

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

**SISTEMÁTICA, EVOLUÇÃO E BIOLOGIA REPRODUTIVA  
DE *Utricularia* COM ÊNFASE PARA *Utricularia amethystina*  
Salzm. ex A.St.-Hil. & Girard (LENTIBULARIACEAE)**

**Cristine Gobbo Menezes**  
**Bióloga**

**2015**

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

**SISTEMÁTICA, EVOLUÇÃO E BIOLOGIA REPRODUTIVA  
DE *Utricularia* COM ÊNFASE PARA *Utricularia amethystina*  
Salzm. ex A.St.-Hil. & Girard (LENTIBULARIACEAE)**

**Cristine Gobbo Menezes**

**Orientador: Prof. Dr. Vítor Fernandes Oliveira de Miranda**

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)

**2015**

M543s Menezes, Cristine Gobbo  
Sistemática, evolução e biologia reprodutiva de *Utricularia* com ênfase para *Utricularia amethystina* Salzm. ex A.St.-Hil. & Girard (Lentibulariaceae) / Cristine Gobbo Menezes. – – Jaboticabal, 2015  
cxl, 140 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2015  
Orientador: Vítor Fernandes Oliveira de Miranda  
Banca examinadora: Davi Rodrigo Rossato, Eduardo Custódio Gasparino, Maurício Bacci Júnior, Welington Luiz Araújo  
Bibliografia

1. Antocianinas. 2. Genética de populações. 3. Polimorfismo floral. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 631.527:633.87

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

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

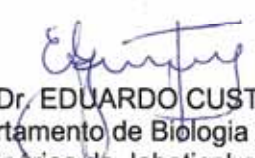
**TÍTULO:** SISTEMÁTICA, EVOLUÇÃO E BIOLOGIA REPRODUTIVA DE Utricularia COM ÊNFASE PARA Utricularia amethystina Salzm. ex A.St.-Hil. & Girard (LENTIBULARIACEAE)

**AUTORA:** CRISTINE GOBBO MENEZES

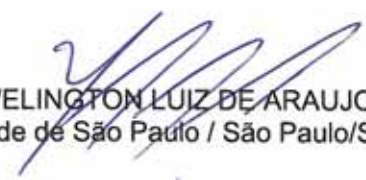
**ORIENTADOR:** Prof. Dr. VITOR FERNANDES OLIVEIRA DE MIRANDA

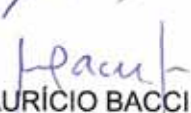
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM AGRONOMIA (GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS) , pela Comissão Examinadora:

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

  
Prof. Dr. EDUARDO CUSTODIO GASPARINO  
Departamento de Biologia Aplicada À Agropecuária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

  
Prof. Dr. DAVI RODRIGO ROSSATTO  
Departamento de Biologia Aplicada À Agropecuária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

  
Prof. Dr. WELINGTON LUIZ DE ARAUJO  
Universidade de São Paulo / São Paulo/SP

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

Data da realização: 06 de fevereiro de 2015.

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**CRISTINE GOBBO MENEZES** é natural de São Paulo, Estado de São Paulo, e nascida à 17 de dezembro de 1983. A curiosidade pelas plantas começou no jardim do seu avô Dante e se estendeu para sua pequena biblioteca. Paixão e curiosidades que a levaram a se graduar no ano de 2007 em Ciências Biológicas (Licenciatura) pela Universidade de Mogi das Cruzes (UMC) e concluir o Bacharelado em Ciências Biológicas no ano seguinte pela mesma instituição. Em 2009 assistiu ao curso “Genética de la conservación y sus aplicaciones” na Universidad del Comahue (Argentina) com bolsa pela “Red Latinoamericana de Botánica”. Em 2010, também pela UMC, obteve título de Mestre em Biotecnologia sob orientação do Prof. Dr. Vítor Fernandes Oliveira de Miranda. No ano seguinte, 2011, ingressou no doutorado em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) pela UNESP, câmpus Jaboticabal, novamente sob orientação do Prof. Dr. Vítor Fernandes Oliveira de Miranda. Em 2013 estagiou no laboratório do Prof. Dr. Claude DePamphilis (Pennsylvania State University, Estados Unidos) durante 7 meses (doutorado-sanduíche) financiada pelo programa Ciência sem Fronteiras (CNPq). Em 2014 passou a integrar a equipe de atualização e revisão da Lista de Espécies da Flora do Brasil (Família Lentibulariaceae). Interessa-se por genética vegetal, de populações e de conservação, expressão gênica, além de sistemática vegetal, especialmente da família Lentibulariaceae.

“If we knew what we were doing, it wouldn’t be called Research”.

Albert Einstein

*Ao meus pais Martinho e Cristina, ao meu querido vô Dante, ao meu fiel  
companheiro Victor, dedico.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à Capes (DS) e ao CNPq (Processos 141884/2012-6 e 245991/2012-3) o suporte financeiro. Aos herbários HB, INPA, IPA, MG, SPF e UB o empréstimo de exsicatas e disponibilização de fotos.

Agradeço a disponibilização e infraestrutura para o desenvolvimento deste trabalho aos professores e responsáveis pelos: Laboratório de Morfologia (DBAA), Laboratório de Genética de Microorganismos (DBAA), Laboratório de Bioquímica de Plantas e Microorganismos (Tecnologia), Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (Tecnologia), Laboratório Multiusuário de Microscopia Eletrônica (Unesp/FCAV). Agradeço também aos técnicos Eliane, João Carlos, Rosely, Márcia, Cláudia e Paula que muito me ensinaram e colaboraram para o desenvolvimento do trabalho.

Agradeço também ao professor Claude dePamphilis e à sua equipe (Plant Molecular Evolution and Systematics Lab, Pennsylvania State University, EUA) pelas discussões valiosas e infraestrutura oferecida durante o doutorado-sanduíche. Aos professores Dr. Daniel Pinheiro e Dr. Alessandro Varani (Tecnologia) e ao Dr. Todd Michael (Ibis Biosciences, EUA) agradeço o auxílio na análise e disponibilização de genomas de espécies de Lentibulariaceae.

Agradeço ainda ao meu orientador, amigo e companheiro de projetos e ideias malucas que há dez anos tem me ensinado muito, não apenas sobre Botânica, Latim ou o significado das palavras. Você e todo o trabalho que fizemos juntos me deram a oportunidade de conhecer muitas pessoas e lugares, ampliar os horizontes e a mente. A você meu professor-amigo sou infinitamente grata e será sempre uma referência para mim.

Obrigada também aos professores que fizeram parte da banca de defesa pelas valiosas contribuições e sugestões que serão adotadas aqui e em futuras publicações: Dr. Davi Rodrigo Rossato, Dr. Eduardo Custódio Gasparino, Dr. Maurício Bacci Júnior e Dr. Welington Luiz Araújo.

Agradeço aos amigos e colegas que compartilharam momentos de alegria e estresse e que colaboraram com discussões de ideias e dúvidas, nas atividades de campo e com o trabalho na bancada, além da disponibilização de imagens e auxílio

com a análise dos dados, ou simplesmente tornando a convivência divertida e amena entre os problemas de todo pós-graduando: Aurélio, Bassan, Claudenia, Dasmiliá, Dimas, Eric, Érica, Guilherme, Iolanda, Jordana, Joshua, Juliana, Kaila, Loren, Luiz Eduardo, Marcelo, Maria Natália, Marcos, Michelle, Nina, Néstor, Prakesh, Renato, Robert, Ronny, Thiago, Samuel, Saulo, Saura, Yelting, Yoannis e Zen Zhang.

Agradeço especialmente à Yani Cristina e Elwi Guillermo, por abrir as portas da sua casa me acolhendo durante o último e mais difícil ano do doutorado. Serei sempre grata a vocês por cada taça de vinho e cada riso compartilhado, assim como pelas broncas e puxões de orelha.

Ao meu pai e mãe, que frente a todas as dificuldades nunca permitiram que eu desistisse. Aos meus irmãos e sobrinhos que sempre deram sentido à minha volta pra casa. Aos amigos de sempre — Ilani, Gabriel, Elisa, Aline Santamaria, Alan, Aline Dal'Olio, Kadu, Marcus, Danissa, Roberta, Fabrício, Bruno, Claudinha, Jajá, Vanessa — que entenderam e me apoiaram apesar da minha distância e ausência em tantas comemorações e datas importantes. E finalmente, ao meu companheiro que dividiu comigo a angústia da ausência, o cansaço e toda ansiedade e incerteza de tantos momentos.

## SUMÁRIO

|                                                                                                                                                                                 | Página |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....                                                                                                                                          | 01     |
| Introdução.....                                                                                                                                                                 | 01     |
| Objetivos.....                                                                                                                                                                  | 06     |
| Revisão da literatura.....                                                                                                                                                      | 07     |
| Evolução da carnivoría em Lentibulariaceae (Lamiales).....                                                                                                                      | 10     |
| Biogeografia de Lentibulariaceae.....                                                                                                                                           | 12     |
| Reprodução e polinização de <i>Utricularia</i> .....                                                                                                                            | 13     |
| Referências.....                                                                                                                                                                | 16     |
| CAPÍTULO 2 – MORFOLOGIA DE SEMENTES: UMA AVALIAÇÃO EM<br><i>Utricularia</i> (sect. <i>Foliosa</i> e <i>Psyllosperma</i> : LENTIBULARIACEAE) COM<br>IMPLICAÇÕES TAXONÔMICAS..... | 26     |
| RESUMO.....                                                                                                                                                                     | 26     |
| Introdução.....                                                                                                                                                                 | 26     |
| Materiais e métodos.....                                                                                                                                                        | 28     |
| Resultados.....                                                                                                                                                                 | 28     |
| <i>Utricularia</i> sect. <i>Foliosa</i> .....                                                                                                                                   | 31     |
| <i>Utricularia</i> sect. <i>Psyllosperma</i> .....                                                                                                                              | 32     |
| Discussão.....                                                                                                                                                                  | 32     |
| Referências.....                                                                                                                                                                | 38     |
| CAPÍTULO 3 – ESTRATÉGIAS REPRODUTIVAS EM <i>Utricularia</i> :<br>AUTOPOLINIZAÇÃO MEDIADA PELO POLINIZADOR EM <i>Utricularia</i><br><i>amethystina</i> .....                     | 41     |
| Resumo.....                                                                                                                                                                     | 41     |
| Introdução.....                                                                                                                                                                 | 42     |
| Resultados.....                                                                                                                                                                 | 43     |
| Discussão.....                                                                                                                                                                  | 49     |
| Anatomia e morfologia da flor.....                                                                                                                                              | 49     |
| Viabilidade polínica e receptividade estigmática.....                                                                                                                           | 52     |
| Observação dos visitantes florais.....                                                                                                                                          | 53     |
| Implicações para a manutenção das populações.....                                                                                                                               | 54     |
| Conclusões.....                                                                                                                                                                 | 55     |
| Materiais e métodos.....                                                                                                                                                        | 56     |
| Local de estudo.....                                                                                                                                                            | 56     |
| Espécie estudada.....                                                                                                                                                           | 56     |
| Anatomia e morfologia dos órgãos reprodutivos.....                                                                                                                              | 57     |
| Viabilidade polínica e receptividade estigmática.....                                                                                                                           | 57     |
| Visitantes florais e polinizadores efetivos.....                                                                                                                                | 58     |
| Teste de polinização por estímulo mecânico.....                                                                                                                                 | 59     |
| Referências.....                                                                                                                                                                | 60     |
| Apêndices.....                                                                                                                                                                  | 63     |
| CAPÍTULO 4 – EVOLUÇÃO MOLECULAR DO COMPLEXO ' <i>Utricularia</i><br><i>amethystina</i> '.....                                                                                   | 66     |
| Resumo.....                                                                                                                                                                     | 66     |

|                                                                                                                                                                                    |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Introdução.....                                                                                                                                                                    | 66  |
| Materiais e métodos.....                                                                                                                                                           | 68  |
| Coleta de espécimes.....                                                                                                                                                           | 68  |
| Extração e quantificação de DNA genômico total.....                                                                                                                                | 69  |
| Amplificação e sequenciamento.....                                                                                                                                                 | 70  |
| Alinhamento das sequências.....                                                                                                                                                    | 71  |
| Estrutura genética das populações de <i>Utricularia amethystina</i> .....                                                                                                          | 71  |
| Análise dos genes: substituições sinônimas e não-sinônimas.....                                                                                                                    | 72  |
| Análise filogenética e suporte dos cladogramas.....                                                                                                                                | 73  |
| Resultados.....                                                                                                                                                                    | 74  |
| Sequências de regiões cloroplastidiais.....                                                                                                                                        | 74  |
| Estrutura genética do “complexo” <i>Utricularia amethystina</i> .....                                                                                                              | 75  |
| Discussão.....                                                                                                                                                                     | 81  |
| Conclusões.....                                                                                                                                                                    | 83  |
| Referências.....                                                                                                                                                                   | 84  |
| Apêndice 1. “Primers” empregados para amplificação de amostras de <i>Utricularia amethystina</i> .....                                                                             | 94  |
| Apêndice 2. Sequência de lentibulariaceae empregadas para enraizamento das filogenias e comparações das taxas de mutações dos genes <i>matK</i> , <i>rbcL</i> e <i>rps16</i> ..... | 95  |
| Apêndice 3. Frequência dos haplótipos de <i>matK</i> , <i>rbcL</i> , <i>rps16</i> , <i>trnF-L</i> e <i>trnS-G</i> entre as populações e morfotipos amostrados.....                 | 104 |
| Apêndice 4. Média e desvio-padrão dos sítios sinônimos e não-sinônimos presentes nos genes <i>matK</i> , <i>rbcL</i> e <i>rps16</i> em Lentibulariaceae.....                       | 108 |
| CAPÍTULO 5 – EVOLUÇÃO DA VIA DOS FLAVONOIDES EM LENTIBULARIACEAE.....                                                                                                              | 110 |
| Resumo.....                                                                                                                                                                        | 110 |
| Introdução.....                                                                                                                                                                    | 110 |
| Materiais e métodos.....                                                                                                                                                           | 114 |
| Quantificação das transições de cor de flor em Lentibulariaceae.....                                                                                                               | 114 |
| Genes selecionados na via de síntese das antocianinas.....                                                                                                                         | 115 |
| Obtenção das sequências dos genes a partir de genomas.....                                                                                                                         | 116 |
| Alinhamento das sequências.....                                                                                                                                                    | 116 |
| Análise dos genes: substituições sinônimas e não-sinônimas.....                                                                                                                    | 116 |
| Resultados.....                                                                                                                                                                    | 116 |
| Quantificação das transições da coloração floral em Lentibulariaceae.....                                                                                                          | 116 |
| Identificação dos genes-alvo nos genomas de Lentibulariaceae.....                                                                                                                  | 118 |
| Discussão.....                                                                                                                                                                     | 121 |
| Conclusões.....                                                                                                                                                                    | 127 |
| Referências.....                                                                                                                                                                   | 129 |
| Apêndice 1. Sequências de aminoácidos dos genes-alvos obtidas do <i>GenBank</i> , utilizadas como <i>query</i> para busca nos genomas de Lentibulariaceae.....                     | 136 |
| CAPÍTULO 6 – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....                                                                                                                                             | 139 |

**SISTEMÁTICA, EVOLUÇÃO E BIOLOGIA REPRODUTIVA DE *Utricularia***  
**COM ÊNFASE PARA *Utricularia amethystina* Salzm. ex A.St.-Hil. & Girard**  
**(LENTIBULARIACEAE)**

**RESUMO** – *Utricularia* L. é um gênero cosmopolita, ausente apenas nos desertos e regiões polares, rico em espécies e altamente polimórfico em hábitos, morfologia polínica, seminal e das armadilhas. Muitas espécies do gênero possuem genomas miniaturizados, resultado de uma drástica redução de regiões não-codificadoras, dentre outras características moleculares peculiares. *Utricularia amethystina* é descrita como uma das mais polimórficas espécies do gênero, possui um histórico taxonômico complexo (mais de 30 sinônimas) e distribuição ampla entre as Américas. Seu polimorfismo se reflete no tamanho da planta, tamanho e forma da corola, e também na pigmentação floral — *U. amethystina* pode apresentar flores púrpuras (em diferentes tonalidades), amarelas e brancas — dentre outras características. O polimorfismo da pigmentação floral pode afetar a interação com o polinizador e o fluxo gênico entre os morfotipos, sendo por este motivo alvo de nosso interesse. Exploramos se o polimorfismo em caracteres seminais estaria relacionado aos morfotipos florais e buscamos características úteis para a taxonomia *U. amethystina* e espécies próximas. Também descrevemos as estratégias reprodutivas de *Utricularia*, com ênfase nos polinizadores e estratégia de polinização de *U. amethystina*. Além disso, investigamos o fluxo gênico entre os morfotipos florais utilizando diferentes regiões do DNA cloroplastidial previamente reportados como “barcodes”. E exploramos a evolução das transições de cor de flores na família Lentibulariaceae e dos genes relacionados à via de síntese das antocianinas, a principal classe de pigmentos presentes em flores e frutos. Identificamos caracteres seminais úteis para a taxonomia de *Utricularia* e observamos alto polimorfismo intraespecífico em *U. amethystina*. *Utricularia amethystina*, é na verdade um complexo de espécies, dentre as quais é possível encontrar fluxo gênico entre morfotipos branco e púrpura de apenas duas populações próximas. A caracterização dos morfotipos através da cor mostrou-se artificial e nossos resultados sugerem distintas linhagens sob *Utricularia amethystina*, separadas umas das outras com altos valores de probabilidade posterior e indícios de seleção positiva no gene *matK*. A evolução da pigmentação, contudo, sugere que o estado plesiomórfico para as flores de Lentibulariaceae é o púrpura, e as transições de cor partem sempre de uma condição pigmentada (amarelo ou púrpura) para a despigmentada (branco). Este padrão sugere deleção ou subregulação dos genes “core” da via dos flavonoides. Dentre estes genes apenas àquele responsável pela enzima dihidroflavonol 4-redutase mostrou-se, ao contrário dos demais, sob forte pressão negativa. Esta enzima atua no metabolismo secundário para produção de catequinas, taninos e metabólitos de defesa à radiação UV, patógenos e herbívoros. A forte pressão a que o gene está submetido, sugere a importância destes metabólitos para a adaptabilidade da planta aos ambientes extremos que ocupa.

**Palavras-chave:** Polimorfismo floral, pigmentação floral, polinização, sementes, genética de populações, antocianinas.

**SYSTEMATIC, EVOLUTION AND REPRODUCTIVE BIOLOGY OF *Utricularia***  
**WITH FOCUS ON *Utricularia amethystina* Salzm. ex A.St.-Hil. & Girard**  
**(LENTIBULARIACEAE)**

**ABSTRACT** – *Utricularia* L. is a cosmopolitan genus from Lentibulariaceae and the richest genus in species among the carnivorous plants. Its species are highly polymorphic in many traits such as habit, pollen, seed and trap morphology. Many species has a compact genome resulted from the deletion of non-coding regions, and other peculiar molecular features. *Utricularia amethystina* is described as one of the most polymorphic species in the genus, it has a complex taxonomic history and is found across the American continents. Its polymorphism is reflected on plant height, corolla's size and shape, and floral pigmentation — *U. amethystina* might show many shades of purple, yellow and white flowers. However, the most remarkable trait is the polymorphism on pigmentation of flowers, because it might undermine the pollinator attraction, and by this way interrupt the gene flow among its morphotypes. With this in mind, we have surveyed the seed traits, looking for characters useful for taxonomic purposes for *U. amethystina* and related species. The reproductive strategies found on the genus are also described, focusing on *U. amethystina* and describing its pollinator. We also have investigated the gene flow among the *U. amethystina* morphotypes based on barcodes regions from cpDNA. Besides this, were evaluated the evolution of genes related with the transitions on pigmentation of flowers of the Lentibulariaceae. We identified useful seed characters for the genus' taxonomy. *U. amethystina* is a complex with distinct lineages related one each other with high support from molecular survey with cpDNA, from which only two populations from different floral phenotypes (purple and white) were clustered in all analyses. Some lineages also showed evidences for positive selection on *matK* gene. The pigmentation evolution showed the expected pattern with purple flowers as the ancestral state from which the transitions occurred. We also observed that the transitions are more frequent from pigmented flowers to non-pigmented. Such pattern might suggest deletion or downregulation from some of the core genes from flavonoid biosynthetic pathway. Among the studied genes, that encoding the dihydroflavonol 4-reductase enzyme showed strong negative selection, different from the others. Such enzyme is related with the production of tannin, catequin and other secondary metabolites that play an important role on defense against UV radiation, pathogens and herbivores. The strong pressure observed on this gene suggest its importance for plant fitness in extreme environmental conditions, such high UV radiation, poor and moist soils, where the carnivorous plants are frequently found.

**Keywords:** Floral polymorphism, flower pigmentation, pollination, seeds, population genetics, anthocyanin.

## CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

### Introdução

*Pinguicula*, *Utricularia* e *Genlisea* constituem a família Lentibulariaceae (Lamiales sensu APG III; APG-III, 2009; CHASE; REVEAL, 2009) e juntos somam mais de 380 espécies de angiospermas carnívoras. *Utricularia* é o gênero mais derivado (JOBSON; ALBERT, 2002; MÜLLER et al., 2004, 2006), cosmopolita e compreende aproximadamente 250 espécies (FLEISCHMANN, 2012), e mais de 35% das angiospermas carnívoras (GUISANDE et al., 2007). No Brasil ocorrem 65 espécies de *Utricularia*, dentre as quais 16 são endêmicas (MIRANDA et al., 2014).

*Utricularia amethystina* é a espécie-tipo da seção *Foliosa* que agrupa três espécies atualmente aceitas (*Utricularia amethystina* Salzm. ex A. St.-Hil. & Girard, *U. tricolor* A. St.-Hil. e *U. tridentata* Sylven). No entanto, devido à ampla variação morfológica presente na seção, o número de espécies pode variar entre duas a mais de seis espécies, de acordo com o sistema de classificação adotado (TAYLOR, 1989a). Taylor (1989) definiu a seção *Foliosa* como um grupo natural, restrito às zonas quentes da região Neotropical, e com formas únicas dos utrículos e deiscência das cápsulas entre as demais *Utricularia*. Contudo, Müller & Borsh (2005) sugeriram que a seção *Foliosa* não é monofilética e que as seções *Foliosa* e *Psyllosperma* sejam grupos-irmãos. Esta hipótese é suportada pelas características polínicas compartilhadas entre ambas as seções (TAYLOR, 1989).

*Utricularia amethystina* é uma erva terrestre, com folhas pecioladas dispostas em roseta na base da inflorescência racemosa com 6-30 cm de comprimento. A corola é frequentemente violeta ou lilás, no entanto ocorrem também corolas amarelas ou brancas (TAYLOR, 1989). Como as demais espécies da seção *Foliosa*, *Utricularia amethystina* distribui-se amplamente pela região Neotropical, com registro em 18 países dos continentes americanos, desde os Estados Unidos (Flórida) ao Brasil (São Paulo; TAYLOR, 1989) e em diferentes altitudes (desde os tepuis venezuelanos à costa da Guiana Francesa). No Brasil *U. amethystina* distribui-se em praticamente todas as regiões, exceto a Sul (MIRANDA et al., 2014).

A variação morfológica ampla de *Utricularia amethystina*, principalmente nos caracteres reprodutivos, tem sido motivo de recorrentes rearranjos para este táxon. Taylor (1989) sinonimizou 31 táxons sob o binômio *Utricularia amethystina* porque foi incapaz de encontrar descontinuidades para suportar os táxons anteriormente descritos, apesar do alto polimorfismo observado. A classificação proposta por Taylor (1989) baseou-se largamente em caracteres vegetativos como a morfologia das armadilhas. Mas também incluiu caracteres polínicos (HUYNH, 1968; SOHMA, 1975; THANIKAIMONI, 1966), além de forma e densidade de glândulas sobre o cálice, comprimento do pedicelo floral, tamanho das flores e o padrão de divisão em lobos do lábio inferior da corola.

A cor das flores facilita a identificação de pelo menos três morfotipos de *Utricularia amethystina* (Figura 1), mas pode estar associada a outras características como o tamanho das flores e o tamanho do lábio inferior da corola em relação ao comprimento do cálcar. O polimorfismo intraespecífico de cor das flores ocorre em outras espécies de *Utricularia* (e.g. *U. blanchetii* A.DC., *U. hispida* Lam. e *U. parthenopipes* P.Taylor), além de estar distribuído entre as angiospermas de modo geral, como em Brassicaceae (MAJETIC et al., 2007), Convolvulaceae (WEBSTER et al., 2000), Orchidaceae (GIGORD; MACNAIR; SMITHSON, 2001), Plantaginaceae (LANKINEN, 2009), entre outras.

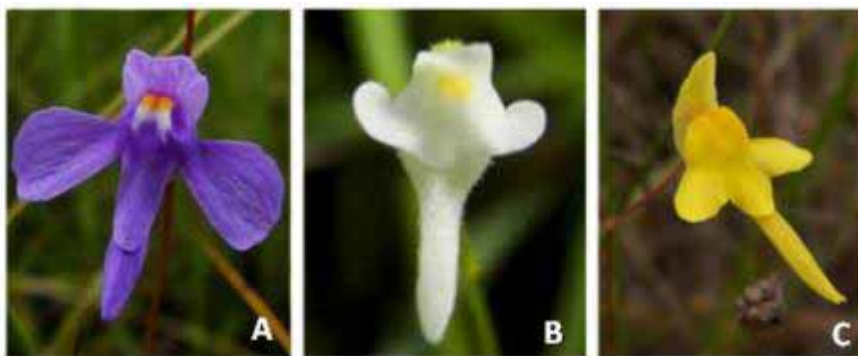


Figura 1. Três fenótipos florais (púrpuro, branco e amarelo, respectivamente) de *Utricularia amethystina* para exemplificar o polimorfismo intraespecífico em Lentibulariaceae. Créditos das imagens A e B: equipe LSVP; C: cedida por Marcos Ferramosca (2009).

Variações da coloração floral permitem uma primeira percepção da variação genética em uma população (WARREN; MACKENZIE, 2001). Apesar disso, esta

variação depende da interação genética e ambiental, respondendo tanto às condições climáticas (luz, radiação, umidade) quanto às condições celulares (pH, localização intracelular, associação com proteínas ou copigmentos). Além disso, a atratividade dos polinizadores por morfotipos florais específicos tem sido invocada para explicar a transição de cores das flores, levando-se a reconhecer “síndromes de polinização” que incluem, além da cor, outros traços florais (FENSTER et al., 2004; HOBALLAH et al., 2007; HOPKINS; RAUSHER, 2012; STUURMAN et al., 2006). Não há evidências definitivas para assumir esta hipótese (RAUSHER, 2008), contudo a assumindo, uma mudança na cor da flor redundaria na alteração do polinizador ou menor sucesso reprodutivo do novo fenótipo.

Tanto na natureza, quanto em espécies ornamentais melhoradas, o polimorfismo em flores é muito mais frequente entre as cores produzidas pelas antocianinas do que em flores amarelas (WARREN; MACKENZIE, 2001). As causas deste polimorfismo de antocianinas e sua manutenção na natureza podem estar relacionadas a vantagens adaptativas dos diferentes fenótipos (FINEBLUM; RAUSHER, 1997; HARBORNE, 1977; LOWRY et al., 2012), ou ao tamanho da via de síntese, que por ser muito longa dispõe de muitos sítios de regulação que alteram o fenótipo expresso (RICHARDS, 1986). Contudo a expressão do fenótipo amarelo também pode estar associada ao bloqueio da via de antocianinas, com consequente redirecionamento do substrato para a produção de chalconas e auronas, ou flavonoides incolores, como quercetina, rutina e kaempferol, que em condições especiais podem conferir a cor amarela ao tecido (MARKHAM; GOULD; RYAN, 2001; ONO et al., 2006).

As antocianinas são glicosídeos flavonoides produzidos ao final de uma longa via de síntese (Figura 2) de compostos secundários relacionados à defesa da planta contra radiação UV, herbívoros, patógenos, além de influenciar no fluxo de auxinas e também na fertilidade masculina (ANDERSEN; JORDHEIM, 2010; HARBORNE, 1977; RAUSHER, 2006). As antocianinas podem ser derivadas de três classes principais de moléculas precursoras (antocianidinas): pelargonidinas, cianidinas ou delfinidinas (Figura 2). De modo geral, as antocianidinas diferem umas das outras quanto ao grau de hidroxilação. A antocianina produzida irá diferir quanto à cor de acordo com o deslocamento da absorção de luz devido aos substituintes ligados à

molécula: grupos hidroxila absorvem comprimentos de ondas maiores conferindo a cor azul; grupos metila têm o comportamento oposto, conferindo a cor vermelha (ANDERSEN; JORDHEIM, 2010).

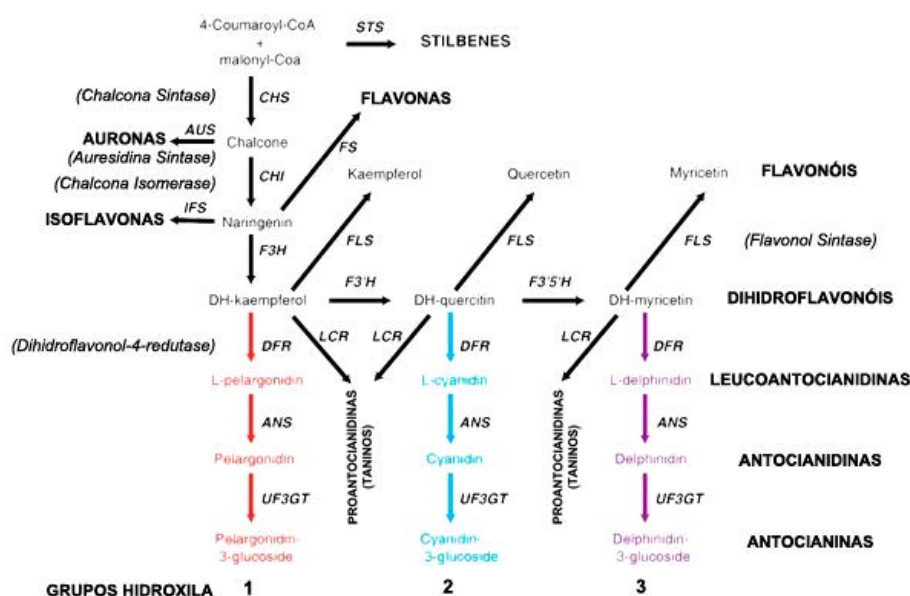


Figura 2. Representação das enzimas e genes da via dos flavonoides que participam da produção de pigmentos florais. Fonte: Adaptado de Rausher (2008).

As pelargonidinas, cianidinas e delphinidinas são responsáveis pelos fenótipos laranja a vermelho, ciano, e púrpura a azul escuro, respectivamente. Embora outras tonalidades sejam obtidas pela quantidade de pigmento produzido a partir de cada antocianidina (Figura 2), sua interação com moléculas de copigmentos, localização na célula, pH celular e quantidade acumulada nos tecidos.

A evolução da transição de cor das flores ainda não está totalmente compreendida, porém, segundo Rausher (2008), dois mecanismos são frequentemente sugeridos: a transição ocorre devido a mutações envolvendo perda de função de algum dos genes estruturais – por exemplo, pela inserção de *transposons* deslocando ou inativando o *frame* de leitura – ou mutações em genes codificadores de fatores de transcrição. No primeiro caso a transição é irreversível, uma vez que os genes estruturais estão distribuídos em poucas cópias no genoma e são expressos em muitos tecidos, portanto há efeitos negativos devido à pleiotropia. No segundo caso, não há efeitos pleiotrópicos negativos, porque a cópia que sofreu

mutação tem ação tecido-específica (RAUSHER, 2006, 2008; SMITH; RAUSHER, 2011).

Mudanças nos fatores de transcrição não fixam o fenótipo no processo evolutivo, portanto podem ocorrer reversões à cor ancestral. O mesmo não acontece quando ocorrem alterações nos genes *core* da via, que são rapidamente fixados (COBERLY; RAUSHER, 2008; STREISFELD; RAUSHER, 2009). Rausher (2008) observou que as transições de cor das flores são assimétricas em muitas famílias, o que significa que as linhagens com flores despigmentadas (ou brancas) se originam sempre a partir de ancestrais pigmentados e, uma vez perdido o pigmento, são raras as reversões para a condição plesiomórfica pigmentada.

O polimorfismo floral intraespecífico tem intrigado muitos pesquisadores desde Darwin (1899). No entanto, restam muitas dúvidas sobre os mecanismos evolutivos que mantêm na natureza fenótipos polimórficos em uma mesma espécie. Em alguns casos, fenótipos divergentes diferem na capacidade de atração de uma ou mais classes de polinizadores (artrópodes, passeriformes, etc) (MAJETIC et al., 2007; WARREN; MACKENZIE, 2001), ou apresentam maior sobrevivência de plântulas e resistência a condições ambientais estressantes (excesso ou falta de umidade; LANKINEN, 2009; RAUSHER, 2008).

De modo geral, plantas carnívoras e espécies de *Lentibulariaceae* crescem em ambientes com alta umidade e radiação UV (ELLISON; GOTELLI, 2001), e sujeitos a variações sazonais (HOBBHANN; KÜCHMEISTER; POREMBSKI, 2006). *Utricularia* apresenta um amplo espectro de ambientes colonizados por suas espécies (TAYLOR, 1989), em alguns casos a mesma espécie pode ocorrer em mais de um ambiente (GUISANDE et al., 2007). Além disso, em campo não se observa predação nas plantas, apesar de se tratar de plantas herbáceas de tecido geralmente frágil. Portanto, é possível supor que a produção de flavonóis, flavanonas e taninos – substâncias de defesa contra patógenos, herbívoros e radiação UV, produzidas pela via dos flavonoides – sejam tão importantes quanto o desenvolvimento da “síndrome da carnivoría” (ELLISON et al., 2003) para o estabelecimento nestes ambientes.

Portanto, seria plausível supor alterações na via dos flavonoides possa estar relacionado ao polimorfismo floral e a manutenção das diferentes formas intraespecíficas em *Utricularia*.

## Objetivos

Avaliar o polimorfismo intraespecífico no gênero *Utricularia*, sob diferentes aspectos, tendo *U. amethystina* como modelo. Assim os objetivos específicos foram:

- I. Avaliar morfologia das sementes à procura de caracteres úteis à taxonomia do gênero, e especialmente, à *Utricularia amethystina*;
- II. Descrever polinizadores e estratégia reprodutiva de *Utricularia amethystina*;
- III. Testar se há fluxo gênico entre os diferentes morfotipos de *Utricularia amethystina*;
- IV. Avaliar se os caracteres morfológicos e moleculares levantados suportam a circunscrição de *Utricularia amethystina*;
- V. Estudar a transição da pigmentação floral em Lentibulariaceae e evolução de genes da via dos flavonoides relacionados à expressão de antocianinas.

## Revisão da literatura

Apesar de plantas como *Dionaea muscipula*, *Drosera*, *Utricularia* e outras serem conhecidas desde antes de Linnaeu, o reconhecimento da carnivoría neste e em outros táxons tardou séculos (DARWIN, 1899). A publicação de *Insectivorous*

*plants* (DARWIN, 1899) despertou grande interesse por parte de botânicos e leigos por tais plantas “bizarras”, e alimentou o imaginário popular sobre plantas assassinas, produzindo muitas obras de ficção (vide revisão de CHASE et al., 2009). Duas hipóteses divergentes inicialmente tentavam explicar o surgimento da carnivoría: (1) teria surgido uma única vez e seria uma característica plesiomórfica dentre as angiospermas (CRONQUIST, 1981); e em oposição à esta, (2) a carnivoría teria surgido mais de uma vez na história filogenética das angiospermas (DARWIN, 1899). Posteriormente, uma filogenia ampla entre linhagens de plantas carnívoras (ALBERT et al., 1992) corroborou a hipótese de múltiplas origens da carnivoría, suportada também por estudos recentes (MÜLLER et al., 2004, 2006; RENNER; SPECHT, 2011). Atualmente são reconhecidos, no mínimo, 6 eventos independentes de surgimento da carnivoría distribuídos em quatro das maiores linhagens de angiospermas — monocotiledôneas, eudicotiledôneas “core”, rosídeas e asterídeas (CHASE et al., 2009; ELLISON; GOTELLI, 2009).

As armadilhas dentre as diferentes linhagens de plantas carnívoras podem ser artificialmente divididas entre “ativas” e “passivas” (Figura 3). Pertencem ao primeiro grupo as armadilhas “fly-trap” encontradas em *Dionaea muscipula* J.Ellis ex L. e *Aldrovanda vesiculosa* L. (Caryophyllales: Droseraceae), além dos utrículos típicos de *Utricularia* (Lamiales: Lentibulariaceae). As armadilhas passivas são as mais comuns dentre as linhagens de plantas carnívoras (CHASE et al., 2009), caracterizam-se por armadilhas do tipo “pitfall” em que as folhas formam tanques ou estruturas semelhantes a jarros, “eel-trap” com folhas modificadas em tubos ou adesivas caracterizadas por folhas cobertas por tricomas glandulares. De modo geral, secretam um fluido responsável por aderir (nas armadilhas adesivas) e digerir as presas de modo constitutivo, contudo a produção de secreções tende a aumentar na presença de presas (KRÓL et al., 2012).

Armadilhas em forma de tanque são típicas de Bromeliaceae (Poales); as armadilhas em forma de jarros (“pitfall”) são características de Sarraceniaceae (Ericales), Cephalotaceae (Oxalidales) e Nepenthaceae (Caryophyllales); “eel-trap” são exclusivas de *Genlisea* (Lamiales: Lentibulariaceae). As armadilhas adesivas, entretanto, são mais comuns e podem ser encontradas em: *Drosera* (Droseraceae), Drosophyllaceae e Dioncophyllaceae (Caryophyllales); Roridulaceae (Ericales);

Byblidaceae (Lamiales), *Pinguicula* (Lamiales: Lentibulariaceae) e *Phylcoxia* (Lamiales: Plantaginaceae) (ELLISON; GOTELLI, 2009; KRÓL et al., 2012). A distinção entre plantas carnívoras e não-carnívoras, assim como entre armadilhas passivas e ativas, não é sempre óbvia porque existem muitas condições intermediárias, especialmente para armadilhas adesivas (CHASE et al., 2009).

A definição de plantas carnívoras tampouco é livre de divergências, porém os requisitos mais aceitos são: ter a capacidade de atrair, capturar, digerir e absorver nutrientes obtidos da presa (CHASE et al., 2009; JUNNIPER et al., 1989). Modelos de custo-benefício da carnivoría têm sido propostos no sentido de explicar sua associação a ambientes com alta radiação UV e pobres em nutrientes (GIVNISH et al., 1984; LAAKKONEN; JOBSON; ALBERT, 2006). Givnish et al. (1984) propuseram um modelo em que os macronutrientes obtidos pela digestão de presas conferem benefícios energéticos às plantas carnívoras, por três vias: (1) aumento da fotossíntese devido ao aumento de folhas fotossintetizantes, em resposta ao incremento nutricional obtido pela carnivoría; (2) a quantidade de presas e a produção de sementes, e/ou o conteúdo nutritivo das sementes, seriam positivamente correlacionados; (3) produção de açúcares a partir do carbono obtido da digestão das presas, compensaria as perdas decorrentes da diminuição da fotossíntese (ELLISON; GOTELLI, 2009; KRÓL et al., 2012).

