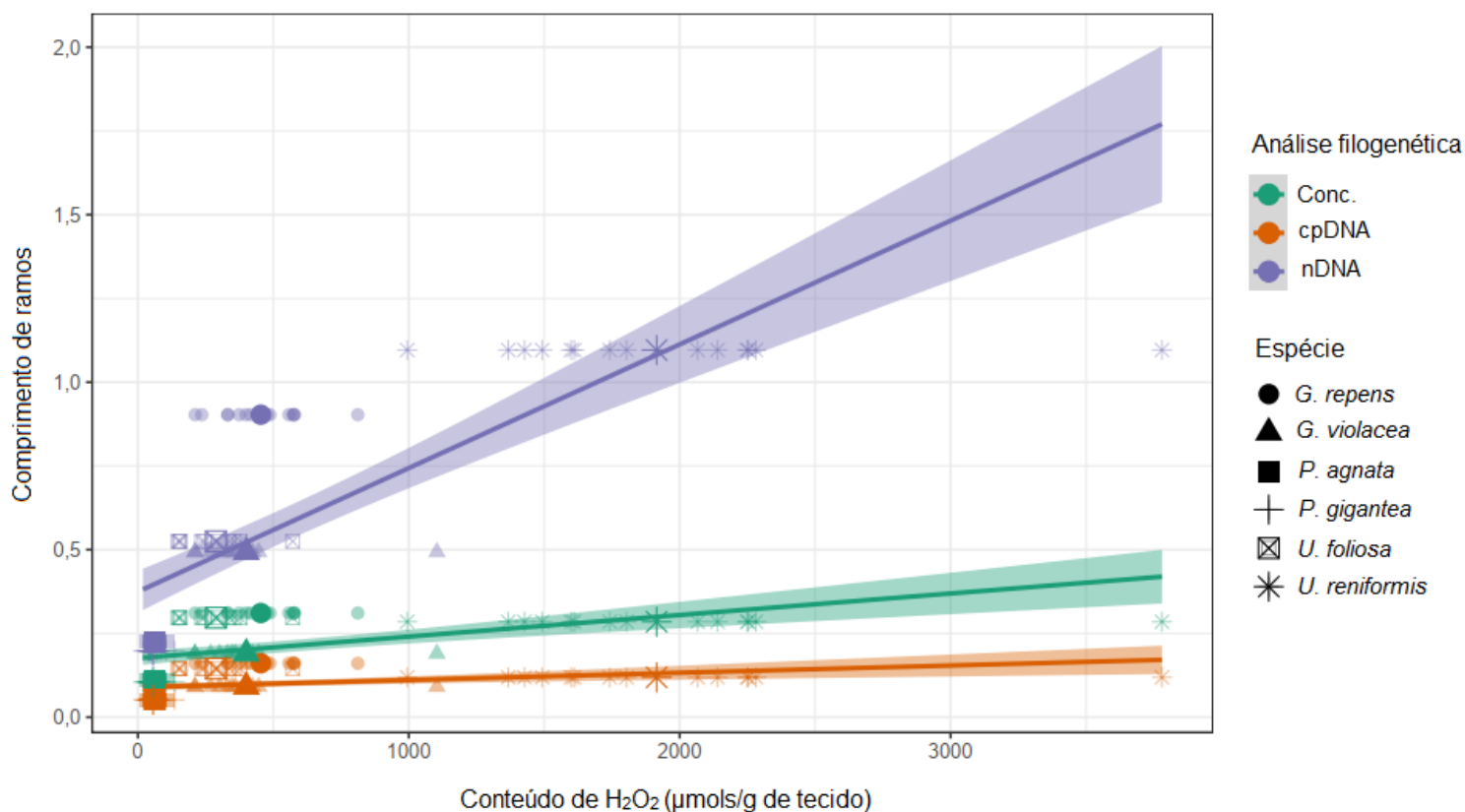


Fig. 20. Conteúdo de H_2O_2 (eixo X) por comprimento de ramos (eixo Y) de cada análise filogenética empregada (Conc. [todos os dados concatenados], cpDNA e nDNA) separados por cor e com retas de regressão linear. Foram utilizados os valores de conteúdo de H_2O_2 de todos os indivíduos de cada espécie para o desenvolvimento das retas (sinais representando cada espécie no gráfico), considerando assim as variâncias.

Pôde-se observar esse conjunto de dados de forma separada e calcular as correlações para cada tipo de medição do comprimento de ramos (tab. 8). Observou-se que a filogenia cujos valores de comprimento de ramos ficam melhores ajustados numa reta foi a baseada em dados do nDNA. O fato de a reta baseada nos valores do cpDNA estar quase na horizontal é um indicativo de baixa correlação. Os valores de correlação (R) das análises baseadas no conjunto de todos os dados concatenados e no nDNA são maiores que 0,5 (tab. 8), indicando que existe correlação positiva entre o conteúdo de H_2O_2 nas folhas das seis espécies estudadas e o comprimento de ramos nessas análises filogenéticas.

Tabela 8. Correlação para o comprimento de ramos de cada análise filogenética e o conteúdo de H₂O₂ nas folhas.

Análises filogenéticas	R-quadrado	R ou Correlação
Dados concatenados	0,28	0,53
cpDNA	0,12	0,35
nDNA	0,71	0,84

Existem poucos trabalhos que fazem correlações entre o comprimento de ramos em uma filogenia e outras variáveis. Balandraud et al. (2005) encontraram correlação entre o comprimento de ramos na filogenia de uma família gênica e o nível de expressão de cada *locus*. Omland (1997) encontrou correlação entre a taxa de transformações morfológicas e a taxa de evolução molecular no DNA em sete dos oito grupos que estudou, porém essa correlação é questionada por Bromham et al. (2002). Analisando dados de 81 genes de 64 genomas plastidiais de angiospermas, Jansen et al. (2007) encontraram correlação entre o comprimento de ramos e o número de deleções de genes e íntrons, modificações no posicionamento de genes e ocorrência de *indels*. Yu et al. (2019) encontraram correlação positiva entre maiores taxas de evolução molecular e rearranjos genômicos no cpDNA de um grupo de algas, porém não foi encontrada essa correlação com o tamanho desses plastomas.

É conhecida a relação entre a ocorrência de maiores taxas de substituições nucleotídica e a diminuição de genomas (DRAKE, 1991; DRAKE et al., 1998; DUFRESNE et al., 2005; LYNCH et al., 2006), existindo inclusive a discussão acerca das altas taxas de substituição encontradas em linhagens de Lentibulariaceae e a contração genômica que ocorreu no grupo, com a hipótese de modulação por ERO (ALBERT et al., 2010; IBARRA-LACLETTE et al., 2011a; IBARRA-LACLETTE et al., 2011b; VELEBA et al., 2014). Nossos resultados mostram correlação positiva entre o comprimento de ramos e o conteúdo de H₂O₂ nas folhas de seis espécies de Lentibulariaceae (tab. 8), porém foram encontradas evidências de que a origem dessas ERO é mais relacionada à fotossíntese do que à alta demanda energética dos utrículos em *Utricularia*, que possuem altas taxas respiratórias (ADAMEC, 2006; ALBERT et al., 2010). Nesse sentido, considera-se válida a hipótese de modulação das transformações

genômicas em linhagens de Lentibulariaceae por ERO, porém a origem desses compostos nos órgãos das espécies é majoritariamente relacionada à fotossíntese, e não à carnivoría.

5.4. Origem do H₂O₂ nos órgãos de *Utricularia foliosa*

Os resultados que compararam o conteúdo de H₂O₂ nos diferentes órgãos de *Utricularia* (tab. 3) e de *Genlisea* (tab. 4) sugerem uma maior importância da fotossíntese no acúmulo dessa substância. Observou-se um maior acúmulo dessa ERO nos estolões e nos utrículos de *U. foliosa*, uma espécie aquática, quando em relação aos mesmos órgãos de *U. reniformis*, que é terrestre. Por se tratar de uma espécie aquática livre, que vive próxima à superfície de rios e lagos, *U. foliosa* possui esses órgãos clorofilados, contribuindo com a fotossíntese, a despeito dos mesmos órgãos em *U. reniformis*, que são subterrâneos e apigmentados. Portanto, o maior acúmulo de H₂O₂ nos estolões e utrículos de *U. foliosa* é mais um indicativo de que a fotossíntese está relacionada à produção de parte considerável dessa ERO. Para que fosse testada essa hipótese, foi realizado um ensaio utilizando *U. foliosa* como modelo. Um *n* de 15 indivíduos dessa espécie aquática foi mantido em bandejas com água, e submetido a uma exposição de 12 horas à luz branca (fig. 4), tendo três tipos de órgãos amostrados em seguida (fig. 5). Imediatamente após esse procedimento, os mesmos indivíduos foram expostos ao escuro absoluto por 12 horas, ocorrendo amostragem dos mesmos órgãos em seguida. O conteúdo de H₂O₂ nos órgão foi mensurado, nos dois tratamentos, e as análises estatísticas não encontraram diferença significativa entre os valores das plantas quando submetidas à luz e quando submetidas ao escuro (teste F não significativo; nível de significância $\alpha = 0,05\%$; tabs. 9, 10 e 11). O coeficiente de variação da análise foi de 17%.

Tab. 9. Acúmulo de H₂O₂ nas folhas fotossintetizantes de *Utricularia foliosa* sob dois tratamentos. Médias seguidas de mesmas letras não diferiram entre si, com nível de significância $\alpha = 0,05$. Médias comparadas por teste de Tukey. $n = 15$ por tratamento

Tratamentos	Médias	Grupos
Folhas – 12 h de luz	5,22	a
Folhas – 12 h de escuro	5,17	a

Tab. 10. Acúmulo de H₂O₂ nos utrículos de *Utricularia foliosa* sob dois tratamentos. Médias seguidas de mesmas letras não diferiram entre si, com nível de significância $\alpha = 0,05$. Médias comparadas por teste de Tukey. $n = 15$ por tratamento

Tratamentos	Médias	Grupos
Utrículos – 12 h de luz	4,56	a
Utrículos – 12 h de escuro	4,24	a

Tab. 11. Acúmulo de H₂O₂ nos estolões de *Utricularia foliosa* sob dois tratamentos. Médias seguidas de mesmas letras não diferiram entre si, com nível de significância $\alpha = 0,05$. Médias comparadas por teste de Tukey. $n = 15$ por tratamento

Tratamentos	Médias	Grupos
Estolões – 12 h de luz	3,83	a
Estolões – 12 h de escuro	3,78	a

As reações redox que ocorrem nos cloroplastos durante a fotossíntese são uma fonte conhecida e bastante estudada de ERO, existindo um sistema complexo para manter os níveis dessas substâncias em patamares homeostáticos, através de enzimas e moléculas antioxidantes (KHOROBRYKH et al., 2020). Esse equilíbrio é importante inclusive para manter altas taxas fotossintéticas. Vários estudos que observaram a produção fotossintética de ERO concentraram-se principalmente na discussão acerca dos efeitos deletérios dessas moléculas, como sua toxicidade e sua capacidade de ocasionar danos celulares, e devido a essa ótica é comum o uso dos termos “estresse oxidativo” ou “dano oxidativo”. Os estudos mais atuais tendem a interpretar a produção fotossintética de ERO como um mecanismo de sinalização essencial, pois essas

moléculas possuem um importante papel regulatório durante os processos de captação e utilização da energia em plantas (FOYER; SHIGEOKA, 2011). A função sinalizadora das ERO vem sendo discutida em diversos organismos (MITTLER et al., 2011).