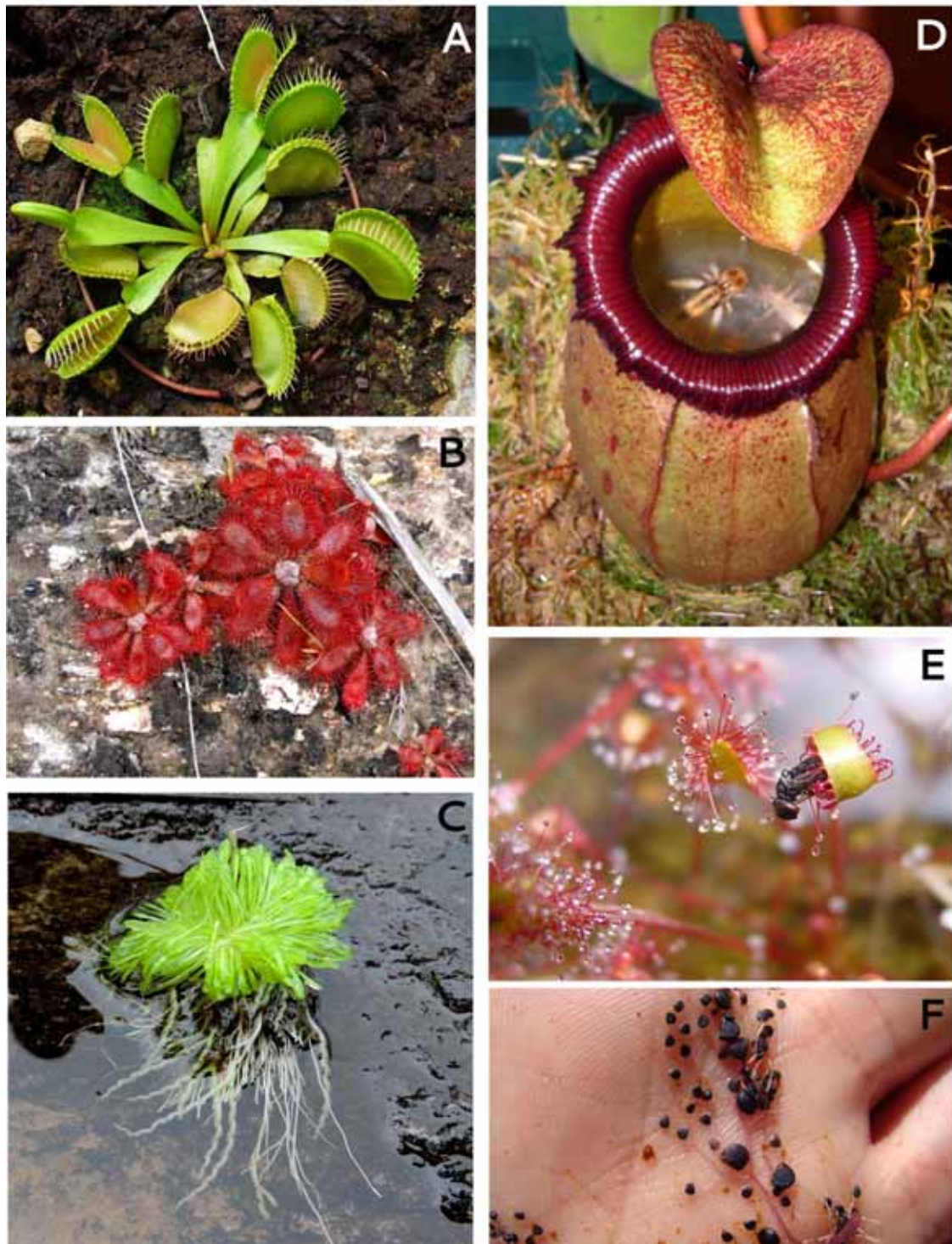


Figura 3. Armadilhas “passivas” e “ativas” encontradas em plantas carnívoras. A. “Fly-trap” típica de *Dionaea muscipula* (Droseraceae); B e E: Armadilhas adesivas em *Drosera* spp. (Droseraceae); C: “Eel-trap” em *Genlisea* (Lentibulariaceae); D: “Pitfall” em *Nepenthes* sp. (Nepenthaceae); F: Utrículos de *Utricularia foliosa* (Lentibulariaceae). Fotos A, D e E obtidas no WikiCommons; B, C e F do acervo pessoal de Vítor F. O. de Miranda.

No entanto, ao avaliar simultaneamente o custo para construção das armadilhas e a taxa fotossintética das armadilhas foi observado um baixo custo energético associado à baixa taxa fotossintética das armadilhas (ADAMEC, 2010; KARAGATZIDES; ELLISON, 2009; PAVLOVIČ et al., 2014). Neste contexto, o modelo proposto com base em Lentibulariaceae (JOBSON et al., 2004; LAAKKONEN; JOBSON; ALBERT, 2006) explicaria melhor o custo-benefício da carnivoría nesta linhagem. O modelo propõe que uma alteração enzimática na via respiratória seja potencialmente capaz de aumentar a eficiência da produção de ATP, ainda que a taxa fotossintética não seja alterada.

#### Evolução da carnivoría em Lentibulariaceae (Lamiales)

A carnivoría em Lamiales (*sensu* APG III, 2009) evoluiu independentemente pelo menos três vezes — em Plantaginaceae, Byblidaceae e Lentibulariaceae — (MÜLLER et al., 2004; PEREIRA et al., 2012; SCHAEFERHOFF et al., 2010). A monofilia de Lentibulariaceae é altamente suportada, mas a relação com as demais famílias da ordem é ainda controversa (MÜLLER et al., 2004; SCHAEFERHOFF et al., 2010). Trata-se da maior família de angiospermas carnívoras, com cerca de 380 espécies distribuídas em três gêneros: *Pinguicula* L. (≈100 spp.; RODONDI; BERETTA; ANDREIS, 2010), *Genlisea* A.St.-Hil. (≈30 spp.; FLEISCHMANN et al., 2010) e *Utricularia* L. (≈250 spp.; FLEISCHMANN, 2012), todos monofiléticos (JOBSON; ALBERT, 2002).

*Genlisea* e *Utricularia* formam um clado bem suportado (JOBSON; ALBERT, 2002; JOBSON et al., 2003; MÜLLER; BORSCH, 2005; MÜLLER et al., 2004) e compartilham a ausência de raízes (JOBSON; ALBERT, 2002; JOBSON et al., 2003a; TAYLOR, 1989) e cotilédones (KONDO; SEGAWA; NEHIRA, 1978; PŁACHNO; ŚWIĄTEK, 2010). Além disso, nesta linhagem também foram identificadas altas taxas mutacionais em muitos *loci* dos três compartimentos genômicos (IBARRA-LACLETTE et al., 2011a; JOBSON; ALBERT, 2002; MÜLLER et al., 2004; WICKE et al., 2013) e o menor genoma dentre as angiospermas — *Genlisea aurea* A.St.-Hil. (GREILHUBER et al., 2006; VELEBA et al., 2014).

A miniaturização do genoma é uma tendência compartilhada entre ambos gêneros (GREILHUBER et al., 2006; IBARRA-LACLETTE et al., 2013; LEUSHKIN et al., 2013; VELEBA et al., 2014) associada ao baixo conteúdo GC e drástica redução das regiões intergênicas (GREILHUBER et al., 2006; IBARRA-LACLETTE et al., 2011b; VELEBA et al., 2014), mas com redução de apenas 3% das regiões codificadoras (IBARRA-LACLETTE et al., 2013).

Jobson et al. (2004) identificaram a alteração de um resíduo de aminoácido na enzima citocromo *c* oxidase, na linhagem *Genlisea+Utricularia*. A COX é uma enzima altamente conservada desde procariotos a eucariotos, que cataliza a reação de conversão do oxigênio derivado da respiração em água, evitando o acúmulo de espécies reativas ao oxigênio (ROS – “reactive oxygen species”) no ambiente intracelular, que podem causar danos irreversíveis à célula e ao DNA. A alteração identificada na citocromo *c* oxidase (JOBSON et al., 2004) pode estar envolvida com o incremento na produção energética da célula (LAAKKONEN; JOBSON; ALBERT, 2006), porém, como efeito colateral, permite o acúmulo de ROS devido ao mau funcionamento da enzima. Por este motivo tem-se especulado a relevância desta alteração para a miniaturização do genoma no clado *Genlisea+Utricularia* (ALBERT et al., 2010; IBARRA-LACLETTE et al., 2011b) e aumento da taxa respiratória (LAAKKONEN; JOBSON; ALBERT, 2006) — especialmente nas armadilhas de *Utricularia*, que têm alto consumo energético (ADAMEC, 2013).

*Pinguicula* é o gênero basal, caracteriza-se por possuir folhas dispostas em rosetas e armadilhas adesivas, além de outros caracteres plesiomórficos como sementes com um ou dois cotilédones (DEGTJAREVA et al., 2004, 2006) e raízes, ainda que temporárias (ADLASSNIG et al., 2005). Ao contrário do observado para o clado *Genlisea+Utricularia*, *Pinguicula* não apresenta drástica redução do genoma ou aceleração das taxas de mutação.

#### Biogeografia de Lentibulariaceae

A família é cosmopolita, ausente apenas em desertos e regiões polares, mas os gêneros diferem quanto à história biogeográfica. *Pinguicula* distribui-se amplamente na Europa, América Central, Caribe e México, e de forma mais restrita

na América do Sul e Ásia (CIESLAK et al., 2005; LEGENDRE, 2000). A distribuição biogeográfica é congruente com a filogenia, que sugere maior proximidade entre o clado da Eurásia com o clado do América Central, Caribe e México, onde tem sido proposto ser o centro de diversidade do gênero. Entretanto, o clado mais basal é de origem tropical, ainda que pouco suportado (CIESLAK et al., 2005).

*Genlisea* está restrito à América do Sul e à África, com origem neotropical, uma vez que o clado basal de *Genlisea* possui exclusivamente espécies endêmicas do Brasil. O clado intermediário agrupa espécies exclusivamente africanas, e o clado mais derivado possui espécies atualmente distribuídas na África ou na América do Sul — não há espécies compartilhadas entre os dois continentes (FLEISCHMANN et al., 2010). Este padrão poderia sugerir uma origem durante a existência do Gondwana, contudo, a ausência de fósseis confiáveis para construção de um relógio molecular confiante, aliado à idade mínima estimada para origem de Lamiales ser posterior à separação do supercontinente, não corroboram esta hipótese. Fleischmann et al. (2010) propõe dois eventos de radiação e expansão, primeiro da América do Sul para África, e um segundo da África de volta à América do Sul, mediados por dispersão por longa distância.

*Utricularia* é o gênero mais derivado, com maior diversidade de hábitos e cosmopolita, ausente apenas em desertos e regiões polares (TAYLOR, 1989). As filogenias disponíveis são coerentes em apontar o hábito terrestre como plesiomórfico para o gênero (JOBSON; ALBERT, 2002; JOBSON et al., 2003; MÜLLER; BORSCH, 2005; MÜLLER et al., 2004; REUT; JOBSON, 2010). A América do Sul concentra a maior riqueza de espécies terrestres e tem sido sugerido que seria o centro de origem e diversificação do gênero (GUISANDE et al., 2007). Entretanto, as espécies basais pertencem à seção *Pleiochasia* e se distribuem na Austrália. A distribuição geográfica das espécies de *Utricularia* apontam alto índice de endemismo e baixo compartilhamento de táxons entre regiões vizinhas ou não-vizinhas. Apenas duas espécies destacam-se por possuir distribuição cosmopolita: *Utricularia gibba* L. e *U. subulata* L. (GUISANDE et al., 2007; TAYLOR, 1989a).

Considerando ainda a baixa amostragem de espécies do gênero nas filogenias atualmente disponíveis (somente cerca de 40% das espécies foram abrangidas) é desafiador apontar hipóteses para história biogeográfica do gênero.

Contudo, Jobson *et al.* (2003) sugeriram três eventos de vicariância e dispersão, sendo que o primeiro deles teria ocorrido na base da filogenia, partindo da América do Sul para a Austrália, como forma de explicar o grupo basal ser atualmente restrito à Austrália. Contudo, uma filogenia mais ampla e melhor resolvida poderia contribuir para a compreensão do padrão de distribuição do gênero.

#### Reprodução e polinização de *Utricularia*

Apesar da sua importância para processos de especiação e manutenção das populações, a biologia reprodutiva de plantas carnívoras tem recebido menos atenção que características relacionadas à carnivoraria. Especialmente em *Utricularia*, com seus utrículos de morfologia e funcionamento peculiares, as características reprodutivas têm sido pouco estudadas (CLIVATI *et al.*, 2014; HOBHANN; KÜCHMEISTER; POREMBSKI, 2006; JÉRÉMIE, 1989; KAUSIK; RAJU, 1955; KHOSLA; SHIVANNA; RAM, 1998; KONDO, 1972; YAMAMOTO; KADONO, 1990).

A reprodução vegetativa é comum em *Utricularia* e pode ocorrer pela fragmentação do estolão. Contudo, algumas espécies aquáticas da seção *Utricularia* desenvolvem estruturas chamadas “turions” capazes de resistir a baixas temperaturas e dessecação durante o inverno. Os “turions” desenvolvem-se no ápice dos estolões e caracterizam-se por um eixo caulinar congestionado com folhas modificadas (Figura 4) e forma globóide a piriforme (TAYLOR, 1989a). A predominância clonal em algumas populações de *Utricularia australis* R.Br. foi parcialmente atribuída à maior chance de sobrevivência dos “turions” em relação às sementes, dado seu tamanho e capacidade de reserva maiores (ARAKI; KADONO, 2003). Embora sementes e “turions” acumulem amiloplastos e lipídeos, a principal fonte energética dos “turions” são proteínas acumuladas em vacúolos de estocagem e em inclusões cristalinas, e são importantes por fornecer carbono, nitrogênio e enxofre para o desenvolvimento da plântula após o inverno (PŁACHNO *et al.*, 2014).



Figura 4. “Turion” no ápice do estolão de *Utricularia vulgaris* L. Crédito: WikiMedia Commons.

*Utricularia* possui espécies com flores casmógamas (alógamas) e cleistógamas (autógamas) que podem ocorrer simpatricamente (KHOSLA; SHIVANNA; RAM, 1998; KONDO, 1972; YAMAMOTO; KADONO, 1990). Existem poucos registros de anormalidades na formação dos gametófitos que ocasionaram esterilidade ou redução da fertilidade (ARAKI; KADONO, 2003; ARAKI, 2000; FAROOQ; SIDDIQUI; SIDDIQUI, 1966; SIDDIQUI; FAROOQ, 1965). Dependendo da posição da superfície do estigma em relação às anteras, pode ocorrer autogamia também em flores casmógamas (JÉRÉMIE, 1989; KHOSLA; SHIVANNA; RAM, 1998; KONDO, 1972), ainda que a autopolinização espontânea seja incomum nestas flores. A autopolinização poderia também ser mediada pelo polinizador, como sugerido previamente por Hobbhahn *et al.* (2006).

Insetos e, menos frequentemente, beija-flores foram descritos como polinizadores de *Utricularia* (FISHER *et al.*, 2004; TAYLOR, 1989a), de modo geral baseado apenas em observações eventuais (FISHER *et al.*, 2004; JÉRÉMIE, 1989; TAYLOR, 1989a). As únicas exceções são três espécies indianas de *Utricularia* (*Utricularia albocaerulea* Dalzell, *Utricularia purpurascens* J.Graham e *Utricularia reticulata* Sm.) (HOBHANN; KÜCHMEISTER; POREMBSKI, 2006) e uma espécie endêmica do Brasil (*Utricularia reniformis* A.St.-Hil.) (CLIVATI *et al.*, 2014), que tiveram aspectos da biologia reprodutiva investigados e a descrição de seus

polinizadores. A escassez de registros de polinizadores é inconsistente com suas características florais atrativas, como a produção de néctar (HOBBHANN; KÜCHMEISTER; POREMBSKI, 2006), simetria zigomorfa, corola em forma de garganta, com cores vibrantes, guias de néctar e dividida em dois lábios, superior e inferior, que escondem os órgãos reprodutivos (FAEGRI; PIJL, 1976)

O tipo polínico basal para *Utricularia* possui 3 cólpores, semelhante ao encontrado em *Pinguicula* e *Genlisea* (FROMM-TRINTA, 1979; JOBSON et al., 2003; RODONDI; BERETTA; ANDREIS, 2010; SILVA et al., 2014). Porém, pode-se encontrar espécies com até 28 aberturas (THANIKAIMONI, 1966). As aberturas são características chave para *Utricularia* devido à variação encontrada em seu número, forma (colpo, poro ou cólporo), padrões de sincolpismo, presença de endocíngulo, entre outros (HUYNH, 1968).

Dentre as espécies de *Utricularia* atualmente aceitas, cerca de 110 distribuídas em 29 seções, tiveram a morfologia polínica descrita (BERETTA et al., 2014; HUYNH, 1968; LOBREAU-CALLEN; JÉRÉMIE, 1999; SOHMA, 1975; THANIKAIMONI, 1966). Dentre as espécies que ocorrem no Brasil (MIRANDA et al., 2014), cerca de 43 —  $\frac{2}{3}$  do total — tiveram a morfologia polínica descrita, mas somente 28 delas foram estudadas a partir de amostras do Brasil para pelo menos uma de suas sinônimas. Avaliações regionais dos caracteres polínicos poderiam beneficiar a compreensão sobre a taxonomia e evolução de espécies com ampla distribuição geográfica e histórico taxonômico complexo. Além de permitir investigar se o hábito (terrestre, aquático, epifítico ou outro) teria relevância sobre a morfologia polínica, uma vez que em *Utricularia* é possível encontrar espécies que se adaptam a mais de um hábito através da sua área de distribuição (GUISANDE et al., 2007).

As sementes de Lentibulariaceae são diminutas e anátropas (CORNER, 1976; FAROOQ, 1964; RAJAN; KUMAR, 1973; SHIVARAMIAH, 1967). Algumas linhagens dentro da família perderam os cotilédones (KONDO; SEGAWA; NEHIRA, 1978; PŁACHNO; ŚWIĄTEK, 2010), particularmente *Genlisea* e algumas espécies de *Utricularia*, sugerindo que a ausência de cotilédone seja um estado apomórfico, uma vez que o gênero mais basal da família, *Pinguicula* (JOBSON; ALBERT, 2002; JOBSON et al., 2003; MÜLLER et al., 2004), possui cotilédones, frequentemente reduzidos a um único (DEGTJAREVA et al., 2004, 2006). Em *Pinguicula* caracteres

das sementes são relevantes para a delimitação infragenérica (DEGTJAREVA et al., 2004). Assim como para o gen. *Genlisea*, as características de sementes também são úteis para a delimitação dos subgêneros: *Genlisea* subgen. *Genlisea* possui sementes piramidais, o subgen. *Tayloria* apresenta sementes prismáticas, globosas ou elipsóides (FISCHER; POREMBSKI; BARTHLOTT, 2000; FLEISCHMANN et al., 2010, 2011; FROMM-TRINTA, 1979). As sementes de *Utricularia* são morfologicamente muito variáveis, quanto à ornamentação da testa e forma (TAYLOR, 1989), com caracteres úteis para a taxonomia e identificação de algumas espécies (MENEZES et al., 2014).

## Referências

- ADAMEC, L. Mineral cost of carnivory in aquatic carnivorous plants. **Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 205, n. 9, p. 618–621, 2010.
- ADAMEC, L. A comparison of photosynthetic and respiration rates in six aquatic carnivorous *Utricularia* species differing in morphology. **Aquatic Botany**, v. 111, p. 89–94, 2013.
- ADLASSNIG, W. et al. The roots of carnivorous plants. **Plant and Soil**, v. 274, p. 127–140, 2005.
- ALBERT, V. A et al. The carnivorous bladderwort (*Utricularia*, Lentibulariaceae): a system inflates. **Journal of Experimental Botany**, v. 61, n. 1, p. 5–9, 2010.
- ALBERT, V. A. et al. Carnivorous Plants : Structural Phylogeny Evolution. **Science**, v. 257, n. 5076, p. 1491–1495, 1992.
- ANDERSEN, Ø. M.; JORDHEIM, M. Chemistry of Flavonoid-Based Colors in Plants. In: MANDER, L.; LIU, H.-W. (BEN) (Eds.). . **Comprehensive Natural Products II - Chemistry and Biology**. Oxford: Elsevier, 2010. p. 547–614.
- APG-III. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 161, n. 2, p. 105–121, 2009.
- ARAKI, S. Variation of sterility and fertility in *Utricularia australis* f. *australis* in Hokkaido, northern Japan. **Ecological Research**, v. 15, n. 2, p. 193–201, 2000.

ARAKI, S.; KADONO, Y. Restricted seed contribution and clonal dominance in a free-floating aquatic plant *Utricularia australis* R. Br. in southwestern Japan. **Ecological Research**, v. 18, n. 5, p. 599–609, 2003.

BERETTA, M. et al. Pollen morphology of European bladderworts (*Utricularia* L., Lentibulariaceae). **Review of Palaeobotany and Palynology**, v. 205, p. 22–30, 2014.

BOGS, J. et al. Recent advances in the transcriptional regulation of the flavonoid biosynthetic pathway. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 8, p. 2465–83, 2011.

CHASE, M. W. et al. Murderous plants: Victorian Gothic, Darwin and modern insights into vegetable carnivory. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 161, p. 329–356, 2009.

CHASE, M. W.; REVEAL, J. L. A phylogenetic classification of the land plants to accompany APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 161, p. 122–127, 2009.

CIESLAK, T. et al. Phylogenetic Analysis of *Pinguicula* (Lentibulariaceae): Chloroplast DNA Sequences and Morphology Support Several Geographically Distinct Radiations. **American Journal of Botany**, v. 92, n. 10, p. 1723–1736, 2005.

CLEGG, M. T.; DURBIN, M. L. Flower color variation : A model for the experimental study of evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 13, p. 7016–7023, 2000.

CLIVATI, D. et al. Reproductive biology and pollination of *Utricularia reniformis* A.St.-Hil. (Lentibulariaceae). **Plant Biology**, v. 16, n. 3, p. 677–682, 2014.

COBERLY, L. C.; RAUSHER, M. D. Pleiotropic effects of an allele producing white flowers in *Ipomoea purpurea*. **Evolution**, v. 62, n. 5, p. 1076–85, 2008.

CORANDER, J. et al. Enhanced Bayesian modelling in BAPS software for learning genetic structures of populations. **BMC Bioinformatics**, v. 9, p. 539, 2008.

CORANDER, J.; MARTTINEN, P. Bayesian identification of admixture events using multilocus molecular markers. **Molecular Ecology**, v. 15, p. 2833–2843, 2006.

CORANDER, J.; TANG, J. Bayesian analysis of population structure based on linked molecular information. **Mathematical Biosciences**, v. 205, p. 19–31, 2007.

CORNER, E. J. H. Lentibulariaceae. In: **The Seeds of Dicotyledons**. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1976. p. 173.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press, 1981. p. 1262

DARWIN, C. **Insectivorous Plants**. 2a. ed. New York: D. Appleton and Company, 1899.

DEGTJAREVA, G. et al. Seed morphology in the genus *Pinguicula* (Lentibulariaceae) and its relation to taxonomy and phylogeny. **Botanische Jahrbücher für Systematik**, v. 125, n. 4, p. 431–452, 2004.

DEGTJAREVA, G. V et al. Morphology and nrITS phylogeny of the genus *Pinguicula* L. (Lentibulariaceae), with special attention to embryo evolution. **Plant Biology**, v. 8, n. 6, p. 778–790, 2006.

ELLISON, A. M. et al. The evolutionary ecology of carnivorous plants. **Advances in Ecological Research**, v. 33, p. 1–74, 2003.

ELLISON, A. M.; GOTELLI, N. J. Evolutionary ecology of carnivorous plants. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 16, n. 11, p. 623–629, 2001.

ELLISON, A. M.; GOTELLI, N. J. Energetics and the evolution of carnivorous plants-Darwin's "most wonderful plants in the world." **Journal of Experimental Botany**, v. 60, p. 19–42, 2009.

FAEGRI, K.; PIJL, L. VAN DER. **The Principles of Pollination Ecology**. Second ed. New York: Robert Maxwell, M.C., 1976.

FAROOQ, M. Studies in Lentibulariaceae - Embriology of *U. stellaris* Linn. f. var. *inflexuosa* Part 1. Flower, organogeny, ovary, megasporogenesis and female gametophyte. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the India**, v. 30, n. 5&6, p. 263–279, 1964.

FAROOQ, M.; SIDDIQUI, S. A.; SIDDIQUI, A. Studies in the Lentibulariaceae. V. the Development of Endosperm in *Utricularia vulgaris* var. *americana* A. Gray: a Reinvestigation. **New Phytologist**, v. 65, n. 1, p. 50–53, 1966.

FENSTER, C. B. et al. Pollination Syndromes and Floral Specialization. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 35, n. 1, p. 375–403, 2004.

FINEBLUM, W. L.; RAUSHER, M. D. Do floral pigmentation gene also influence resistance do enemies? The W locus in *Ipomoea purpurea*. **Ecology**, v. 78, n. 6, p. 1646–1654, 1997.

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.

FISHER, E. et al. Lentibulariaceae. In: KUBITZKI, K. (Ed.). . **The Families and Genera of Vascular Plants**. Berlin: Springer, 2004. p. 276–282.

FLEISCHMANN, A. et al. 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. et al. A revision of *Genlisea* subgenus *Tayloria* (Lentibulariaceae). **Phytotaxa**, v. 433, p. 1–40, 2011.

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

FLEISCHMANN, A. et al. 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**, v. 114, p. 1651–1663, 2014.

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

FRY, J. D.; RAUSHER, M. D. Selection on a Floral Color Polymorphism in the Tall Morning Glory (*Ipomoea purpurea*): Transmission Success of the Alleles Through Pollen. **Evolution**, v. 51, n. 1, p. 66–78, 2012.

GERTZ, E. M. et al. Composition-based statistics and translated nucleotide searches: improving the TBLASTN module of BLAST. **BMC Biology**, v. 4, p. 41, 2006.

GIGORD, L. D. B.; MACNAIR, M. R.; SMITHSON, A. Negative frequency-dependent selection maintains a dramatic flower color polymorphism in the rewardless orchid *Dactylorhiza sambucina* (L.) Soò. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 11, p. 6253–6255, 2001.

GIVNISH, T. J. et al. Carnivory in the bromeliad *Brocchinia reducta*, with a cost/benefit model for the general restriction of carnivorous plants to sunny, moist, nutrient-poor habitats. **The American Naturalist**, v. 124, n. 4, p. 479–497, 1984.

GREILHUBER, J. et al. Smallest angiosperm genomes found in Lentibulariaceae, with chromosomes of bacterial size. **Plant Biology**, v. 8, n. 6, p. 770–777, nov. 2006.

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

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

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

HARBORNE, J. B. Flavonoids and the Evolution of the Angiosperms. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 5, p. 7–22, 1977.

HARTL, D. L.; CLARK, A. G. **Princípios de Genética de Populações**. 4a. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. p. 660

HOBALLAH, M. E. et al. Single gene-mediated shift in pollinator attraction in *Petunia*. **The Plant Cell**, v. 19, n. 3, p. 779–90, 2007.

HOBBHANN, N.; KÜCHMEISTER, H.; POREMBSKI, S. Pollination Biology of Mass Flowering Terrestrial *Utricularia* species (Lentibulariaceae) in the Indian Western Ghats. **Plant Biology**, v. 8, p. 791–804, 2006.

HOPKINS, R.; RAUSHER, M. D. Pollinator-mediated selection on flower color allele drives reinforcement. **Science**, v. 335, n. 6072, p. 1090–1092, 2012.

HUYNH, K.-L. Étude de la morphologie du pollen du genre *Utricularia* L. **Pollen et Spores**, v. X, n. 1, p. 11–55, 1968.

IBARRA-LACLETTE, E. et al. Transcriptomics and molecular evolutionary rate analysis of the bladderwort (*Utricularia*), a carnivorous plant with a minimal genome. **BMC Plant Biology**, v. 11, n. 1, p. 101, 2011a.

IBARRA-LACLETTE, E. et al. Is GC bias in the nuclear genome of the carnivorous plant *Utricularia* driven by ROS-based mutation and biased gene conversion? **Plant Signaling & Behavior**, v. 6, n. 11, p. 1631–4, 2011b.

IBARRA-LACLETTE, E. et al. Architecture and evolution of a minute plant genome. **Nature**, v. 000, p. 1–6, 2013.

IRWIN, R. E. et al. The role of herbivores in the maintenance of a flower color polymorphism in wild radish. **Ecology**, v. 84, n. 7, p. 1733–1743, 2003.

JÉRÉMIE, J. Autogamie dan le genre *Utricularia* L. (Lentibulariaceae). **Bulletin du Museum National d'Histoire Naturelle - Section B, Adansonia, Botanique, Phytochimie**, v. 11, n. 1, p. 17–28, 1989.

JOBSON, R. W. et al. Molecular Phylogenetics of Lentibulariaceae Inferred from Plastid rps16 Intron and trnL-F DNA Sequences : Implications for Character Evolution and Biogeography. **Sistematic Botany**, v. 28, n. 1, p. 157–171, 2003.

JOBSON, R. W. et al. Adaptive evolution Infrastructure for of a cytochrome c oxidase : carnivorous plant radiation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, v. 101, n. 52, p. 18064–18068, 2004.

JOBSON, R. W.; ALBERT, V. A. Molecular Rates Parallel Diversification Contrasts between Carnivorous Plant Sister Lineages 1. **Cladistics**, v. 18, p. 127–136, 2002.

JOHNSON, E. T. et al. Alteration of a single amino acid changes the substrate specificity of dihydroflavonol 4-reductase. **The Plant Journal**, v. 25, n. 3, p. 325–333, 2001.

JUNNIPER, E. B. et al. **The carnivorous plants**. London: Academic Press, 1989. p. 353

KARAGATZIDES, J. D.; ELLISON, A. M. Construction costs, payback times, and the leaf economics of carnivorous plants. **American Journal of Botany**, v. 96, n. 9, p. 1612–1619, 2009.

KAUSIK, S. B.; RAJU, M. V. S. A contribution to the floral morphology and embryology of *U. reticulata*. **Proceedings of the Indian Academy Of Science**, v. 41, p. 155–166, 1955.

KHOSLA, C.; SHIVANNA, K. R.; RAM, H. Y. M. Pollination in aquatic insectivore *Utricularia inflexa* var. *stellaris*. **Phytomorphology**, v. 48, n. 4, p. 417–425, 1998.

KLAHRE, U. et al. Pollinator choice in *Petunia* depends on two major genetic Loci for floral scent production. **Current Biology**, v. 21, n. 9, p. 730–739, 2011.

KONDO, K. A Comparison of Variability in *Utricularia cornuta* and *Utricularia juncea*. **American Journal of Botany**, v. 59, n. 1, p. 23–37, 1972.

KONDO, K.; SEGAWA, M.; NEHIRA, K. Anatomical Studies on Seeds and Seedlings of Some *Utricularia* (Lentibulariaceae). **Brittonia**, v. 30, n. 1, p. 89–95, 1978.

KRESS, W. J.; ERICKSON, D. L. A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcL* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region. **PloS one**, v. 2, n. 6, p. e508, 2007.

KRÓL, E. et al. Quite a few reasons for calling carnivores “the most wonderful plants in the world”. **Annals of Botany**, v. 109, n. 1, p. 47–64, 2012.

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. 758–64, 2006.

LANKINEN, A. Upper petal lip colour polymorphism in *Collinsia heterophylla* (Plantaginaceae): genetic basis within a population and its use as a genetic marker. **Journal of Genetics**, v. 88, n. 2, p. 205–15, 2009.

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

LEUSHKIN, E. V et al. 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. 476, 2013.

LEVIN, D. A.; BRACK, E. T. Natural Selection Against White Petals in *Phlox*. **Evolution**, v. 49, n. 5, p. 1017–1022, 1995.

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

LOBREAU-CALLEN, D.; JÉRÉMIE, J. Morphologie et ultrastructure du pollen dans le genre *Utricularia* L. (Lentibulariaceae). **Canadian Journal of Botany**, v. 767, p. 744–767, 1999.

LODHI et al. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars, *Vitis* species and *Ampelopsis*. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 12, n. 1, p. 6–13, 1994.

LOWRY, D. B. et al. Five anthocyanin polymorphisms are associated with an R2R3-MYB cluster in *Mimulus guttatus* (Phrymaceae). **American Journal of Botany**, v. 99, n. 1, p. 82–91, 2012.

MAJETIC, C. J. et al. Flower color-flower scent associations in polymorphic *Hesperis matronalis* (Brassicaceae). **Phytochemistry**, v. 68, n. 6, p. 865–74, 2007.

MARKHAM, K. R.; GOULD, K. S.; RYAN, K. G. Cytoplasmic accumulation of flavonoids in flower petals and its relevance to yellow flower colouration. **Phytochemistry**, v. 58, p. 403–413, 2001.

MENEZES, C. G. et al. Seed morphology of bladderworts: a survey on *Utricularia* sect. *Foliosa* and sect. *Psyllosperma* (Lentibulariaceae) with taxonomic implications. **Phytotaxa**, v. 167, p. 173–182, 2014.

MENEZES, C. G.; MIRANDA, V. F. O. DE. **Dinâmica e estrutura de populações de *Utricularia* (Lentibulariaceae): comparação entre espécies ameaçadas e não-ameaçadas**. [s.l.] Universidade de Mogi das Cruzes, 2010.

MIRANDA, V. F. O. et al. **Lentibulariaceae**. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB8570>>. Acesso em: 1 dez. 2014.

MÜLLER, K. et al. Evolution of carnivory in Lentibulariaceae and the Lamiales. **Plant Biology**, v. 6, n. 4, p. 1–14, 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, n. 1-2, p. 39–67, 2005.

MÜLLER, K. F. et al. Recent progress in understanding the evolution of carnivorous Lentibulariaceae (Lamiales). **Plant Biology**, v. 8, n. 6, p. 748–57, 2006.

ONO, E. et al. Yellow flowers generated by expression of the aurone biosynthetic pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 29, p. 3–8, 2006.

OXELMAN, B.; N, M. L.; BERGLUND, D. Chloroplast rps16 intron phylogeny of the tribe Sileneae (Caryophyllaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 206, p. 393–410, 1997.

PAVLOVIČ, A. et al. Feeding on prey increases photosynthetic efficiency in the carnivorous sundew *Drosera capensis*. **Annals of Botany**, v. 113, n. 1, p. 69–78, 2014.

PEREIRA, C. G. et al. Underground leaves of *Philcoxia* trap and digest nematodes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 4, p. 1154–8, 2012.

PŁACHNO, B. J. et al. Cytochemical and ultrastructural aspects of aquatic carnivorous plant turions. **Protoplasma**, v. 251, n. 6, p. 1449–54, 2014.

PŁACHNO, B. J.; ŚWIĄTEK, P. Unusual embryo structure in viviparous *Utricularia nelumbifolia*, with remarks on embryo evolution in genus *Utricularia*. **Protoplasma**, v. 239, n. 1, p. 69–80, 2010.

QUATTROCCHIO, F. et al. Molecular analysis of the anthocyanin2 gene of *Petunia* and Its Role in the Evolution of Flower Color. **The Plant Cell**, v. 11, n. August, p. 1433–1444, 1999.

RAJAN, S. S.; KUMAR, D. J. Embryological studies in Lentibulariaceae. I. Floral morphology and embryology of *Utricularia smithiana*. **Proceedings of the Indian Academy of Sciences Plant**, v. 80, p. 18–25, 1973.

RAUSHER, M. D. The evolution of flavonoids and their genes. In: GROTEWOLD, E. (Ed.). **The Science of Flavonoids**. Ohio: Springer, 2006. p. 175–211.

RAUSHER, M. D. Evolutionary Transitions in Floral Color. **International Journal of Plant Sciences**, v. 169, n. 1, p. 7–21, 2008.

RENNER, T.; SPECHT, C. D. A Sticky Situation: Assessing Adaptations for Plant Carnivory in the Caryophyllales by Means of Stochastic Character Mapping. **International Journal of Plant Sciences**, v. 172, n. 7, p. 889–901, 2011.

REUT, M. S.; JOBSON, R. W. A phylogenetic study of subgenus *Polypompholyx*: a parallel radiation of *Utricularia* (Lentibulariaceae) throughout Australasia. **Australian Systematic Botany**, v. 23, p. 152–161, 2010.

RICHARDS, A. J. **Plant Breeding Systems**. 2a edição ed. Londres: RU: Chapman e Hall, 1986.

RODONDI, G.; BERETTA, M.; ANDREIS, C. Review of Palaeobotany and Palynology Pollen morphology of alpine butterworts (*Pinguicula* L., Lentibulariaceae). **Review of Palaeobotany and Palynology**, v. 162, n. 1, p. 1–10, 2010.

RODRÍGUEZ, Y. D.; MIRANDA, V. F. O. DE. **Taxonomia e filogeografia de *Pinguicula* L. ser. Albidae Casper (Lentibulariaceae)**. [s.l.] Universidade de Mogi das Cruzes, 2014.

SCHAEFERHOFF, B. et al. Towards resolving Lamiales relationships : insights from rapidly evolving chloroplast sequences. **BMC Evolutionary Biology**, v. 10, n. 352, p. 352, 2010.

SHIVARAMIAH, G. Observations on the floral morphology and embriology of *Utricularia stricticaulis* Stapf. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 65, p. 56–62, 1967.

SIDDIQUI, S. A.; FAROOQ, M. Degeneration in the ovules of *Utricularia coerulea*. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, v. 92, n. 4, p. 245–249, 1965.

SILVA, S. R. DA et al. **Estudo polínico em espécies de *Genlisea* A. St.-Hil. (Lentibulariaceae) subgênero *Genlisea* da América do Sul**. 64<sup>o</sup> Congresso Nacional de Botânica. **Anais...**Belo Horizonte, MG: 2014

SMITH, S. D.; RAUSHER, M. D. Gene Loss and Parallel Evolution Contribute to Species Difference in Flower Color. **Molecular Biology**, v. 28, n. 10, p. 2799–2810, 2011.

SOHMA, K. Pollen morphology of the Japanese species of *Utricularia* L. and *Pinguicula* L. with notes on fossil pollen of *Utricularia*. **Journal of Japanese Botany**, v. 50, p. 164–179, 193–210, 1975.

STREISFELD, M. A; RAUSHER, M. D. Altered trans-regulatory control of gene expression in multiple anthocyanin genes contributes to adaptive flower color evolution in *Mimulus aurantiacus*. **Molecular Biology and Evolution**, v. 26, n. 2, p. 433–44, 2009.

STUURMAN, J. et al. The genetic dissection of floral pollination syndromes. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 9, n. 1, p. 78–82, 2006.

TABERLET, P. et al. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. **Plant Molecular Biology**, v. 17, n. 5, p. 1105–9, 1991.

TAYLOR, P. **The Genus *Utricularia* - a taxonomic monograph**. London: Royal Botanical Gardens, Kew, 1989a. p. 724

THANIKAIMONI, G. Pollen morphology of the genus *Utricularia*. **Pollen et Spores**, v. 8, n. 2, p. 265–285, 1966.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. ClustalW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, n. 22, p. 4673–4680, 1994.

VELEBA, A. et al. Genome size and genomic GC content evolution in the miniature genome-sized family. **New Phytologist**, v. 203, n. 1, p. 22–28, 2014.

WARREN, J.; MACKENZIE, S. Why are all colour combinations not equally represented as flower-colour polymorphisms? **New Phytologist**, v. 151, n. 1, p. 237–241, 2001.

WEBSTER, R. et al. Balancing selection on a floral polymorphism. **Evolution**, v. 54, n. 2, p. 691–695, 2000.

WESTERKAMP, C.; CLASSEN-BOCKHOFF, R. Bilabiate flowers: the ultimate response to bees? **Annals of Botany**, v. 100, n. 2, p. 361–74, 2007.

WHIBLEY, A. C. et al. Evolutionary paths underlying flower color variation in *Antirrhinum*. **Science**, v. 313, n. 5789, p. 963–6, 2006.

WICKE, S. et al. Disproportional plastome - wide increase of substitution rates and relaxed purifying selection in genes of carnivorous Lentibulariaceae. **Molecular Biology and Evolution**, v. 31, n. 3, p. 529–545, 2013.

YAMAMOTO, I.; KADONO, Y. A study on the reproductive biology of aquatic *Utricularia* species in southwestern Japan. **Acta Phytotaxonomica et Geobotanica**, v. 41, p. 189–200, 1990.

## CAPÍTULO 2 – Morfologia de sementes: uma avaliação em *Utricularia* (sect. *Foliosa* e *Psyllosperma*: Lentibulariaceae) com implicações taxonômicas

### Resumo

Espécies de *Utricularia* das sect. *Foliosa* e *Psyllosperma* foram estudadas com base em características das sementes. Nossos objetivos foram buscar caracteres úteis para delimitação de espécies, especialmente para aquelas altamente polimórficas, com *U. amethystina*, e também fornecer uma chave de identificação das espécies de ambas as seções. Os caracteres qualitativos das sementes foram mais úteis que os quantitativos para propostas taxonômicas. Apresentamos aqui uma chave de identificação, porém foi impossível distinguir entre três espécies (*Utricularia huntii*, *U. praelonga* e *U. tridentata*). Nossos resultados não permitiram especular profundamente sobre a delimitações das sect. *Foliosa* e *Psyllosperma*, contudo discordam do sistema proposto por Taylor, uma vez que não foi possível separar as espécies estudadas em dois grupos claramente distintos. Entretanto, a variabilidade encontrada nos caracteres das sementes avaliados neste trabalho é também brevemente discutida quanto às implicações ecológicas de algumas características das sementes.

**Palavras-chave:** dispersão, sementes exalbuminosas, morfometria, taxonomia, testa, *Utricularia amethystina*

### Introdução

Lentibulariaceae Richard *in* Poiteau & Turpin (1808: 23) é uma família de plantas carnívoras que possui sementes diminutas e anátropas (Farooq 1964, Shivaramiah 1967, Rajan and Kumar 1973, Corner 1976). Algumas linhagens dentro da família perderam os cotilédones (Kondo *et al.* 1978, Płachno & Świątek 2009), particularmente *Genlisea* Saint-Hilaire (1833: 428) e algumas espécies de *Utricularia* Linnaeus (1753: 18), sugerindo que a ausência de cotilédone seja um estado apomórfico, uma vez que o gênero mais basal da família, *Pinguicula* Linnaeus (1753: 17) (Jobson *et al.* 2003, Müller *et al.* 2004), possui cotilédones, frequentemente reduzidos a um único (Degtjareva *et al.* 2004). Em *Pinguicula* caracteres das sementes são relevantes para a delimitação infragenérica (Degtjareva *et al.* 2004). Assim como em *Genlisea* as características de sementes também são úteis para a

delimitação dos subgêneros: *Genlisea* subgen. *Genlisea* possui sementes piramidais, o subgen. *Tayloria* (Fromm 1977: 2) Fischer *et al.* (2000: 293) apresenta sementes prismáticas, globosas ou elipsóides (Fromm-Trinta 1979, Fleishmann *et al.* 2011, 2012, Fischer *et al.* 2000).

*Utricularia* é dentre as Lentibulariaceae o gênero mais rico em espécies e mais amplamente disperso, o que também se reflete na alta diversidade morfológica das armadilhas (Taylor 1989, Guisande *et al.* 2007, Reifenrath *et al.* 2006). Muitas linhagens do gênero se dispersaram e adaptaram-se a diferentes hábitos, como o aquático (livre-flutuante ou fixo), terrestre, litofítico, epifítico e reofítico. As sementes de *Utricularia* possuem morfologia bastante variável, assim como as armadilhas, variando especialmente quanto à superfície do tegumento (testa), como previamente reportado (e.g. Abraham & Subramanyan 1965, Taylor 1989). Portanto, se as sementes apresentam características tão variáveis quanto as armadilhas, também poderiam ser úteis à taxonomia infragenérica.

De acordo com Taylor (1989), *Utricularia* sect. *Foliosa* inclui *U. amethystina* Salzm. ex Saint-Hilaire & Girard (1838: 870), *U. tridentata* Sylvén (1909: 28) e *U. tricolor* Saint-Hilaire (1833: 418). Ainda segundo o sistema proposto por Taylor, *Utricularia* sect. *Psyllosperma* agrupa 10 espécies: *U. calycifida* Benjamin (1847: 493), *U. hintonii* Taylor (1986: 8), *U. hispida* Lamarck (1791: 50), *U. huntii* Taylor (1986: 9), *U. longifolia* Gardner (1842: 545), *U. panamensis* Steyerm. ex Taylor (1986: 9), *U. petersoniae* Taylor (1986: 9), *U. praelonga* Saint-Hilaire & Girard (1838: 870), *U. regia* Zamudio & Olvera (2009: 119) e *U. schultesii* Fernández-Pérez (1964: 39). Ambas as seções envolvem espécies exclusivamente neotropicais (Taylor 1989, Miranda & Rivadavia, 2010, 2013). Dentre elas, *U. amethystina* é uma das espécies mais polimórficas, levando em conta caracteres como forma, tamanho e cor da corola, tamanho das inflorescências, presença de papilas e tricomas, dentre outros, que resultam em uma complexa taxonomia.

Visando contribuir com a taxonomia de *Utricularia*, é apresentada a descrição das sementes de uma ampla amostragem dentro de *U.* sect. *Foliosa* e *U.* sect. *Psyllosperma*, incluindo a caracterização da superfície do tegumento (testa), da ornamentação e o tamanho das sementes. A presente descrição teve como objetivos: (1) testar se as características das sementes suportam a circunscrição de

ambas as seções; (2) avaliar o polimorfismo de *Utricularia amethystina* quanto aos caracteres seminais e sua utilidade para taxonomia de espécies complexas, e (3) fornecer uma chave dicotômica de identificação das espécies de ambas as seções a partir dos caracteres das sementes.

## Materiais e Métodos

Sementes obtidas de espécimes de *Utricularia* sect. *Foliosa* e *U.* sect. *Psyllosperma* foram amostradas de espécimes de 20 localidades entre Brasil, Colômbia e Venezuela (*vouchers* depositados nos herbários HB, INPA, IPA, SPF e UB; vide Tabela 1). As sementes foram desidratadas em secador de ponto crítico (EMS 850), metalizadas (DDESK II, DETON VACUUM) e visualizadas e fotografadas a partir de microscopia eletrônica (JEOL, Mod. JSM 5410).

As análises morfométricas basearam-se em 379 sementes, que foram dispostas sobre lâminas de vidro e mensuradas por observação direta em microscópio óptico (Zeiss) sob aumento de 200×. O comprimento dos eixos longitudinal e transversal das sementes foram medidos e, em seguida, analisados por estatística descritiva básica (média, desvio-padrão e variância) com emprego do Systat 13 (Systat Software Inc.).

## Resultados

No total foram medidas 379 sementes (Tabela 1), destas 243 são de *U. amethystina*. As médias obtidas de todas as espécies estudadas dos caracteres mensurados estão descritas na Tabela 2. As medidas obtidas de amostras de *U. amethystina* provenientes de diferentes localidades estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 1. Amostras de sementes de espécies de *Utricularia* (*U. sect. Psyllosperma* e *U. sect. Foliosa sensu* Taylor [1989]) analisadas neste estudo. As amostras empregadas para morfometria e MEV estão indicadas por “X”.

| Seção<br>(spp. amostradas/<br>total spp.) | Espécies                                               | Cor da<br>flor | Origem e voucher                               | <i>n</i> <sup>1</sup> | Morfometria | MEV <sup>2</sup> |
|-------------------------------------------|--------------------------------------------------------|----------------|------------------------------------------------|-----------------------|-------------|------------------|
| <i>Foliosa</i><br>(2/3)                   | <i>Utricularia amethystina</i><br>Salzm. ex A.St.-Hil. | Púrpura        | Brasil, Amazonas<br>(IPA 15801)                | 35                    | X           | X                |
|                                           | <i>Utricularia amethystina</i><br>Salzm. ex A.St.-Hil. | Branco         | Brasil, Amazonas<br>(IPA 15801)                | 01                    | X           | -                |
|                                           | <i>Utricularia amethystina</i><br>Salzm. ex A.St.-Hil. | Púrpura        | Brasil, Amazonas<br>(INPA 76278)               | 25                    | X           | X                |
|                                           | <i>Utricularia amethystina</i><br>Salzm. ex A.St.-Hil. | Púrpura        | Brasil, Goiás<br>(UB 24985)                    | 03                    | X           | X                |
|                                           | <i>Utricularia amethystina</i><br>Salzm. ex A.St.-Hil. | Púrpura        | Brasil, Minas Gerais<br>(SPF 157212)           | 07                    | X           | X                |
|                                           | <i>Utricularia amethystina</i><br>Salzm. ex A.St.-Hil. | Púrpura        | Brasil, Minas Gerais                           | 10                    | X           | X                |
|                                           | <i>Utricularia amethystina</i><br>Salzm. ex A.St.-Hil. | Amarelo        | Brasil, Minas Gerais<br>(UB 24955)             | 35                    | X           | X                |
|                                           | <i>Utricularia amethystina</i><br>Salzm. ex A.St.-Hil. | Púrpura        | Brasil, Minas Gerais<br>(SPF 22329)            | 03                    | -           | X                |
|                                           | <i>Utricularia amethystina</i><br>Salzm. ex A.St.-Hil. | Púrpura        | Brasil, Minas Gerais<br>(SPF 23302)            | 21                    | X           | X                |
|                                           | <i>Utricularia amethystina</i><br>Salzm. ex A.St.-Hil. | Púrpura        | Brasil, Paraíba<br>(IPA 5474)                  | 07                    | X           | X                |
|                                           | <i>Utricularia amethystina</i><br>Salzm. ex A.St.-Hil. | Púrpura        | Brasil, Rondônia<br>(INPA 218169)              | 35                    | X           | X                |
|                                           | <i>Utricularia amethystina</i><br>Salzm. ex A.St.-Hil. | Púrpura        | Brasil, Roraima<br>(INPA 20147)                | 01                    | X           | X                |
|                                           | <i>Utricularia amethystina</i><br>Salzm. ex A.St.-Hil. | Púrpura        | Brasil, Roraima<br>(INPA 235618)               | 33                    | X           | X                |
|                                           | <i>Utricularia amethystina</i><br>Salzm. ex A.St.-Hil. | Púrpura        | Colômbia, Vaupes<br>(INPA 76518)               | 27                    | X           | X                |
|                                           | <i>Utricularia tridentata</i> Sylvén                   | -              | Brasil, Minas Gerais<br>(L.Krieger 23581,UFSJ) | 03                    | X           | X                |
| <i>Psyllosperma</i><br>(5/10)             | <i>Utricularia calycifida</i> Benj.                    | -              | Brasil, Pará<br>(INPA 96497)                   | 30                    | X           | X                |
|                                           | <i>Utricularia huntii</i> P.Taylor                     | -              | Brasil, Goiás<br>(SPF 136799)                  | 40                    | X           | X                |
|                                           | <i>Utricularia hispida</i> Lam.                        | -              | Venezuela, Bolívar<br>(SPF 165501)             | 11                    | X           | -                |
|                                           | <i>Utricularia hispida</i> Lam.                        | -              | Brasil, Goiás<br>(SPF 103814)                  | 12                    | X           | X                |
|                                           | <i>Utricularia longifolia</i> Gardner                  | -              | Brasil, Rio de Janeiro<br>(HB 34583)           | 12                    | X           | X                |
|                                           | <i>Utricularia praelonga</i> A.St.-<br>Hil. & Girard   | -              | Brasil, Minas Gerais<br>(UB 58701)             | 28                    | X           | X                |
| <b>Total</b>                              |                                                        |                |                                                | <b>379</b>            |             |                  |

<sup>1</sup> *n* = número de sementes medidas

<sup>2</sup> MEV = microscopia eletrônica de varredura

Tabela 2. Características morfométricas obtidas de espécies de *Utricularia* (*U. sect. Psyllosperma* e *U. sect. Foliosa sensu Taylor [1989]*). DP= desvio-padrão ( $\mu\text{m}$ ); CV= coeficiente de variação ( $\text{DP}/\text{Média} \times 100$ ; %); Cp= comprimento médio ( $\mu\text{m}$ ); Lg= largura média ( $\mu\text{m}$ ); Cp/Lg= razão entre as medidas de comprimento e largura para inferir sobre a forma das sementes.

| Seção               | Espécies              | Cp semente | DP: Cp semente | CV: Cp semente | Lg semente | DP: Lg semente | CV: Lg semente | Cp célula da testa | DP: Cp célula da testa | CV: Cp célula da testa | Lg célula da testa | DP: Lg célula da testa | CV: Lg célula da testa | Cp/Lg semente | Cp/Lg célula da testa |
|---------------------|-----------------------|------------|----------------|----------------|------------|----------------|----------------|--------------------|------------------------|------------------------|--------------------|------------------------|------------------------|---------------|-----------------------|
| <i>Foliosa</i>      |                       |            |                |                |            |                |                |                    |                        |                        |                    |                        |                        |               |                       |
|                     | <i>U. amethystina</i> | 282,0      | $\pm 50,85$    | 18,1           | 155,1      | $\pm 38,67$    | 25,0           | 108,5              | $\pm 34,3$             | 31,6                   | 21,2               | $\pm 6,9$              | 32,5                   | 1,82          | 5,3                   |
|                     | <i>U. tridentata</i>  | 426,7      | $\pm 136,08$   | 31,9           | 165,3      | $\pm 33,31$    | 20,1           | 171,4              | $\pm 62,3$             | 36,3                   | 30,5               | $\pm 11,5$             | 37,9                   | 2,58          | 5,6                   |
| <i>Psyllosperma</i> |                       |            |                |                |            |                |                |                    |                        |                        |                    |                        |                        |               |                       |
|                     | <i>U. calycifida</i>  | 370,7      | $\pm 41,19$    | 11,1           | 561,6      | $\pm 68,32$    | 12,2           | 61,7               | $\pm 7,7$              | 12,5                   | 22,2               | $\pm 3,7$              | 16,7                   | 0,66          | 2,8                   |
|                     | <i>U. hispida</i>     | 464,7      | $\pm 93,48$    | 20,1           | 178,1      | $\pm 34,22$    | 19,2           | 123,8              | $\pm 43,6$             | 35,3                   | 19,0               | $\pm 8,7$              | 45,8                   | 2,61          | 6,5                   |
|                     | <i>U. huntii</i>      | 319,6      | $\pm 37,21$    | 11,6           | 138,0      | $\pm 22,83$    | 16,5           | 196,2              | $\pm 62,6$             | 31,9                   | 43,0               | $\pm 9,3$              | 21,7                   | 2,32          | 4,6                   |
|                     | <i>U. longifolia</i>  | 644,0      | $\pm 108,33$   | 16,8           | 258,7      | $\pm 75,92$    | 29,4           | 52,4               | $\pm 14,1$             | 26,9                   | 25,7               | $\pm 4,9$              | 19,2                   | 2,49          | 2,0                   |
|                     | <i>U. praelonga</i>   | 456,6      | $\pm 63,48$    | 13,9           | 247,4      | $\pm 52,16$    | 21,1           | 117,1              | $\pm 13,1$             | 11,2                   | 17,1               | $\pm 2,9$              | 16,7                   | 1,85          | 6,8                   |

Tabela 3. Características morfométricas das sementes de *Utricularia amethystina*. DP= desvio-padrão ( $\mu\text{m}$ ); CV= coeficiente de variação ( $\text{DP}/\text{Média} \times 100$ ; %); Cp= comprimento médio ( $\mu\text{m}$ ); Lg= largura média ( $\mu\text{m}$ ); Cp/Lg= razão entre as medidas de comprimento e largura para inferir sobre a forma das sementes.

| Origem               | Cp semente | DP: Cp semente | CV: Cp semente | Lg semente | DP: Lg semente | CV: Lg semente | Lg célula da testa |
|----------------------|------------|----------------|----------------|------------|----------------|----------------|--------------------|
| Brasil, Amazonas     | 313,90     | $\pm 37,20$    | 11,9           | 134,10     | $\pm 35,71$    | 26,6           | 2,52               |
| Brasil, Amazonas     | 270,55     | $\pm 42,90$    | 15,9           | 137,60     | $\pm 17,28$    | 12,6           | 1,93               |
| Brasil, Amazonas     | 256,00     | $\pm 0,00^*$   | 0,0            | 112,00     | $\pm 0,00$     | 0,0            | 2,29               |
| Brasil, Goiás        | 330,67     | $\pm 64,66$    | 19,6           | 181,33     | $\pm 36,95$    | 20,4           | 1,90               |
| Brasil, Minas Gerais | 246,10     | $\pm 47,59$    | 19,3           | 125,71     | $\pm 33,29$    | 26,5           | 2,13               |
| Brasil, Minas Gerais | 331,43     | $\pm 41,02$    | 12,4           | 194,29     | $\pm 32,57$    | 16,8           | 1,74               |
| Brasil, Minas Gerais | 264,00     | $\pm 43,49$    | 16,5           | 201,60     | $\pm 37,10$    | 18,4           | 1,33               |
| Brasil, Minas Gerais | 304,91     | $\pm 42,14$    | 13,8           | 189,26     | $\pm 34,40$    | 18,2           | 1,67               |
| Brasil, Paraíba      | 317,71     | $\pm 14,40$    | 4,5            | 178,29     | $\pm 40,72$    | 22,8           | 1,80               |
| Brasil, Rondônia     | 271,09     | $\pm 26,02$    | 9,6            | 147,20     | $\pm 24,87$    | 16,9           | 1,89               |
| Brasil, Roraima      | 298,67     | $\pm 24,55$    | 8,2            | 150,79     | $\pm 34,42$    | 22,8           | 2,07               |
| Brasil, Roraima      | 320,00     | $\pm 0,00^*$   | 0,0            | 192,00     | $\pm 0,00$     | 0,0            | 1,67               |
| Colômbia, Vaupes     | 295,70     | $\pm 38,27$    | 12,9           | 156,44     | $\pm 24,44$    | 15,6           | 1,93               |

\* Uma única semente desta amostra pode ser medida (vide Tabela 1).

O emprego da razão comprimento/ largura (Cp/Lg) combinado às características qualitativas permitiram a identificação de quase todas as espécies,

com exceção de *Utricularia huntii*, *U. tridentata* e *U. praelonga*. Assim, apresentamos as descrições das sementes de cada espécie.

### ***Utricularia* sect. *Foliosa***

*Utricularia amethystina*: sementes com  $282,0 \pm 50,85$   $\mu\text{m}$  de comprimento, e  $155,1 \pm 38,67$   $\mu\text{m}$  de largura, arredondadas a prismáticas ou fusiformes, embora alongadas ( $\text{Cp/Lg} = 1,82$ ), algumas vezes torcidas no eixo longitudinal. A superfície da testa pode ser nua ou lisa a verrucosa nas paredes periclinais (Fig. 1D, 2).

*Utricularia tridentata*: sementes com  $426,7 \pm 136,08$   $\mu\text{m}$  de comprimento, e  $165,3 \pm 33,31$   $\mu\text{m}$  em largura, fusiforme e muito alongada ( $\text{Cp/Lg} = 2,58$ ); testa lisa (Fig. 1C).

### ***Utricularia* sect. *Psyllosperma***

*Utricularia calycifida*: sementes com  $370,7 \pm 41,19$   $\mu\text{m}$  de comprimento e  $561,6 \pm 68,32$   $\mu\text{m}$  de largura, ovadas a deltoides ( $\text{Cp/Lg} = 0,66$ ), achatada. A superfície da testa é papilosa e as células têm formato peculiar de estrela (Fig. 1G).

*Utricularia hispida*: sementes com  $464,7 \pm 93,48$   $\mu\text{m}$  de comprimento e  $178,1 \pm 34,22$   $\mu\text{m}$  de largura, prismáticas e bastante alongadas ( $\text{Cp/Lg} = 2,61$ ), células tetragonais com superfície granulada (Fig. 1E).

*Utricularia huntii*: sementes com  $319,6 \pm 37,21$   $\mu\text{m}$  de comprimento e  $138,0 \pm 22,83$   $\mu\text{m}$  de largura, fusiformes e bastante alongadas ( $\text{Cp/Lg} = 2,32$ ). As células da testa tem formato tetragonal e muito alongado — uma única célula pode estender-se por todo eixo longitudinal. A superfície é lisa (Fig. 1B).

*Utricularia longifolia*: sementes com  $644,0 \pm 108,33$   $\mu\text{m}$  de comprimento e  $258,7 \pm 75,92$   $\mu\text{m}$  de largura, prismáticas e bastante alongadas ( $\text{Cp/Lg} = 2,49$ ). As células da testa, assim como *U. calycifida*, têm formato peculiar e menor em comparação às demais espécies, mas neste caso assemelham-se ao formato de colméias de abelha com superfície lisa (Fig. 1A).

*Utricularia praelonga*: sementes com  $456,6 \pm 63,48$   $\mu\text{m}$  de comprimento e  $247,4 \pm 52,16$   $\mu\text{m}$  de largura, prismáticas e alongadas ( $\text{Cp/Lg} = 1,85$ ). A superfície da testa é lisa e as células apresentam formas irregulares (Fig. 1F).

Foi encontrado um gradiente entre o tamanho das sementes de diferentes espécies. Somente duas espécies divergiram quanto às dimensões, sendo facilmente identificáveis: *U. calycifida* e *U. longifolia* (Fig. 3–4). As espécies de *Utricularia* estudadas apresentaram sementes arredondadas, prismáticas, alongadas ou fusiformes, com a razão entre comprimento e largura (Cp/Lg) variando de 0,66 (*U. calycifida*) a 2,61 (*U. hispida*) (Tabela 2).

As sementes de *U. amethystina* apresentaram alto polimorfismo, em relação à diferentes variáveis como comprimento e largura (Tabela 3; Fig. 5–6) assim como dimensão (Tabela 3) e ornamentação das células da testa (Fig. 2). As paredes periclinais das células da testa exibem grande variação de padrões, desde liso a levemente rugoso (Fig. 2D) ao padrão tubercular com projeções elipsóides e/ou esféricas (Fig. 2F).

## Discussão

O tamanho das sementes depende de muitos fatores ecológicos, principalmente relacionados ao sucesso da germinação, viabilidade, predação e também dispersão. Dentro deste contexto, sementes pequenas chamam atenção devido à miniaturização ser acompanhada pela diminuição do estoque energético para manutenção do embrião — o que pode implicar em menor viabilidade — e uma tendência à simplificação do embrião em uma massa de células indiferenciadas. Estas sementes têm sido chamadas genericamente de “dust seeds” (Eriksson *et al.* 2011). As sementes de Lentibulariaceae são exalbuminosas e diminutas, em geral com comprimento entre 0,2–2,0 mm (Abraham & Subramanyam, 1965, Corner 1976). Porém, estudos recentes com *Pinguicula* reportaram uma variação menor do tamanho da semente, entre 0,4–1,0 mm (Degtjareva *et al.* 2004, Conti & Peruzzi 2006). Não foi possível identificar as espécies estudadas baseado exclusivamente nas características morfométricas, principalmente devido à sobreposição do tamanho das sementes de diferentes táxons, mesmo entre espécies das distintas seções de acordo com sistema de classificação proposto por Taylor (1989). Os tamanhos das sementes não permitiram a separação das espécies (Fig. 3–4). Assim, nossos resultados mostram que o tamanho da semente não é uma

característica útil para fins taxonômicos em *Utricularia*, assim como foi observado em *Pinguicula* (Conti & Peruzzi 2006).

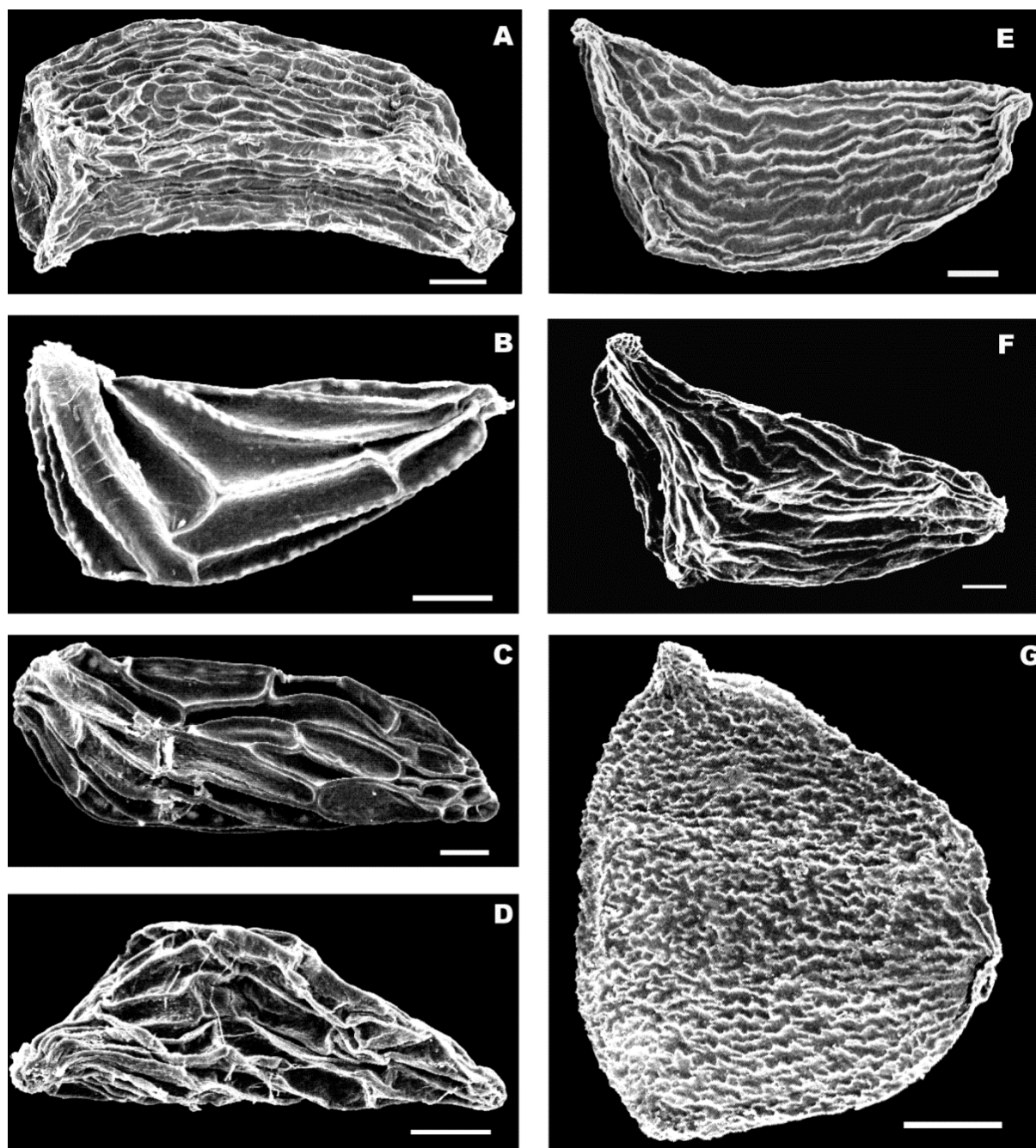


Figura 1. Sementes de *Utricularia*. A. *U. longifolia*; B. *U. huntii*; C. *U. tridentata*; D. *U. amethystina*; E. *U. hispida*; F. *U. praelonga*; G. *U. calycifida*. A barra representa 50µm.

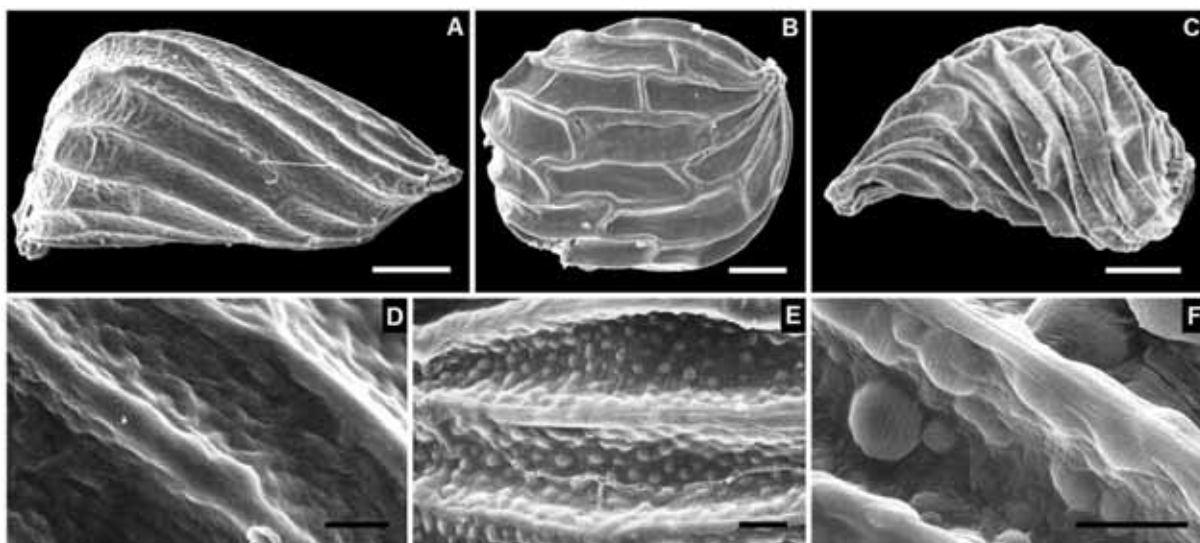


Figura 2. Sementes de *Utricularia amethystina* e detalhes das características morfológicas: diferentes formatos (A, B e C) e superfície da testa (D, E e F). (A, B e C: barra=50µm; D, E e F: barra=10µm).

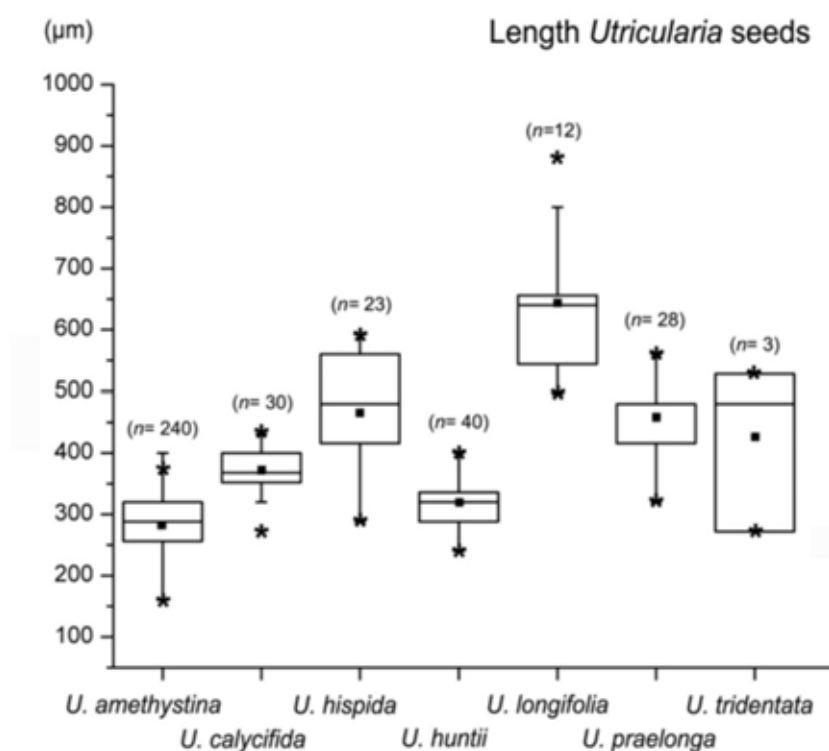


Figura 3. Comprimento das sementes de *Utricularia* representadas por *box-plot*. Os números acima das barra indicam o número de sementes medidas.

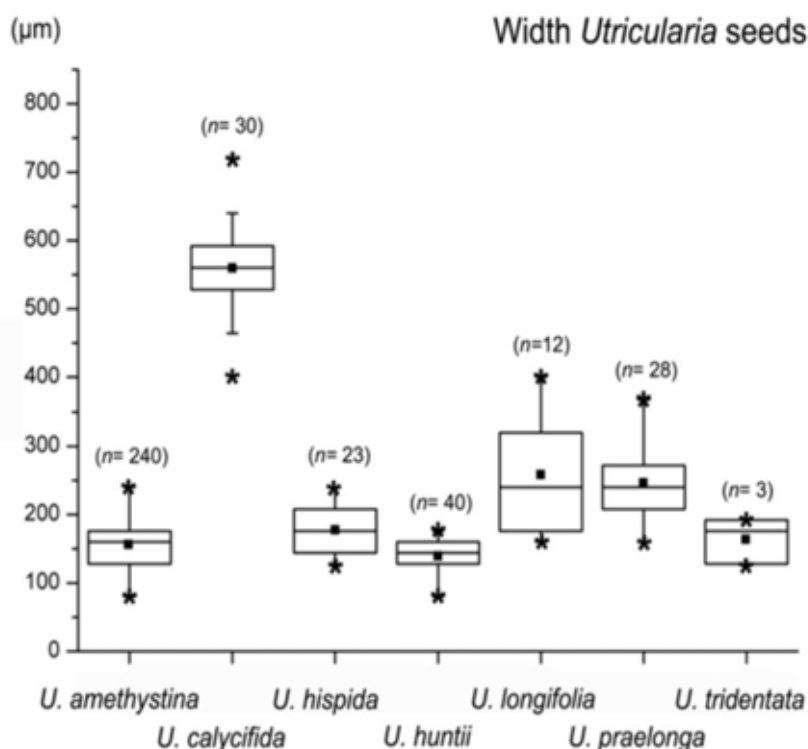


Figura 4. Largura das sementes de *Utricularia* representadas por *box-plot*. O N de sementes medidas para cada amostra está indicado no gráfico.

As sementes de *Utricularia* são muito variáveis quanto à forma (Taylor 1989), mas não são necessariamente tão alongadas quanto proposto por Eriksson *et al.* (2011). Apesar disso, o formato da semente e outras características qualitativas podem ser aplicadas para distinguir muitas espécies. Como exemplificado aqui, o formato da semente, a ornamentação nas paredes periclinais e o formato das células da testa são caracteres úteis para identificação, contudo não foram suficientes para distinguir entre *U. huntii*, *U. praelonga* e *U. tridentata*. Estes resultados corroboram o relacionamento próximo entre *U. sect. Psyllosperma* e *U. sect. Foliosa*, possivelmente como um grupo monofilético como proposto por Müller & Borsh (2005) baseado em dados moleculares.

Não foram identificados caracteres das sementes que permitam delimitar as seções. Isto porque as sementes de ambas as seções exibem características similares tanto entre os caracteres contínuos (como tamanho da semente ou das

células) quanto discretos (forma das sementes e células, ornamentação) com grande variação (Tabela 2; Fig. 1–4). Portanto, baseado exclusivamente nas características de sementes de *Utricularia*, não há suporte para as seções propostas pelo sistema de classificação do Taylor (1989).

Contudo, o tamanho pequeno das sementes associado às grandes células da testa com as paredes periclinais achatadas produzem uma superfície foveolada, que é muito favorável para a agregação de bolhas de ar e desse modo poderia facilitar a flutuabilidade da semente. Espécies de *Utricularia* são geralmente encontradas em ambientes brejosos e solos hidromórficos, em geral associados com corpos d'água sazonais, portanto um ambiente bastante propício para a dispersão de sementes por meio da água.

Quanto à *Utricularia amethystina*, uma ampla amostragem foi analisada com representantes de todas as regiões do Brasil onde a espécie pode ser encontrada (Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste) e também Colômbia (Tabela 1, Fig. 5–6). Apesar disso, encontrou-se alto polimorfismo e nenhuma correlação entre morfologia da semente e distribuição geográfica ou tipo floral (corola amarela, branca e púrpura). As sementes das plantas com flores brancas e amarelas distribuem-se em gradiente com os espécimes com flores púrpuras. O alto polimorfismo encontrado neste táxon (hábito, forma e cor da corola, além de caracteres polínicos) historicamente foi responsável pelo reconhecimento e descrição de mais de 30 espécies. Contudo, Taylor (1989) não foi capaz de reconhecer diferentes espécies apesar do alto polimorfismo observado. Seu principal argumento para sinonimizar tantos táxons sob *Utricularia amethystina* foi a ausência de discontinuidades entre os táxons propostos, devido à variação gradual em diferentes características. E, baseado nos caracteres de sementes dos morfotipos de *U. amethystina* estudados não foram encontradas evidências para dividi-la em diferentes táxons.

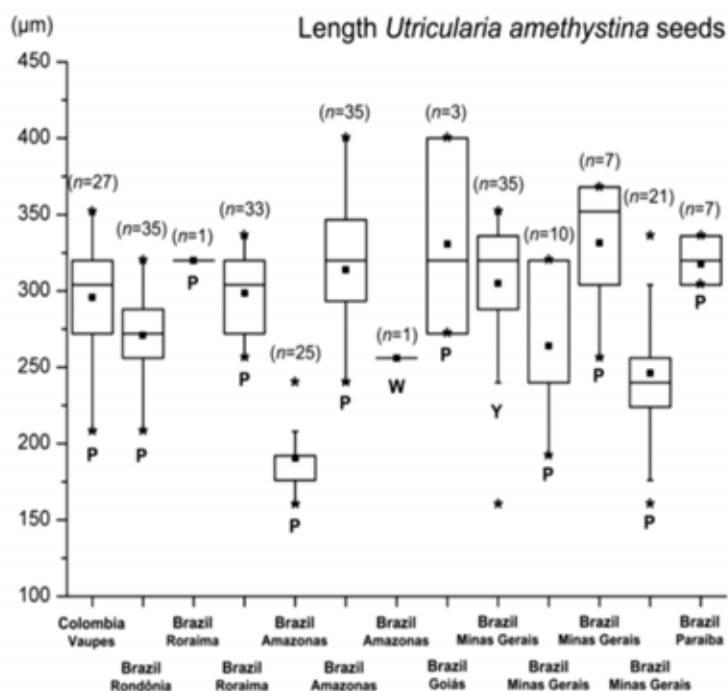


Figura 5. Comprimento das sementes de *Utricularia amethystina* representadas por *box-plot*. O N de sementes medidas para cada amostra está indicado no gráfico.

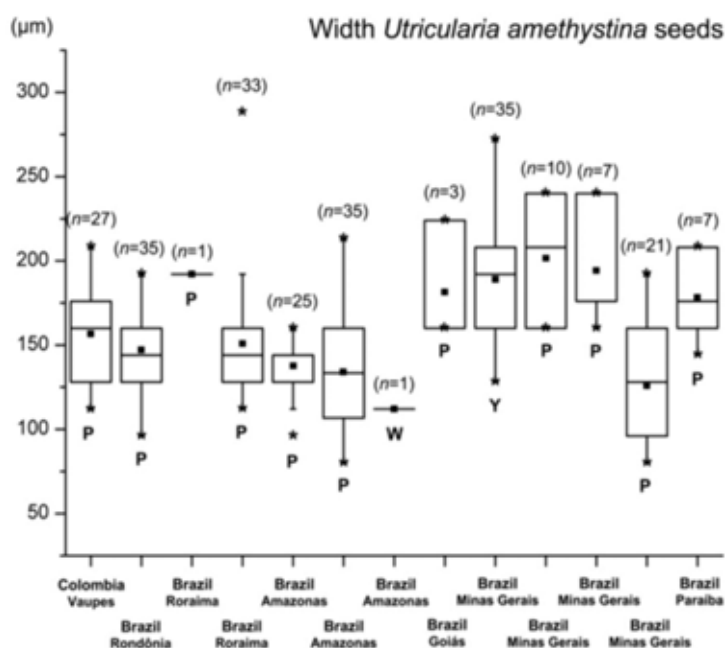


Figura 6. Largura das sementes de *Utricularia amethystina* representadas por *box-plot*. O N de sementes medidas para cada amostra está indicado no gráfico. Chave de identificação para espécies de *Utricularia* sect. *Foliosa* Kamieński e *U.* sect. *Psyllosperma* P.Taylor baseado em caracteres das sementes.

1. Sementes ovada-deltoides; células da testa com forma de estrela.....*U. calycifida*
- Sementes não ovada-deltoides; células da testa com outra forma.....2
2. Sementes arredondas, alongadas ou fusiformes.....*U. amethystina*
- Sementes prismáticas.....3
3. Paredes periclinais das células da testa com superfície tuberculosa.....*U. hispida*
- Paredes periclinais das células da testa com superfície lisa.....4
4. Células da testa com razão comprimento/largura  $\leq 2$ .....*U. longifolia*
- Células da testa com razão comprimento/largura maior que 2.....*U. huntii* / *U. praelonga* / *U. tridentata*

## Referências

- Abraham, V. & Subramnyanm, K. (1965) Studies on seeds of various taxa of *Utricularia* occurring in west Bengal. *Botanical Survey of India*, 62: 97–102.
- Benjamin, L. 1847. Lentibularieae. *Linnaea*, 20: 485–498.
- Corner, E.J.H. (1976) Lentibulariaceae. In: Corner, E.J.H. (ed.) *The Seeds of Dicotyledons*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 173–174.
- Conti, F. & Peruzzi, L. (2006) *Pinguicula* (Lentibulariaceae) in central Italy: taxonomic study. *Annales Botanici Fennici* 43: 321–337.
- Degtjareva, G., Casper, J., Hellwig, F. & Sokoloff, D. (2004) Seed morphology in the genus *Pinguicula* (Lentibulariaceae) and its relation to taxonomy and phylogeny. *Botanische Jahrbücher* 125: 431–452.  
<http://dx.doi.org/10.1127/0006-8152/2004/0125-0431>
- Eriksson, O. & Kainulainen, K. (2011) The evolutionary ecology of dust seeds. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 13: 73–87.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ppees.2011.02.002>
- Farooq, M. (1964) Studies in Lentibulariaceae - Embriology of *Utricularia stellaris* Linn.f. var. *inflexuosa*. Part 1. Flower, organogeny, ovary, megasporogenesis and female gametophyte. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the India* 30: 263–279.
- Fernández-Pérez, A. (1964) Plantas Insetívoras I. Lentibulariaceas de Colombia y Peru. *Caldasia* 9(41): 5–84.
- Fischer E., Porembski S. & Barthlott W. (2000) Revision of the genus *Genlisea* (Lentibulariaceae) in Africa and Madagascar with notes on ecology and phytogeography. *Nordic Journal Botany* 20: 291–318.  
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1756-1051.2000.tb00746.x>
- Fleischmann, A., Rivadavia, F., Gonella, P.M. & Heubl, G. (2011) A revision of *Genlisea* subgenus *Tayloria* (Lentibulariaceae). *Phytotaxa* 433: 1–40.
- Fleischmann, A. (2012) *A Monograph of the Genus 'Genlisea'*. Redfern Natural History Productions, Ltd., Poole. 727 pp.

- Fromm-Trinta, E. (1977) *Tayloria* Fromm-Trinta—Nova Seção do gênero *Genlisea* St.-Hil. (Lentibulariaceae). *Boletim do Museu Nacional Rio de Janeiro, Botanica* 44: 1–4.
- Fromm-Trinta, E. (1979) Revisão das espécies do gênero *Genlisea* St.-Hil. (Lentibulariaceae) das regiões sudeste e sul do Brasil. *Rodriguésia* 31: 17–139.
- Gardner, G. (1842) Contributions towards a Flora of Brazil. *London Journal of Botany* 1: 528–545.
- Guisande, C., Granado-Lorencio, C., Andrade-Sossa, C. & Duque, S.R. (2007) Bladderworts. *Functional Plant Science and Biotechnology* 1: 58–68.
- Jobson, R.W., Playford, J., Cameron, K.M. & Albert, V.A. (2003) Molecular phylogenetics of Lentibulariaceae inferred from plastid rps16 intron and trnL-F DNA sequences: implications for character evolution and biogeography. *Systematic Botany* 28: 157–171.
- Kamiński, F. (1891) Lentibulariaceae. In: Engler, A. & Prantl, K.A.E, *Die Naturalischen Pflanzenfamilien*. W. Engelmann, IV, 3b, (preprint), Leipzig, 108–123.
- Kondo, K., Segawa, M. & Nehira, K. (1978) Anatomical Studies on Seeds and Seedlings of Some *Utricularia*(Lentibulariaceae). *Brittonia* 30: 89–95.  
<http://dx.doi.org/10.2307/2806465>
- Lamarck, J.B.A.P. de M. (1791) *Tableau encyclopedique et methodique des trois règnes de la nature: Botanique* 1. Panckoucke, Paris, 250 pp.  
<http://dx.doi.org/10.5962/bhl.title.218>
- Linnaeus, C. (1753) *Species Plantarum* 1. Impensis Laurentii Salvii, Holmiae, 560 pp.
- Miranda, V.F.O. de & Rivadavia, F. (2010) Lentibulariaceae. In: Forzza, R.C., Baumgratz, J.F.A., Bicudo, C.E.M., Jr., A.A.C., Costa, A., Costa, D.P., Hopkins, M., Leitman, P.M., Lohmann, L.G., Maia, L.C., Martinelli, G., Menezes, M., Morim, M.P., Coelho, M.A.N., Peixoto, A.L., Pirani, J.R., Prado, J., Queiroz, L.P., Souza, V.C., Stehmann, J.R., Sylvestre, L.S., Walter, B.M.T. & Zappi, D. (eds.) *Catálogo de Plantas e Fungos do Brasil* 2(1). Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, pp. 1163–1166.
- Miranda, V.F.O. de & Rivadavia, F. (2013) Lista de Espécies da Flora do Brasil: Lentibulariaceae. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB146> (accessado: 10 Junho 2013).
- Müller, K., Borsch, T., Legendre, L., Porembski, S., Theisen, I. & Barthlott, W. (2004) Evolution of carnivory in Lentibulariaceae and the Lamiales. *Plant Biology* 6: 1–14.  
<http://dx.doi.org/10.1055/s-2004-817909>
- Müller, K. & Borsch, T. (2005) Phylogenetics of *Utricularia* (Lentibulariaceae) and molecular evolution of the trnK intron in a lineage with high substitutional rates. *Plant Systematics and Evolution* 250: 39–67.  
<http://dx.doi.org/10.1007/s00606-004-0224-1>
- Płachno, B. & Świątek, P. (2009) Unusual embryo structure in viviparous *Utricularia nelumbifolia*, with remarks on embryo evolution in genus *Utricularia*. *Protoplasma* 239: 69–80.