As reações que captam a energia solar nos seres autótrofos durante a fotossíntese são responsáveis pela manutenção de toda cadeia de transferência energética que sustenta a vida na Terra. A energia luminosa promove a excitação das clorofilas nos fotossistemas I e II, levando-as a um nível de energia que resulta na transferência de elétrons destas para as enzimas da cadeia transportadora de elétrons da fotossíntese (CTEF). Os elétrons perdidos pelas clorofilas do fotossistema II são repostos pelos oriundos da fotólise da água, que além de elétrons produz O_2 e prótons (H^+), utilizados para a produção do gradiente eletroquímico necessário à produção de ATP. Isso ocorre por meio da transferência desses prótons dos tilacóides, onde a hidrólise ocorre, para o estroma, através da ATP sintase. Já os elétrons perdidos pelas clorofilas do fotossistema I são repostos por aqueles oriundos do fotossistema II pela CTEF, e sua energia é utilizada para a produção de NADPH. Nesse processo a energia luminosa é transportada por uma série de reações redox a fim de que se produza energia química, armazenada nas moléculas de ATP e NADPH (ALLEN, 2002). Tanto o ATP quanto o NADPH que são produzidos durante a fase dependente da luz na fotossíntese, são utilizados durante o ciclo de Calvin para que o carbono oriundo do CO_2 seja fixado, produzindo açúcares (GEIGER; SERVAITES, 1994). Existem mecanismos celulares que regulam a CTEF, para que se minimize a produção de ERO resultantes desta, principalmente o oxigênio singleto (1O_2) durante o fotossistema II e o radical superóxido (O_2^-) e H_2O_2 durante o fotossistema I (FOYER; SHIGEOKA, 2011). Além disso, quando estes são produzidos, existem os mecanismos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos de controle dos níveis desses compostos nas células (JALEEL et al., 2009; KHOROBRYKH et al., 2020). No caso do H_2O_2 , as plantas evoluíram diversos mecanismos para ter um controle bastante eficiente dos níveis dessa substância, sendo muito mais tolerantes a esta do que os animais. Existem diversas origens desse composto nas células vegetais, com forte influência ambiental em cada uma dessas fontes (FOYER; NOCTOR, 2003). Devido à

complexidade desse sistema, é extremamente difícil inferir a origem do H_2O_2 em órgãos vegetais.

Apesar de os ensaios com *Utricularia foliosa* não demonstrarem diferença estatística no conteúdo de H_2O_2 nos órgãos entre um grupo de indivíduos induzidos à fotossíntese e depois submetidos ao escuro absoluto (tabs. 9, 10 e 11), os resultados comparando o conteúdo de H_2O_2 entre órgãos em *Genlisea* e *Utricularia* apontam para uma maior importância da fotossíntese (tabs. 3 e 4). Uma possível explicação para a falta de significância estatística pode ser a incapacidade dos sistemas antioxidantes reduzirem os níveis de H_2O_2 nos órgãos sob as condições do ensaio.

5.5. Influência do hábito no acúmulo de H_2O_2 nas folhas

Os resultados relativos ao acúmulo de H_2O_2 em três tipos de órgãos (folhas fotossintetizantes, estolões e utrículos) de duas espécies de *Utricularia* (*U. foliosa* e *U. reniformis* – tab. 3) demonstraram que este foi maior nas folhas fotossintetizantes de ambas as espécies. *U. reniformis*, que é uma espécie terrestre, possui um acúmulo maior dessa substância nas folhas fotossintetizantes quando em relação a *U. foliosa*, que é aquática, e isso pode ter relação com o hábito. Macrófitas e algas podem perder o H_2O_2 , substância potencialmente tóxica, por difusão no ambiente aquático (COLLÉN; PEDERSÉN, 1996). Por conta disso, realizou-se um ensaio utilizando uma espécie de planta “anfíbia”, ou seja, que pode ser cultivada tanto em submersão, como se fosse uma planta aquática, quanto sobre um substrato úmido. *U. graminifolia* é um modelo ideal para esse caso, e foi cultivada sob as duas condições (fig. 6).

Os resultados claramente indicam que, quando cultivada sob um substrato úmido, *U. graminifolia* acumula mais H_2O_2 nas folhas do que quando os indivíduos são cultivados submersos (teste F significativo; nível de significância $\alpha = 0,05\%$; tab. 12), corroborando a hipótese de que o ambiente aquático ajuda as plantas a perderem essa ERO por difusão. O coeficiente de variação foi de 88%.

Tab. 12. Acúmulo de H₂O₂ nas folhas de *Utricularia graminifolia* sob dois tipos de cultivo. Médias seguidas de mesmas letras não diferiram entre si, com nível de significância $\alpha = 0,05$. Médias comparadas por teste de Tukey. $n = 5$ por tratamento

Tratamentos	Médias	Grupos
Cultivo como planta terrestre (sobre substrato úmido)	329,7787	a
Cultivo como planta aquática (em submersão)	69,6462	b

O H₂O₂ é uma substância mutagênica (STAVREVA; GICHNER et al., 2002), portanto seu acúmulo nos órgãos pode ser um fator de indução à variabilidade genética, tornando-se assim benéfico no sentido de aumentar a capacidade adaptativa de uma população, como ocorre em microrganismos (ČÁP et al., 2012). A possível superprodução de ERO vem sendo associada às altas taxas mutacionais que ocorrem nos genomas de espécies do clado *Genlisea-Utricularia* (ALBERT et al., 2010), e esse acúmulo de mutações no DNA pode estar associado à contração genômica que ocorreu em espécies do grupo (FLEISCHMANN et al., 2014; GREILHUBER et al., 2006; IBARRA-LACLETTE et al., 2011b; IBARRA-LACLETTE et al., 2013; LEUSHKIN et al., 2013; SILVA et al. 2020; VELEBA et al., 2014) e à diversificação de linhagens e irradiação adaptativa ocorrida neste (JOBSON; ALBERT, 2002). Nesse sentido, o fato de que o ambiente terrestre leva a um maior acúmulo de ERO nos órgãos de plantas nos leva a supor que linhagens terrestres de um mesmo clado tendem a possuir maior variabilidade genética do que linhagens relacionadas que se tornaram aquáticas, inclusive sofrendo mais cladogêneses, porém essa hipótese deve ser testada por estudos subsequentes.