- <http://dx.doi.org/10.1007/s00709-009-0084-1>
- Rajan, S.S. & Kumar, D.J. (1973) Embryological studies in Lentibulariaceae. I. Floral morphology and embryology of *Utricularia smithiana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 80: 18–25.
- Reifenrath, K., Theisen, I., Schnitzler, J., Porembski, S. & Barthlott, W. (2006) Trap architecture in carnivorous *Utricularia* (Lentibulariaceae). *Flora* 201: 597–605.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.flora.2005.12.004>
- Richard, L.C.M. (1808) Lentibulariae. In: Poiteau, P.A. & Turpin, P.J.F. *Flore parisienne: contenant la description des plantes qui croissent naturellement aux environs de Paris* 1. PR, Paris, pp. 26.
- Saint-Hilaire, A.F.C. de. (1833) Voyage dans le District des Diamans du Brésil. Librairie-Gide, Paris, 454 pp.
- Saint-Hilaire, A. & Girard, F. de. (1838) Monographie des Primulacées et des Lentibulariées du Brésil méridional. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences* 7: 868–870.
- Shivaramiah, G. (1967) Observations on the floral morphology and embryology of *Utricularia stricticaulis* Stapf. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 65: 56–62.
- Sylvén, N.O.V. (1909) Die Genliseen und Utricularien des Regnellschen Herbariums. *Arkiv für Botanik* 8: 1–48 pp.
- Taylor, P. (1986) New Taxa in *Utricularia* (Lentibulariaceae). *Kew Bulletin* 41: 8–9.
- Taylor, P. (1989) The Genus *Utricularia*—a taxonomic monograph. *Kew Bulletin Additional Series* 14: 724 pp.
- Zamudio, S. & Olvera, M. (2009) A new species of *Utricularia* (Lentibulariaceae) from Guerrero, Mexico. *Brittonia* 61: 119–125.  
<http://dx.doi.org/10.1007/s12228-008-9063-7>.

## CAPÍTULO 3 – Estratégias reprodutivas em *Utricularia*: autopolinização mediada pelo polinizador em *Utricularia amethystina*

### Resumo

**Justificativas:** Polinizadores de *Utricularia* têm sido raramente observados, o que motivou alguns autores a sugerir sua escassez no ambiente natural. Sabe-se que algumas dentre as 250 espécies do gênero são autocompatíveis, porém apenas quatro espécies tiveram seus polinizadores registrados. De fato, a biologia reprodutiva de Lentibulariaceae tem sido negligenciada em favor de características relacionadas à síndrome da carnivoría. Considerando que *Utricularia* é um gênero cosmopolita, e que possui espécies com ampla distribuição — como *U. amethystina* que se distribui em diferentes altitudes desde o Sul da América do Norte à América do Sul — investigar aspectos da sua biologia reprodutiva podem auxiliar a compreender sua dispersão e manutenção através de longos gradientes ambientais.

**Resultados:** Foram observadas borboletas (Hesperiidae) e abelhas solitárias (Halictidae) polinizando flores de *Utricularia amethystina*, confirmando a síndrome melitófila predita pelas características da flor. Ambos polinizadores apresentaram comportamento generalista e visitas curtas, concentradas no final da tarde. O comportamento dos polinizadores associado à sua escassez e baixa frequência de visitação poderiam afetar a manutenção das populações. Paralelamente, a receptividade estigmática mostrou-se persistente durante toda a vida da flor; o pólen atingiu a viabilidade máxima em 24h após a antese, decaindo rapidamente em seguida; a razão pólen:óvulo (P/O) é baixa (4), comparável à espécies cleistógamas de *Utricularia*, contudo *U. amethystina* é incapaz de autopolinizar-se espontaneamente. Com base nestas características, sugerimos que a autopolinização mediada pelo polinizador poderia explicar a baixa razão P/O em flores casmógamas.

**Conclusões:** *Utricularia amethystina* é polinizada por abelhas do gênero *Augochloropis* sp. (Halictidae) e borboletas (Hesperiidae), como esperado pela síndrome de polinização. Sugerimos que o comportamento generalista do polinizador e os efeitos negativos da baixa visitação seja minimizado pela autopolinização mediada pelo polinizador. Estas características podem ser comuns a outras espécies do gênero e contribuir para adaptação à disponibilidade local de polinizadores.

**Palavras-chave:** Halictidae, Hesperiidae, polinização, viabilidade polínica, receptividade estigmática, plantas carnívoras.

## Introdução

Apesar da sua importância para processos de especiação e manutenção das populações, a biologia reprodutiva de plantas carnívoras tem recebido menos atenção que características relacionadas com a carnivoría. Lentibulariaceae Rich. é a maior família de angiospermas carnívoras, cosmopolita, com aproximadamente 320 espécies [1] distribuídas em três gêneros: *Pinguicula* L., *Genlisea* A.St.-Hil. e *Utricularia* L. O gênero *Utricularia* L. agrupa aproximadamente 250 espécies [2] e representa cerca de 30% de todas as espécies das angiospermas carnívoras. Cosmopolita, está ausente apenas em regiões desérticas e polares. Apesar de suas características atrativas e ampla área de distribuição, suas características reprodutivas têm sido parcamente estudadas [3-9].

Insetos e, menos frequentemente, beija-flores foram descritos como polinizadores de *Utricularia* [1, 10], de modo geral baseado apenas em observações eventuais [4, 5, 10]. As únicas exceções são três espécies indianas de *Utricularia* (*Utricularia albocaerulea* Dalzell, *Utricularia purpurascens* J.Graham e *Utricularia reticulata* Sm.) [8] e uma espécie endêmica do Brasil (*Utricularia reniformis* A.St.-Hil.) [9], que tiveram aspectos da biologia reprodutiva investigados e a descrição de seus polinizadores. A escassez de registros de polinizadores é inconsistente com suas características florais atrativas, como a produção de néctar [8], simetria zigomorfa, corola em forma de garganta, com cores vibrantes, guias de néctar e dividida em dois lábios, superior e inferior, que escondem os órgãos reprodutivos [11].

Se, de fato, seus polinizadores são escassos no ambiente natural como sugerido por alguns autores [4, 5, 10], a variação entre autopolinização e polinização cruzada pode contribuir para que espécies de *Utricularia* se adaptem às condições naturais distintas em amplas áreas de ocorrência [4, 5, 6, 7, 8, 12, 13]. Além disso, características atrativas podem variar ao longo da área de distribuição auxiliando na adaptação da planta à oferta local de polinizadores, como tamanho do cálcir [16, 17] — porção da corola adaptada para produzir e estocar néctar —, cor da corola e forma das células da epiderme da flor [14, 18, 19].

Algumas espécies de *Utricularia* possuem flores casmógamas (alógamas) e cleistógamas (autógamas) que podem ocorrer simpatricamente [4, 6, 7].

Dependendo da posição da superfície do estigma em relação às anteras, pode ocorrer autogamia também em flores casmógamas [4, 5, 7, 9], ainda que a autopolinização espontânea seja incomum nestas flores. Contudo, seria possível a autopolinização ocorrer em flores casmógamas através de estímulo mecânico, semelhante à “buzz pollination”. Apesar de incomum em flores com anteras com deiscência longitudinal, já houve um registro semelhante em Myrtaceae (*Gomidesia cerqueira* Niedenzu) [20]. Outra possibilidade, seria a autopolinização ser mediada pelo polinizador, como sugerido previamente por Hobbhahn *et al.* [8].

Em campo foi observado que alguns insetos, inclusive os polinizadores de *Utricularia amethystina*, pousavam sobre a flor e produziam uma vibração com o corpo, e em seguida deixavam a flor sem tentar abri-la em busca de recompensas (e.g. néctar). Baseado nesta observação, foi hipotetizado que a autopolinização em *Utricularia amethystina* poderia ser mediada por estímulo vibratório. Com isso, revisamos a literatura sobre biologia reprodutiva disponível para o gênero *Utricularia*, descrevemos características morfoanatômicas da flor e outros aspectos da reprodução de *Utricularia amethystina*, e testamos se a autopolinização poderia ser mediada por estímulo mecânico.

## Resultados

### *Anatomia e morfologia da flor de Utricularia*

*Utricularia amethystina* possui somente flores casmógamas, porém é altamente polimórfica quanto às características florais como número de flores, altura da inflorescência, assim como forma, tamanho e cor da corola. Por este motivo, faz-se necessário registrar que a população estudada apresentava 1-4 flores por eixo floral, com altura em torno de  $120,5 \pm 54,7$  mm ( $n=135$ ). A corola com margens inteiras, lábio inferior profundamente trilobado (Fig. 1A) e medindo  $5,5 \pm 1,6$  mm de comprimento ( $n=98$ ), lábio superior inteiro com  $3,5 \pm 1,2$  mm de comprimento ( $n=86$ ).

Com exceção de poucas espécies do gênero (e.g. *Utricularia neottiioides* A.St.-Hil & Girard) o lábio inferior da corola de *Utricularia* possui uma projeção que esconde o acesso ao cálcio e também aos órgãos reprodutivos, protegendo-os de

visitantes não-polinizadores (Fig. 1B). No interior do cálcx são armazenadas algumas poucas gotas de néctar. O posicionamento das anteras pode variar entre as espécies de *Utricularia*, afetando diretamente a probabilidade de autopolinização. Em *Utricularia amethystina*, assim como em outras espécies do gênero com flores casmógamas, as anteras com deiscência longitudinal localizam-se abaixo da superfície do estigma (Fig. 1B). O ovário é súpero, bicarpelar, sincárpico e unilocular, com muitos óvulos anátropos (Fig. 1C, 1D, 1E), com um tegumento e tenuinucelado, preso à placenta por um pedestal (Fig. 1E). O estilete é curto e oco (Fig. 1C). O estigma é dividido em dois lábios de tamanhos desiguais (Fig. 1C, 1F); o lábio maior corresponde à superfície estigmática, revestida por papilas onde os grãos de pólen se aderem (Fig. 1G). As papilas marginais alongam-se para baixo sem, contudo, tocar as anteras. O estigma é classificado como úmido do tipo III [21], devido à produção de secreção na superfície estigmática.

Tanto a epiderme da corola quanto do ovário são cobertas por tricomas curtos, unisseriados, capitados, glandulares, com cabeça formada por duas células (Fig. 2A). A face interna do palato — a projeção do lábio inferior da corola — possui papilas alongadas voltadas para a superfície do estigma (Fig. 2B). As células da epiderme com forma cônica (Fig. 2C e 2D) revestem toda corola, exceto o interior do cálcx, onde ocorrem papilas (Fig. 2D, 2E, 2F). Os nectários localizam-se apenas na face adaxial do interior do cálcx e diferem dos tricomas presentes na epiderme pelo pedúnculo unicelular com base larga, uma célula semelhante a um anel mais estreito, e a cabeça glandular que pode variar de uma a oito células (Fig. 2E, 2F).

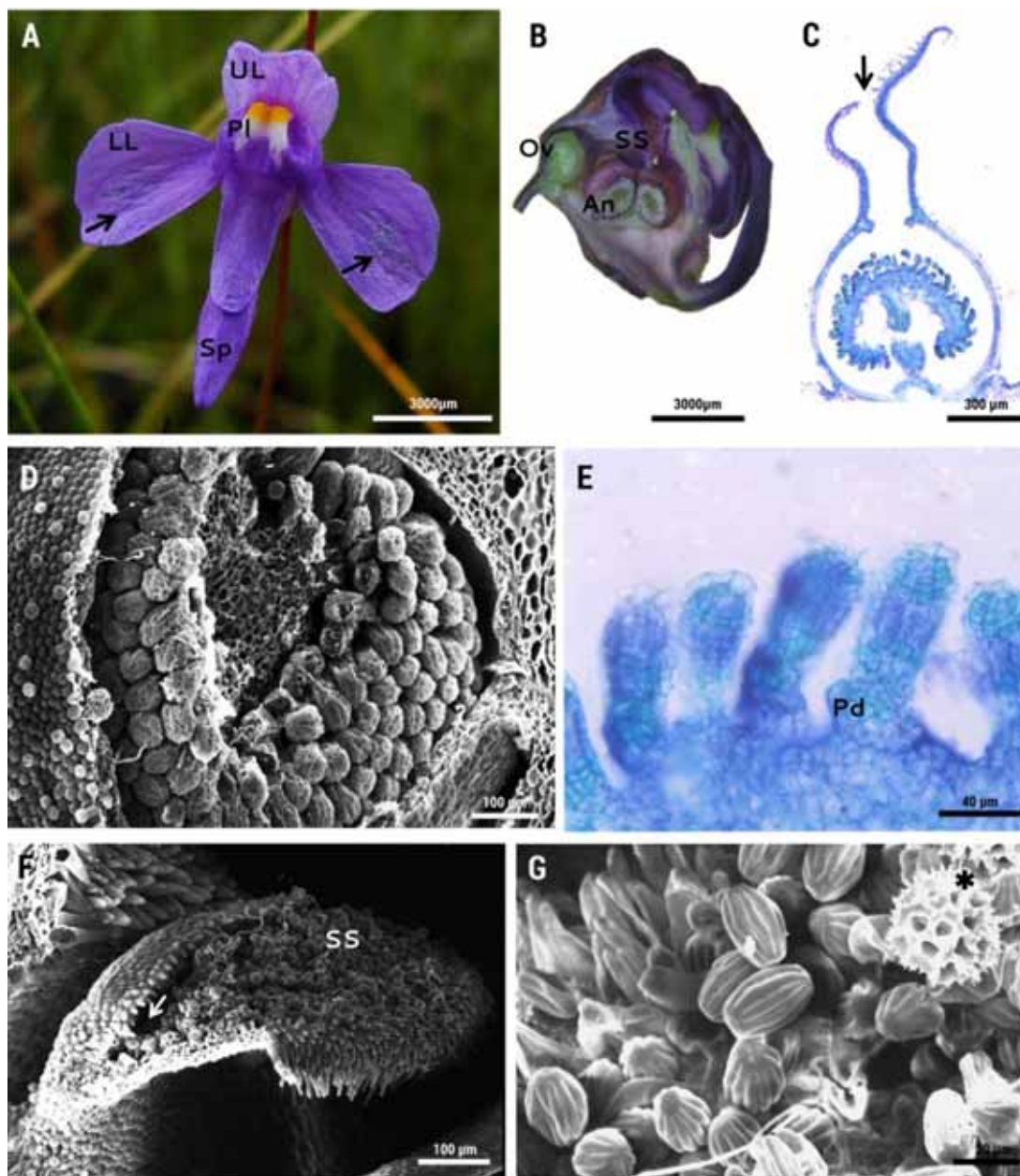


Figura 1. Características morfológicas e anatômicas da flor de *Utricularia amethystina*. A. Vista frontal da flor de *U. amethystina*; UL: Lábio superior da corola, LL: Lábio inferior da corola, Pl: região do palato, onde estão localizadas as guias de néctar, Sp: Cálcar, \*: indica as injúrias feitas pelos pés do polinizador ao pousar na flor. B: Vista lateral em corte da flor de *U. amethystina*, observe a disposição das anteras em relação à superfície do estigma; Ov: Ovário, An: Anteras, SS: Superfície do estigma. C: Corte longitudinal do pistilo, observe o estilete oco (seta) e o estigma bilabiado. D: Epiderme do ovário coberta por tricomas, interior do ovário: placenta e óvulos em MEV. E: Óvulos presos à placenta pelo pedestal (Pd). F: Superfície estigmática coberta com grãos de pólen; SS: Superfície do estigma, UL: Lábio superior, LL: Lábio inferior. G: Grãos de pólen alóctones (\*) sobre o estigma de *U. amethystina*.

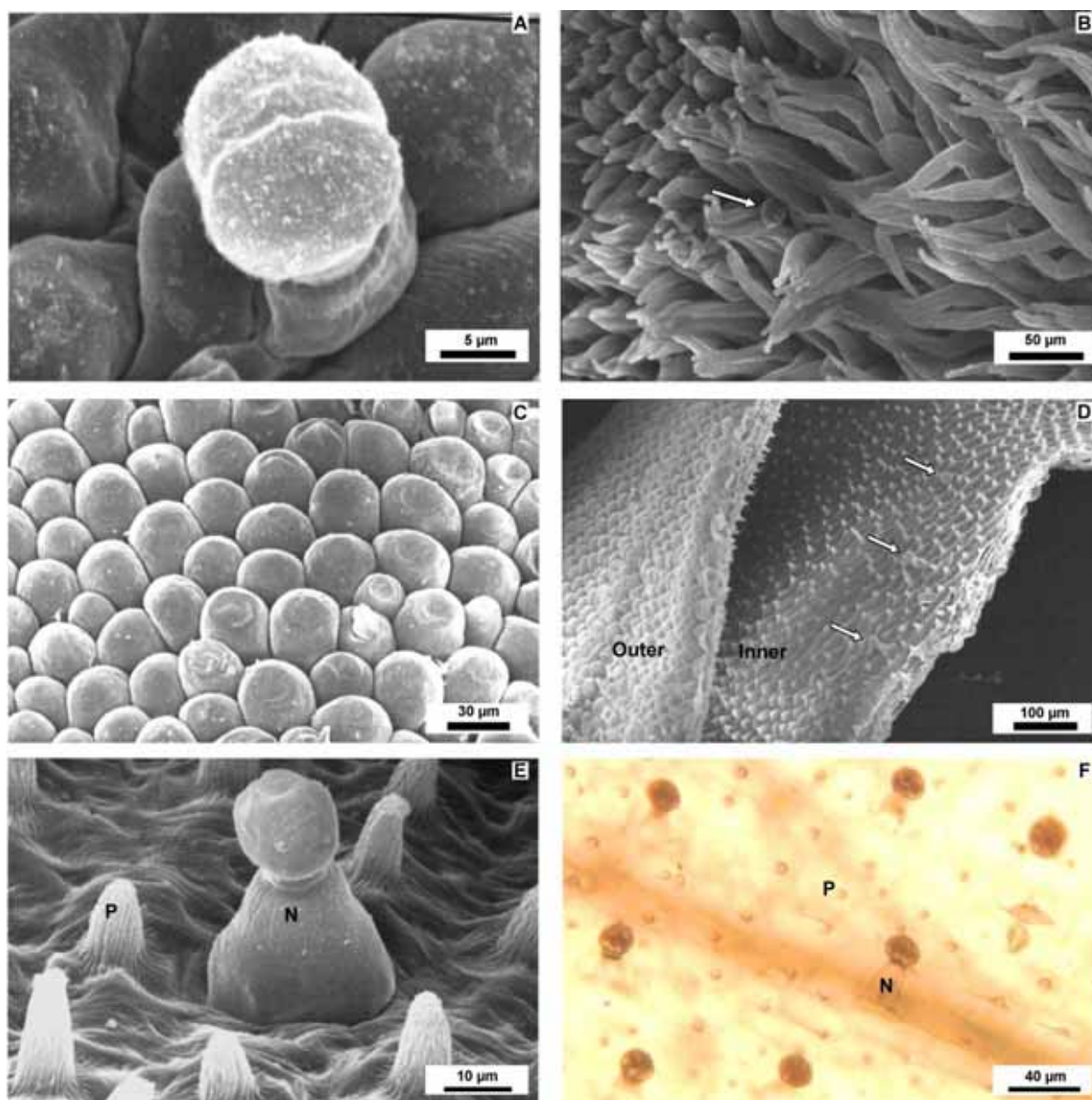


Figura 2. Tricomas e glândulas das flores de *U. amethystina*. A. Tricoma glandular presente na epiderme da corola. B: Tricomas localizados na face interna da região do palato, que provavelmente auxiliam na captura de grãos de pólen do corpo do polinizador; a seta indica um grão de pólen de *Utricularia*. C: Células cônicas da epiderme da corola. D: Superfície interna e externa do cálcar; as setas indicam nectários entre papilas. E: Vista em detalhe de nectários (N) e papilas (P) em MEV. F: Corte à fresco do cálcar, é possível observar variação na quantidade de células da cabeça glandular dos nectários.

### Viabilidade polínica e receptividade estigmática

A avaliação da viabilidade polínica a partir de corantes distintos (Alexander, Lugol e cloreto de tetrazolio) apresentou resultados coerentes, contudo o uso de corantes para grãos de amido (Lugol) se mostrou pouco sensível (Fig. 3). No total, 9.448 grãos de pólen foram contabilizados. A viabilidade polínica no início da antese foi de aproximadamente 60%, atingindo a viabilidade máxima após 24h da antese, decrescendo nas 24h seguintes.

Em contraste à variação da viabilidade do pólen liberado durante a vida da flor, o estigma permanece sempre receptivo desde o estágio de botão. O estigma somente torna-se não-receptivo com o início do desenvolvimento do fruto.

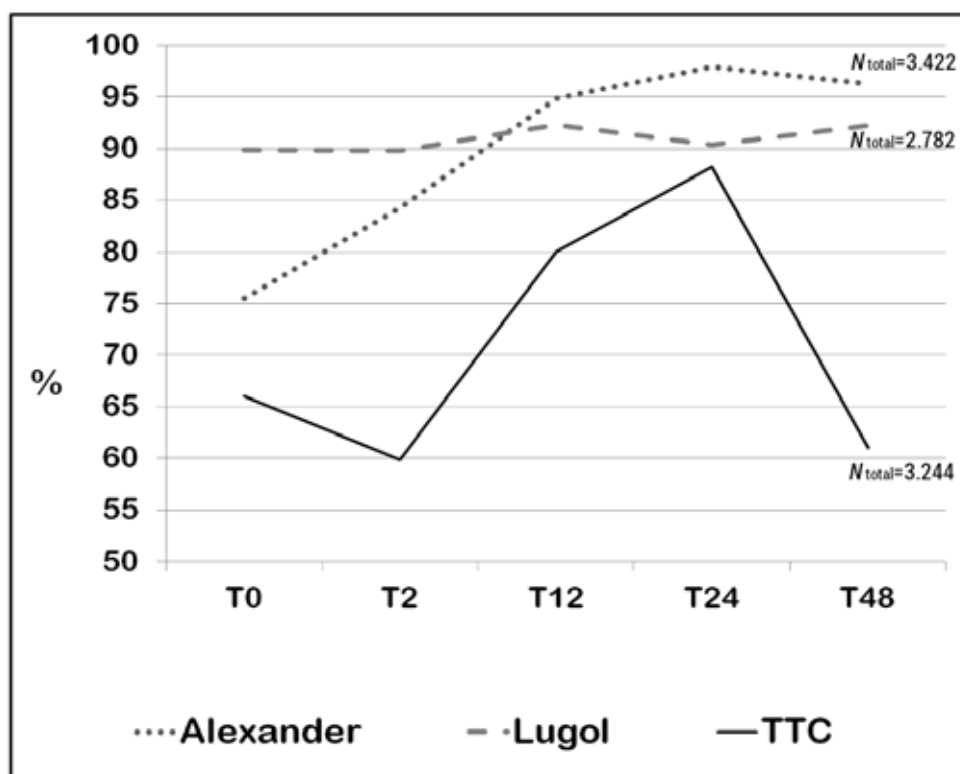


Figura 3. Variação temporal da viabilidade do pólen de *U. amethystina*. Descrito pelo percentual de grãos de pólen viáveis, de acordo com três métodos de avaliação: Alexander (linha pontilhada), lugol (linha tracejada) e TTC (linha cheia). A quantidade total de grãos de pólen avaliados (N) para cada método está apresentada no gráfico.

*Visitantes florais*

Poucos visitantes foram observados durante 84h de observação e somente uma abelha solitária *Augochloropsis* sp.1 (Halictidae; Fig. 4A, 4B) e uma borboleta (Hesperiidae; Fig. 4C) foram capazes de abrir a flor e alcançar o cálcar. Durante a observação, somente duas visitas da abelha e uma visita da borboleta foram registradas, embora os polinizadores foram observados em alta atividade durante a tarde, principalmente ao entardecer. Apesar da observação do comportamento de visita da abelha e borboleta, não foram observados grãos de pólen de *Utricularia amethystina* aderidos ao corpo dos animais capturados. Contudo, grãos de pólen de *Utricularia triloba* Benj. — uma espécie simpátrica à *U. amethystina* — no corpo de *Augochloropsis* sp.2 (Halictidae).

Além disso, considerando que o experimento com estímulo mecânico não resultou em formação de frutos, pode-se concluir que *U. amethystina* não é capaz de se autopolinizar espontaneamente, e que a vibração do diapasão não foi suficiente para mediar a autopolinização.



Figura 4. Polinizadores de *U. amethystina*. A and B: *Augochloropsis* sp.1 (Halictidae). C: Lepidóptero da família Hesperiidae.

## Discussão

### *Anatomia e morfologia da flor*

Corolas bilabiadas e bilateralmente simétricas com cálcar são características compartilhadas entre as Lentibulariaceae [1]. Além disso o clado *Genlisea-Utricularia* [22-24] — com poucas exceções — compartilham uma projeção do lábio inferior da corola chamada palato, que esconde os órgãos reprodutivos e o acesso ao cálcar. É comum existir manchas amarelas sobre o palato, funcionando como guias de néctar. O néctar é produzido e estocado no interior do cálcar, em pequenas quantidades e com alta concentração de açúcar [8]. Flores zigomorfas com cores atrativas e produção de néctar são características frequentemente associadas à síndrome melitófila [11,14,25]. Apesar disso, visitantes não previstos pela síndrome floral podem ser importantes [26], principalmente para espécies amplamente distribuídas. Neste caso, podem favorecer a adaptação das populações às condições locais, como foi observado em *Pinguicula vulgaris* L. [15] e *Utricularia juncea* Vahl [4].

O tamanho da corola em *Utricularia* é bastante variável e pode estar correlacionado com a forma de vida (e.g. epífita, terrestre ou aquática) e com a altura da inflorescência [27]. O lábio superior é, em geral, menor que lábio inferior, contudo este é bastante variável quanto à forma e tamanho. *U. amethystina* mostra alta variação intraespecífica em caracteres florais, mas a população estudada apresentava lábio inferior profundamente trilobado e maior que o lábio superior. Esta forma pode auxiliar os polinizadores a encontrar o acesso ao cálcar, por restringir as possibilidades de pouso. A posição de pouso pode ser percebida pelas injúrias deixadas nas pétalas (Fig. 1A).

As células cônicas observadas na epiderme da corola (Fig. 2C) — registrada pela primeira vez para a família — podem contribuir para a adesão do polinizador à superfície da flor, assim como aumentar a atratividade da flor devido ao brilho característico. Abelhas são capazes de aprender a distinguir e escolher entre corolas com superfícies diferentes [19, 28, 29] e apresentar preferência por flores com células cônicas na epiderme [29].

Além disso, superfícies revestidas por células cônicas são capazes de repelir água, sujeira e esporos de fungos [30-32], que poderiam acelerar a degradação da corola e diminuir a atratividade da flor para os polinizadores. Esta característica pode ser importante para o gênero, uma vez que sua floração em geral está associada aos períodos de chuva, ou logo após eles [6, 8].

As células cônicas, no entanto, revestem apenas a parte externa da corola, inclusive do cálc; mas o interior dele é revestido por papilas e nectários (Fig. 2D, 2E, 2F). É possível que as papilas tenham um papel importante na agregação de gotículas de néctar sobre a parede do cálc, uma vez que a pequena quantidade de néctar produzida não se acumula no fundo do cálc. Agregar o néctar em gotas maiores, poderia facilitar o acesso aos polinizadores.

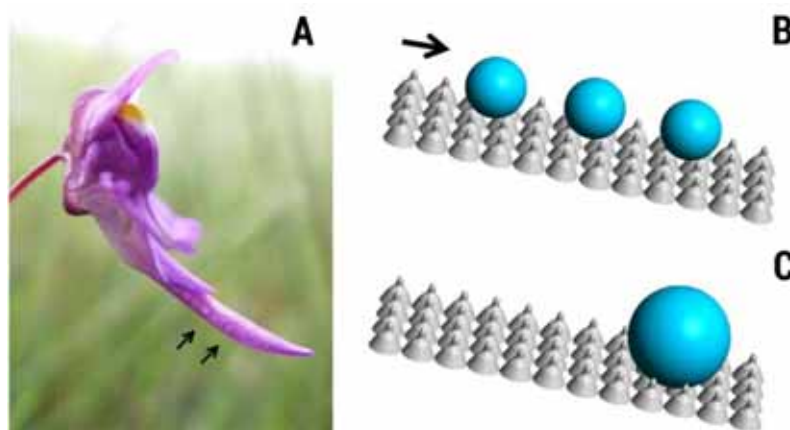


Figura 5. Hipótese para o mecanismo de agregação das gotículas de néctar em flores de *U. amethystina*. A: Vista lateral da flor; setas indicam algumas gotas de néctar aderidas na parte interna do cálc. B e C: Representação hipotética de como as papilas poderiam agir para agregação de gotas de néctar.

As flores de *U. amethystina* possuem três tipos de tricomas: (i) glandular, peduncular e unisseriado com cabeça formada por 2 células — semelhante ao descrito para *Utricularia caerulea* L. [7, 10, 33] — e dispersas por toda a face externa da corola e superfície do ovário (Fig. 2A); (ii) papilas não-glandulares que localizam-se na face interna do palato (Fig. 2B), próximo à entrada da cavidade do palato, e inclinada para baixo pode ajudar a capturar grãos de pólen do corpo do polinizador; e (iii) nectários glandulares, pedunculares, e unisseriados, com a base ampla e a

cabeça formada por 3-8 células, distribuídos apenas na face interna adaxial do cálcar (Fig. 2E, 2F).

Taylor [10] sugeriu que os tricomas na corola seriam osmóforos, assim como foi sugerido [34] que os tricomas cobrindo o ovário seriam nectários. Todavia, Clivati [9] concluiu que, em *Utricularia reniformis* A.St.-Hil., tanto os tricomas presentes na corola quanto aqueles sobre o ovário não são osmóforos. Em *U. amethystina* os tricomas da corola e ovário diferem morfologicamente dos nectários (Fig 2A, 2E e 2F). É possível que estes tricomas tenham sido herdados de ancestrais não-carnívoros como proteção contra herbívoros e atualmente não está claro se permanecem funcionais. Contudo, algumas espécies de *Genlisea* e *Utricularia* têm seus pedúnculos florais, pedicelos e sépalas cobertos por tricomas glandulares, e é incomum observar flores destas espécies com injúrias.

A anatomia do ovário observada para *U. amethystina* não difere substancialmente do padrão para o gênero, contudo, este é apenas o terceiro registro em Lentibulariaceae da presença de pedestal (Fig. 1E) — uma estrutura que conecta o óvulo à placenta. Esta característica, comum para Scrophulariaceae, foi descrito anteriormente para *U. reniformis* [35] e *Utricularia nelumbifolia* Gardner [36], como sinapomorfia para a sect. *Orchidioides*. A função do pedestal é incerta, talvez auxilie o despreendimento das sementes da placenta no fruto maduro [37], contudo sua observação em *U. amethystina* (sect. *Foliosa*) sugere que seja uma característica dispersa no gênero.

A superfície do estigma de *U. amethystina* é papilosa, com papilas marginais estendendo-se para baixo, porém sem alcançar as anteras. . Em flores cleitógamas de *Utricularia* estas papilas capturam os grãos de pólen diretamente das anteras, muitas vezes antes mesmo da antese. Devido à secreção produzida pelo estigma, este pode ser classificado como estigma úmido do tipo III [21], que está associado à alta taxa de germinação polínica. Khosla *et al.* [7] encontraram na secreção do estigma alta atividade de esterases não-específicas e proteínas relacionadas com a germinação polínica em *Utricularia stellaris* L. f. (no texto original chamado pelo sinônimo *Utricularia inflexa* var. *stellaris* L.f.).

### *Viabilidade polínica e receptividade estigmática*

As Lentibulariaceae, de modo geral, crescem em ambientes estressantes e sob forte sazonalidade — como ambientes com disponibilidade de água inconstante, acidificados, pobre em nutrientes e com alta radiação solar [8, 38-40]. É fundamental para a manutenção das populações que a reprodução esteja adaptada a estas pressões ambientais.

A receptividade precoce do estigma (desde o estágio de botão) foi observada em outras *Utricularia* [7], assim como a alta viabilidade polínica, com poucas exceções [3, 6, 7]. Estas características contribuem para aumentar a efetividade da reprodução sexuada, assim como a razão entre a quantidade de grãos de pólen e óvulos (P/O) por flor permite estimar sistemas alogâmicos e autogâmicos [41].

*U. amethystina* possui cerca de 300 óvulos e 1.200 grãos de pólen por flor, portanto, sua razão P/O é bastante baixa (P/O=4). Razões P/O menores que 100 são, de modo geral, associadas a espécies autogâmicas [42], contudo, em *Utricularia* mesmo espécies alogâmicas estritas possuem valores inferiores a 100 (e.g. *Utricularia tenuicaulis* Miki, P/O=53,5 [6]), assim como espécies com flores casmógamas como *U. amethystina* (e.g. *Utricularia dimorphantha* Makino P/O=24,1, [6]). Considerando que não houve autopolinização espontânea ou mediada por estímulo vibratório, é possível que *U. amethystina* seja alógama, apesar da baixa razão P/O.

Tão importante quanto a razão P/O é a distância entre o estigma e o tecido de transmissão, no interior do estilete, que frequentemente produz secreções que suportam ou regulam o crescimento do tubo polínico [41]. O estilete em *Utricularia* pode ser curto ou longo [10], mas em *U. amethystina* é curto e oco (Fig. 1C). Consequentemente o crescimento do tubo polínico dependerá exclusivamente das reservas energéticas (na forma de grãos de amido) presentes no gametófito. Por outro lado, não existem mecanismos de seleção, regulação ou resistência ao seu desenvolvimento. Portanto, considerando o curto tempo de vida da flor de *U. amethystina* e suas características anatômicas, o grão de pólen deve germinar rapidamente — auxiliado, exclusivamente, pelas secreções do estigma — e em seguida, o tubo polínico deverá crescer suportado apenas pelas reservas do gametófito até encontrar o óvulo. Há poucos casos de anormalidades em

gametófitos masculinos registrados para *Utricularia* [6, 12, 13, 43] que afetaram o crescimento do tubo.

A viabilidade polínica máxima (80%) em *U. amethystina* foi atingida entre 12h e 24h após a antese, decrescendo rapidamente em seguida (61% após 48h da antese) (Fig.4). Esta variação na viabilidade do pólen em um período curto de tempo ( $\approx 24h$ ) deve se refletir na estrutura e diversidade genética das populações, pois favorece o cruzamento maior entre plantas próximas.

#### *Observação dos visitantes florais*

Flores com simetria zigomorfa são associadas a altos níveis de especialização na relação polinizador-planta, devido à padronização do local de contato entre a flor e o corpo do polinizador [14, 25]. *Utricularia* possui um conjunto de características da síndrome de polinização melitófila, como a produção e armazenamento de néctar, em pequenas quantidades e com alta concentração de açúcares, o formato da corola e a presença de guias de néctar [11].

Assim como previsto pela síndrome, foi observado a visitação de abelhas do gênero *Augochloropsis* sp. (Halictidae, Fig. 3) em flores de *U. amethystina*, assim como de lepidópteros da família Hesperidae. Dentre os visitantes observados (Apêndice Fig. A3) estes foram os únicos capazes de abrir a flor para alcançar o acesso ao cálcio. Para *Utricularia purpurascens* J.Graham [8] mais de 50 visitantes foram observados, contudo apenas duas abelhas (*Apis dorsata* e *A. cerana*) e lepidópteros das famílias Hesperidae, Noctuidae e Sphingidae foram polinizadores efetivos. Também *U. reniformis* teve abelhas *Xylocopa* sp. e *Bombus* sp. registradas como polinizadores [9]. Assim, os polinizadores observados estão de acordo com o esperado para o gênero, mas considerando também a ampla área de ocorrência de *U. amethystina*, podemos classificar seus polinizadores em um grupo funcional — de acordo com as medidas da cabeça ( $3,7 \pm 0,1\text{mm}$ ,  $n = 4$ ) e comprimento da língua ( $7,89 \pm 3,74\text{mm}$ ,  $n = 4$ ) — no qual insetos locais que se encaixem nestas medidas, poderiam ser potenciais polinizadores.

Contudo, os polinizadores observados, a despeito das características altamente especializadas para a polinização cruzada, apresentaram comportamento

generalista e baixa visitação nas flores de *U. amethystina*. Evidências deste comportamento são a presença de grãos de pólen de outras plantas tanto no estigma das flores de *U. amethystina* quanto no corpo e língua dos polinizadores (Apêndice Fig. A5). Possivelmente, esta seja uma característica comum para o gênero, já que também foram encontrados grãos de pólen alóctone em *Utricularia calycifida* Benj. e *Utricularia tricolor* A.St.-Hil. (C.G. Menezes, dados não publicados).

### *Implicações para a manutenção das populações*

Polinizadores com comportamento generalista poderiam reduzir drasticamente o sucesso da reprodução cruzada, devido à maior probabilidade de perda do pólen em flores de outras espécies antes de visitar a próxima flor de *Utricularia*. Portanto, nesta situação, a autopolinização deveria aumentar a estabilidade da população porque garantiria a produção de sementes, ainda que em menor proporção que a reprodução cruzada [4, 6]. Contudo, os experimentos em casa de vegetação sugerem que a autopolinização não é um evento comum, e não pode ocorrer espontaneamente — como em flores cleistógamas de *Utricularia* —, portanto, se ocorrer em *U. amethystina*, sugerimos que seja mediada pelo próprio polinizador.

Considerando a escassez de visitas observada em campo e a receptividade persistente do estigma, a autopolinização mediada pelo polinizador exigiria menos visitas para garantir a produção de sementes, permitiria a polinização cruzada — especialmente nos períodos em que a flor libera grãos de pólen com baixa viabilidade — e explicaria a redução da razão P/O, uma vez que este processo minimizaria as perdas de grãos de pólen.

Assim, a reprodução de *U. amethystina* é provavelmente resultado de um balanço entre autopolinização e polinização cruzada. A variação temporal da viabilidade polínica funciona como agente regulador deste balanço entre os dois tipos de reprodução e deve se refletir sobre a estrutura genética e o fluxo gênico entre as populações.

## Conclusões

*U. amethystina* possui simetria zigomorfa, guias de néctar, produção e armazenamento de néctar no interior do cálcio, portanto, um conjunto de características adaptadas para a polinização por abelhas. Estas características são compartilhadas entre outras espécies da família, contudo pela primeira vez descrevemos a presença de células cônicas na epiderme floral de *Lentibulariaceae*. Estas células são responsáveis pelo brilho característico das pétalas, podem aumentar a adesão do polinizador à flor no momento do pouso, e também podem ter ação repelente de água, esporos e poeira. Além disso, também é descrito para *U. amethystina* a presença do pedestal, estrutura que conecta o óvulo à placenta e inicialmente foi considerada como sinapomorfia da sect. *Orchidioides*. Sua presença em *U. amethystina* sugere que seja uma característica mais dispersa no gênero do que inicialmente suposto.

Um ponto crítico para a reprodução de *U. amethystina* — e, provavelmente para outras espécies do gênero — é o comportamento generalista dos seus polinizadores. Esta característica deveria fazer com que a razão pólen/óvulo (P/O) por flor fosse maior para compensar a alta probabilidade de perda do grão de pólen até chegar à próxima flor de *Utricularia*. Contudo, observou-se justamente o contrário: uma razão P/O baixa, semelhante ao encontrado em flores cleistógamas. Apesar disso, a autopolinização espontânea não foi observada. Para explicar esta relação conflitante entre baixa P/O, ausência de autopolinização nas condições testadas, e todos os caracteres altamente adaptados para a polinização cruzada e atratividade de abelhas, sugerimos que poucas visitas dos polinizadores sejam requeridas, desde que o polinizador realize tanto a autopolinização quanto a polinização cruzada, resultando em alta economia de grãos de pólen, segurança quanto à produção de sementes, aumento do fluxo gênico pela polinização cruzada.

## Materiais e Métodos

### *Local de estudo*

O estudo foi conduzido em fevereiro de 2012, na área do PARNA Serra da Canastra (coordenadas: S20,25947° O46,54578°; coletores: V.F.O. de Miranda (1644), E.C.Gasparino; C.G. Menezes; S. R. Silva; L.E. Mascaro; D.M. do Carmo; 1.394m de altitude) que está situado ao sul do Estado de Minas Gerais, Brasil. O clima local é classificado como temperado úmido [44] e tem precipitação anual em torno de 1.300–1.700 mm, sendo que o período chuvoso se concentra entre dezembro e fevereiro (autorização SisBio n. 26938-1).

A área do estudo é incluída no bioma Cerrado, com vegetação herbácea típica de campo rupestre. A população crescia em campo natural (formação Campo Limpo) [45] em meio a espécies de Asteraceae, Cyperaceae, Gesneriaceae e Poaceae. O solo é raso, úmido e arenoso: condições ideais para o crescimento e florescimento de *Utricularia* ao final do período chuvoso.

### *Espécie estudada*

*Utricularia amethystina* Salzm. ex A.St.-Hil. & Girard é uma angiosperma carnívora distribuída desde a América do Norte (Flórida, EUA) à América do Sul. No Brasil pode ser encontrada desde a região Norte e Nordeste ao Estado de São Paulo [46,47]. *U. amethystina* foi descrita como a espécie mais polimórfica dentre as *Utricularia* [10], com variações morfológicas que podem ser observadas entre e dentro das populações. Por exemplo, o pólen mostra variação na forma, ornamentação, e número de aberturas nos dois casos (C.G.Menezes, dados não publicados). Além disso, também o tamanho e cor da flor podem variar em diferentes locais — *U. amethystina* é uma das espécies do gênero que possuem variação na cor da corola, ela pode variar entre púrpura, branco e amarelo [10]. A população estudada apresentava flores púrpuras.

### *Anatomia e morfologia dos órgãos reprodutivos*

Flores de *U. amethystina* foram preservadas em glutaraldeído (3%, feito em tampão fosfato 0,1M, pH 7.4) por 48h, e em seguida preparadas para microscopia eletrônica de varredura (MEV). A preparação envolveu desidratação através de série etílica (10 min por concentração: 50%, 70%, 80%, 90% e 100%, sendo que a última etapa foi repetida três vezes). Em seguida, as amostras foram desidratadas em desidratador de ponto crítico (SEM 850) e metalizadas (DDESK II, Deton Vacuum). As amostras foram observadas e fotografadas sob microscópio eletrônico de varredura JEOL (Mod. JSM 5410). As fotografias obtidas dos ovários foram utilizadas para estimar a quantidade de óvulos. Flores desidratadas foram também metalizadas, seguindo o mesmo protocolo acima, e observadas em MEV para observar grãos de pólen sobre o estigma. Os tricomas foram descritos de acordo com a nomenclatura proposta por Theobald *et al.* [48].

Flores abertas, obtidas de espécimes mantidos em casa de vegetação, foram preservados por 24h em solução de FAA50 [49] (mantendo a proporção de 1:10 entre o volume da amostra e o volume da solução). Após, as amostras foram transferidas para solução de etanol 50%, para remover resíduos de FAA50. Em seguida as amostras foram desidratadas em série etílica (70%, 85%, 95% e 100%, trocando de solução a cada 2h). Após 24h foi trocada a solução de etanol 100%, e depois as amostras foram mantidas em solução de tert-butanol, trocando três vezes. Finalmente as amostras foram colocadas em solução tert-butanol e vaselina (na proporção 1:1). As amostras foram incluídas em parafina, seccionadas em lâminas de 12,5 µm de espessura e coradas com azul de toluidina. As lâminas foram observadas em microscópio de luz e fotografadas usando o sistema de captura de imagem.

### *Viabilidade polínica e receptividade estigmática*

A viabilidade polínica foi medida de acordo com três protocolos [50] usando métodos corantes: (i) através da identificação de grãos abortados (Alexander [51]); (ii) identificação de grãos de amido usando lugol [52]; e (iii) medindo a atividade

enzimática com emprego de 2,3,5 trifenil cloreto de tetrazólio (TTC 1%). Plantas com flores nos estágios iniciais da antese foram coletadas e mantidas em vasos para este experimento.

Cada tratamento empregado para a avaliação da viabilidade polínica (Alexander, lugol e TTC) foi aplicada à uma antera obtida de três flores diferentes. Cada antera foi macerada e corada de acordo com o protocolo-padrão [50], observada em microscópio de luz e todos os grãos de pólen foram contabilizados, classificando-os entre corados e não-corados. Foi estabelecido como T0 a primeira lâmina produzida, e à partir destas os procedimentos foram repetidos em 3, 12, 24 e 48h após a primeira avaliação e os resultados foram plotados em gráfico. Baseado nesta contagem foi estimada a quantidade de grãos de pólen por flor.

A avaliação da receptividade estigmática foi testada em diferentes estádios de desenvolvimento da flor (botão, antese, flor madura, fruto), despejando algumas gotas de peróxido de hidrogênio sobre a superfície do estigma e observando a reatividade.

#### *Visitantes florais e polinizadores efetivos*

Visitantes florais foram observados em campo, durante dois dias entre 8 e 18h, foram totalizadas 84h de observação. Sempre que possível os visitantes foram capturados e mantidos em solução de etanol 70%.

Para testar a efetividade do polinizador, o etanol utilizado na conservação dos visitantes foi centrifugado, e o *pellet* formado foi acetolisado [53, 54]. Lâminas com o pólen coletado do corpo dos visitantes foi observado em microscópio de luz buscando identificar grãos de pólen da espécie estudada.

Além disso, foram tomadas medidas da cabeça e língua dos insetos capturados utilizando o microscópio de luz, o sistema integrado de captura de imagens, e o *software* de medição, buscando definir um grupo funcional de polinizadores baseado no tamanho da cabeça e língua.

### *Teste de polinização por estímulo mecânico*

Em casa de vegetação, nove flores de plantas distintas foram selecionadas e isoladas para testar se a vibração por estímulo mecânico — simulado pela vibração de um diapasão — poderiam produzir autopolinização. Dez flores foram isoladas como grupo-controle. O estímulo mecânico foi feito tocando o diapasão em vibração (Apêndice Fig. A1) na corola e pedúnculo floral. O estímulo foi repetido 5 vezes consecutivas, todos os dias até o final do florescimento ( $\approx 10$  dias). Em seguida o desenvolvimento do ovário foi observado.

## Referências

1. Fisher E, Barthlott W, Seine R, Theisen I: **Lentibulariaceae**. In: *The Families and Genera of Vascular Plants*. Edited by Kubitzki K. Berlin: Springer, 2004:276–282.
2. Fleishmann A. **The new *Utricularia* species described since Peter Taylor's monograph**. *Carnivorous Plants News* 2012, **41**: 67–76.
3. Kausik SB, Raju MVS. **A contribution to the floral morphology and embryology of *U. reticulata***. *Proceedings of the Indian Academy of Science* 1955, **41**: 155–166.
4. Kondo K. **A Comparison of Variability in *Utricularia cornuta* and *Utricularia juncea***. *American Journal of Botany* 1972, **59**: 23–37.
5. Jérémie J. **Autogamie dan le genre *Utricularia* L. (Lentibulariaceae)**. *Bulletin du Museum National d'Histoire Naturelle - Section B, Adansonie, Botanique, Phytochimie* 1989, **11**: 17–28.
6. Yamamoto I, Kadono Y. **A study on the reproductive biology of aquatic *Utricularia* species in southwestern Japan**. *Acta Phytotaxonomica et Geobotanica* 1990, **41**: 189–200.
7. Khosla C, Shivanna KR, Ram HYM. **Pollination in aquatic insectivore *Utricularia inflexa* var. *stellaris***. *Phytomorphology* 1998, **48**: 417–425.
8. Hobbhahn N, Kückmeister H, Porembski S. **Pollination Biology of Mass Flowering Terrestrial *Utricularia* Species (Lentibulariaceae) in the Indian Western Ghats**. *Plant Biology* 2006, **8**: 791 – 804.
9. Clivati D, Cordeiro GD, Plachno BJ, Miranda VFO. **Reproductive biology and pollination of *Utricularia reniformis* A. St.-Hil. (Lentibulariaceae)**. *Plant Biology* 2013, **16**: 677–682. Doi:10.1111/plb.12091.
10. Taylor P: *The Genus Utricularia — a taxonomic monograph*. London: Royal Botanical Gardens, Kew; 1989.
11. Faegri K, Pijl L van der: *The Principles of Pollination Ecology*. New York: Robert Maxwell, M.C; 1976.
12. Araki S. **Variation of sterility and fertility in *Utricularia australis* f. *australis* in Hokkaido, northern Japan**. *Ecological Research* 2000, **15**: 193–201.
13. Araki S, Kadono Y. **Restricted seed contribution and clonal dominance in a free-floating aquatic plant *Utricularia australis* R. Br. in southwestern Japan**. *Ecological Research* 2003, **18**: 599–609.
14. Fenster CB, Armbruster WS, Wilson P, Dudash MR, Thomson JD. **Pollination syndromes and floral specialization**. *Annual Review of Ecology and Systematics* 2004, **35**: 375–403.
15. Molau U. **Reproductive ecology of the three Nordic *Pinguicula* species (Lentibulariaceae)**. *Nordic Journal of Botany* 1993, **13**: 149–157.
16. Whittall JB, Hodges SA. **Pollinator shifts drive increasingly long nectar spurs in columbine flowers**. *Nature* 2007, **447**: 1–6.
17. Ennos RA. **Spurred on by pollinators**. *Heredity* 2008, **10**: 3–4.
18. Whitney HM, Bennett KMV, Dorling M, Sandbach L, Prince D, Chittka L, Glover BJ. **Why do so many petals have conical epidermal cells?** *Annals of Botany* 2011, **108**: 609–617.
19. Yoshioka Y, Ohashi K, Konuma A, Iwata H, Ohsawa R, Ninomiya S. **Ability of bumblebees to discriminate differences in the shape of artificial flowers of *Primula sieboldii* (Primulaceae)**. *Annals of Botany* 2007, **99**: 1175–82.

20. Proença CEB. **Buzz pollination – older and more widespread than we think?** *Journal of Tropical Ecology* 1992, **8**: 115–120.
21. Heslop-Harrison Y, Shivanna KR. **The Receptive Surface of the Angiosperm Stigma.** *Annals of Botany* 1977, **41**: 1233–1258.
22. Jobson RW, Playford J, Cameron KM, Albert VA. **Molecular Phylogenetics of Lentibulariaceae Inferred from Plastid *rps16* Intron and *trnL-F* DNA Sequences: Implications for Character Evolution and Biogeography.** *Systematic Botany* 2003, **28**: 157–171.
23. Müller K, Borsch T, Legendre L, Porembski S, Theisen I, Barthlott W. **Evolution of Carnivory in Lentibulariaceae and the Lamiales.** *Plant Biology* 2004, **6**: 477–490.
24. 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* 2005, **250**: 39–67.
25. Westerkamp C, Classen-Bockhoff R. **Bilabiate flowers: the ultimate response to bees?** *Annals of Botany* 2007, **100**: 361–74.
26. Merxem DG De, Borremans B, Jäger ML De, Johnson T, Jooste M, Ros P, Zenni RD, Ellis AG, Anderson B. **The importance of flower visitors not predicted by floral syndromes.** *South African Journal of Botany* 2009, **75**: 660–667.
27. Guisande C, Granado-Lorencio C, Andrade-Sossa C, Duque SR. **Bladderworts.** *Functional Plant Science and Biotechnology* 2007, **1**: 58–68.
28. Kevan PG, Lane M a. **Flower petal microtexture is a tactile cue for bees.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1985, **82**: 4750–4752.
29. Whitney HM, Chittka L, Bruce TJA, Glover BJ. **Report Conical Epidermal Cells Allow Bees to Grip Flowers and Increase Foraging Efficiency.** *Current Biology* 2009, **19**: 948–953.
30. Barthlott W, Neinhuis C, Schott CL. **Purity of the sacred lotus, or escape from contamination in biological surfaces.** *Planta* 1997, **202**: 1–8.
31. Neinhuis C, Barthlott W. **Characterization and Distribution of Water-repellent, Self-cleaning Plant Surfaces.** *Annals of Botany* 1997, **79**: 667–677.
32. Whitney HM, Poetes R, Steiner U, Chittka L, Glover BJ. **Determining the contribution of epidermal cell shape to petal wettability using isogenic *Antirrhinum* lines.** *PloS One* 2011, **6**: e17576. Doi:10.1371/journal.pone.0017576.
33. Subramanyam K, Narayana LL. **Floral anatomy of *Utricularia caerulea* L. and *U. stricticaulis* Stapf (Lentibulariaceae).** *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 1969, **96**: 107–113.
34. Płachno BJ. “Sweet But Dangerous”: Nectaries In Carnivorous Plants. *Acta Agrobotanica* 2007, **60**: 31–37.
35. Płachno BJ, Clivati D, Miranda Vitor FO de, Swiatek P. **Are There Seed Pedestals in Lentibulariaceae?** *Acta Biologica Cracoviensia* 2009, **51**: 115–118.
36. Płachno BJ, Świątek P. **Unusual embryo structure in viviparous *Utricularia nelumbifolia*, with remarks on embryo evolution in genus *Utricularia*.** *Protoplasma* 2009, **239**: 69–80.
37. Rebernig CA, Weber A. **Diversity, development and systematic significance of seed pedestals in Scrophulariaceae (s.l.).** *Botanische Jahrbücher* 2007, **127**: 133–150.

38. Juniper BE, Robins RJ, and Joel JM. *The Carnivorous Plants*. London: Academic Press; 1989
39. Ellison AM, Gotelli NJ. **Evolutionary ecology of carnivorous plants**. *Trends in Ecology & Evolution* 2001, **16**: 623–629.
40. Ellison AM, Gotelli NJ, Brewer JS, Cochran-Stafira DL, Kneitel JM, Miller TE, Worley AC, Zamora R. **The evolutionary ecology of carnivorous plants**. *Advances in Ecological Research* 2003, **33**: 1–74.
41. Cruden RW. **Pollen grains: Why so many?** *Plant Systematics and Evolution* 2000, **222**: 143–165.
42. Cruden R. W. **Pollen-ovule ratios: a conservative indicator of breeding systems in flowering plants**. *Evolution* 1977, **31**: 32-46.
43. Siddiqui SA, Farooq M. **Degeneration in the ovules of *Utricularia coerulea* L. var. *filicaulis* Clarke**. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 1965, **92**: 245–249.
44. Köppen, W. *Climatologia; con un estudio de los climas de la tierra*. Mexico City: Fondo de Cultura Económica; 1948.
45. Klink CA, Machado RB. **A conservação do Cerrado brasileiro**. *Megadiversidade* 2005, **1**: 147–155.
46. Miranda VFO de, Rivadavia F: **Lentibulariaceae**. In: *Catálogo de Plantas e Fungos do Brasil. Volume 2*. 1st edition. Edited by Forzza RC, Baumgratz JFA, Bicudo CEM, Jr. AAC, Costa A, Costa DP, Hopkins M, Leitman PM, Lohmann LG, Maia LC, Martinelli G, Menezes M, Morim MP, Coelho MAN, Peixoto AL, Pirani JR, Prado J, Queiroz LP, Souza VC, Stehmann JR, Sylvestre LS, Walter BMT, Zappi D. Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010: 1163–1166.
47. Miranda VFO, Menezes CG, Silva SR, Díaz YCA, Rivadavia F: **Lentibulariaceae**. [<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB146>].
48. Theobald WL, Krahulik JL, Rollins RC. **Trichome description and classification**. In: *Anatomy of Dicotyledons: Systematic Anatomy of the Leaf and Stem*. Edited by Chaek CRM e L. New York: Oxford University Press, 1979:41–53.
49. Johansen DA: *Plant microtechnique*. New York: McGraw-Hill Book Co; 1940.
50. Dafni A: *Pollination ecology. A practical approach*. Oxford: Oxford University Press; 1992.
51. Alexander MP: **A versatile stain for pollen fungi, yeast and bacteria**. *Stain Technology* 1980, **55**: 13–8.
52. Purvis MJ. *Laboratory Techniques in Botany*. London: Butterworths; 1966.
53. Erdtman G. *Pollen Morphology and Plant Taxonomy Angiosperms*. Stockholm: Almquist & Wiksell; 1952.
54. Melhem T, Cruz-Barros M, Corrêa A, Makino-Watanabe H, Silvestre-Capelato M, Gonçalves-Esteves V. **Variabilidade polínica em plantas de Campos de Jordão (São Paulo, Brasil)**. *Boletim do Instituto de Botânica de São Paulo* 2003, **16**: 1–104.

## Apêndices



Figura A1. Teste de autopolinização por estímulo vibratório com diapausa.

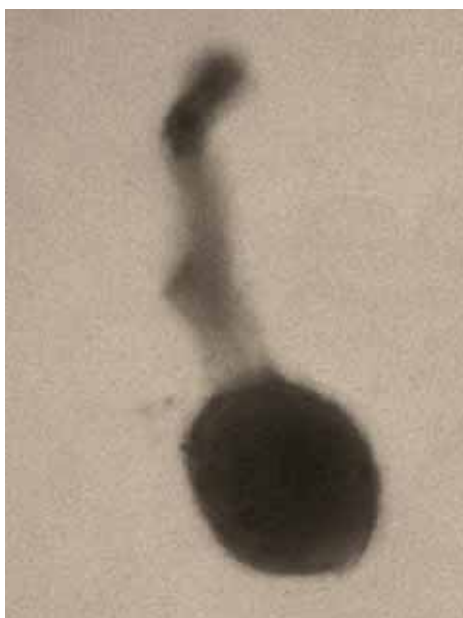


Figura A2. Tubo polínico de *Utricularia amethystina* Salzm. ex A. St-Hil. & Girard. A germinação iniciou-se após poucos de entrar em contato com solução saturada de sacarose.

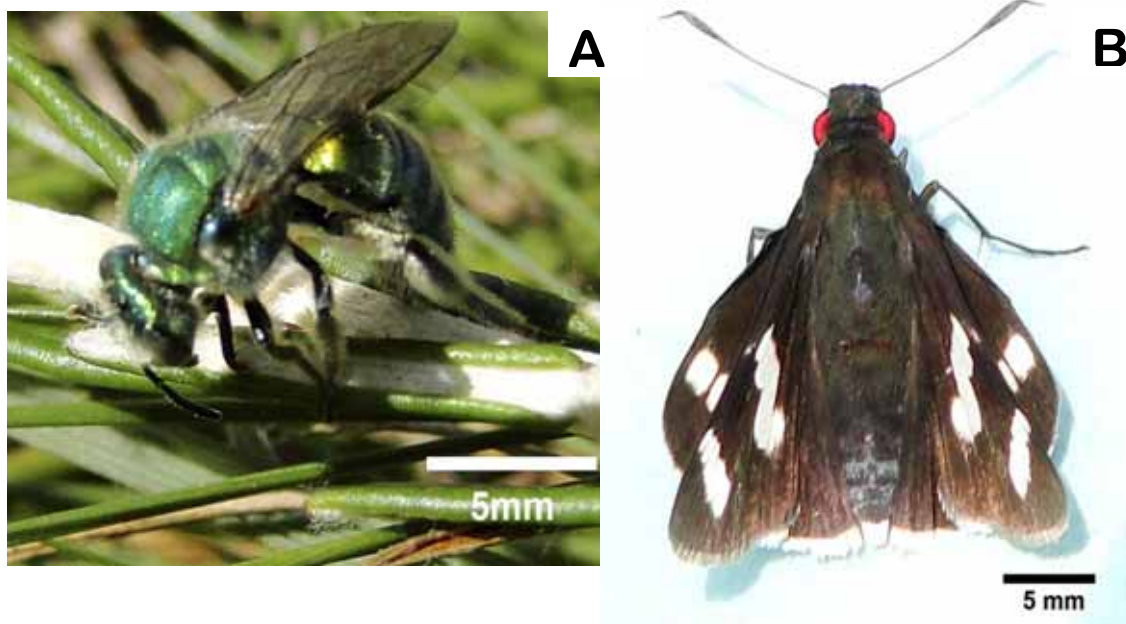


Figure A3. Visitantes florais de *Utricularia amethystina*. A. *Augochloropsis* sp.2 (Halictidae); B: *Synapte elana elana* (Plötz, 1882).



Figure A4. Grãos de pólen presos ao corpo do polinizador de *Utricularia amethystina*: *Augochloropsis* sp.1 (Halictidae). Provavelmente os grãos presos em diferentes posições do corpo do polinizador são de espécies distintas, considerando o comportamento generalista destas abelhas.

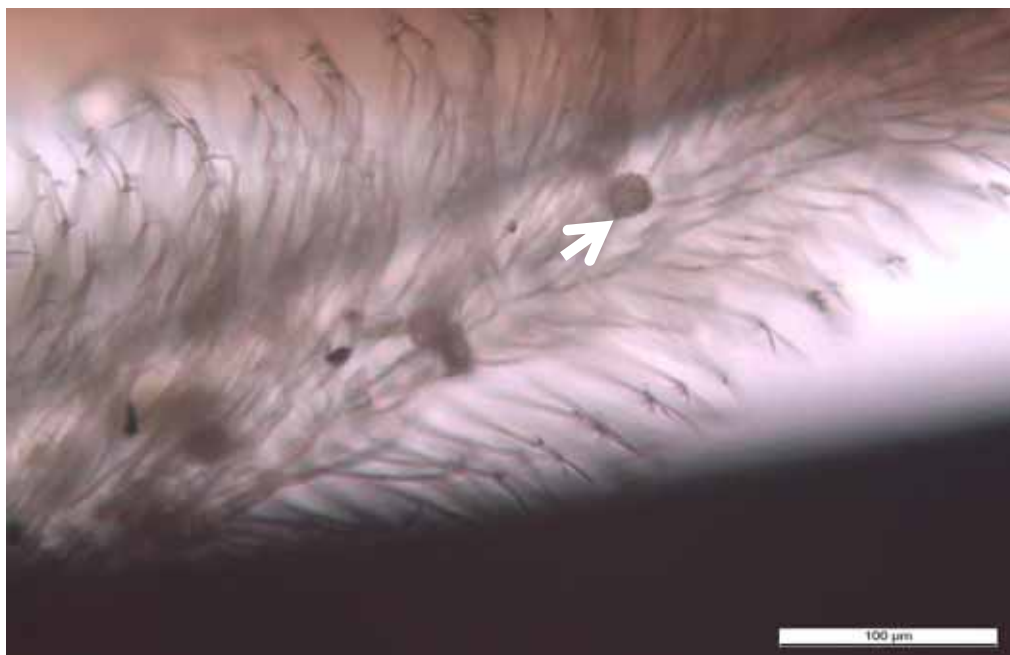


Figure A5. Grãos de pólen de diferentes espécies foram encontrados na língua da abelha capturada (*Augochloropsis* sp1.).

## CAPÍTULO 4 – Evolução molecular do complexo ‘*Utricularia amethystina*’

### Resumo

*Utricularia amethystina* possui histórico taxonômico controverso e é altamente polimórfica. Distribui-se da América do Norte à América do Sul e possui um polimorfismo floral único para o gênero: podem ser produzidas flores amarelas, brancas ou púrpuras. Contudo, a cor da flor possui importante papel na sinalização e atração de polinizadores e, por consequência, pode afetar a reprodução, estrutura genética e fluxo de genes entre populações. Tendo isso em mente, nossos objetivos foram: (1) testar se os morfotipos de *U. amethystina* são geneticamente isolados; (2) neste caso, a diferença genética entre os morfotipos seria suficiente para inferir especiação? Empregamos dois espaçadores cloroplastidiais e três genes, um deles bastante conservado entre as angiospermas — o *rbcL*. No total foram identificados 133 haplótipos entre todas as populações amostradas, que foram analisadas quanto à estrutura genética, distribuição haplotípica e filogenia. Os resultados foram congruentes em apontar que os morfotipos caracterizados pela cor da flor são artificiais. Adicionalmente, encontramos evidências de seleção positiva, sobretudo para o gene *matK*, entre algumas das linhagens identificadas. Finalmente, o status taxonômico de *Utricularia amethystina* é questionado, uma vez que identificamos linhagens independentes sob o táxon *Utricularia amethystina* Salzm. ex A.St.-Hil & Girard, sugerindo que este seja, na verdade, um complexo de espécies filogeneticamente próximas que não podem ser facilmente distintas pela coloração floral.

**Palavras-chave:** polimorfismo floral, estrutura genética, rede de haplótipos, pigmentação floral

### Introdução

*Utricularia amethystina* é uma espécie controversa e altamente polimórfica (Figura 1). Na última revisão taxonômica para o gênero (TAYLOR, 1989b) foram sinonimizados 31 táxons sob este binômio, desta forma a espécie passou a abranger uma distribuição geograficamente ampla — da América do Norte (Flórida, Estados Unidos) à América do Sul (São Paulo, Brasil) — além de alto polimorfismo em caracteres usualmente constantes (e.g. quantidade de aberturas nos grãos de pólen).

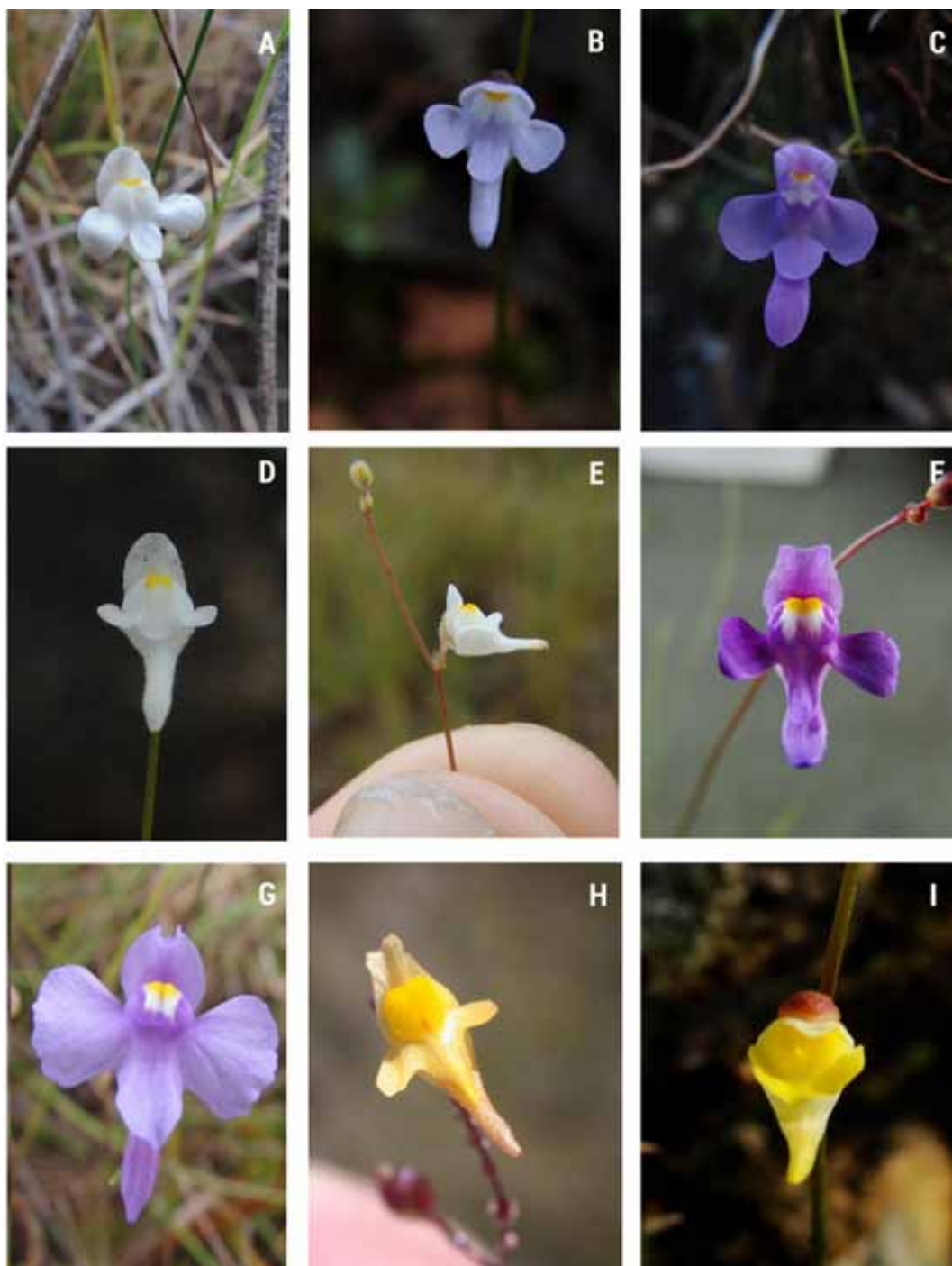


Figura 1. Flores de *Utricularia amethystina* Salzm. ex A.St.-Hil. & Girard. A: Morfotipo branco (Rio de Contas, BA); B: Morfotipo branco (São Roque de Minas, MG); C: Morfotipo púrpura (São João Batista do Glória, MG); D: Morfotipo branco (Chapada dos Guimarães, MT); E: Morfotipo branco (Pedregulho, SP); F: Morfotipo púrpura (São Roque de Minas, MG); G: Morfotipo púrpura (Chapada dos Guimarães, MT [crédito: M. Ferramosca, 2010]); H: Morfotipo amarelo (Chapada Diamantina, BA [crédito: F. Rivadavia, 2005]); I: Morfotipo amarelo (São João del Rey, MG).

Taylor (1989) registrou em sua monografia que por muito tempo reconheceu as espécies *Utricularia hirtella* A.St.-Hil. & Girard, *U. genliseoides* Benj. e *U. adenantha* Standl. ex Standl. & Record, distintas pelo tamanho do pedúnculo floral, tamanho do lábio inferior da flor e presença de tricomas cobrindo densamente sépalas ou pétalas (Figura 1). Porém, posteriormente ele sinonimizou estas espécies sob *Utricularia amethystina* por observar um gradiente entre estas formas. Além disso, Taylor (1989) também observou que o espécime-tipo de *Utricularia amethystina* Salzm. ex A.St.-Hil & Girard diferem das formas mais comuns encontradas no Brasil, quanto ao tamanho da corola, contudo, também para esta característica há um gradiente que dificultou uma circunscrição mais restrita do táxon. Outras características morfológicas também são variáveis, porém a cor da flor pode ser relevante para a interação planta-polinizador e afetar o fluxo gênico entre populações, levando-as ao isolamento e, por fim, à especiação.

Por este motivo avaliamos a estrutura genética de populações de *Utricularia amethystina* Salzm. ex A.St.-Hil & Girard com flores amarelas, brancas e púrpura. Os objetivos foram: (1) testar se os morfotipos com distintas cores de flor são geneticamente isolados, portanto se seria natural dividi-los a partir do critério cor de flor; (2) reponder se, no caso de isolamento, a diferença genética entre os morfotipos seria suficiente para inferir especiação?

## Materiais e Métodos

### *Coleta de espécimes*

As expedições de campo foram realizadas durante o período de fevereiro/2012 a maio/2014 para coleta nas localidades descritas na Tabela 1. Para todas as plantas coletadas foram registradas as coordenadas geográficas por GPS. Os materiais-testemunho ainda não receberam código de tombamento pelo herbário JABU (FCAV/UNESP), por isso foi utilizado o número de coletor como voucher. As coletas foram realizadas com autorização do SisBio nº 26938 e 43985.

Tabela 1. Amostras de *Utricularia amethystina* coletadas entre 2008 e 2014.

| Ano               | Flor    | Localidade                                                              | nº Coletor <sup>1</sup> | Código da amostra |
|-------------------|---------|-------------------------------------------------------------------------|-------------------------|-------------------|
| 2008 <sup>2</sup> |         |                                                                         |                         |                   |
|                   | Branca  | Chapada dos Guimarães (MT)                                              | CM101                   | WC3               |
| 2012              |         |                                                                         |                         |                   |
|                   | Púrpura | São Batista do Glória/ MG                                               | VM1622                  | PA                |
|                   | Púrpura | São Roque de Minas (MG), à beira da estrada para o alto da Casca D'Anta | VM1627                  | PB                |
|                   | Púrpura | São Roque de Minas (MG), à beira da estrada para o alto da Casca D'Anta | VM1644                  | PC                |
|                   | Amarela | São João del Rei/ MG                                                    | CM106                   | YA                |
|                   | Branco  | São Roque de Minas (Serra da Canastra)/ MG                              | VM1647                  | WA                |
| 2014              |         |                                                                         |                         |                   |
|                   | Branca  | Rio de Contas/ BA                                                       | VM1695                  | WB                |
|                   | Branca  | Pedregulho/ SP                                                          | CM110                   | WD                |

<sup>1</sup> Acrônimos dos coletores: CM - Cristine Gobbo Menezes e colaboradores; VM – Vitor Fernandes Oliveira de Miranda e colaboradores.

<sup>2</sup> Amostra coletada durante o mestrado da autora.

### *Extração e quantificação de DNA genômico total*

Folhas, pedúnculos florais, estolões e flores — de acordo com a disponibilidade de tecidos — foram utilizados para o isolamento de DNA, seguindo o protocolo descrito por Lodhi *et al.* (1994) adaptado para “miniprep”.

Aproximadamente 100 mg de tecido foram congelados com nitrogênio líquido e macerados com auxílio de um pistilo. Ao final da maceração, com o cadinho ainda gelado, foi adicionado 1 mL do tampão de extração (conforme protocolo original) e incubado a 60 °C por 30 min, invertendo os tubos a cada 10 min. Ao final da incubação foi adicionado 1 mL de solução de clorofórmio e álcool isoamílico (24:1) agitando os tubos por inversão durante 5min. Os tubos foram centrifugados, em seguida, a 10.000 rpm por 15 min. O sobrenadante foi transferido para tubos limpos e em função do volume recuperado (quando necessário o volume recuperado foi dividido em dois tubos de 1,5 mL) foram adicionados 0,5 vol de NaCl a 5 M e 2–2,5 vol de etanol 100% gelado. As amostras foram mantidas a -20 °C por 60min e em seguida submetidas a duas centrifugações: a 6.000 rpm por 5 min e 10.000 rpm por

5min, ambas a 4 °C. Todo o líquido foi descartado e o “pellet” lavado com 1mL de etanol 70 % gelado, seguido de centrifugação a 10.000 rpm por 5 min. Após o “pellet” secar foi adicionado de 50-70 µL de tampão TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, pH 8.0) e adicionado 10 µL de RNase bovina A (10 mg/ mL), seguido de incubação a 37°C por 30 min ou mantido “overnight” à temperatura ambiente.

Ao final, as amostras foram quantificadas por espectrofotometria (Nanodrop®) e armazenadas a -20 °C.

### *Amplificação e sequenciamento*

Foram amplificadas cinco regiões cloroplastidiais: *rps16*, *trnL-F*, *rbcL*, *trnS-G* e *matK*. Os “primers” empregados, assim como a temperatura de anelamento empregada para cada um, estão descritos no apêndice 1.

As reações de PCR foram otimizadas para empregar 0,1 vol. do tampão (10x), 0,2 µM de dNTP mix (cada dNTP a 25 µM), 0,1 µM de iniciadores “forward” e “reverse”, 0,04 U de Taq DNA polimerase, DNA “template” (concentração final variável entre 0,004 a 2 ng/ µL) e água ultrapura para completar o volume desejado (10 ou 25 µL). Para amplificação foi empregado termociclador PTC-100 (*MJ Research*) com o programa aqui descrito: abertura a 95 °C por 5 min, seguido de 30 ciclos de 92 °C por 30 s, 52-53 °C por 30 s e 72 °C por 2min e, após o último ciclo, uma extensão final a 72 °C por 5min.

A purificação das amostras foi feita a partir de precipitação “overnight” com adição de acetato de sódio (3 M, pH 5,2, 1/10 do volume da reação) e etanol (100 %, gelado, 2,5 vol.) seguida por lavagens (duas, no mínimo) com 1 mL de etanol (70 %) gelado para remover resíduos do acetato. Para evitar erros de pipetagem e minimizar a perda do produto de PCR as amostras amplificadas foram diluídas (5x) e transferidas para tubos de 1,5 mL antes da precipitação. Após, e entre as lavagens, os tubos foram centrifugados a 14.000 rpm. O “pellet” foi seco à temperatura ambiente e em seguida eluído em água estéril (≈18 µL).

A reação de sequenciamento empregou 1µL de de “primer” (10µM), 3 µL de tampão (2,5x), 1 µL de “big dye” (v.3.1), 20-50 ng de “template” e água ultrapura para completar 10 µL de reação. Para amplificação foi empregado termociclador

PTC-100 (MJ Research) com o programa aqui descrito: abertura a 96 °C por 1 min, seguido de 40 ciclos de 96 °C por 15 s, 52-53 °C por 15 s e 60 °C por 4 min. Ao final, as reações são precipitadas seguindo o protocolo anteriormente descrito. Após o “pellet” secar, as amostras são ressuspensas em 10 µL de formamida, desnaturadas por 5 min a 95 °C e submetidas ao sequenciamento no sequenciador automático ABI 3730 XL conforme recomendações sugeridas pelo fabricante do equipamento (Applied Biosystems, Foster City, California (CA)).

#### *Alinhamento das sequências*

Para cada região amplificada foram sequenciadas as fitas senso e antisenso. Os eletroferogramas foram checados para identificar falsos polimorfismos e as produzir sequências-consenso com emprego do aplicativo BioEdit v. 7.0.9.0 (HALL, 1999) e ClustalW (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994). Para o alinhamento múltiplo das sequências foi empregado o aplicativo Geneious® v.5.4.6 (Biomatters Ltd.), com suas configurações-padrão (peso 12 para abertura de “gaps” e 3 para extensão). Após o alinhamento, os sítios terminais contendo muitos “gaps” foram excluídos e, no caso de amostras com sequências mais curtas, estes “gaps” foram substituídos por “N” para evitar confundi-los com “indels” verdadeiros. Este procedimento foi adotado produzindo dois alinhamentos distintos para cada um das regiões amplificadas: (1) um alinhamento exclusivamente entre as populações de *Utricularia amethystina* amostradas; (2) um alinhamento entre as as populações de *Utricularia amethystina* amostradas e outras espécies de Lentibulariaceae. As sequências utilizadas para o segundo alinhamento estão descritas no apêndice 2.

#### *Estrutura genética das populações de Utricularia amethystina*

A estrutura genética das populações de *Utricularia amethystina* — e também agrupadas por morfotipo: amarelo, branco e púrpura — foi inferida para cada matriz de sequências (*rps16*, *trnL-F*, *rbcL*, *trnS-G* e *matK*) separadamente pelo aplicativo BAPS (“Bayesian Analysis of Population Structure”) (CORANDER; TANG, 2007; CORANDER et al., 2008).

Os indivíduos foram pré-agrupados utilizando a opção “clustering with linked loci”, para aceitar alinhamentos de sequências como arquivos de entrada, além de pré-definir quais sequências pertencem a cada população ou morfotipo. Esta primeira busca por “clusters” empregou múltiplos números máximos de agrupamentos (3, 5, 10, 15, 20, 25 e 30), com uma réplica para cada. Em seguida, o resultado deste pré-agrupamento foi utilizado para uma nova busca por agrupamentos de acordo com o modelo evolutivo “admixture” (CORANDER; MARTTINEN, 2006). Esta segunda busca considerou o tamanho mínimo de uma população igual ao menor número de sequências obtidas para um morfotipo, com 5.000 iterações.

Além disso, matrizes de haplótipos para cada região cloroplastidial sequenciada foram criadas com emprego do aplicativo DNAsp (LIBRADO; ROZAS, 2009) e empregadas para testar a distribuição e compartilhamento de haplótipos. Para isso foi estimada uma filogenia intraespecífica através do critério de “Median Joining” ( $\epsilon=0$ ; Bandelt, Forster, & Röhl 1999) e construída redes de haplótipos, ambos com o emprego do software NETWORK 4.5.1.0. ([www.fluxus-engineering.com](http://www.fluxus-engineering.com)). As filogenias produzidas não foram polarizadas por um grupo externo.

#### *Análise dos genes: substituições sinônimas e não-sinônimas*

A razão entre substituições não-sinônimas e sinônimas (dN/dS) permite inferir se o gene estudado está sob forte pressão seletiva, portanto se apresenta poucas alterações não-sinônimas como esperado para comparações intraespecíficas.

As substituições sinônimas e não sinônimas entre os gêneros de Lentibulariaceae, e entre as populações de *Utricularia amethystina*, foram investigadas para os genes *matK*, *rbcl* e *rps16* com emprego do aplicativo DNAsp (LIBRADO & ROZAS, 2009). Para isso foi utilizado um alinhamento contendo, além das sequências obtidas para as populações de *U. amethystina*, sequências de outras espécies de Lentibulariaceae (Apêndice 2). Foram calculadas a média aritmética e desvio-padrão da razão dN/dS entre todos os indivíduos de cada par de populações comparadas.

### *Análise filogenética e suporte dos cladogramas*

As análises de máxima parcimônia (MP) foram realizadas com o aplicativo PAUP\* versão 4b10 (“Phylogenetic Analysis Using Parsimony”) (SWOFFORD, 2002). As árvores mais parcimoniosas foram encontradas por meio de buscas heurísticas com adição aleatória de terminais e 5.000 réplicas (“branching swapping” com o algoritmo TBR – “Tree Bisection and Reconnection”). O suporte dos clados foi avaliado por “bootstrap” (FELSENSTEIN, 1985) com 2.000 pseudorréplicas (pseudomatrizes) com buscas heurísticas de 100 ou 200 réplicas (com adição aleatória de terminais com o algoritmo TBR – “Tree Bisection and Reconnection” para “branching swapping”).