6. CONCLUSÕES

Existe correlação positiva entre o acúmulo de H_2O_2 nas folhas de espécies de Lentibulariaceae e o comprimento de ramos na filogenia do grupo, que está associado à taxa de substituição nucleotídica. Essa associação provavelmente se relaciona ao efeito mutagênico dessa ERO, portanto a hipótese de que as ERO estariam fazendo com que essas espécies possuam altas taxas de substituição nucleotídica e sofram contração genômica é fortalecida. Contudo, não existe associação entre a produção de ERO e a alta demanda energética ocasionada pela carnivoría. As folhas fotossintetizantes são os órgãos que mais acumulam H_2O_2 em *Genlisea* e em *Utricularia*, e não as armadilhas.

O ambiente aquático diminui o acúmulo de H_2O_2 nos órgãos de plantas, provavelmente devido à difusão. Esse resultado é enfatizado pelo maior acúmulo dessa ERO nas folhas de uma espécie terrestre de *Utricularia* quando comparada a uma espécie aquática. Devido ao efeito mutagênico das ERO, supõe-se que linhagens de plantas terrestres tendem possuir maior variabilidade genética do que grupos filogeneticamente relacionados que se tornaram aquáticos. Portanto, o hábito pode ter grande importância na adaptabilidade e diversificação de plantas.

7. REFERÊNCIAS

- ADAMEC, L.; SIROVÁ, D.; VRBA, J.; REJMÁNKOVÁ, E. Enzyme production in the traps of aquatic *Utricularia* species. **Biologia**, v. 65, n. 2, p. 273-278, 2010.
- 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.
- ADAMEC, L. The smallest but fastest: Ecophysiological characteristics of traps of aquatic carnivorous *Utricularia*. **Plant signaling & behavior**, v. 6, n. 5, p. 640-646, 2011.
- AGRAWAL, G. K.; IWAHASHI, H.; RAKWAL, R. Small GTPase 'Rop': molecular switch for plant defense responses. **FEBS letters**, v. 546, n. 2-3, p. 173-180, 2003.
- 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. p. 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.
- ALLEN, J. F. Photosynthesis of ATP—electrons, proton pumps, rotors, and poise. **Cell**, v. 110, n. 3, 273-276, 2002.

ALEXIEVA, V.; SERGIEV, I.; MAPELLI, S.; KARANOV, E. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. **Plant, Cell & Environment**, v. 24, n. 12, p. 1337-1344, 2001.

ALKHALAF, I. A.; HÜBENER, T.; POREMBSKI, S. Prey spectra of aquatic Utricularia species (Lentibulariaceae) in northeastern Germany: The role of planktonic algae. **Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 204, n. 9, p. 700-708, 2009.

ALVES, L. R.; PRADO, E. R.; OLIVEIRA, R.; SANTOS, E. F.; SOUZA, I. L.; REIS, A. R., AZEVEDO, R. A; GRATÃO, P. L. Mechanisms of cadmium-stress avoidance by selenium in tomato plants. **Ecotoxicology**, p. 1-13, 2020a.

ALVES, R. D. C.; NICOLAU, M. C. M.; CHECCHIO, M. V.; SOUSA JUNIOR, G. D. S.; OLIVEIRA, F. D. A. D.; PRADO, R. M.; GRATÃO, P. L. Salt stress alleviation by seed priming with silicon in lettuce seedlings: an approach based on enhancing antioxidant responses. **Bragantia**, v. 79, n. 1, p. 19-29, 2020b.

ASADA, K. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. **Plant physiology**, v. 141, p. 391-396, 2006.

BALANDRAUD, N.; GOURET, P.; DANCHIN, E. G. J.; BLANC, M.; ZINN, D.; ROUDIER, J.; PONTAROTTI, P. A rigorous method for multigenic families' functional annotation: the peptidyl arginine deiminase (PADs) proteins family example. **BMC genomics**, v. 6, n. 1, p.153, 2005.

BARBOSA M. R.; SILVA M. M. A.; WILLADINO L.; ULISSES C.; CAMARA T. R. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, v. 44, p. 453-460, 2014.

BARCELÓ, A. R. Hydrogen peroxide production is a general property of the lignifying xylem from vascular plants. **Annals of Botany**, v. 82, n. 1, p. 97-103, 1998.

BARTHET, M. M.; HILU, K. W. Expression of matK: functional and evolutionary implications. **American Journal of Botany**, v. 94, n. 8, p. 1402-1412, 2007.

BAUWE, H.; HAGEMANN, M.; FERNIE, A. R. Photorespiration: players, partners and origin. **Trends in plant science**, v. 15, p. 330-336, 2010.

BERG, O.; BROWN, M. D.; SCHWANER, M. J.; HALL, M. R.; MÜLLER, U. K. Hydrodynamics of the bladderwort feeding strike. **Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology**, v. 333, n. 1, p. 29-37, 2020.

BOLWELL, G. P.; BINDSCHEDLER, L. V.; BLEE, K. A.; BUTT, V. S.; DAVIES, D. R.; GARDNER, S. L.; GUERRISH, C.; MINIBAYEVA, F. The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. **Journal of experimental botany**, v. 53, n. 372, p. 1367-1376, 2002.

BROMHAM, L.; WOOLFIT, M.; LEE, M. S.; RAMBAUT, A. Testing the relationship between morphological and molecular rates of change along phylogenies. **Evolution**, v. 56, n.10, p. 1921-1930, 2002.

ČÁP, M.; VÁCHOVÁ, L.; PALKOVÁ, Z. Reactive oxygen species in the signaling and adaptation of multicellular microbial communities. **Oxidative medicine and cellular longevity**, 2012.

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.

CHEESEMAN, J. M. Hydrogen peroxide concentrations in leaves under natural conditions. **Journal of experimental botany**, 57, p. 2435-2444, 2006.

CHEN, Z.; GALLIE, D. R. The ascorbic acid redox state controls guard cell signaling and stomatal movement. **The Plant Cell**, v. 16, n. 5, p. 1143-1162, 2004.

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**, v. 92, p. 1723–1736, 2005.

CLIVATI, D.; CORDEIRO, G. D.; PŁACHNO, B. J.; MIRANDA, V. F. O. Reproductive biology and pollination of *Utricularia reniformis* A.St.-Hil. (Lentibulariaceae). **Plant Biology**, v. 16, n. 3, p. 677-682, 2014.

COLLÉN, J.; PEDERSÉN M. Production, scavenging and toxicity of hydrogen peroxide in the green seaweed *Ulva rigida*. **European Journal of Phycology**, v. 31, p. 265-271, 1996.

DELPRATO, M. L.; KRAPP A. R.; CARRILLO, N. Green Light to Plant Responses to Pathogens: The Role of Chloroplast Light-Dependent Signaling in Biotic Stress. **Photochemistry and photobiology**, v. 91, p. 1004-1011, 2015.

DESMOND, O. J.; MANNERS, J. M.; STEPHENS, A. E.; MACLEAN, D. J.; SCHENK, P. M.; GARDINER, D. M.; MUNN, A. L.; KAZAN, K. The *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol elicits hydrogen peroxide production, programmed cell death and defence responses in wheat. **Molecular plant pathology**, v. 9, n. 4, p. 435-445, 2008.

DRAKE, J. W. A constant rate of spontaneous mutation in DNA-based microbes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 88, n. 16, p. 7160-7164, 1991.

DRAKE, J. W.; CHARLESWORTH, B.; CHARLESWORTH, D.; CROW, J. F. Rates of spontaneous mutation. **Genetics**, v. 148, n. 4, p. 1667-1686, 1998.

DUFRESNE, A.; GARCZAREK, L.; PARTENSKY, F. Accelerated evolution associated with genome reduction in a free-living prokaryote. **Genome biology**, v. 6, n. 2, p. R14, 2005.

EHLERINGER J. R; CERLING T. E. C3 and C4 photosynthesis. **Encyclopedia of global environmental change**, v. 2, p. 186-190, 2002.

ELLISON, A. M.; ADAMEC, L. **Carnivorous Plants: physiology, ecology, and evolution**. Oxford University Press, 2018.

FAROOQ, M. A.; NIAZI, A. K.; AKHTAR, J.; FAROOQ, M.; SOURI, Z.; KARIMI, N.; RENGEL, Z. Acquiring control: The evolution of ROS-Induced oxidative stress and redox signaling pathways in plant stress responses. **Plant Physiology and Biochemistry**, 2019.

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

FISCHER, E.; POREMBSKI, S.; BARTHLOTT, W. Revision of the genus *Genlisea* (Lentibulariaceae) in Africa and Madagascar with notes on ecology and phytogeography. **Nordic Journal of Botany**, v. 20, n. 3, p. 291-318, 2000.

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, 2012.

FLEISCHMANN, A.; ROCCIA, A. Systematics and evolution of Lentibulariaceae: I. Pinguicula. **Carnivorous plants: physiology, ecology, and evolution**, p. 70-80, 2018.

FLEISCHMANN, A.; SCHÄFERHOFF, B.; HEUBL, G.; RIVADAVIA, F.; BARTHLOTT, W.; MÜLLER, K. F. Phylogenetics and character evolution in the carnivorous plant genus *Genlisea* A. St.-Hil. (Lentibulariaceae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 56, n. 2, p. 768-783, 2010.

FLEISCHMANN, A. Taxonomic *Utricularia* news. **Carnivorous Plant Newsletter**, v. 44, p. 13-16, 2015.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. **Physiologia plantarum**, v. 119, n. 3, p. 355-364, 2003.

FOYER, C. H.; SHIGEOKA, S. Understanding oxidative stress and antioxidant functions to enhance photosynthesis. **Plant physiology**, v. 155, n. 1, p. 93-100, 2011.

FRIDAY, L. E. The size and shape of traps of *Utricularia vulgaris* L. **Functional ecology**, p. 602-607, 1991.

FROMM-TRINTA, E. **Revisão do gênero *Genlisea* St.-Hil. (Lentibulariaceae) no Brasil**. 1981.

GAY, C.; COLLINS, J.; GEBICKI, J. M. Hydroperoxide assay with the ferric-xylenol orange complex. **Analytical biochemistry**, v. 273, n. 2, p. 149-155, 1999.

GARG, N.; MANCHANDA, G. ROS generation in plants: boon or bane?. **Plant Biosystems**, v. 143, n. 1, p. 81-96, 2009.

GEIGER, D. R.; SERVAITES, J. C. Diurnal regulation of photosynthetic carbon metabolism in C3 plants. **Annual review of plant biology**, v. 45, n. 1, 235-256, 1994.