Para as análises probabilísticas, foram escolhidos os melhores modelos evolutivos (“best-of-fit”) com o aplicativo jModelTest versão 2.1.1 (DARRIBA *et al.*, 2012). Assim, o modelo “best-of-fit” de substituições de DNA foi avaliado para cada sequência de DNA com o critério “Akaike information criterion” corrigido (AICc; AKAIKE, 1973; BURNHAM & ANDERSON, 2002) para estimar os parâmetros. Foram realizadas análises de máxima verossimilhança (ML) e bayesiana (“posterior probabilities”; PP) com o algoritmo “Metropolis-coupled Markov chain Monte Carlo” (MCMCMC; GEYER, 1991) para estimar as hipóteses filogenéticas para cada matriz de dados. Foram realizadas análises de máxima verossimilhança (ML) com o programa RAxML BlackBox (STAMATAKIS *et al.*, 2008). Para as buscas das melhores árvores, foi empregado o modelo GTR+GAMMA+I e para o “bootstrapping” foi aplicada a opção “halt automatically”. Os valores de “bootstrap” para ML foram identificados com a análise da frequência de clados recuperados de todos os cladogramas amostrados com o emprego do aplicativo PAUP versão 4b10. As análises de MCMCMC foram realizadas com o emprego do MrBayes versão 3.2.2 (HUELSENBECK & RONQUIST, 2001) para cada matriz com  $9 \times 10^6$  gerações amostradas a cada 100 gerações, usando os parâmetros padrão do aplicativo. Para cada análise duas corridas (nrns=2) com quatro cadeias (nchains=4) foram realizadas iniciando-se de árvores aleatórias. Foram descartadas amostras iniciais como “burn-in” após o alcance da “stationary” (estimado em 25% das árvores

amostradas). As probabilidades posteriores (PP) para cada clado foram obtidas por meio da comparação e congruência das análises individuais com a análise de uma árvore de consenso de maioria (>50%) realizada com o auxílio do programa PAUP versão 4b10. As análises com os aplicativos RAxML (ref) e MrBayes (ref) foram realizadas nas nuvens com a plataforma CIPRES (MILLER et al., 2010). Os cladogramas foram desenhados com o programa TreeGraph2 versão 2.0.52-347 beta (STÖVER & MÜLLER, 2010). Para o enraizamento dos cladogramas e polarização das transformações, foram empregadas como grupo-externo espécies de Lentibulariaceae (Apêndice 2).

## Resultados

### *Sequências de regiões cloroplastidiais*

As regiões cloroplastidiais empregadas variaram quanto à eficiência da amplificação e qualidade do sequenciamento, o que resultou em amostragens desiguais entre as populações de *Utricularia amethystina*. Para minimizar problemas associados ao *N* amostral, populações de um mesmo morfotipo — caracterizado pela cor da flor — foram agrupadas para as análises de estrutura genética com o aplicativo BAPS. A quantidade de sequências obtidas por população e por morfotipo, assim como dos haplótipos identificados estão descritos no quadro 1. A lista completa de haplótipos e suas frequências para cada população amostrada está descrita no apêndice 3.

Quadro 1. Indivíduos amostrados de *Utricularia amethystina* ( $N_{\text{seqs}}$ ) por população e quantidade de haplótipos ( $N_{\text{haps}}$ ) discriminados por região cloroplastidial e por morfotipo.

| Morfotipo              | Populações | <i>rbcL</i>       |                   | <i>rps16</i>      |                   | <i>matK</i>       |                   | <i>trnS-G</i>     |                   | <i>trnF-L</i>     |                   | Total             |                   |
|------------------------|------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                        |            | $N_{\text{seqs}}$ | $N_{\text{haps}}$ | $N_{\text{seqs}}$ | $N_{\text{haps}}$ | $N_{\text{seqs}}$ | $N_{\text{haps}}$ | $N_{\text{seqs}}$ | $N_{\text{haps}}$ | $N_{\text{seqs}}$ | $N_{\text{haps}}$ | $T_{\text{seqs}}$ | $T_{\text{haps}}$ |
| Púrpura                | PA         | 11                | 5                 | 10                | 5                 | 5                 | 5                 | 8                 | 4                 | 8                 | 2                 | 107               | 71                |
|                        | PB         | 9                 | 5                 | 5                 | 5                 | 6                 | 5                 | 7                 | 6                 | 6                 | 5                 |                   |                   |
|                        | PC         | 8                 | 4                 | 6                 | 6                 | 5                 | 4                 | 8                 | 5                 | 5                 | 5                 |                   |                   |
| Branco                 | WA         | 5                 | 4                 | 7                 | 2                 | 4                 | 4                 | 5                 | 5                 | 3                 | 3                 | 67                | 50                |
|                        | WB         | 7                 | 3                 | -                 | -                 | 3                 | 3                 | 9                 | 7                 | 7                 | 6                 |                   |                   |
|                        | WC         | 1                 | 1                 | -                 | -                 | -                 | -                 | 2                 | 1                 | 3                 | 2                 |                   |                   |
|                        | WD         | 3                 | 3                 | -                 | -                 | 2                 | 2                 | 3                 | 3                 | 3                 | 1                 |                   |                   |
| Amarelo                | YA         | 10                | 6                 | 3                 | 3                 | 2                 | -                 | 7                 | 2                 | 3                 | 2                 | 25                | 15                |
| Púrpura<br>(exsicatas) | E1400      | 1                 | 1                 | -                 | -                 | -                 | -                 | -                 | -                 | -                 | -                 | 8                 | 8                 |
|                        | E2839      | 1                 | 1                 | -                 | -                 | -                 | -                 | -                 | -                 | -                 | -                 |                   |                   |
|                        | E3094      | 1                 | 1                 | -                 | -                 | -                 | -                 | -                 | -                 | -                 | -                 |                   |                   |
|                        | E4046      | 1                 | 1                 | -                 | -                 | -                 | -                 | 1                 | 1                 | -                 | -                 |                   |                   |
|                        | E4159      | 1                 | 1                 | -                 | -                 | -                 | -                 | -                 | -                 | -                 | -                 |                   |                   |
|                        | E26600     | 1                 | 1                 | -                 | -                 | -                 | -                 | 1                 | 1                 | -                 | -                 |                   |                   |
| Total de seqüências    |            | 60                |                   | 31                |                   | 27                |                   | 51                |                   | 38                |                   | 207               |                   |
| Total de haplótipos    |            |                   | 28                |                   | 20                |                   | 25                |                   | 34                |                   | 26                |                   | 133               |

### Estrutura genética do “complexo” *Utricularia amethystina*

Apesar da amostragem desigual entre as populações e marcadores utilizados, os resultados obtidos foram congruentes. Identificamos grupos geneticamente distintos e não correlacionados à distância geográfica. Estes resultados são corroborados pelas reconstruções filogenéticas, análise da estrutura populacional feita pelo BAPS, e redes de haplótipos. Foram identificadas entre 3 a 6 populações geneticamente distintas. Dentre as regiões amplificadas, *trnS-G* e *rbcL* tiveram maior sucesso na amplificação e sequenciamento, resultando nos maiores  $N$  de indivíduos. Estas duas regiões cloroplastidiais diferiram drasticamente quanto aos resultados, uma vez que o gene *rbcL* é mais conservado que o espaçador *trnS-G*.

As populações de *U. amethystina* são diversas (em média 15 haplótipos por população, considerando todas as regiões investigadas; Quadro 1) e geneticamente

estruturadas, com poucos haplótipos compartilhados. Identificamos um único haplótipo compartilhado (Apêndice 3) entre duas ou mais populações para as regiões *matK* (1 de 24 haplótipos identificados), *rps16* (1 de 20 haplótipos) e *trnS-G* (1 de 34); apenas *rbcL* apresentou 6 haplótipos compartilhados (6 de 28 haplótipos); os haplótipos identificados para *trnF-L* foram todos privativos. Não foram identificados haplótipos ancestrais ou compartilhados entre todas as populações, que poderiam sugerir o ponto de diversificação do grupo no Brasil.

Dentre as populações que compartilham haplótipos destacam-se PB e PC, ambas de flores púrpuras, e WA (flor branca) coletadas na Serra da Canastra (MG, Tabela 1). Contudo, a população PB parece ser subdivida em dois grupos gênicos, suportados tanto pelas filogenias (máxima parcimônia, máxima verossimilhança e probabilística; dados não apresentados) quanto pelas redes de haplótipos produzidas com base nas regiões *matK*, *trnF-L* e *trnS-G* (Figura 2, 3, 6 e 7). Apenas um dentre estes subgrupos compartilha haplótipos ou forma clado com indivíduos de flores brancas (WA) proveniente da Serra da Canastra. Outro agrupamento entre populações de morfotipos florais branco e púrpura (Figura 2, 3, 4, 5, 6) chama atenção devido à distância geográfica entre as populações PA, PB+WA (São Roque de Minas, MG) e WB (Rio de Contas, BA). Por outro lado, as populações de flores brancas WC (Chapada dos Guimarães, MT) e WD (Pedregulho, SP) e a população de flores amarelas YA (São João del Rey, MG) distinguem-se geneticamente das demais com haplótipos privativos (exceto para o gene *rbcL*, Figura 4) e com alto suporte filogenético (Figura 3). Selecionamos apenas o filograma e análise de estrutura genética baseados na região *trnS-G*, devido ao *N* mais representativo obtido para este marcador e à congruência dos resultados com as demais regiões.

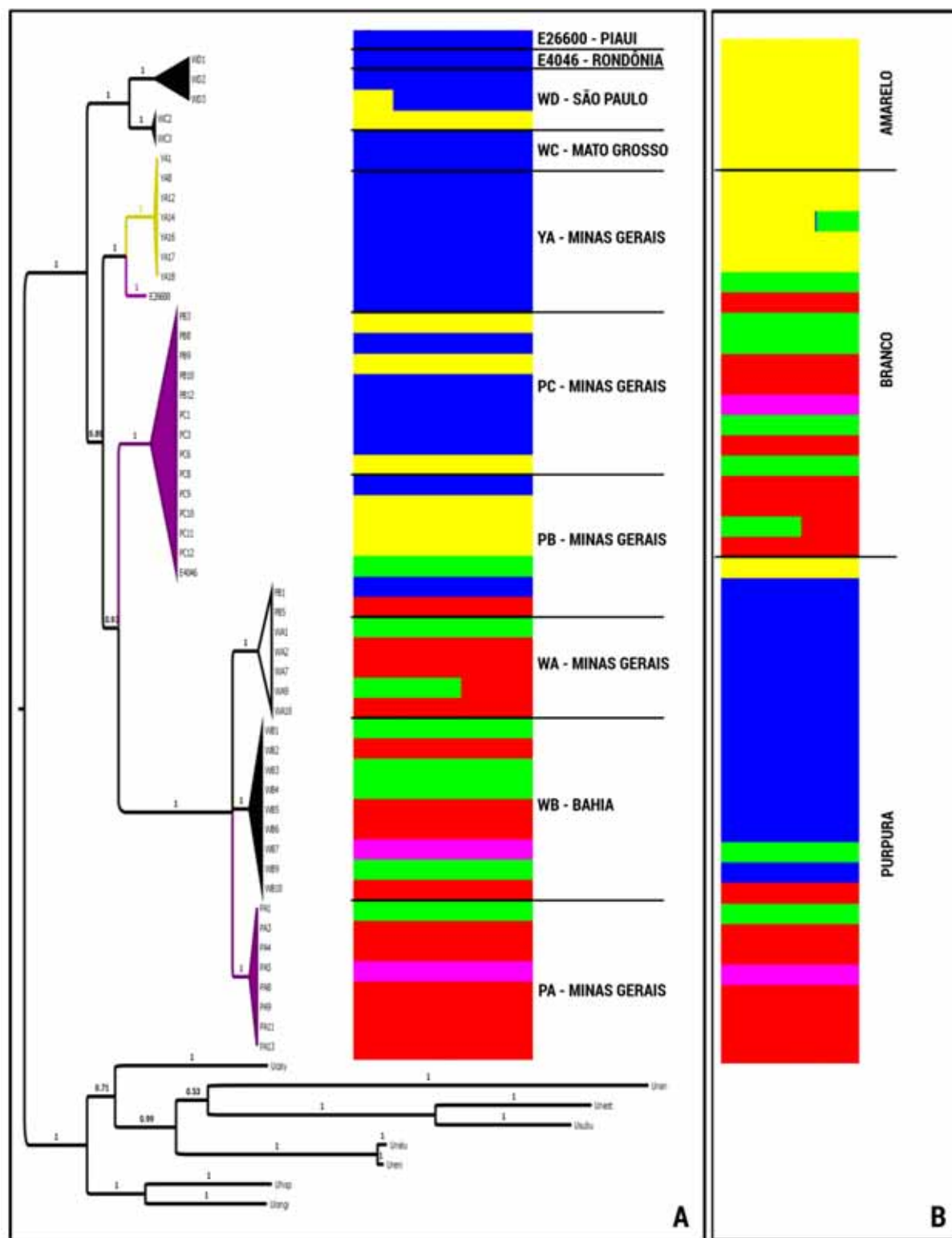


Figura 2. Estrutura genética de *Utricularia amethystina* baseada no espaçador cloroplastidial *trnS-G*. A. Comparação entre filograma bayesiano enraizado (a probabilidade posterior está indicada sobre os ramos) e o resultado da estrutura genética populacional feita pelo BAPS. B. Resultado do BAPS com os indivíduos agrupados em morfotipos de acordo com a cor da flor (púrpura, amarelo e branco).

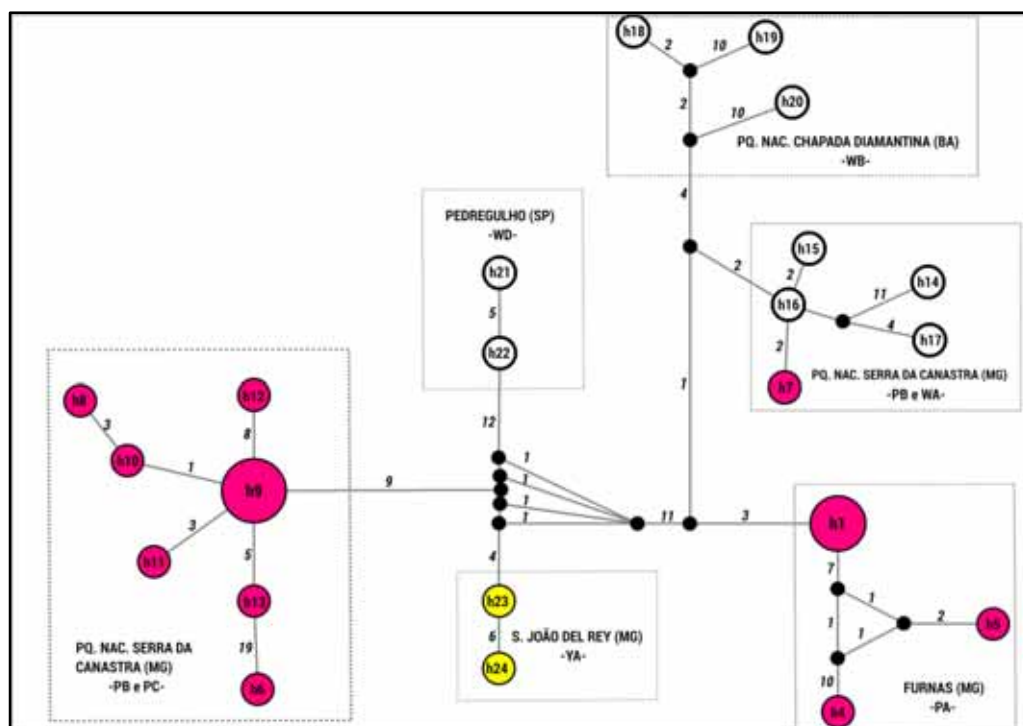


Figura 3. Rede de haplótipos do gene *matK* em populações de *Utricularia amethystina*. A quantidade de mutações entre os haplótipos está sobre os ramos. Os nós intermediários estimam haplótipos não-amostrados. As cores identificam os haplótipos encontrados em cada morfotipo floral: púrpura, amarelo e branco.

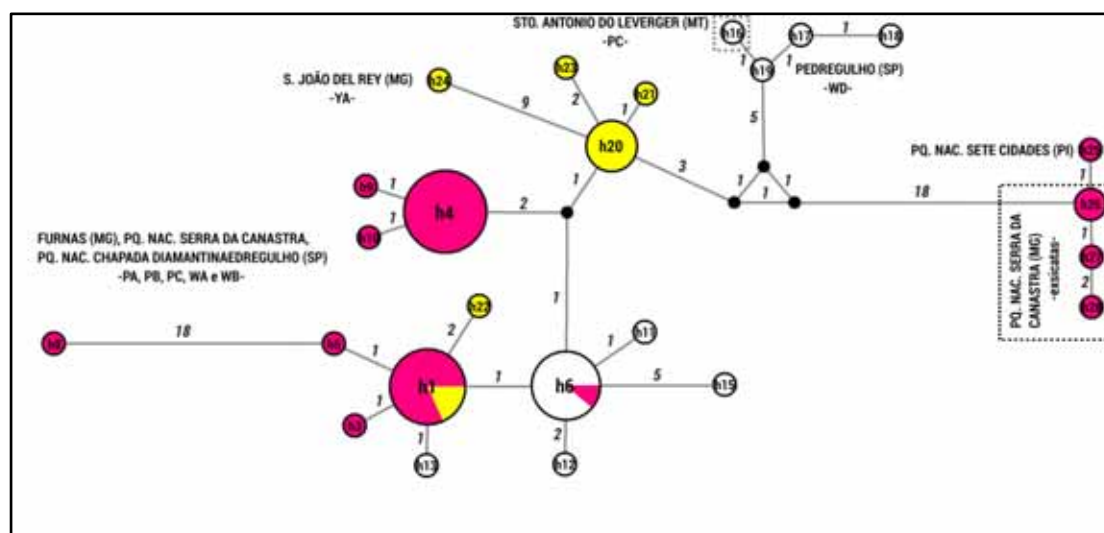


Figura 4. Rede de haplótipos do gene *rbcL* em populações de *Utricularia amethystina*. A quantidade de mutações entre os haplótipos está sobre os ramos. Os nós intermediários estimam haplótipos não-amostrados. As cores identificam os haplótipos encontrados em cada morfotipo floral: púrpura, amarelo e branco.

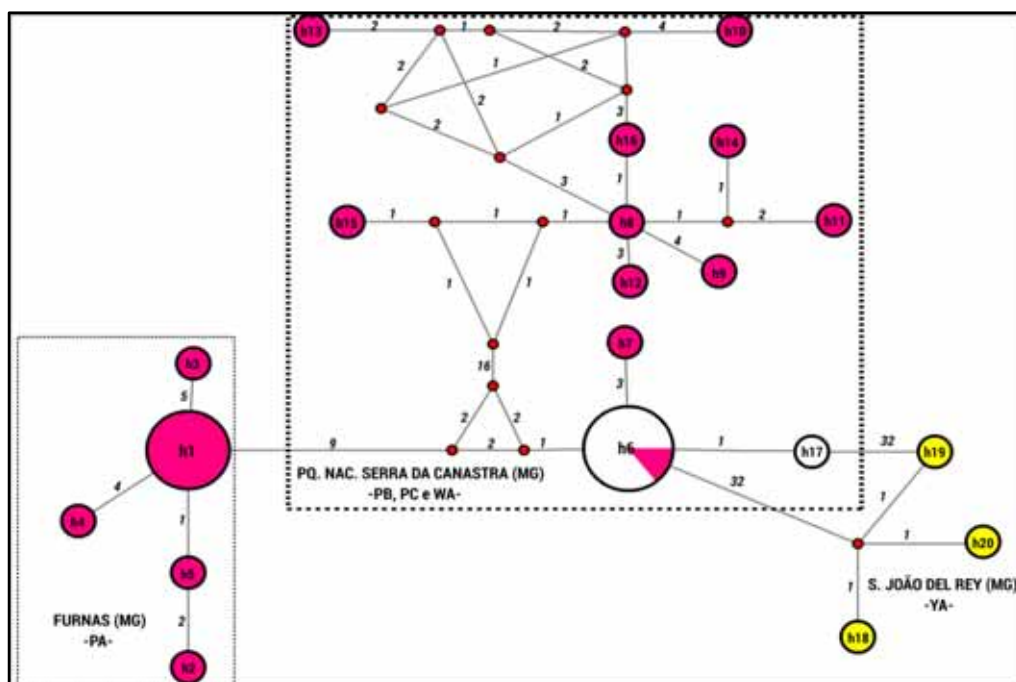


Figura 5. Rede de haplótipos do gene *rps16* em populações de *Utricularia amethystina*. A quantidade de mutações entre os haplótipos está sobre os ramos. Os nós intermediários estimam haplótipos não-amostrados. As cores identificam os haplótipos encontrados em cada morfotipo floral: púrpura, amarelo e branco.

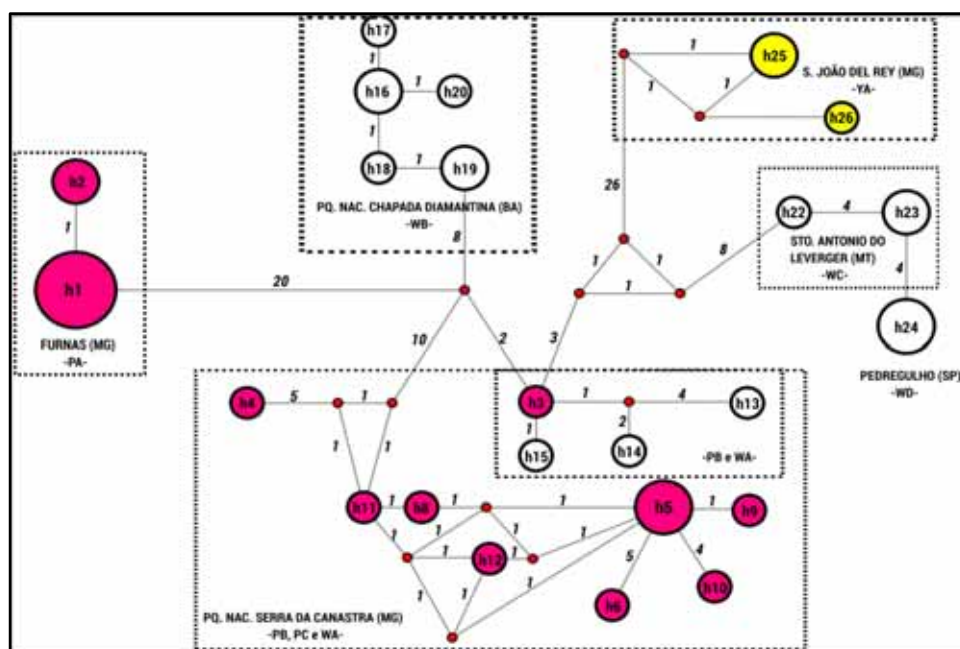


Figura 6. Rede de haplótipos do espaçador *trnF-L* em populações de *Utricularia amethystina*. A quantidade de mutações entre os haplótipos está sobre os ramos. Os nós intermediários estimam haplótipos não-amostrados. As cores identificam os haplótipos encontrados em cada morfotipo floral: púrpura, amarelo e branco.

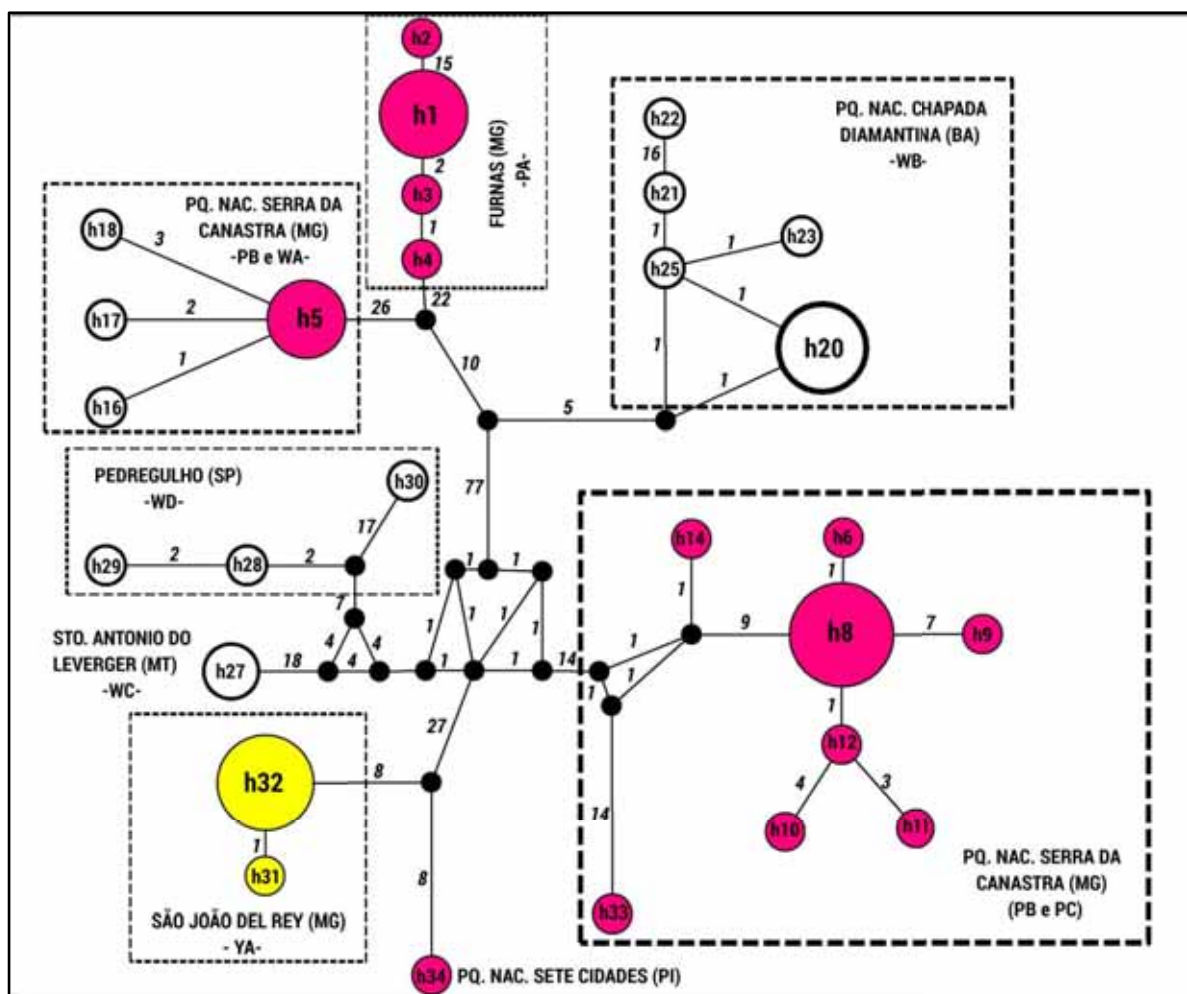


Figura 7. Rede de haplótipos do espaçador *trnS-G* em populações de *Utricularia amethystina*. A quantidade de mutações entre os haplótipos está sobre os ramos. Os nós intermediários estimam haplótipos não-amostrados. As cores identificam os haplótipos encontrados em cada morfotipo floral: púrpura, amarelo e branco.

A partir dos resultados com a filogenia e demais análises, optamos investigar se os genes sequenciados (*matK*, *rbcL* e *rps16*) estariam sujeitos à seleção positiva, ou seja se estaria acumulando mutações não-sinônimas em sua sequência (Apêndice 4). A seleção positiva é inferida quando a razão entre substituições não-sinônimas e sinônimas é maior que um (pressão seletiva positiva =  $dN/dS > 1$ ).

Os resultados sugerem que o gene *matK* esteja sob pressão seletiva nas populações YA e WD, com valores dN/dS muito superiores a 1 (Apêndice 4). No sentido contrário, WA comparado à PA e PB comparado à PC apresentaram valores muito próximos à zero, como esperado para comparações intraespecíficas (HARTL; CLARK, 2010) e o mesmo padrão foi observado para estas populações com os genes *rbcL* e *rps16*. Embora os valores de dN/dS dos genes *rbcL* e *rps16*, de modo geral, não tenham sido tão discrepantes quanto *matK*, tomando com base a média encontrada em comparações interespecíficas de *Utricularia*, ou mesmo entre os gêneros de Lentibulariaceae, fica claro que algumas populações estão acumulando mutações nas sequências codificadoras, ainda que a uma taxa reduzida (e.g.: para *rbcL* PA versus YA =  $0,54 \pm 0,51$ ; para *rps16* PA versus PC =  $0,86 \pm 0,10$ ; Apêndice 4).

## Discussão

Taylor (1989) descreveu *Utricularia amethystina* como uma das espécies mais polimórficas do gênero, mas foi incapaz de reconhecer caracteres morfológicos úteis para a distinção de táxons relacionados. Contudo, flores com cores distintas são facilmente identificadas e agrupadas, mais do que características como presença de tricomas, tamanho de folhas ou a forma das minúsculas brácteas típicas de *Utricularia*. Por outro lado, o polimorfismo intraespecífico para cor das flores ocorre naturalmente em famílias botânicas (CLEGG; DURBIN, 2000; FRY; RAUSHER, 2012; QUATTROCCHIO et al., 1999; WARREN; MACKENZIE, 2001; WHIBLEY et al., 2006), inclusive em Lentibulariaceae (vide capítulo 5), e tem sido explorado especialmente para o melhoramento de espécies ornamentais. Entretanto, se considerarmos que flores com cores distintas podem não compartilhar dos mesmos polinizadores, devido à preferência do polinizador e adaptação às síndromes de polinização (FENSTER et al., 2004; KLAHRE et al., 2011; WESTERKAMP; CLASSEN-BOCKHOFF, 2007), justifica-se investigar se os morfotipos florais de *Utricularia amethystina* seriam geneticamente isolados.

Entretanto constatamos que a cor da flor é uma característica homoplástica para *Utricularia amethystina*, uma vez que foram observadas três transições

independentes do púrpura para o branco, assim como uma transição da condição púrpura para o amarelo, todas com alto suporte (Figura 2A) entre as populações amostradas.

De modo geral, as populações de *Utricularia amethystina* apresentaram alta diversidade, tendo como base a quantidade de haplótipos identificado e comparado tanto aos resultados obtidos para *Pinguicula* L. ser. *Albidae* Casper — à partir do espaçador cloroplastidial *psbA-trnH* (RODRÍGUEZ; MIRANDA, 2014) — quanto para populações ameaçadas de *Utricularia longifolia* Gardner, com apenas 9 haplótipos identificados para o espaçador cloroplastidial *rpl20-rps12* (MENEZES; MIRANDA, 2010).

Dentre os grupos amostrados, a população PC e parte da população PB chamam atenção porque formam o grupo mais rico em haplótipos (Quadro 1; Figura 2, 3, 6, 7 e Apêndice 3) dentre as populações amostradas. Além disso, os genes *matK*, *rbcL* e *rps16* para estas populações apresentaram razões dN/dS próximos a zero (Tabela 2), como esperado para comparações intraespecíficas. Portanto, não há dúvidas de que formem um táxon natural, mas a riqueza de haplótipos pode estar relacionada à sua localização em área protegida (PARNA Serra da Canastra), visto que os efeitos das ameaças sobre as espécies — como redução e fragmentação das populações, ou barreiras ao fluxo gênico — se refletem negativamente sobre a riqueza haplotípica, como observado para *Utricularia longifolia* (MENEZES; MIRANDA, 2010). Ademais, estas populações (PB e PC) foram empregadas para observação de polinizadores (vide capítulo 3), quando constatamos a baixa frequência de visitação e seu comportamento generalista. Portanto, a alta riqueza haplotípica é congruente com a hipótese de autopolinização mediada pelo polinizador (vide capítulo 3), que permite a polinização cruzada sem, contudo, depender exclusivamente dela para a produção de sementes.

Alguns indivíduos da população PB formaram um clado bem suportado com a população WA (Figura 1), congruente com as redes de haplótipos construídas para *matK*, *trnF-L* e *trnS-G* (Figura 3, 6 e 7). As razões dN/dS neste caso também ficaram próximas à zero (Tabela 2), portanto o polimorfismo da coloração floral, neste caso, pode estar associado à mutações intraespecíficas na via de síntese da antocianina — a principal classe de pigmentos presentes em flores e frutos (RAUSHER, 2006).

Polimorfismos semelhantes à estes são conhecidos para outras famílias botânicas, sem contudo haver consenso quanto aos processos que os mantêm na natureza (IRWIN et al., 2003; LEVIN; BRACK, 1995; RAUSHER, 2008).

Os clados formados entre PA, PB (parcialmente), WA, e WB (Rio de Contas, BA), assim como entre WC (Chapada dos Guimarães, MT) e WD (Pedregulho, SP) têm em comum o agrupamento entre populações não-adjacentes. Considerando que todas as populações amostradas pertencessem a uma única espécie, é desafiador propor uma rota ou barreiras naturais que expliquem esta distribuição filogeográfica. A alta razão dN/dS encontrada nas comparações entre WD (Pedregulho, SP) e as populações da Serra da Canastra (PB e PC), é, portanto congruente com a hipótese de que não apenas os morfotipos não são geneticamente isolados — considerando parte de PB e WA como monofiléticos — quanto as diferenças acumuladas entre populações suportam a divisão de *Utricularia amethystina* em novos táxons.

## Conclusões

Empregamos dois espaçadores cloroplastidiais e três genes, um deles bastante conservado entre as angiospermas — o *rbcL*. Apesar da amostragem desigual os resultados foram congruentes: morfotipos caracterizados pela cor da flor são artificiais não apenas porque escondem grupos geneticamente distintos, mas porque morfotipos distintos podem compartilhar haplótipos, além de grupos geneticamente próximos estarem distribuídos em áreas não-adjacentes. Além disso, a filogenia reconstruiu clados coerentes com a distribuição de haplótipos e populações, com suporte maior do que o esperado para agrupamentos intraespecíficos. Adicionalmente, encontramos evidências de seleção positiva, sobretudo para o gene *matK*. Portanto, os resultados obtidos põe em dúvida o *status* taxonômico de *Utricularia amethystina*, sugerindo que este táxon seja na verdade um complexo de espécies filogeneticamente próximas, que não podem ser facilmente distintas pela coloração floral.

## Referências

- ADAMEC, L. Mineral cost of carnivory in aquatic carnivorous plants. **Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 205, n. 9, p. 618–621, 2010.
- ADAMEC, L. A comparison of photosynthetic and respiration rates in six aquatic carnivorous *Utricularia* species differing in morphology. **Aquatic Botany**, v. 111, p. 89–94, 2013.
- ADLASSNIG, W. et al. The roots of carnivorous plants. **Plant and Soil**, v. 274, p. 127–140, 2005.
- ALBERT, V. A et al. The carnivorous bladderwort (*Utricularia*, Lentibulariaceae): a system inflates. **Journal of Experimental Botany**, v. 61, n. 1, p. 5–9, 2010.
- ALBERT, V. A. et al. Carnivorous Plants : Structural Phylogeny Evolution. **Science**, v. 257, n. 5076, p. 1491–1495, 1992.
- ANDERSEN, Ø. M.; JORDHEIM, M. Chemistry of Flavonoid-Based Colors in Plants. In: MANDER, L.; LIU, H.-W. (BEN) (Eds.). . **Comprehensive Natural Products II - Chemistry and Biology**. Oxford: Elsevier, 2010. p. 547–614.
- APG-III. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 161, n. 2, p. 105–121, 2009.
- ARAKI, S. Variation of sterility and fertility in *Utricularia australis* f. *australis* in Hokkaido, northern Japan. **Ecological Research**, v. 15, n. 2, p. 193–201, 2000.
- ARAKI, S.; KADONO, Y. Restricted seed contribution and clonal dominance in a free-floating aquatic plant *Utricularia australis* R. Br. in southwestern Japan. **Ecological Research**, v. 18, n. 5, p. 599–609, 2003.
- BERETTA, M. et al. Pollen morphology of European bladderworts (*Utricularia* L., Lentibulariaceae). **Review of Palaeobotany and Palynology**, v. 205, p. 22–30, 2014.
- BOGS, J. et al. Recent advances in the transcriptional regulation of the flavonoid biosynthetic pathway. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 8, p. 2465–83, 2011.
- CHASE, M. W. et al. Murderous plants: Victorian Gothic, Darwin and modern insights into vegetable carnivory. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 161, p. 329–356, 2009.

CHASE, M. W.; REVEAL, J. L. A phylogenetic classification of the land plants to accompany APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 161, p. 122–127, 2009.

CIESLAK, T. et al. Phylogenetic Analysis of *Pinguicula* (Lentibulariaceae): Chloroplast DNA Sequences and Morphology Support Several Geographically Distinct Radiations. **American Journal of Botany**, v. 92, n. 10, p. 1723–1736, 2005.

CLEGG, M. T.; DURBIN, M. L. Flower color variation : A model for the experimental study of evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 13, p. 7016–7023, 2000.

CLIVATI, D. et al. Reproductive biology and pollination of *Utricularia reniformis* A.St.-Hil. (Lentibulariaceae). **Plant Biology**, v. 16, n. 3, p. 677–682, 2014.

COBERLY, L. C.; RAUSHER, M. D. Pleiotropic effects of an allele producing white flowers in *Ipomoea purpurea*. **Evolution**, v. 62, n. 5, p. 1076–85, 2008.

CORANDER, J. et al. Enhanced Bayesian modelling in BAPS software for learning genetic structures of populations. **BMC Bioinformatics**, v. 9, p. 539, 2008.

CORANDER, J.; MARTTINEN, P. Bayesian identification of admixture events using multilocus molecular markers. **Molecular Ecology**, v. 15, p. 2833–2843, 2006.

CORANDER, J.; TANG, J. Bayesian analysis of population structure based on linked molecular information. **Mathematical Biosciences**, v. 205, p. 19–31, 2007.

CORNER, E. J. H. Lentibulariaceae. In: **The Seeds of Dicotyledons**. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1976. p. 173.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press, 1981. p. 1262

DARWIN, C. **Insectivorous Plants**. 2a. ed. New York: D. Appleton and Company, 1899.

DEGTJAREVA, G. et al. Seed morphology in the genus *Pinguicula* (Lentibulariaceae) and its relation to taxonomy and phylogeny. **Botanische Jahrbücher für Systematik**, v. 125, n. 4, p. 431–452, 2004.

DEGTJAREVA, G. V et al. Morphology and nrITS phylogeny of the genus *Pinguicula* L. (Lentibulariaceae), with special attention to embryo evolution. **Plant Biology**, v. 8, n. 6, p. 778–790, 2006.

ELLISON, A. M. et al. The evolutionary ecology of carnivorous plants. **Advances in Ecological Research**, v. 33, p. 1–74, 2003.

ELLISON, A. M.; GOTELLI, N. J. Evolutionary ecology of carnivorous plants. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 16, n. 11, p. 623–629, 2001.

ELLISON, A. M.; GOTELLI, N. J. Energetics and the evolution of carnivorous plants-Darwin's "most wonderful plants in the world." **Journal of Experimental Botany**, v. 60, p. 19–42, 2009.

FAEGRI, K.; PIJL, L. VAN DER. **The Principles of Pollination Ecology**. Second ed. New York: Robert Maxwell, M.C., 1976.

FAROOQ, M. Studies in Lentibulariaceae - Embriology of *U. stellaris* Linn. f. var. *inflexuosa* Part 1. Flower, organogeny, ovary, megasporogenesis and female gametophyte. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the India**, v. 30, n. 5&6, p. 263–279, 1964.

FAROOQ, M.; SIDDIQUI, S. A.; SIDDIQUI, A. Studies in the Lentibulariaceae. V. the Development of Endosperm in *Utricularia vulgaris* var. *americana* A. Gray: a Reinvestigation. **New Phytologist**, v. 65, n. 1, p. 50–53, 1966.

FENSTER, C. B. et al. Pollination Syndromes and Floral Specialization. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 35, n. 1, p. 375–403, 2004.

FINEBLUM, W. L.; RAUSHER, M. D. Do floral pigmentation gene also influence resistance do enemies? The W locus in *Ipomoea purpurea*. **Ecology**, v. 78, n. 6, p. 1646–1654, 1997.

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.

FISHER, E. et al. Lentibulariaceae. In: KUBITZKI, K. (Ed.). . **The Families and Genera of Vascular Plants**. Berlin: Springer, 2004. p. 276–282.

FLEISCHMANN, A. et al. 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. et al. A revision of *Genlisea* subgenus *Tayloria* (Lentibulariaceae). **Phytotaxa**, v. 433, p. 1–40, 2011.

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

FLEISCHMANN, A. et al. 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**, v. 114, p. 1651–1663, 2014.

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

FRY, J. D.; RAUSHER, M. D. Selection on a Floral Color Polymorphism in the Tall Morning Glory (*Ipomoea purpurea*): Transmission Success of the Alleles Through Pollen. **Evolution**, v. 51, n. 1, p. 66–78, 2012.

GERTZ, E. M. et al. Composition-based statistics and translated nucleotide searches: improving the TBLASTN module of BLAST. **BMC Biology**, v. 4, p. 41, 2006.