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

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.

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

HOFMANN, N. R. The Evolution of Photorespiratory Glycolate Oxidase Activity. **Plant Cell**, p. 1, 2011.

HSU, G. W.; OBER, M.; CARELL, T.; BEESE, L. S. Error-prone replication of oxidatively damaged DNA by a high-fidelity DNA polymerase. **Nature**, v. 431, n. 7005, p. 217-221, 2004.

HUANG, H.; ULLAH, F.; ZHOU, D. X.; YI, M.; ZHAO, Y. Mechanisms of ROS regulation of plant development and stress responses. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, 2019.

IBARRA-LACLETTE, E., ALBERT, V. A., HERRERA-ESTRELLA, A.; HERRERA-ESTRELLA, L. Is GC bias in the nuclear genome of the carnivorous plant *Utricularia* driven by ROS-based mutation and biased gene conversion? **Plant signalling & behavior**, v. 6, n. 11, p. 1631-1634, 2011a.

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, 2011b.

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

JALEEL C. A.; RIADH K.; GOPI R.; MANIVANNAN P.; INES J.; AL-JUBURI H. J.; PANNEERSELVAM R. Antioxidant defense responses: physiological plasticity in higher plants under abiotic constraints. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 31, p. 427-436, 2009.

JANA, S.; CHOUDHURI, M. A. Glycolate metabolism of three submersed aquatic angiosperms during ageing. **Aquatic Botany**, v. 12, p. 345-354, 1982.

JANSEN, R. K.; CAI, Z.; RAUBESON, L. A.; DANIELL, H.; DEPAMPHILIS, C. W.; LEEBENS-MACK, J.; MUÜLLER, K. F.; GUISSINGER-BELLIAN, M.; HABERLE, R. C.; HANSEN, A. K.; CHUMLEY, T. W.; LEE, S.; PEERY, R.; MCNEAL, J. R.; KUEHL, J. V.; BOORE, J. L. Analysis of 81 genes from 64 plastid genomes resolves relationships in angiosperms and identifies genome-scale evolutionary patterns. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 49, p. 19369-19374, 2007.

JOBSON, R. W.; ALBERT, V. A. Molecular Rates Parallel Diversification Contrasts between Carnivorous Plant Sister Lineages. **Cladistics**, v. 18, p. 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**, v. 28, p. 157–171, 2003.

JUDD, W. S.; SKEAN JR, J. D.; MCMULLEN, C. K.; GRIFFIN III, D. G.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F.; DONOGHUE, M. J. **Plant systematics: a phylogenetic approach**, 2nd ed. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts, USA, 2002.

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**, v. 119, n. 4, p. 357-362, 2006.

KAPOOR, D.; SINGH, S.; KUMAR, V.; ROMERO, R.; PRASAD, R.; SINGH, J. Antioxidant enzymes regulation in plants in reference to reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS). **Plant Gene**, v. 19, 2019.

KARANJAWALA, Z. E.; MURPHY, N.; HINTON, D. R.; HSIEH, C. L.; LIEBER, M. R. Oxygen metabolism causes chromosome breaks and is associated with the

neuronal apoptosis observed in DNA double-strand break repair mutants. **Current biology**, v. 12, n. 5, p. 397-402, 2002.

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.

KELLER, J., ROUSSEAU-GUEUTIN, M.; MARTIN, G. E.; MORICE, J.; BOUTTE, J.; COISSAC, E.; OURARE, M; AÏNOUCHE, M; SALMON, A.; CABELLO-HURTADO, F.; AÏNOUCHE, A. The evolutionary fate of the chloroplast and nuclear rps16 genes as revealed through the sequencing and comparative analyses of four novel legume chloroplast genomes from *Lupinus*. *Dna Research*, v. 24, n. 4, 343-358, 2017.

KHOROBYKH, S., HAVURINNE, V., MATTILA, H., & TYYSTJÄRVI, E. Oxygen and ROS in Photosynthesis. **Plants**, v. 9, n. 1, p. 91, 2020.

KRISTIANSEN, K. A.; JENSEN, P. E.; MØLLER, I. M.; SCHULZ, A. Monitoring reactive oxygen species formation and localisation in living cells by use of the fluorescent probe CM-H₂DCFDA and confocal laser microscopy. **Physiologia plantarum**, v. 136, n. 4, p. 369-383, 2009.

KRÓL, E.; PŁACHNO, B. J.; ADAMEC, L.; STOLARZ, M.; DZIUBIŃSKA, H.; TRĘBACZ, K. Quite a few reasons for calling carnivores 'the most wonderful plants in the world'. **Annals of Botany**, v. 109, n. 1, p. 47-64, 2011.

KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Molecular biology and evolution**, v. 35, n. 6, p. 1547-1549, 2018.

KHURANA, J. S.; WANG, X.; CHEN, X.; PERLMAN, D. H.; LANDWEBER, L. F. Transcription-independent functions of an RNA polymerase II subunit, Rpb2, during genome rearrangement in the ciliate, *Oxytricha trifallax*. **Genetics**, v. 197, n. 3, p. 839-849, 2014.

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. 6, 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.

LI, L., TAN; Y. H., MENG; H. H.; MA, H.; LI, J. Two new species of *Alseodaphnopsis* (Lauraceae) from southwestern China and northern Myanmar: evidence from morphological and molecular analyses. **PhytoKeys**, v. 138, p. 27, 2020.

LINDAHL, T. Instability and decay of the primary structure of DNA. **Nature**, v. 362, n. 6422, p. 709-715, 1993.

LIU, Y.-H.; OFFLER, C. E.; RUAN, Y.-L. A simple, rapid, and reliable protocol to localize hydrogen peroxide in large plant organs by DAB-mediated tissue printing. **Frontiers in plant science**, v. 5, p. 745, 2014.

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

LUSTOFIN, K.; ŚWIĄTEK, P.; MIRANDA, V. F. O.; PŁACHNO, B. J. Flower nectar trichome structure of carnivorous plants from the genus butterworts *Pinguicula* L. (Lentibulariaceae). **Protoplasma**, v. 257, n. 1, p. 245-259, 2020.

LYNCH, M.; KOSKELLA, B.; SCHAACK, S. Mutation pressure and the evolution of organelle genomic architecture. **Science**, v. 311, n. 5768, p. 1727-1730, 2006

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.

MATIOLI, S. R.; FERNANDES, F. M. C. **Biologia molecular e evolução**, 2012.

MCPHERSON, S. **Carnivorous plants and their habitats**. London: Redfern natural history Productions, 2010.

MILLER, G. A. D.; SUZUKI, N.; CIFTCI-YILMAZ, S. U. L. T. A. N.; MITTLER, R. O. N. Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. **Plant, cell & environment**, v. 33, n. 4, p. 453-467, 2010.

MITTLER, R.; VANDERAUWERA, S.; SUZUKI, N.; MILLER, G. A. D.; TOGNETTI, V. B.; VANDEPOELE, K.; GOLLERY, M.; SHULAEV, V.; VAN BREUSEGEM, F. ROS signaling: the new wave? **Trends in plant science**, v. 16, n. 6, p. 300-309, 2011.

MÜLLER, K. F.; BORSCH, T.; LEGENDRE, L.; POREMBSKI, S.; BARTHLOTT, W. Recent progress in understanding the evolution of carnivorous Lentibulariaceae (Lamiales). **Plant Biology**, v. 8, n. 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**, v. 6, p. 477-490, 2004.

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**, v. 250, p. 39-67, 2005.

OMLAND, K. E. Correlated rates of molecular and morphological evolution. **Evolution**, v. 51, n. 5, p. 1381-1393, 1997.

OROZCO-CARDENAS, M.; RYAN, C. A. Hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and systemin via the octadecanoid pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 11, p. 6553-6557, 1999.

PEDRENO, M. A.; BARCELO, A. R.; SABATER, F.; MUNOZ, R. Control by pH of cell wall peroxidase activity involved in lignification. *Plant and cell physiology*, v. 30, n. 2, p. 237-241, 1989.

PEREIRA, C. G.; ALMENARA, D. P.; WINTER, C. E.; FRITSCH, P. W.; LAMBERS, H.; OLIVEIRA, R. S. Underground leaves of *Philcoxia* trap and digest nematodes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 4, p. 1154- 1158, 2012.

PEROUTKA, M.; ADLASSNIG, W.; VOLGGER, M.; LENDL, T.; URL, W. G.; LICHTSCHEIDL, I. K. *Utricularia*: a vegetarian carnivorous plant?. **Plant Ecology**, v. 199, n. 2, p. 153-162, 2008.

PETROV V.; HILLE J.; MUELLER-ROEBER B.; GECHEV T. S. ROS-mediated abiotic stress-induced programmed cell death in plants. **Frontiers in plant science**, v. 6, p. 69, 2015.

PETROV, V. D.; VAN BREUSEGEM, F. Hydrogen peroxide—a central hub for information flow in plant cells. **AoB plants**, v. 2012, 2012.

PITZSCHKE, A.; FORZANI, C.; HIRT, H. Reactive oxygen species signaling in plants. **Antioxidants & redox signaling**, v. 8, p. 1757-1764, 2006.

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**, v. 8, p. 813-820, 2006.

PLACHNO, 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.

PLACHNO, B. J.; ŚWIĄTEK, P. Unusual embryo structure in viviparous *Utricularia nelumbifolia*, with remarks on embryo evolution in genus *Utricularia*. **Protoplasma**, v. 239, p. 69-80, 2010.

PLACHNO, B. J.; WOŁOWSKI, K. Algae commensal community in *Genlisea* traps. **Acta Societatis Botanicorum Poloniae**, v. 77, n. 1, 2008.

POPPINGA, S.; WEISSKOPF, C.; WESTERMEIER, A. S.; MASSETER, 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. 140, 2016.

QUEVAL G.; ISSAKIDIS-BOURGUET E.; HOEBERICHTS F. A.; VANDORPE M.; GAKIÈRE B.; VANACKER H.; NOCTOR G. Conditional oxidative stress responses in the *Arabidopsis* photorespiratory mutant *cat2* demonstrate that redox state is a key modulator of daylength-dependent gene expression, and define photoperiod as a crucial factor in the regulation of H₂O₂-induced cell death. **The Plant Journal**, v. 52, p. 640-657, 2007.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL: <http://www.R-project.org/>, 2013.

REIFENRATH, K.; THEISEN, I.; SCHNITZLER, J.; POREMBSKI, S.; BARTHLOTT, W. Trap architecture in carnivorous *Utricularia* (Lentibulariaceae). **Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 201, n. 8, p. 597-605, 2006.

RODRIGUES, F. G.; MARULANDA, N. D. F.; SILVA, S. R.; PŁACHNO, B. J.; ADAMEC, L.; MIRANDA, V. F. O. Phylogeny of the 'orchid-like' bladderworts (gen. *Utricularia* sect. *Orchidioides* and *Iperua*: Lentibulariaceae) with remarks on the stolon–tuber system. **Annals of botany**, v. 120, n. 5, p. 709-723, 2017.

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.

SAKAI, A.; NAKANISHI, M.; YOSHIYAMA, K.; MAKI, H. Impact of reactive oxygen species on spontaneous mutagenesis in *Escherichia coli*. **Genes to Cells**, v. 11, n. 7, p. 767-778, 2006.