GIGORD, L. D. B.; MACNAIR, M. R.; SMITHSON, A. Negative frequency-dependent selection maintains a dramatic flower color polymorphism in the rewardless orchid *Dactylorhiza sambucina* (L.) Soò. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 11, p. 6253–6255, 2001.

GIVNISH, T. J. et al. Carnivory in the bromeliad *Brocchinia reducta*, with a cost/benefit model for the general restriction of carnivorous plants to sunny, moist, nutrient-poor habitats. **The American Naturalist**, v. 124, n. 4, p. 479–497, 1984.

GREILHUBER, J. et al. Smallest angiosperm genomes found in Lentibulariaceae, with chromosomes of bacterial size. **Plant Biology**, v. 8, n. 6, p. 770–777, nov. 2006.

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

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

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

HARBORNE, J. B. Flavonoids and the Evolution of the Angiosperms. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 5, p. 7–22, 1977.

HARTL, D. L.; CLARK, A. G. **Princípios de Genética de Populações**. 4a. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. p. 660

HOBALLAH, M. E. et al. Single gene-mediated shift in pollinator attraction in *Petunia*. **The Plant Cell**, v. 19, n. 3, p. 779–90, 2007.

HOBBHANN, N.; KÜCHMEISTER, H.; POREMBSKI, S. Pollination Biology of Mass Flowering Terrestrial *Utricularia* species (Lentibulariaceae) in the Indian Western Ghats. **Plant Biology**, v. 8, p. 791–804, 2006.

HOPKINS, R.; RAUSHER, M. D. Pollinator-mediated selection on flower color allele drives reinforcement. **Science**, v. 335, n. 6072, p. 1090–1092, 2012.

HUYNH, K.-L. Étude de la morphologie du pollen du genre *Utricularia* L. **Pollen et Spores**, v. X, n. 1, p. 11–55, 1968.

IBARRA-LACLETTE, E. et al. Transcriptomics and molecular evolutionary rate analysis of the bladderwort (*Utricularia*), a carnivorous plant with a minimal genome. **BMC Plant Biology**, v. 11, n. 1, p. 101, 2011a.

IBARRA-LACLETTE, E. et al. Is GC bias in the nuclear genome of the carnivorous plant *Utricularia* driven by ROS-based mutation and biased gene conversion? **Plant Signaling & Behavior**, v. 6, n. 11, p. 1631–4, 2011b.

IBARRA-LACLETTE, E. et al. Architecture and evolution of a minute plant genome. **Nature**, v. 000, p. 1–6, 2013.

IRWIN, R. E. et al. The role of herbivores in the maintenance of a flower color polymorphism in wild radish. **Ecology**, v. 84, n. 7, p. 1733–1743, 2003.

JÉRÉMIE, J. Autogamie dan le genre *Utricularia* L. (Lentibulariaceae). **Bulletin du Museum National d'Histoire Naturelle - Section B, Adansonia, Botanique, Phytochimie**, v. 11, n. 1, p. 17–28, 1989.

JOBSON, R. W. et al. Molecular Phylogenetics of Lentibulariaceae Inferred from Plastid rps16 Intron and trnL-F DNA Sequences: Implications for Character Evolution and Biogeography. **Sistematic Botany**, v. 28, n. 1, p. 157–171, 2003.

JOBSON, R. W. et al. Adaptive evolution Infrastructure for of a cytochrome c oxidase: carnivorous plant radiation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, v. 101, n. 52, p. 18064–18068, 2004.

JOBSON, R. W.; ALBERT, V. A. Molecular Rates Parallel Diversification Contrasts between Carnivorous Plant Sister Lineages 1. **Cladistics**, v. 18, p. 127–136, 2002.

JOHNSON, E. T. et al. Alteration of a single amino acid changes the substrate specificity of dihydroflavonol 4-reductase. **The Plant Journal**, v. 25, n. 3, p. 325–333, 2001.

JUNNIPER, E. B. et al. **The carnivorous plants**. London: Academic Press, 1989. p. 353

KARAGATZIDES, J. D.; ELLISON, A. M. Construction costs, payback times, and the leaf economics of carnivorous plants. **American Journal of Botany**, v. 96, n. 9, p. 1612–1619, 2009.

KAUSIK, S. B.; RAJU, M. V. S. A contribution to the floral morphology and embryology of *U. reticulata*. **Proceedings of the Indian Academy Of Science**, v. 41, p. 155–166, 1955.

KHOSLA, C.; SHIVANNA, K. R.; RAM, H. Y. M. Pollination in aquatic insectivore *Utricularia inflexa* var. *stellaris*. **Phytomorphology**, v. 48, n. 4, p. 417–425, 1998.

KLAHRE, U. et al. Pollinator choice in *Petunia* depends on two major genetic Loci for floral scent production. **Current Biology**, v. 21, n. 9, p. 730–739, 2011.

KONDO, K. A Comparison of Variability in *Utricularia cornuta* and *Utricularia juncea*. **American Journal of Botany**, v. 59, n. 1, p. 23–37, 1972.

KONDO, K.; SEGAWA, M.; NEHIRA, K. Anatomical Studies on Seeds and Seedlings of Some *Utricularia* (Lentibulariaceae). **Brittonia**, v. 30, n. 1, p. 89–95, 1978.

KRESS, W. J.; ERICKSON, D. L. A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcL* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region. **PloS one**, v. 2, n. 6, p. e508, 2007.

KRÓL, E. et al. Quite a few reasons for calling carnivores “the most wonderful plants in the world”. **Annals of Botany**, v. 109, n. 1, p. 47–64, 2012.

LAACKKONEN, 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. 758–64, 2006.

LANKINEN, A. Upper petal lip colour polymorphism in *Collinsia heterophylla* (Plantaginaceae): genetic basis within a population and its use as a genetic marker. **Journal of Genetics**, v. 88, n. 2, p. 205–15, 2009.

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

LEUSHKIN, E. V et al. 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. 476, 2013.

LEVIN, D. A.; BRACK, E. T. Natural Selection Against White Petals in *Phlox*. **Evolution**, v. 49, n. 5, p. 1017–1022, 1995.

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

LOBREAU-CALLEN, D.; JÉRÉMIE, J. Morphologie et ultrastructure du pollen dans le genre *Utricularia* L. (Lentibulariaceae). **Canadian Journal of Botany**, v. 767, p. 744–767, 1999.

LODHI et al. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars, *Vitis* species and *Ampelopsis*. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 12, n. 1, p. 6–13, 1994.

LOWRY, D. B. et al. Five anthocyanin polymorphisms are associated with an R2R3-MYB cluster in *Mimulus guttatus* (Phrymaceae). **American Journal of Botany**, v. 99, n. 1, p. 82–91, 2012.

MAJETIC, C. J. et al. Flower color-flower scent associations in polymorphic *Hesperis matronalis* (Brassicaceae). **Phytochemistry**, v. 68, n. 6, p. 865–74, 2007.

MARKHAM, K. R.; GOULD, K. S.; RYAN, K. G. Cytoplasmic accumulation of flavonoids in flower petals and its relevance to yellow flower colouration. **Phytochemistry**, v. 58, p. 403–413, 2001.

MENEZES, C. G. et al. Seed morphology of bladderworts: a survey on *Utricularia* sect. *Foliosa* and sect. *Psyllosperma* (Lentibulariaceae) with taxonomic implications. **Phytotaxa**, v. 167, p. 173–182, 2014.

MENEZES, C. G.; MIRANDA, V. F. O. DE. **Dinâmica e estrutura de populações de Utricularia (Lentibulariaceae): comparação entre espécies ameaçadas e não-ameaçadas**. [s.l.] Universidade de Mogi das Cruzes, 2010.

MIRANDA, V. F. O. et al. **Lentibulariaceae**. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB8570>>. Acesso em: 1 dez. 2014.

MÜLLER, K. et al. Evolution of carnivory in Lentibulariaceae and the Lamiales. **Plant Biology**, v. 6, n. 4, p. 1–14, 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, n. 1-2, p. 39–67, 2005.

MÜLLER, K. F. et al. Recent progress in understanding the evolution of carnivorous Lentibulariaceae (Lamiales). **Plant Biology**, v. 8, n. 6, p. 748–57, 2006.

ONO, E. et al. Yellow flowers generated by expression of the aurone biosynthetic pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 29, p. 3–8, 2006.

OXELMAN, B.; N, M. L.; BERGLUND, D. Chloroplast rps16 intron phylogeny of the tribe Sileneae (Caryophyllaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 206, p. 393–410, 1997.

PAVLOVIČ, A. et al. Feeding on prey increases photosynthetic efficiency in the carnivorous sundew *Drosera capensis*. **Annals of Botany**, v. 113, n. 1, p. 69–78, 2014.

PEREIRA, C. G. et al. Underground leaves of *Philcoxia* trap and digest nematodes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 4, p. 1154–8, 2012.

PLACHNO, B. J. et al. Cytochemical and ultrastructural aspects of aquatic carnivorous plant turions. **Protoplasma**, v. 251, n. 6, p. 1449–54, 2014.

PLACHNO, B. J.; ŚWIĄTEK, P. Unusual embryo structure in viviparous *Utricularia nelumbifolia*, with remarks on embryo evolution in genus *Utricularia*. **Protoplasma**, v. 239, n. 1, p. 69–80, 2010.

QUATTROCCHIO, F. et al. Molecular analysis of the anthocyanin2 gene of *Petunia* and Its Role in the Evolution of Flower Color. **The Plant Cell**, v. 11, n. August, p. 1433–1444, 1999.

RAJAN, S. S.; KUMAR, D. J. Embryological studies in Lentibulariaceae. I. Floral morphology and embryology of *Utricularia smithiana*. **Proceedings of the Indian Academy of Sciences Plant**, v. 80, p. 18–25, 1973.

RAUSHER, M. D. The evolution of flavonoids and their genes. In: GROTEWOLD, E. (Ed.). **The Science of Flavonoids**. Ohio: Springer, 2006. p. 175–211.

RAUSHER, M. D. Evolutionary Transitions in Floral Color. **International Journal of Plant Sciences**, v. 169, n. 1, p. 7–21, 2008.

RENNER, T.; SPECHT, C. D. A Sticky Situation: Assessing Adaptations for Plant Carnivory in the Caryophyllales by Means of Stochastic Character Mapping. **International Journal of Plant Sciences**, v. 172, n. 7, p. 889–901, 2011.

REUT, M. S.; JOBSON, R. W. A phylogenetic study of subgenus *Polypompholyx*: a parallel radiation of *Utricularia* (Lentibulariaceae) throughout Australasia. **Australian Systematic Botany**, v. 23, p. 152–161, 2010.

RICHARDS, A. J. **Plant Breeding Systems**. 2a edição ed. Londres: RU: Chapman e Hall, 1986.

RODONDI, G.; BERETTA, M.; ANDREIS, C. Review of Palaeobotany and Palynology Pollen morphology of alpine butterworts (*Pinguicula* L., Lentibulariaceae). **Review of Palaeobotany and Palynology**, v. 162, n. 1, p. 1–10, 2010.

RODRÍGUEZ, Y. D.; MIRANDA, V. F. O. DE. **Taxonomia e filogeografia de *Pinguicula* L. ser. *Albidae* Casper (Lentibulariaceae)**. [s.l.] Universidade de Mogi das Cruzes, 2014.

SCHAEFERHOFF, B. et al. Towards resolving Lamiales relationships : insights from rapidly evolving chloroplast sequences. **BMC Evolutionary Biology**, v. 10, n. 352, p. 352, 2010.

SHIVARAMIAH, G. Observations on the floral morphology and embriology of *Utricularia stricticaulis* Stapf. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 65, p. 56–62, 1967.

SIDDIQUI, S. A.; FAROOQ, M. Degeneration in the ovules of *Utricularia coerulea*. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, v. 92, n. 4, p. 245–249, 1965.

SILVA, S. R. DA et al. **Estudo polínico em espécies de Genlisea A. St.-Hil. (Lentibulariaceae) subgênero Genlisea da América do Sul**. 64<sup>o</sup> Congresso Nacional de Botânica. **Anais...**Belo Horizonte, MG: 2014

SMITH, S. D.; RAUSHER, M. D. Gene Loss and Parallel Evolution Contribute to Species Difference in Flower Color. **Molecular Biology**, v. 28, n. 10, p. 2799–2810, 2011.

SOHMA, K. Pollen morphology of the Japanese species of *Utricularia* L. and *Pinguicula* L. with notes on fossil pollen of *Utricularia*. **Journal of Japanese Botany**, v. 50, p. 164–179, 193–210, 1975.

STREISFELD, M. A; RAUSHER, M. D. Altered trans-regulatory control of gene expression in multiple anthocyanin genes contributes to adaptive flower color evolution in *Mimulus aurantiacus*. **Molecular Biology and Evolution**, v. 26, n. 2, p. 433–44, fev. 2009.

STUURMAN, J. et al. The genetic dissection of floral pollination syndromes. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 9, n. 1, p. 78–82, 2006.

TABERLET, P. et al. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. **Plant Molecular Biology**, v. 17, n. 5, p. 1105–9, 1991.

TAYLOR, P. **The Genus *Utricularia* - a taxonomic monograph**. London: Royal Botanical Gardens, Kew, 1989a. p. 724

THANIKAIMONI, G. Pollen morphology of the genus *Utricularia*. **Pollen et Spores**, v. 8, n. 2, p. 265–285, 1966.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. ClustalW: improving the sensivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, n. 22, p. 4673–4680, 1994.

VELEBA, A. et al. Genome size and genomic GC content evolution in the miniature genome-sized family. **New Phytologist**, v. 203, n. 1, p. 22–28, 2014.

WARREN, J.; MACKENZIE, S. Why are all colour combinations not equally represented as flower-colour polymorphisms? **New Phytologist**, v. 151, n. 1, p. 237–241, 2001.

WEBSTER, R. et al. Balancing selection on a floral polymorphism. **Evolution**, v. 54, n. 2, p. 691–695, 2000.

WESTERKAMP, C.; CLASSEN-BOCKHOFF, R. Bilabiate flowers: the ultimate response to bees? **Annals of Botany**, v. 100, n. 2, p. 361–74, 2007.

WHIBLEY, A. C. et al. Evolutionary paths underlying flower color variation in *Antirrhinum*. **Science**, v. 313, n. 5789, p. 963–6, 2006.

WICKE, S. et al. Disproportional plastome - wide increase of substitution rates and relaxed purifying selection in genes of carnivorous Lentibulariaceae. **Molecular Biology and Evolution**, v. 31, n. 3, p. 529–545, 2013.

YAMAMOTO, I.; KADONO, Y. A study on the reproductive biology of aquatic *Utricularia* species in southwestern Japan. **Acta Phytotaxonomica et Geobotanica**, v. 41, p. 189–200, 1990.

Apêndice 1. “Primers” empregados para amplificação de amostras de *Utricularia amethystina*.

| Região                    | Sentido   | Sequência                           | Tamanho<br>esperado | Temperatura de<br>anelamento | Referência                    |
|---------------------------|-----------|-------------------------------------|---------------------|------------------------------|-------------------------------|
| <i>matK</i>               | “forward” | 5'-CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGAG-3'     | 850                 | 53°C                         | KI-JOONG KIM, (não-publicado) |
| <i>matK</i>               | “reverse” | 5'-ACCCAGTCCATCTGGAAATCTTGGTTC-3'   | 850                 | 53°C                         | KI-JOONG KIM, (não-publicado) |
| <i>rbcL</i>               | “forward” | 5'-ATGTCACCACAAAACAGAGACTAAAGC-3'   | 600                 | 52°C                         | KRESS; ERICKSON, (2007)       |
| <i>rbcL</i>               | “reverse” | 5'-GTAAATCAAGTCCACCCRCG-3'          | 600                 | 52°C                         | CBOL                          |
| <i>rps16</i> <sup>1</sup> | “forward” | 5'-GTGGTAGAAAGCAACGTGCGACTT-3'      | 800                 | 53°C                         | OXELMAN; N: BERGLUND, (1997)  |
| <i>rps16</i> <sup>1</sup> | “reverse” | 5'-TCGGGATCGAACATCAATTGCAAC-3'      | 800                 | 53°C                         | OXELMAN; N: BERGLUND, (1997)  |
| <i>trnL</i> <sup>1</sup>  | “forward” | 5'-GGTTCAAGTCCCTCTATCCC-3'          | 400                 | 52°C                         | TABERLET et al.,<br>(1991)    |
| <i>trnL</i> <sup>1</sup>  | “reverse” | 5'-ATTTGAACTGGTGACACGAG-3'          | 400                 | 52°C                         | TABERLET et al., (1991)       |
| <i>trnS-G</i>             | “forward” | 5'-GCC GCT TTAGTC CAC TCA GC-3'     | 900                 | 52°C                         | HAMILTON (1999)               |
| <i>trnS-G</i>             | “reverse” | 5'-GAA CGA ATC ACA CTT TTA CCA C-3' | 900                 | 52°C                         | HAMILTON (1999)               |

<sup>1</sup>Empregados anteriormente para reconstruções filogenéticas em *Utricularia* (JOBSON; ALBERT, 2002; JOBSON et al., 2003; REUT; JOBSON, 2010).

## Apêndice 2. Sequência de Lentibulariaceae empregadas para enraizamento das filogenias e comparações das taxas de mutações dos genes *matK*, *rbcL* e *rps16*.

### *matK*

*Utricularia aurea*  
(Silva & Miranda, em preparação)

TTGCATTTATTACGATTCTTTCTCAGCGAGTCTTGGAAACGGGAATAGTCTTTT  
TAATGCAAAAAAATCTTTCTTTTCAAAAAAATCAACGAGTTTCTTATTTCT  
TATATAGTTTCTCATGTATATGAATATGAATCCATTTTCGTTTTCTACGCAAT  
CAATCCTTTTAAATTTACGATCAACGCTTTTGAACTTTTCTTGAACGGATCTA  
TTTCTATAGAAAAATAGAAGTCTTTATGAAAGTCTTTGAGAAGGTTACGGATT  
TTCAAGAGAATCTATGGTTGGTGAAGGAACCTTGCATACATTATATAGATAT  
CAAAAAAATTTATCTGTCTTCCAAAGGCAATCCCGTTTCCTGAATAAATG  
GAAATGTTACCTTGTGAATTTTGGCAATGGTATTTTCTTTGTGGTTTTCCG  
CAAGAAAGATTTTTGTTAACCAATTAGCCAATCATTCCGTAGAATTTTTGGGT  
TATTTTGCAAGCGTACGGATGAACCTTTTGTGGTACGTAGTCAAAGTCTAGA  
AAATTCATTTATAATGAATAATGCTATTAAAAAGTGTATACACTTGTTCCTA  
TTAGTCTTTGCTTATGGCATTGACTAAGGCGCAATTTGTAATGTATTAGGA  
CATCCGATTAGTAAGTCGTCTTGGGTGGATTAGCGGATTCTACTATTATAGA  
TAGATTTGGGCGTATATGCAGAAATATTTCTCATTATCATAGTGGGTCTTACA  
CAAAAAAAGTTTGTAT

*Utricularia breonii*  
(Silva & Miranda, em preparação)

TTGCATTTATTACGATTCTTTCTCAGCGAGTCTTGGAAATGGGAATAGTCTTTT  
TAATGCAAAAAAATCTTTCTTTTCAAAAAAATAAAGAGTTTCTTATTTCT  
TATATAGTTTCTCATGTATATGAATACGAATCCATTTTCGTTTTCTACGCAAT  
CAATCCTTTTCAATTTACGATCAACGCTTTTGAAGTTTTCTTGAACGAATCTA  
TTTCTATAGAAAAGTAGAAGTCTTTGTGAAAGTCTTTGAGAAGGTTACGGATT  
TTCAAGAGAATCTATGGTTGGTGAAGGAACCTTGCATACATTATATAGGTAT  
AAAAAATTCATTCTGTCTTCCAAAGGCGGATCTCGTTTCTCTGAATAAATG  
GAAATGTTACCTTGTGAATTTTGGCAATGGTATTTTCTTTGTGGTTTTCCG  
CAAGAAAGATTTTTTTAACCAATTAGCCAACCATTCTGTAGAATTTTTGGGT  
TATTTTGCAAGCGTACGGATGAACCTTTTGTGGTACGTAGTCAAAGTCTAGA  
AAATTCATTTATAATGAATAATGCTATTAAAAAGTGTATACACTTGTTCCTA  
TTAGTCTTTGCTTATGGCATTGACTAAGGCGCAATTTGTAATGTATTAGGA  
CATCCGATTAGTAAGTCGTCTTGGGTAGATTAGCGGATTTCGACTATTATAGA  
TAGATTTGGGCGTATATGCAGAAATCTTTCTCATTATCACAGCGGGTCTTCCA  
CAAAAAAAGTTTGTAT

*Utricularia breviscapa*  
(Silva & Miranda, em preparação)

NNNNNTTTATTACGATTATTTCTCAGTGAGTCTTGGAAATGGGAATAGTCTTTT  
GAATGCAAAAAAATCTTTCTTTTCAAAAAAATCAAGAGTTTCTTATTTCT  
TATATAGTTTCTCATGTATATGAATATGAATCCATTTTCGTTTTCTACGCAAT  
CAATCCTTTTCGTTTACGATCAGTGTCTTTTGAACTTTTCTTGAACGAATCTA  
TTTCTATAGAAAAATGGAAGTCTTTGTGAAAGTCTTTGAGAAGGTTACGTATT  
TTCAAGAGAATCTATGGTTGGTGAAGGAACCTTGTATACATTATATAGGTAT  
ACAAAAAATTTATCTGTCTTCGAAAAGCAGCTCTCGTTTCTCTGAATAAATG  
GAAATCCTTACCTTGTGAATTTTGGCAATGGTATTTTCTTTGTGGTTTTCCG  
CAAGAAAGATTTTTGTTAACCAATTAGCCAACCATTCTGTAGAATTTTTGGGT  
TATTTTGCAAGTGTACGGATGAACCTTTTGTAGTACGTAGTCAAAGTCTAGA  
AAATTCATTTATAATGAATAATGCTATTACAAAGTGTATACACTTGTTCCTA  
TTAGTCTTTGCTTATGGCATTCACTAAGGCGCAATTTGTAATGTATTAGGA  
CATCCGATTAGTAAGTCGTCTTGGGTAGATTAGCGGATTTCGACTATTATAGA  
TAGATTTGGGCGTATATGCAGAAATCTATCTCATTATCATAGTGGGTCTTCCA  
CAAAAAAAGTTTATAT

*Utricularia hispida*  
(Silva & Miranda, em preparação)

TTGCATTTATTACGATTCTTGCTCAGCGAGTGTGGAAATCGAAATAATAGTCT  
TATTAATGCAAAATCCAAGAAAAATTTCTTTTGATTTTTTTTTGAAAAATCAAA  
GAGTTTTCTTATTTCTATATAATTTCTCATGTATATGAATATGAATCTATTTTC  
GTCTTTATACGTAAACCAATCCTTTTATTTACGATCCATATTTTTGACCTTTT  
TCTTGAACGAATCTATTTCTATAGAAAAACGGAACCCCTCGTGAAGTCTTTG  
CGAAGGTTGCGTATTTTCAGGCGAATCTATGGTTGGTCAAGGAACCTTGCATA  
TATTATATTAGATATCAAAGAAAAATATTTCTGGCTTCCAAGGGCGTGTACACA  
TTTCTCTGAATAAATGGAAATGCTACCTTGTAAATTTTGGCAATGGTATTTTT  
CCTTGTGGTTTCTGCAAGAAAGATTTCTATCAAACACTTAGTCAATGATTCC  
ATGGAATTTTGGGGTATTTTTTAAGCGTACGAATGAGCTTTTTCTTGTACG  
GAGTCAAAGTCTAGAAAATTCATTTATAATGAATAATGCTATTAAAAAGTTG  
ATACGCTTGTTCCTAATTTATTTCTTTATTTGGCTAAAGCGCAATTTTGTAACTA  
TTAGGGCATCCGATTAGTAAGTCGTCTTGGGCTGATTTATCGGATTTTACTAT  
TATTGATCGATTTGGGCGTATATGCAGAAATCTTTTCTCATTATCATAGTGGGT  
CTTCCAAAAAAGTTTATAT

## Apêndice 2. (continuação) Sequência de Lentibulariaceae empregadas como grupo-externo

| matK                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|--------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Utricularia hydrocarpa</i><br>(SILVA & MIRANDA, em preparação)  | <p>TTGCATTTATTAAGATTCTTTCTCAGCGAGTCTTGGAAATGGGAATAGTCTTTT<br/> TAATGCAAAAAAATTTCTTTTCAAGAAAAATCAAAGATTTTCTTATTCT<br/> TATATAGTTTTTCATGTATATGAATATGAGTCCATTTTAGTTTTCTACGCAAT<br/> CAATCCTTTTCATTTACGATCAACGTCTTTTAACTTTTCTTGAACGAATCTA<br/> TTTCTATAGAAAAATAGAAGTCCTTTGTGAAAGTCTTTGAGAAGGTTATGGATT<br/> TTCAAGAGAATCTATGGTTGGTCAAGGAACCTTGCATACATTATATTAGGTAT<br/> AAAAAAAATTTGTTCTGTCTTCCAAAGGCAGATCTCGTTTCTGAAATAAATG<br/> GAAATGTTACCTTGTGGATTTTGGCAATGGTATTTTCTTTGTGGTTTCCG<br/> CAAGAAAGATTTTGTAAACCAATTAGCCAACCATTCTATAGAATTTTGGT<br/> TATTTTGCAGCGTACGGATGAATCTTTTGTGGTACGTATTCAAAGCTAGA<br/> AAATTCATTTTAAATGAATAATGCTATTAAGAGTGTGATACACTTGTCCAA<br/> TTAGTCTTTGCTTATGGCATTTACTAAGGCGCAATTTGTATGTATTAGGA<br/> CATCTATTAGTAAGTCGTCTTGGGTAGATTTAGAGGATTCTACTATTATAGA<br/> TAGATTTAGTCATATATGCAGAAATCTTCTCATTATCATAGTGGGTCTTCCA<br/> CAAAAAAAGTTTGTAT</p>      |
| <i>Utricularia neottioides</i><br>(SILVA & MIRANDA, em preparação) | <p>TTGCATTTATTACGATTCTTTCTCAGTGAATGTTGGAATGGGAATACTCTTAT<br/> TAATACAAAAAATTTCTTTTCAAAACAAAATCAAAGATTTTATTATCT<br/> TATATAATTCTCATGTATATGAATATGAATCCACTTTGATTTTCTATGTAAC<br/> CAATCCGTTAATTTACGCTCAACATCTTTTGGGCTTTTCTTGAACGAATCCA<br/> TTTCTATAGAAAAATGGAACCTCTTGTGAAAGTCTTTGGGAAGGTTTCTGATT<br/> TTCAATTCAATCTATGGTTGGTGAAGGAACCTTGCATACATTATGTTAGGTAT<br/> CAAAGAAAAATATATTCTGTCTTCCAAGGGCATGTCTCGTTTCTGAAATAAATG<br/> GAAATGTTACCTTGTGACTTTTGGCAATGGTATTTTCCCTGTGGTTTCTG<br/> CCAGAAAAATTTCTATCAACCAATTAGGCAATCATCTGTGGAATTTGGGGGT<br/> TATTTTAAAGCGTACGAATCAAGCTTTTGTAGTCCGAGTAAAGTATAGA<br/> AAATTCATTTATAATGAATAATGCTATTAAGAACTGTGATACACTGTTCCAC<br/> TTATTCCTTTGCTTCTGAGATTATCTAAGGCGCAATTTGTACGTATTGGGG<br/> CATCCGATTAGTAAATCGTCTTGGGCTGATTTAGGGGATTCTCACATTATTGA<br/> TAGATTTGGACGTATATGCAGAAATCTTCTCATTATTATAGTGGGTCTTCCA<br/> CAAAAAAAGTTTGTAT</p>    |
| <i>Utricularia nervosa</i><br>(SILVA & MIRANDA, em preparação)     | <p>TTGCATTTATTACGATTCTTTCTCAGTGAATGTTGGAATGGGAATAGTCTTAT<br/> TAATACAAAAAATTTCTTTTCAAAAAAATCAAAGATTTTCTTATTCT<br/> TATATAATTCTCATGTATATGAATATGAATCCACTTTTATTTTCTATGCAAC<br/> CAATCCGTTTACATTTACGATCAACATCTTTTGAGCTTTTCTTGAACGAATCTA<br/> TTTCTATAGAAAGATGGAACCTCTTGTGAAAGTTTTGGGAAGGTTTCTGATT<br/> TTCAATTCAATCTATGGTTGGTGAAGGAACCTTGCATCCATTATGTTAGGTAT<br/> CAAAGAAAAATATATTCTGTCTTCCAAGGGCATGGCTCGGTTCTGAAAGAAATG<br/> GAAATGTTACCTTGTGAATTTTGGCAATGGTATTTTCCCTGTGGTTTCTG<br/> CCAGAAAAATTTCTATCAACCAATTAGCCAATCATCTGTGGAATTTGGGGT<br/> TATTTTCAAGCGTACGAATCAAGCTTTTGTAGTACGAAGTCAAAGTATAGA<br/> AAATTCATTTATAATGAATAATGCTATTAAGAACTGTGATACACTGTTCCAA<br/> TTATTCCTTTACTTCTTACATTGTCTAAGGCGCAATTTGTACGTATTGGGG<br/> CATCCGATTAGTAAATCGTCTTGGGCGGATTTAGGGGATTCTATTATTATTGA<br/> TAGATTTGGACATATATGCAGAAATCTTCTCATTATTATAGTGGGTCTTCCG<br/> CAAAAAAAGTTTGTAT</p>   |
| <i>Utricularia reniformis</i><br>(SILVA & MIRANDA, em preparação)  | <p>NNGCATTTATTACGATTCTTTCTCAACGAGTGTTGTAATGGGANTAGNCTTAT<br/> TAATGCAACAAAAATTTCTTTTCAAAAAAATTAAGAGTTTCTTATTCT<br/> TATATAATTCTCATGTATATGAATATGAATCAATTTTCGTCTTTATACGTAAC<br/> CAATCCTTTTCATTTACGATCAACATCTTTTGCAATTTTCTTGAACGAATCTA<br/> TTTCTATAGAAAAAGGAACCCCTTGTGAAAGTCTTTGGTAAGGTTATGGATT<br/> TTCCGGGCGAATCTATGGTTGGTCAAGGAACCTTACATACATTATATTAGGTAT<br/> AAAAGAACTATATTGTGGCTTCCAAGGCATGTCTCATTTCCTGACTAAATG<br/> GAAATGTTACCTTGTAAATTTTGTCAATGGTATTTTCCCTGTGGTTTCTCTG<br/> TAAGAAAGATTTCTATCAACCACTTATCCAACCATTCATGGAATTTGGGGT<br/> TATTTTGAAGCGTACGAACGAACCCCTTGTGTAGTACGAGTCAAAGTATAGA<br/> AAATTCCTTTATAATGACTAATGTTAGTAAAGAGTGCATACGCTTGTCCAA<br/> TTATTCCTTTGCTTATGTCTATTGGCTAAAGCGCAATTTGTACGTATTAGGG<br/> CATCCGATTAGTAAATCGTCTTGGGCTGATTTATCAGATTCTAATATTATTGA<br/> TCGATTTGGGCGTATATGCAGAAATCTTCTCATTATCCTAGTGGGTCTTCAA<br/> AAAAAAAAGTTTGTAT</p> |

## Apêndice 2. (continuação) Sequência de Lentibulariaceae empregadas como grupo-externo

|                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p><b>matK</b></p> <p><i>Utricularia volubilis</i><br/>(SILVA &amp; MIRANDA, em preparação)</p> | <p>TTGCATTTTATTACGATTATTTCTCAGCGAGTGTTTTAATTGGAATAGTCTTTT<br/>AAATGCAAAAAAATTTCTTTTTCAAAAAGAAATCAAAGATTTTTTTTATTCT<br/>TATATAATTCTCATGTATATGAATATGAATCCATTTTCGTATTTATACGTAAC<br/>CAAACCTTTTCATTTAAGATCAACTTCTTTTGCACCTTTTTTTGAACGAATCTA<br/>TTTCTATAGAAAAATGGAACACCTTGTGAAAGTCTTTGGGAAGGTTACGGATT<br/>TTCAGGCAAACTATGGTTGGTCAAGGACCCTTGCCTACATATATATAGGTAT<br/>CAAAGAAAAATATTTCTGGCTTCCAAAGGCATGTCTCGTTTCCTGAATAAATG<br/>GAAATGTTATCTTGTCAATTTTGGCAATGGTATTTTCCCTGTGGGTTCCTG<br/>CAAGAAATATTTCTATCAACCAATTAGTCAATCATTCCATGGAATTTTGGGGT<br/>TATTTTCAAGCGTACGAATGAACCTTTTGGTGGTACGGAGTCAAGGTCTAGA<br/>AAATTCATTTATAATGAAAAATGCTATTAGAAAGTTTGTATGCACCTGTTCCAA<br/>TTATTCCTTTGCTTGGAGCATTTGGCTAAGGCACAAATTTTGAACGTATTAGGG<br/>CATCCGATTAGTAAGTCGGCTTGGGCTGATTTAGCGGATTCTACTATTATGTA<br/>TCGATTTGGGCGTATATGCAGAAATTTTCTCATTATCATAGCGGGTCTGCCA<br/>AAAAAAGGTTTGTAT</p> |
| <p><b>rbcL</b></p> <p><i>Pinguicula filifolia</i><br/>(SILVA &amp; MIRANDA, em preparação)</p>  | <p>CAACAGAGACTAAAGCAAGTGTGGATTCAAAGCGGGTGTTAAAGAGTACAAA<br/>TTGACTTATTATACCTGAATACGAAACCAAGATACTGATATCTTGGCAGC<br/>ATTTTCGAGTAACCTCAACCGGGGTTCCGCCGAAGAAGCAGGGGCCGCGAG<br/>TAGCTGCCGAATCTTCTACTGGTACATGGACAACGTGTGGACGGATGGACTT<br/>ACCAGCCTTGATCGTTACAAAGGACGATGCTACAACATCGAGCCTGTTCTTGG<br/>AGAAACGAGTCAATATATCTGTTATGTAGCTTATCCCTTTAGACCTTTTGAAG<br/>AAGGTTCTGTTACTAACATGTTTACTTCCATTGTAGGAAATGTATTGGATTTC<br/>AAAGCCCTGCGTGCTCTACGTCTGGAGGATCTGCGAATCCCTCCTGCTTATGT<br/>TAAACTTTTCCAAGGACCGCCTCATGGAATCCAAGTTGAGAGAGATAAATTGA<br/>ACAAGTATGGTCGTCCCCTGTTGGGATGTACTATTAAACCTAAATTTGGGGTTA<br/>TCTGCTAAAACTACGGTAGAGCAGTTTATGAATGTCTTCGCGTGn</p>                                                                                                                                                                                                               |
| <p><i>Genlisea violacea</i><br/>(SILVA &amp; MIRANDA, em preparação)</p>                        | <p>nnnnAGAGACTAAAGCAAGTGTGGATTAAAGCGGGTGTTAAAGAGTACAAA<br/>TTGACTTATTATACCTGAATACGAAACCAAGGATACTGATATCTTGGCAGC<br/>ATTCGAGTAACCTCAACCTGGGGTTCCGCCGAAGAAGCAGGGGCCGCGG<br/>TAGCTGCCGAATCTTCTACTGGTACATGGACAACGTGTGGACCGATGGACTT<br/>ACCAGCCTTGATCGTTACAAAGGACGATGCTACAACATCGAGCCGTTCTCTGG<br/>AGAAACAGATCAATATATCTGTTATGTAGCTTACCCTTTAGACCTTTTGAAG<br/>AAGGTTCTGTTACTAACATGTTTACTTCCATTGTAGGAAATGTATTGGATTTC<br/>AAAGCCCTGCGTGCTCTACGTCTGGAGGATCTTCGAATCCCTCCTGCTTATAT<br/>TAAACTTTTCCAAGGCCCGCCTCATGGAATCCAAGTTGAGAGAGATAAATTGA<br/>ACAAGTATGGTCGTCCCCTGTTGGGTTGTACTATTAAACCTAAATTTGGGGTTA<br/>TCTGCTAAAACTACGGTAGAGCGGTTTATGAATGTCTTCGCGGTGn</p>                                                                                                                                                                                                                 |
| <p><i>Utricularia flaccida</i><br/>(SILVA &amp; MIRANDA, em preparação)</p>                     | <p>AAACAGAGACTAAAGCAAGTGTGGATTCAAAGCGGGTGTTAAAGAGTACAAA<br/>TTGACTTATTATACCTGAATACGAAACCAAGGATACTGATATCTTGGCAGC<br/>ATTCGAGTAACCTCAACCGGAGTTCACCTGAAGAAGCAGGGGCCGCGG<br/>TAGCTGCCGAATCTTCTACTGGTACATGGACAACGTGTGGACCGATGGCCCT<br/>ACCAGCCTTGATCGTTACAAAGGGCGATGCTACCACATTGAGCCCGTTCTCTGG<br/>AGAAAAAGATCAATATATCTGTTATGTAGCTTACCCTTTAGACCTTTTGAAG<br/>AAGGTTCTGTTACTAACATGTTTACTTCCATTGTAGGAAATGTATTGGATTTC<br/>AAAGCCCTACGTGCTCTACGTCTGGAAGATCTGCGAATCCCTGTTGCTTATAT<br/>TAAACTTTTCCAAGGCCCGCCTCATGGGATCCAAGTTGAGAGAGATAAATTGA<br/>ACAAGTATGGTCGTCCCTCTGTTGGGATGTACTATTAAACCTAAATTTGGGGTTA<br/>TCTGCTAAAACTATGGTAGAGCGGTTTATGAATGTCTTCGCGGTGG</p>                                                                                                                                                                                                               |
| <p><i>Utricularia longifolia</i><br/>(SILVA &amp; MIRANDA, em preparação)</p>                   | <p>nnACAGAGACTAAAGCAAGTGTGGATTCAAAGCGGGTGTTAAAGAGTACAAA<br/>TTGACTTATTATACCTGAATACGAAACCAAGGATACTGATATCTTGGCAGC<br/>ATTCGAGTAACCTCAACCTGGGGTTCCGCCGAGGAAGCAGGGGCTGCGG<br/>TAGCTGCCGAATCTTCTACTGGTACATGGACAACGTGTGGACCGATGGACTT<br/>ACCAGCCTTGATCGTTACAAAGGACGATGCTACAACATAGAGCCCGTTCCCGG<br/>AGAAACAGATCAATATATCTGTTATGTAGCGTACCCTTTAGACCTTTTGAAG<br/>AAGGTTCTGTTACTAACATGTTTACTTCCATTGTAGGAAATGTATTGGATTTC<br/>AAAGCTCTGCGGGCTCTACGTCTGGAGGATCTCCGAATCCCTACCGCTTATAT<br/>TAAACTTTTCCAGGGTCCGCTCATGGAATCCAAGTTGAAAGAGATAAATTGA<br/>ACAAGTATGGTCGTCCCCTGTTGGGTTGTACTATTAAACCAAAATTTGGGGTTA<br/>TCTGCTAAAACTACGGTAGAGCGGTTTATGAATGTCTTCGCGGTGG</p>                                                                                                                                                                                                                 |