SCHRADER, M.; FAHIMI, H. D. Peroxisomes and oxidative stress. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1763, p. 1755-1766, 2006.

SHETTY, N. P.; MEHRABI, R.; LÜTKEN, H.; HALDRUP, A., KEMA; G. H., COLLINGE; D. B.; JØRGENSEN, H. J. L. Role of hydrogen peroxide during the interaction between the hemibiotrophic fungal pathogen *Septoria tritici* and wheat. **New Phytologist**, v. 174, n. 3, p. 637-647, 2007.

SHU-HSIEN, H. U. N. G.; CHIH-WEN, Y. U.; LIN, Chin Ho. Hydrogen peroxide functions as a stress signal in plants. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v. 46, 2005.

SILVA, S. R.; GIBSON, R.; ADAMEC, L.; DOMÍNGUEZ, Y.; MIRANDA, V. F. Molecular phylogeny of bladderworts: a wide approach of *Utricularia*

(Lentibulariaceae) species relationships based on six plastidial and nuclear DNA sequences. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 118, p. 244-264, 2018.

SILVA, S. R.; MORAES, A. P.; PENHA, H. A.; JULIÃO, M. H.; DOMINGUES, D. S.; MICHAEL, T. P.; MIRANDA, V. F. O.; VARANI, A. M. The Terrestrial Carnivorous Plant *Utricularia reniformis* Sheds Light on Environmental and Life-Form Genome Plasticity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 1, p. 3, 2020.

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.; BÁRTA, J.; ŠIMEK, K.; POSCH, T.; PECH, J.; STONE, J.; BOROVEC, J.; ADAMEC, L.; VRBA, J. Hunters or farmers? Microbiome characteristics help elucidate the diet composition in an aquatic carnivorous plant. **Microbiome**, v. 6, n. 1, p. 225, 2018.

SIROVÁ, D.; BOROVEC, J.; ČERNÁ, B.; REJMÁNKOVÁ, E.; ADAMEC, L.; VRBA, J. Microbial community development in the traps of aquatic *Utricularia* species. **Aquatic Botany**, v. 90, p. 129-136, 2009.

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.

SMIRNOFF, N.; ARNAUD, D. Hydrogen peroxide metabolism and functions in plants. **New Phytologist**, v. 221, p. 1197-1214, 2019.

ŠNYRYCHOVÁ, I.; AYAYDIN, F.; HIDEG, É.. Detecting hydrogen peroxide in leaves in vivo—a comparison of methods. **Physiologia plantarum**, v. 135, n. 1, p. 1-18, 2009.

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.

STAVREVA, D. A.; GICHNER, T. DNA damage induced by hydrogen peroxide in cultured tobacco cells is dependent on the cell growth stage. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 514, p. 147-152, 2002.

SUGIURA, N. Further analysis of the data by Akaike's Information Criterion and the finite corrections. **Communications in Statistics, Theory and Methods**, p. 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.

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

THORDAL-CHRISTENSEN, H.; ZHANG, Z.; WEI, Y.; COLLINGE, D. B. Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley—powdery mildew interaction. **The Plant Journal**, v. 11, n. 6, p. 1187-1194, 1997.

TOLBERT, N. E. Microbodies-peroxisomes and glyoxysomes. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 22, p. 45-74, 1971.

VELEBA, A.; BUREŠ, P.; ADAMEC, L.; ŠMARDÁ, P.; LIPNEROVÁ, I.; HOROVÁ, L. Genome size and genomic GC content evolution in the miniature genome-sized family Lentibulariaceae. **New Phytologist**, v. 203, n. 1, p. 22-28, 2014.

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.

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.

WEI, H.; ZHANG, X.; WANG, Y.; LEBWOHL, M. Inhibition of ultraviolet light-induced oxidative events in the skin and internal organs of hairless mice by isoflavone genistein. **Cancer Letters**, v. 185, n. 1, p. 21-29, 2002.

WHITEWOODS, C. D.; GONÇALVES, B.; CHENG, J.; CUI, M.; KENNAWAY, R.; LEE, K.; BUSHELL, C.; YU, M.; PIAO, C.; COEN, E. Evolution of carnivorous traps from planar leaves through simple shifts in gene expression. **Science**, v. 367, n. 6473, p. 91-96, 2020.

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

WINTERBOURN, C. C. The challenges of using fluorescent probes to detect and quantify specific reactive oxygen species in living cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1840, n. 2, p. 730-738, 2014.

WILLEKENS, H.; CHAMNONGPOL, S.; DAVEY, M.; SCHRAUDNER, M.; LANGEBARTELS, C.; VAN MONTAGU M.; INZÉ, D.; VAN CAMP, W. Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C3 plants. **The EMBO journal**, v. 16, p. 4806-4816, 1997.

WOLFE, A. D.; PAMPHILIS, C. W. The effect of relaxed functional constraints on the photosynthetic gene *rbcL* in photosynthetic and nonphotosynthetic parasitic plants. **Molecular Biology and Evolution**, v. 15, n. 10, p. 1243-1258, 1998.

YU, M.; RUHLMAN, T. A.; HAJRAH, N. H.; KHIYAMI, M. A.; SABIR, M. J.; ALBLOWI, M. H.; ALHEBSHI, A. M.; AL-MALKI, A. L.; SABIR, J. S. M.; THERIOT, E. C.; JANSEN, R. K. Nucleotide substitution rates of diatom plastid encoded protein genes are correlated with genome architecture. No. e27636v1, **PeerJ Preprints**, 2019.

ZURBRIGGEN, M. D.; CARRILLO, N.; HAJIREZAEI, M. ROS signaling in the hypersensitive response: when, where and what for?. **Plant signaling & behavior**, v. 5, n. 4, p. 393-396, 2010.