## Apêndice 2. (continuação) Sequência de Lentibulariaceae empregadas como grupo-externo

| <i>rbcL</i>                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Utricularia nelumbifolia</i><br>(SILVA & MIRANDA, em preparação)                               | nnACAGAGACTAAAGCAAGTGTGGATTCAAAGCGGGTGTAAAGAGTACAAA<br>TTGACTTATTATACCTCCTGAATACGAAACCAAGGATACTGATATTTTGGCAGC<br>ATTCGAGTAACCTCCTCAACCGGGGGTTCGCGCTGAAGAAGCAGGGGCTGCGG<br>TAGCTGCCGAATCTTCGACTGGTACATGGACAACCTGTGTGGACCGATGGACTT<br>ACGAGCCTTGATCGTTACAAAGGACGATGCTACAACATCGAGCCCGTTCCTGG<br>AGAAACAGATCAATATATCTGTTATGTAGCTTACCCTTTAGACCTTTTGAAG<br>AAGGTTCTGTTACTAACATGTTTACTTCCATTGTAGGAAATGTATTGGATTC<br>AAAGCCCTGCGGGCTCTACGTCTGGAGGATCTGCGAATCCCTCCTGCTTATAT<br>TAAACTTTCCAGGGCCCCACCTCATGGAATCCAAGTTGAAAGAGATAAATTGA<br>ACAAGTATGGTCGTCCCCTGTTGGGTTGTACTATTAAACCAAATTTGGGTTTA<br>TCTGCAAAAACTACGGTAGAGCGGTTTATGAATGTCTTCGCGnnnnn                                                                                                                                                                                                                                    |
| <i>Utricularia praelonga</i><br>(SILVA & MIRANDA, em preparação)                                  | AAACAGAGACTAAAGCAAGTGTGGATTCAAAGCGGGTGTAAAGAGTACAAA<br>TTGACTTATTATACCTCCTGAATACGAAACCAAGGATACTGATATTTTGGCAGC<br>ATTCGAGTAACCTCCTCAACCTGGGGTTCGCGCTGAGGAAGCAGGGGCTGCGG<br>TAGCTGCCGAATCTTCTACTGGTACATGGACAACCTGTGTGGACCGATGGACTT<br>ACGAGCCTTGATCGTTACAAAGGACGATGCTACAACATAGAGCCCGTTCCTGG<br>AGAAACAGATCAATATATCTGTTATGTAGCTTACCCTTTAGACCTTTTGAAG<br>AAGGTTCTGTTACTAACATGTTTACTTCCATTGTAGGAAATGTATTGGATTC<br>AAAGCTCTGCGGGCTCTACGTCTGGAGGATCTCCGAATCCCTACCGCTTATAT<br>TAAACTTTCCAGGGTCCGCTCATGGAATCCAAGTTGAAAGAGATAAATTGA<br>ACAAGTATGGTCGTCCCCTGTTGGGTTGTACTATTAAACCAAATTTGGGTTTA<br>TCTGCTAAAACTACGG-TAGAGCGGT-TTATGAATGTCTTCGCGGTGG                                                                                                                                                                                                                                     |
| <i>Utricularia reniformis</i><br>(SILVA & MIRANDA, em preparação)                                 | AAACAGAGACTAAAGCAAGTGTGGATTCAAAGCGGGTGTAAAGAGTACAAA<br>TTGACTTATTATACCTCCTGAATACGAAACCAAGGATACTGATATTTTGGCAGC<br>ATTCGAGTAACCTCCTCAACCGGGGGTTCGCGCTGAAGAAGCAGGGGCTGCGG<br>TAGCTGCCGAATCTTCGACTGGTACATGGACAACCTGTGTGGACTGATGGACTT<br>ACGAGCCTTGATCGTTACAAAGGACGATGCTACAACATCGAGCCCGTTCCTGG<br>AGAAACAGATCAATATATCTGTTATGTAGCTTACCCTTTAGACCTTTTGAAG<br>AAGGTTCTGTTACTAACATGTTTACTTCCATTGTAGGAAATGTATTGGATTC<br>AAAGCCCTGCGGGCTCTACGTCTGGAGGATCTGCGAATCCCTCCTGCTTATAT<br>TAAACTTTCCAGGGCCCCACCTCATGGAATCCAAGTTGAAAGAGATAAATTGA<br>ACAAGTATGGTCGTCCCCTGTTGGGTTGTACTATTAAACCAAATTTGGGTTTA<br>TCTGCAAAAACTACGGTAGAGCGGTTTATGAATGTCTTCnnnnnnn                                                                                                                                                                                                                                     |
| <i>Utricularia tricolor</i><br>(SILVA & MIRANDA, em preparação)                                   | GGTGTTAAAGAGTACAAATTGACTTATTATACCTCCTGAATACGAAACCAAAGA<br>TACTGATATCTTGGCAGCATTCCGAGTAACCTCCTCAACCGGAGTTCCGCGCTG<br>AAGAAGCAGGGGCCGCGGTAGCTGCCGAATCTTCTACTGGTACATTTGGACAAT<br>GTGTGGACCGATGGACTTACCAGCCTTTGATCGTTACAAAGGACGATGCTACC<br>ACATAGAGCCCGTTCCTGGAGAAACAGATCAATATATCTGTTATGTAGCTTAC<br>CCTTTAGACCTTTTTGAAGAAGGTTCTGTTACTAACATGTTTACTTCCATTGT<br>AGGAAATGTATTGGATTCAAAGCCCTGCGTGCTCTACGTCTGGAGGATCTGC<br>GAATCCCTCCTGCTTATGTTAAACTTTCCAAGGCCCGCTCATGGAATCCAA<br>GTTGAAAGAGATAAATTGAACAAGTATGGTCGTCCCCTGCTGGGATGTACTAT<br>TAAACCTAAATTGGGTTTATCTGCTAAAACTACGGTAGAGCGGTTTATGAAT<br>GTCTTCGCGGnnn                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| <i>rps16</i>                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| <i>Utricularia triloba</i><br>(JOBSON; ALBERT, 2002; JOBSON et al., 2003;<br>REUT; JOBSON, 2010). | TTCTCAATTAATCTCGACACGAGGGTGCTCTTGACTCGACATTGGTTGTTCTA<br>TTAGACTTGAATCCTTTTTTGTGAGGTTGTAATTGTAATAGTAATAGTTTCAT<br>GGTGCGACTCGAGTAGGAAGGCTTAATTGATTTCTCGGGGATAACGATCTAGG<br>GTTAATGTCAATCAACTGGAACAACCTTCGTAAATGTCTCTCCATATATATAA<br>ATCCAGTGCGAGCAAGTTTCCAAGTAATAAACTTGTGGAATGGATTAACT<br>TTTTTAATTCAAAGTGATCATGCGCGAATCAACTGTCTAGGGTAATCTGTGC<br>TACAAAGAAATAAAAAAAGGATGTTGCTGCCATTTGTTGAAAGGATTAGA<br>TTAAGAAGCGCCGAAGTAATGTCTAAACCCAATGATTTAAATAAGTAAAGG<br>ATCTAAGAACAAGTAAACACCTTTTTAATTTCTAGATAGTCTCAATAACTAT<br>CTTTAACCGGATTAGCTTAAAGAAGACCAATCCAATTTTAAACAGATCCATA<br>TAAAGAACGGGGGTAAAGACCACTCAAGAAATGAAATAGACTAAAGACTTTT<br>CCTTTGAGGTATTTTCTAGTTATCCAACCTTGAGTTAGGAGTACGAATGGTTTT<br>TTTGATTAAAAAAGACTGAAATCACTCAAATCATAGTCTGTCTATTTCT<br>CATGTCATTTATTTCGAGTTGCAGACATATATAAACTTGGAAATAAATCATTT<br>GTTCTGTACCCGTATGAGGAGAAAACCTCATATACGTTTCTAGGGGGGTATT<br>GTG |

## Apêndice 2. (continuação) Sequência de Lentibulariaceae empregadas como grupo-externo

| <i>rps16</i>                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p><i>Utricularia tricolor</i><br/>(JOBSON; ALBERT, 2002; JOBSON et al., 2003; REUT; JOBSON, 2010).</p>    | <p>TTTTCAATTTATCTCGAAACGAGGGTGCTCTTGGCTCGACATTGTTTGTCTG<br/>TTAGACTTGTGAACCTTTTTTGGGGTTGTAAATAGTAATAGTTCATGGTGTA<br/>GCTCGAGTAGAAAGGATTAATTCATTCTCGGGGACAAGGATCTAGGGTTAAT<br/>GCCAATCAATTGGAACAACCTTCGTAAATGTATCTTCTATATATAGAAACCCAA<br/>TTCTAGCAAGTTTCTAATTCAAAAGTCAAACCTGGTGGAATTGATTAAACCTTT<br/>TTTTATTTAGAGTCTATCATGCATGAATCAACTGTCCAGAGGAATTGAGTAAT<br/>TTTCACTACAAAGAAATCAAAAAAGGGTATGTTGCTGCCATTTTGAAGGATT<br/>ATATTAAGAACCTCCGAAGTAATGTCTAAACCCAATGATTTAAATAAGGATA<br/>AAAGATCTAAGAACAAGGAAAGACCATTTTAGTTGTCTCATAACTATCTATAA<br/>CTGGGAAAGAAGACTTAAACCAGTTCAGGAGGGGTAAAGACCCTCAAGAA<br/>ATGAAATAGAATCCAATTTTTTCCTTTGAGGTATTTGACAGTTATCCAACCTTG<br/>AGTTAAGAGTACGAATGCTTTTTTTTTTTTCATTAAAAAGATTGAAATCAGAGT<br/>CTGTCTATTTATCATTAATTTATTCGAATTGCATACATAGACAAAACCTTCGAA<br/>TCAATCATTTTTTCGCGACCCGTATGAGGAGAAAACCTCGTATACGTTTTCTT<br/>AGGTATTGTT</p>                                           |
| <p><i>Utricularia subulata</i><br/>(JOBSON; ALBERT, 2002; JOBSON et al., 2003; REUT; JOBSON, 2010).</p>    | <p>TTCTCAATTAATCTCGACACGAGGGTGCTCTTGAAGTTCGACATTGTTTGTCTA<br/>TCATCTTGAATCCCTTTTTGTGAGTTGTAAATAGTAATAGTTCCATGGTGAG<br/>CTCGAGTAGAAGCTTAATGATTTCTCGGGGACAACGATCTAGGGTTAATGTC<br/>AATCAACTGGAACAACCTTCGTAAATGTCTCTCCATATATATAAATCCAGTGC<br/>GAGCAAGTTTCCAAGTAATAAACTTGTGGGAATGGATTAACTTTTTTTTATT<br/>CAAAGTGATCATGCGCAATCAACTGTCCAGGGTAATCTGTGCTACAAAGAA<br/>ATAAAAAAAGGATGTTGCTGCCATTCTGCTGAAAGGATTAGATTAAGAA<br/>GCGCCGAGTAATGTCTAAACCCAATGATTTAAATATAAGTATAAGGATCTAA<br/>GAACAAGTAAACACCTTTTAAATATCTAGATAGTCTCAATAACTATCTATAA<br/>CCGGATTAGCTTAAAGAAGACAAATCCAATTTTAAACAGATCCATATAAAGA<br/>ACGGGGGTAAAGACCACTCAAGAAATGAAATAGACTAAAGACTTTTTCTTTT<br/>AGGTATTTCTAGTTATCCAACCTTGAGTTAGGAGTACGAATGGTTTTTTTGAT<br/>TAAAAAAAAGACTGAAATCACTGAAATCATAGTCTGTGTCTGTCTATTTCTC<br/>ATGTCAATTTATTCGAGTTGCAGACATATATAAACTTGAATCAAATCATTTT<br/>TTCGTGACGCCGTATGAGGAGAAAACCTCATATACGTTTTCTAGGGGGGTATT<br/>GTGTA</p> |
| <p><i>Utricularia simulans</i><br/>(JOBSON; ALBERT, 2002; JOBSON et al., 2003; REUT; JOBSON, 2010).</p>    | <p>nTTTCACTTTATCTCGAAATGAGGGTGCTCTTAGCTCGACATTGTTTGTCTC<br/>TTAACTTCAACCTTTTTTGTGGGTTGTAAATAGTTCAAGTTTCATGATGTA<br/>GCTCGAGTAGAAAGGATTAAGTCAGTTCTTGGGGACAAGGATCTAGGGTTAAT<br/>GCCAATCAATCGGAACAACCTTCGTAAATGTATCTTCCATATATAGAAACCAAT<br/>TCTAGCATCAAACCTTGTGGAATAAATAAACTTCTTTTATACAAAGTGATC<br/>ATGCGTGAAATCAACTGTCTATAGGAATCTTGTCTACAAAGAAATCAAAAAGGG<br/>TATGTTGCTGCCATTTTGAAGGATTAAATTAAGAAGCGCCGAAGTAATGTCT<br/>CAACCTAATGATTTAACTTAGTAGTAAAGGATCTAAGAACAAGAAAGCCCTT<br/>TTTTATTGTCTAGCTAGTCTCAATAACTATCTATAATTGGATTAGATTAAAGA<br/>AGACAAATCCAAATAAGATCCAGTTAAAGAAAAGGGTAAAGACCACTCAAG<br/>AATTGAAATGGACTAACAAATTTTCTTTGAGGTATTGAGAGTTCTACAACCTT<br/>GAGTTAGGAGTACGAATGCTTTTTTTCATTAAAAAGGCTGAAATCATAGTCT<br/>GTTTATTTCTCATTTAATCTTTCGAATTGTACACATAGAAAAACGAAATCATT<br/>TTTTCTTGACGCCGTAGGAGGAGAAAACCTCGTATACGTTTTCTAGGGGGGTAG<br/>TGTTCA</p>                                                   |
| <p><i>Utricularia sandersonii</i><br/>(JOBSON; ALBERT, 2002; JOBSON et al., 2003; REUT; JOBSON, 2010).</p> | <p>TTTCCAATTATCTCAAATGAGGGTGCTCTTGGCTCGACATTGTTAGTTCTGTT<br/>AGACTTGAACCTTTTTTGTGGGGTAATAGTTTCATATTGTAGCTCGAGTAGAA<br/>AGGATTAATTCATTTTTTCGGGGACCAGGATCTAGGGTTAATGCCAATCAATCA<br/>GAACAACCTTCGTAAATGTATCTTCCATATCATATATAGATATCCAATTCGAGC<br/>AAGTTTCCAATTCAAAATCAAAAAAGTAAACTTGTGGAATTCAATAAACT<br/>TTTTTTATTCAAAGTGATCATGCGTGAATTAACCGTCCAGAGGAATCTTTGC<br/>TACAAAAATCAAAAAAGGGTATGTTGCTGCCATTTTGAAGGATTAGATTAA<br/>GAAGCGACGAAGTAATGTCTAAACCCAATGATTAAAAATAAGGATAAAGGATC<br/>TAAGAACAAGGAAATACCTTTTTTATGTCTCGATAGTCTCACTAACCATCTA<br/>TAACGTGGATTAGACTAACGAGGACAAATCGAATTTTAAACCAAGATCCAGATAA<br/>GGAAAAGAGGGTAAAGACCACTCAAGAAATGAAATAGACTGACGATTTTTTCGT<br/>TTTAGGTATTTTAGAATTATCCAACCTTGAGTTAGGAGTACAAATGCTTTTTTT<br/>TTCATTAAAAAGACTGAAATCATAGTCTGTCTATTTCTCATTTAATTTATTC<br/>TAATTTACACATAGACAACGCTTTGAAGAAAATCATTTTTTCTTGAGCCGTA<br/>CGAGGATAAAACCTCGTATACGTTTTCTAGGGGGGTATTGTTCA</p>         |

## Apêndice 2. (continuação) Sequência de Lentibulariaceae empregadas como grupo-externo

| <i>rps16</i>                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p><b><i>Utricularia reniformis</i></b><br/>(JOBSON; ALBERT, 2002; JOBSON et al., 2003; REUT; JOBSON, 2010).</p> | <p>ATTTCAAATTATCTCGAAATGAGGGTGCTCTTGGCTCGACATTGTTTGTCTG<br/>TTAGACTTGAAACCCCTTTTTTGTGGGTTGTAATAGTAATAGTTCATGGTG<br/>TAGCTCGAGTGGAAGGATTAGAATTAATTTCTCGGGGACGATCTAGGGTTAA<br/>TGCCAATCAATGGGAACAACCTTTGTAAATATATCTCCATATATAGAAATCCA<br/>ATTTCGAGCAAGTTTACAATCAAAAAGTAAAACTTGTGGATGTTGAATTGATT<br/>GAGCTTTTTTTATTTCAAAGTCTATCATGCGTGAATCAACTGTCCAGAGGAAT<br/>CTTTGCTACAAAGAAATCAAAAAAGGGTCTGTTGCTGCCATTTTGAAGGATT<br/>AGATTAAGAACTGCCGAAGTAATGTCTAAACCCAATGATTTAAATAAGGATA<br/>AAGAATCTAAGAACAAGGAAAGACCGTTTTAATTGTCTCATAACTATCTATAA<br/>CTTTAACTGGATTAGCCTTAAGAAAGAAGACAAAGAAAATGTTAACGAGATC<br/>CCGGTAAAGAAAAGGGGTTGAAAAGCCCACTCAAGAAATGAAATAGACTCAAT<br/>ATTTTTCCTTGGGGGTATTGGGGTTATCCAAATTGGGTTAAGGGTGGGGATG<br/>CTTTTTTTTTTTTTCATTACAAGACTTAAATAATAGTCTGTGGCTATTTATC<br/>ATTTAATTTATTCGAATTACATACATAACGCTTAATAAAATCATTTT<br/>TTCGTGAGCCGTACGAGGAGAAAACCTCGTATACGTTTCTAGGGGGGTATTG<br/>TGTA</p> |
| <p><b><i>Utricularia pubescens</i></b><br/>(JOBSON; ALBERT, 2002; JOBSON et al., 2003; REUT; JOBSON, 2010).</p>  | <p>TTTTCAATTTATCTCAAAATGAGGGTGCTCTTGACTCGACATTGTTTGTCTG<br/>TTAGACTTGAAACCCCTTTTTTGTGGGTTGTAATAGTAATAGTGCATGGTGTA<br/>GCTCGAGTAGAAAGGATTCATTAATTTTTGAGGACAAGGATCTAGGGTTAATG<br/>CCAATCAATCAATCCGAACAACCTTCGTAAACGGATCTTCCATATTTATATAG<br/>AAATCCAATTTCTAGCAAGTTTCCAATAAAAAGTAAACTTATTGGAATTTAT<br/>TTAACTTTTTTATTCAAAGTATATCATGCGTGAATCAACTGTCCAGAGGAATC<br/>TTTGCTACAACGAAATCAAAAAAGGGTATGTTGCTGCCATTTTGAAGGATTA<br/>GATTAAGAAGCGACGAAGTAATGTCTAAACCCAATGATTTAAAAAAGGCTAAA<br/>GGATCTAAGAACAAGGAAGACCTTTTTTCTTATCTCGATAGTCTCTATAACTG<br/>GATTAGAATAAAGAAGACAAATCAAATTGAACCCAGATCCAGATAAGGAAAAA<br/>AGGGGGGTAAAGACCACTCAAGAAATGAAATAGACTAACGATTTTTTAGGTAT<br/>TTTATAGTTATACAACCTTGAGTTAGGGGTATGAATGCTTTTTTCATTAAAAAAG<br/>ACTTAACTCATAGTCTGTCTATTTCTCATGTAATTTATTCTAATTCACACATA<br/>GACAAAACCTTGAATCAAATCATTTTGTGCTGAGCCGTACGAGGATAAAACCT<br/>CGTATACGTTTCTAGGGGGGTATTGTTTA</p>                   |
| <p><b><i>Utricularia praelonga</i></b><br/>(JOBSON; ALBERT, 2002; JOBSON et al., 2003; REUT; JOBSON, 2010).</p>  | <p>TTTTCAATTTATCTCGAAATGAGGGTGCTCTTGGCTCGACATTGTTTGTCTG<br/>TTAGACTTGAAATGAACCCCTTTTTTGTGGGTTGTAATGTAATAGTAATAGTT<br/>CATGGTGAGTCTCGAGTATAAAGGATTAATTCATTTCTCGTGGACAAGGATCT<br/>AGGGTTAATGCCAATCAATTGGAACAACCTTCGTAAATGTATCTTCCATATATA<br/>CAAATTCCAATTTCTAGCAAGTTTATAATTCAAAAGTAAACTTGTGTGAATTG<br/>ATTACACTTTTTTTATTCAAACCTGTATCATGCGTGAATCAACTGTCCAGAGGA<br/>ATCTTTGCTACAAAGAAATCAAAAAAGGGTCTGTTGCTGCCATTTTGAAGGA<br/>TTATATTAAGCCGAAGTAATGTCTAAACCCAATGATTTAAATTAAGGTTAAAG<br/>GATCTAAGAACAAGGAAAAGACCATTTTAATTGTATCATAATCTATAATTGGG<br/>TTAACTTAAGAACAAGCAAAATCCAATTTTAAACAGATACATATAAAAAAAGGG<br/>GGGTAAAGACCACTCAAGAAATGAAATAGATTAAATATTTTTACTTGAGGTAT<br/>TTGAGAGTTATTCAACTTGAGTTAAGAGTACGAATGCTTTTTTTTCATTAGA<br/>CTGAAATCATAGTCTGTTTATTTCTCATTTAATTTATTTCGAATTGCACACATA<br/>GACAAAACCTCGAATCAAATCATTTTTCGTGAGCCGTACGAGGAGAAAACCT<br/>CGTATACGTTTCTAGGGGGGGTATTGTTCA</p>                 |
| <p><b><i>Utricularia oliveriana</i></b><br/>(JOBSON; ALBERT, 2002; JOBSON et al., 2003; REUT; JOBSON, 2010).</p> | <p>TTTTCAATTTATCTCGACACGAGGGTGCTCTTGACTCGACATTGTTTGTCTA<br/>TTAGACTTGAAATCCCTTTTTTGTGAGGTTGTAATAATAATAGTTCAAGGTGC<br/>AGCTCGAGTAGGAAGGCTTAATTGATTTCTCGGGGACAACGATCTAGGGTTAA<br/>TGCCAATTAACCTGGAACAACCTTCGTAAATGTATCTTCCATATATATAAATCCA<br/>GTGCGAGCAAGTTTCCACGTCAAAAAGTAAACTTGTGGAATTGATTAACT<br/>TTTTTTATTCAAAGTGATCATGCGCGAATCAACTGTCCAGGGTAACCTGGGC<br/>TATAAAGAATAAAAAAGGGTATGTTGCTGCCATTTTGTGAAAGGATTAGA<br/>TTAAGAAGCGCCGAAGTAATGTCTAAACCCAATGGTTTAAATACATGTAAGGA<br/>TCAAAAACAAGGAACACCTTTTTAATTGTCAAGATTGTCTCAATAACGATCT<br/>ATAACCGGATTAGCCTAAAGAAGACTAACCCAATTTTCAACAGATCCATATA<br/>AAGAATAAAGAACGGGGAGGGTAAAGACCACTCAAGAAATGAAATAGACTAAA<br/>GACTTTCCTTTGAGTTATTTCTAGTTATCCAACCTTGAGTTAGGAGTACGAAT<br/>GGTTTTTTTCTTAAAAAAGACTGAAATCATAGTCTGTCTATTTCTTTCATT<br/>TATTCGAGTTGCAGACATATATAAACTTCGAATCAATCATTTTTTTCGTGAG<br/>CCGTATGAGGAGAAAACCTCATATACGTTTCTAGGGGGGGTAGTGTGA</p>          |

*Utricularia nephrophylla*  
(JOBSON; ALBERT, 2002; JOBSON et al., 2003;  
REUT; JOBSON, 2010).

*Utricularia neottiioides*  
(JOBSON; ALBERT, 2002; JOBSON et al., 2003;  
REUT: JOBSON, 2010).

*Utricularia nelumbifolia*  
(JOBSON; ALBERT, 2002; JOBSON et al., 2003;  
REUT: JOBSON, 2010).

*Utricularia nana*  
(JOBSON; ALBERT, 2002; JOBSON et al., 2003;  
REUT; JOBSON, 2010).

TTTTCAATTAATCTCGAAATGAGGATGCTCTTGGCTCGACATTGTTTGTCTG  
TTATACCTTTGATGACCCCTTTTTTGTGGGTGTAAATAGTAATGGTTCGCG  
GTGTAGCTCGAGTAGAAATGATTAATCATTCTCGGGACAAGGATCTAGGG  
TTAATACCAATCAATAAATGGGAACAATCTGTAATGTATCTCCATCTATAT  
ATAGAAATCCAATTGGAACAAGTTTCCAATTCAAAAAAATCAAACCTGTTGG  
AATTGGATTACACTTTTTTATTCAACGTGTATCTGTATCATGCGTGAATAAACTG  
TCTGGATTGAATCTTTGCTACACAGAAATCAAAAAAGGTTATGTTGCTACCAT  
TTGAAAGGATCAAAATTAAGAGGAGCCGAAGTAATGTCTAAACCAAGTTAAAA  
AAAGGTTAAAGGATCTAAGAACAGTAACACCTTTTTTATTGTCTTGATAGT  
TTCACAACCTGTCTCTAATTGGATTGGATTAAGAAGACAACAACTTAATTGTAA  
ATAGAAATAAGATCCAGATAAAATAAAGAGGAGTAAGACCACTCAAGAAATG  
AAATGACGACAAAGATTTTTCTTTTAGTATTGAGAATTCACAACCTTAGT  
TAGGATGACGAATGCTTTTTTTATGAAAAAAAGCCATTTAATTAGTCTGTAT  
ATTTACATATAGACAAGACTTCAATCAAACTATTATTTCTTGAGCCGTACG  
AGGAGAAACCTCGTATACGTTTTCTAGGGGGGGTATTGTTTA

## Apêndice 2. (continuação) Sequência de Lentibulariaceae empregadas como grupo-externo

| <i>rps16</i>                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p><i>Utricularia meyeri</i><br/>(JOBSON; ALBERT, 2002; JOBSON et al., 2003; REUT; JOBSON, 2010).</p>     | <p>TTTTCAATTAAATCTCGAAATGAGGATGCTCCTGGCTCGACATTGTTTGTCTG<br/>TTAGACTTTTGACCCCTTTTTTGTGGGTTGTAAACAGTAATAGTTCGCGGTGG<br/>AGCTCGAGTAGAAAGGATTAATTCGGTTCCTCGGGGACAAGATCTAGGGTTAA<br/>TGCCAATCAATAAATCGGAACAACCTTCGTAAATGTATCTTCCATATATAAATAT<br/>GGAAATCCAATTCCAACAAGTTTCCAATCAAAAAAACTTGTGCAATTGA<br/>TTCACTTTTTTTATTCAACGTGTATCAGGCGTGAATCAACTGTCCAAAGGAAT<br/>CTTTGCTACAAAGAAATCAAAAAAGGGTATGTTGCTGCCATTTTTTTGAAAGG<br/>ATAAAATTAAGAAGCGCCGAAGTAATGTCTAAACCTAATGATTTAAAAAGGAT<br/>AAAGGATTCAAAAACAAGTAAACACAATTTTAATGTCTCGATAGTCTCAATA<br/>ACTGTTTCAGGATTAGAATCTAAATAGAATTTTGATTGAGACAAACAAAGGG<br/>GGTAAAGACCACTCAATAAATGAAATTCATAAAGATTAGCTTTGAGCTATT<br/>TGAAAGTTATTCAACTTGAGTTATGAGTACGAATGGTTTCTTTTCGTTTTCA<br/>AGAAAGAAGAAGAAATAAATGAAATCATCATAGTCTAATTGATTTTTCTAGG<br/>GTCTGTCTATTAAATTTCTAGAATATTAGAATTGCATACAGAGCAAACTTC<br/>GAATCAATCATTTTTCTCGAGCCGTACGAGGAGAAAACCTCCTAACGGTTCT<br/>AGGGGGGTGTTGTTTA</p> |
| <p><i>Utricularia longifolia</i><br/>(JOBSON; ALBERT, 2002; JOBSON et al., 2003; REUT; JOBSON, 2010).</p> | <p>TTTTCAATTTATCTCGAAATGAGGGTGTCTTGGCTCGACATTGTTTGTCTG<br/>TTAGACTTGAACCCCTTTTTTGTGGGTTGTAAATAGTAATAGTTCAT<br/>GGTGTAGCTCGAGTAGAAAGGATTAATTCATTTCTCGGGGACAAGGATCTAGG<br/>GTTAATGCCAATCAATCAATTGGAACAACCTTCGTAAATGTATCTTCCATCTAG<br/>AGAAATCCAATTCTAGCAAATTTCTAATTCAAAAGTAAATTTGTGTAAATG<br/>ATTAACTTTTTTTGATTCAAACGTGTATCATGCGTGAATCAACTCCAGAGGA<br/>ATCTTTGCTACAAAAAAAGGGTATGTTGCTGCCATTTTGAAAGGATTATATT<br/>CAAAATCGCCGAAGTAATGTCTAAACCCAATGATTTCAAATAAGGATAAAGGA<br/>TCTAAGAACAAAGGAAAAAACTTTTTAATTGTCTCATAACTATCTATAACTGGA<br/>TTAGCCTAAGAACACAAATAAAATTTGAAACCAAGATACAGATAAATAAAGG<br/>GGGTAAAGACCACTCAAGAAATGAAATAGATTCAATATTTTTTACTTTGAAGT<br/>ATTTGAGAGTTATTCAACTTGAGTTAAGAGTACGAATGCTTTTTTTTTTTCAT<br/>TAACATTAAGAACTGAAATCATAGTCGGTCTATTTCTCATTTAATTTATTC<br/>GAATTGCACACATGGACAAAACCTCGAATCAATCATTTTTTCTGTCGAGCCGT<br/>CGAGGATAAAACCTCGTATACGTTTCTAGGGGGGGTATTGTTCA</p>                                 |
| <p><i>Utricularia juncea</i><br/>(JOBSON; ALBERT, 2002; JOBSON et al., 2003; REUT; JOBSON, 2010).</p>     | <p>TTTTCAATTTATCTCGAAACGAAAATGATCTTGGCTCGACATTGTTTGTCTG<br/>TTAGACTTAAATCTCCCTTTTTTTGGGTTGTAAATAGTAATAGTTCATGGTG<br/>TAGCTCGAGTAGAAAGGATTAATTCATTTCTCGGGGACAAGGATCTAGGGTTA<br/>ATGCGAATCAATCACTAAATCGAACAACCTTCGTAAATGTATCTTCCATATATA<br/>AAAAAAATTCACCTGTTTTTATTTTCGAATTGGAATTTGTGGAATTGATT<br/>AACTTTTTTTTATTCAACGTGTATCATGCGGAATCAACTTCGGGGGAATC<br/>TTTGTTACAAAGAAATCAAAAAAGGGTATGTTGCTACCATTTTGAAAGGATTA<br/>AAATAAGAAGCGCCGAAGTAATGTCTAAACCCAATGATTTCAAATAAGGATAA<br/>AGGATCTAAGAACAAAGGAAAGACCTTTTTTATTGTCTCAATAGTCTCAACAAC<br/>TATCTATAACTGGATTAACTAAAGAAAACAATAAAATTTTAAACCATCC<br/>CGATAAACAAAGGGGAGTAAAGACCACTCAAGAAATGAAATAGACTAAAGAGT<br/>TTTCCTTTGAAAATTTTATAGTTCTACAACCTTGAGTTAGGAGTACGAATGTTT<br/>TTTTCATTAAGAAAGACAGAAATTCGAGTCTGTCTATTTATCATTTAATTTAT<br/>TCGAATTGCATACATAGCAAACTTCAAATCAAATCATTTTTTCTTGACGCCG<br/>TACGAGGAGAAAACCTCGTATACGTTTCTAGGGGGGTATTGTTTA</p>                             |
| <p><i>Utricularia huntii</i><br/>(JOBSON; ALBERT, 2002; JOBSON et al., 2003; REUT; JOBSON, 2010).</p>     | <p>TTTTCAATTTATCTCGAAACGAGGGTGTCTTGGCTCGACATTGTTTGTCTG<br/>TTAGACTTGTGAACCTTTTTTGGGGTTATAAATATTAATAGTTCATGGTGT<br/>AGCTCGAGTAGAAAGGATTAATTTATTTTTCGGGGACAAGGATCTAGGGTTAA<br/>TGCCAATCAATTGGAACAACCTTCGTAAATGTATCTTCTATATATAAACCCAAT<br/>TATAGCAAGTTTCTAATTCAAAAGTCAAACCTTGTGGAATTGATTAACTTTT<br/>TTGATTTAGAGTCTATCATGCATGAATCAACTGTCCAGAGGAATTGAGTAATT<br/>TTCGCTACAAAGAAATCAAAAAAGGGTATGTTGCTGCCATTTTGAAAGGATTA<br/>TATTAAGAACC GCCGAAGTAATGTCTAAACCCAATGATTTAAAAATAAGGATAA<br/>AAGATCTAAGAACAAAGGAAAGACCTTTTTATTAGTTGTCTCATAACTATCTAT<br/>TTATAACAAGAAGACTTAAACCAAGTTCAGGAGGGGGTAAAGACCACTCAAG<br/>AAATGAAATGGAATCAAATTTTTCTTTGAGGTATTTGACAGTTATCCAACCT<br/>TGAGTTAAGAGTACGAATGCTTTTTTTTTTCATTAAAAAGATTGAAATCAGAA<br/>TCTGTCTATTTATCATTAATTTATTCGAATTGCATACATAGACAAAACCTTCGA<br/>ATCAATCATTTTTTCGCGACGCCGTATGAGGAGAAAACCTCGTATACGTTTCT<br/>TAGGGGGTTTTGTTTA</p>                                                  |

## Apêndice 2. (continuação) Sequência de Lentibulariaceae empregadas como grupo-externo

| <i>rps16</i>                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p><i>Utricularia australis</i><br/>(JOBSON; ALBERT, 2002; JOBSON et al., 2003; REUT; JOBSON, 2010).</p> | <p>TTTTCTATTTATCTCGAAATGAGGGTGCTCTTGGCTCGACACTATTTGTTCTA<br/>TTAGACTTGAAACCCCTTTTTGTTGGTTTGTAAAAAGTAATAGTTTCATGGGTATA<br/>GCTCGAGTAGAAAGGCTTAATTCATTCTCGGGGACAAGGATCTAGGGTTAAT<br/>GCCAATCAATTGTAACAACCTTCGTAAATGTATTTTCCATATATAGAACTTAA<br/>TTGTAGCAAGTTTTCTATTTAAAAAAGGTAACCTTGTGGAATTGGTTCAA<br/>CTTTTTTTATTCAAAGTGGGTCATGCCTGAATCAACTGTTCCAGAGGAATCTTT<br/>GCTACAAACAAATCAAAAAGGGTATGTTGCTGCCATTTTGAAGGATTAGATT<br/>AAGAAGCGATGAAGTAATGTTTAAACCCATGATTTAAAAATAAGGATCTAAGA<br/>ACAAGTAAAGCCCATTTTAATTGTCTCGATAGTCTCAATAATTATCTATAACT<br/>GGATTAGCCCAAGAAAAACAAATCCAAATTAAAAATCAGATCCAGATAAAGAAA<br/>AGGGGTAAAGACCACTCAAGAAATGAAATAGACTAAATATTTTTCTTTTGAGA<br/>TATTTGAGAGTTATACAACCTGAGTTAGGAGTATGAATGCTTTTTTTAATTAA<br/>AAAACTAAATCAAAGTCTGTCTATTTCTCATTTCATTATTCTAATTGCACA<br/>CATAGACAAAACCTTAGAAAAAATCATTTTTCTGAGCCGTACGAGGGGAAA<br/>ACCTCGTATACGTTTCTGAGGGGGTATTGTTCA</p>                     |
| <p><i>Utricularia aurea</i><br/>(JOBSON; ALBERT, 2002; JOBSON et al., 2003; REUT; JOBSON, 2010).</p>     | <p>ATTCTATTTATCTCGAAATGAGGGTGCTCTTGGCTCGACACTATTTGTTCTAT<br/>AAGACTTGAAACCCCTTTTTGTTGGTTGGTAAATAGTATTACTTAATAGTGTACC<br/>TCGAGTAGAAGGGCTTAATTAATTTCTCGGGGACAAGGATCTAGGGTTAATGC<br/>CAATCAATTGTAACAACCTTCGTAAATGTATTTTCCATATATAGAACTTAATT<br/>GGAGCAAGTTTTCAATTAAAAAAGGTAAACCTTGTGGAATTGGTTCAACTT<br/>TTTTTATTCAAAGTGGGTCATACCTGAATCAACTGTTAGAGGAATCTTTGCTC<br/>CAAAGAAATCAAAAAGGGTATGTTGCTGCCATTTTGAAGGATAGATTAAAGAA<br/>GCGATGAAGTAATGTTTAAACCCATGATTAAAAATAAGGATCTAAGAACAAAGTA<br/>AAGCCCATTTTAATTGTCTAGATGGTCTCAATAACTATCTATAACTGGATTGG<br/>CCCAAGAAAAACAATCTAATTTAAACCAGATCCAGATAAAGAAAGGGGTAAAG<br/>ACCACTCAAGAAATGAAATAGACTAAAGATTTTTCTTTTGAATATTTTGAGAA<br/>TTATCCAACCTGAGTTAGGGGTTTGAATGCTTTTTTTAATTAAAAAACTGAA<br/>ATCAAAGTCTGTCTATTTCTAATTTAATTTTTTCGAATTGCACACATGGACAAC<br/>ACTTGAATAAAAGAATAAAATCATTTTTCTGAGCCGTACGAGAGGAAAAAT<br/>CCTTATACGTTTCTGAGGGGTAATTATTA</p>                     |
| <p><i>Utricularia alpina</i><br/>(JOBSON; ALBERT, 2002; JOBSON et al., 2003; REUT; JOBSON, 2010).</p>    | <p>TTTTCAAATTATCTCGAAATGATGGTGCTCTTGAATCGACATTGTTTGTCTG<br/>TTATACTTGAAACCCCTGTTGGGTTGTAAATAGTAATAGTTTCATGGTGTAGCTC<br/>GAGTAGAAAGGATTCTAATTCATTTCTCGGGGACAAGGATCTAGGGTTAATGC<br/>CAATCAATCAATTGGAACAACCTTCGTAAATGTATCTTCCATATATAGAAATCC<br/>AATTCGAGCAAGTTTCCAATTCATCCAATTCAAAAGTCAAACTTGTGGAATT<br/>GATTGAACTTTTTTGATTCAAAGTGTATCATGCGTGAATCAACAGTCCAGAGG<br/>AATCTTTGTTACAAAGAAATTAAGGGGTATGTTGCTACCATTTTTGAAAGGAT<br/>TAGATTAAGAACCGCCGAAGTAATGTCTAAACCCAATGATTACAAATAAGGA<br/>TAAAGGATCTAAGAACAAAGGAAGAGACCATTTTAATTGTCTCATACTATCTA<br/>TAACCTGGATTACCTTAAAGAAGACAACCTCAAATTTTAAACCAGATCCACGATT<br/>AAAGAAAAGGGGGTAAAGACCACTCAAGAAATGAAGTGGACTCTAAATTTTT<br/>CCTTTGAGGTATTTTGAATTACCAACTTGAGTTAAGAGTACGAATGCTTTT<br/>TTTTTTTTATTAAAAAGACTGAAATCATATCTGTCTATTTCTCATTTAATTT<br/>ATTGCAATTGCACACGTAGACAAAACCTCGAATTAATCATTTTTCTGAGACG<br/>CCGTACGAGGAGAAAACCTCGTATACGTTTCATAGGGGGGGGTATTTTTTCA</p> |



## Apêndice 3. Frequência de haplótipos (continuação)

| Haplótipos                | Púrpura |    |    | Branco |    |    |    | Amarelo | Púrpura |       |       |       |       |        |
|---------------------------|---------|----|----|--------|----|----|----|---------|---------|-------|-------|-------|-------|--------|
|                           | PA      | PB | PC | WA     | WB | WC | WD | YA      | E1400   | E2839 | E3094 | E4046 | E4159 | E26600 |
| <i>rbcL</i> (continuação) |         |    |    |        |    |    |    |         |         |       |       |       |       |        |
| H14                       | -       | -  | -  | -      | 2  | -  | -  | -       | -       | -     | -     | -     | -     | -      |
| H15                       | -       | -  | -  | -      | 1  | -  | -  | -       | -       | -     | -     | -     | -     | -      |
| H16                       | -       | -  | -  | -      | -  | 1  | -  | -       | -       | -     | -     | -     | -     | -      |
| H17                       | -       | -  | -  | -      | -  | -  | 1  | -       | -       | -     | -     | -     | -     | -      |
| H18                       | -       | -  | -  | -      | -  | -  | 1  | -       | -       | -     | -     | -     | -     | -      |
| H19                       | -       | -  | -  | -      | -  | -  | 1  | -       | -       | -     | -     | -     | -     | -      |
| H20                       | -       | -  | -  | -      | -  | -  | -  | 4       | -       | -     | -     | -     | -     | 1      |
| H21                       | -       | -  | -  | -      | -  | -  | -  | 1       | -       | -     | -     | -     | -     | -      |
| H22                       | -       | -  | -  | -      | -  | -  | -  | 1       | -       | -     | -     | -     | -     | -      |
| H23                       | -       | -  | -  | -      | -  | -  | -  | 1       | -       | -     | -     | -     | -     | -      |
| H24                       | -       | -  | -  | -      | -  | -  | -  | 1       | -       | -     | -     | -     | -     | -      |
| H25                       | -       | -  | -  | -      | -  | -  | -  | -       | 1       | -     | -     | -     | -     | -      |
| H26                       | -       | -  | -  | -      | -  | -  | -  | -       | -       | 1     | -     | -     | 1     | -      |
| H27                       | -       | -  | -  | -      | -  | -  | -  | -       | -       | -     | 1     | -     | -     | -      |
| H28                       | -       | -  | -  | -      | -  | -  | -  | -       | -       | -     | -     | 1     | -     | -      |
| <i>rps16</i>              |         |    |    |        |    |    |    |         |         |       |       |       |       |        |
| H1                        | 6       | -  | -  | -      | -  | -  | -  | -       | -       | -     | -     | -     | -     | -      |
| H2                        | 1       | -  | -  | -      | -  | -  | -  | -       | -       | -     | -     | -     | -     | -      |
| H3                        | 1       | -  | -  | -      | -  | -  | -  | -       | -       | -     | -     | -     | -     | -      |
| H4                        | 1       | -  | -  | -      | -  | -  | -  | -       | -       | -     | -     | -     | -     | -      |
| H5                        | 1       | -  | -  | -      | -  | -  | -  | -       | -       | -     | -     | -     | -     | -      |
| H6                        | -       | 1  | -  | 6      | -  | -  | -  | -       | -       | -     | -     | -     | -     | -      |
| H7                        | -       | 1  | -  | -      | -  | -  | -  | -       | -       | -     | -     | -     | -     | -      |
| H8                        | -       | 1  | -  | -      | -  | -  | -  | -       | -       | -     | -     | -     | -     | -      |
| H9                        | -       | 1  | -  | -      | -  | -  | -  | -       | -       | -     | -     | -     | -     | -      |
| H10                       | -       | 1  | -  | -      | -  | -  | -  | -       | -       | -     | -     | -     | -     | -      |
| H11                       | -       | -  | 1  | -      | -  | -  | -  | -       | -       | -     | -     | -     | -     | -      |
| H12                       | -       | -  | 1  | -      | -  | -  | -  | -       | -       | -     | -     | -     | -     | -      |
| H13                       | -       | -  | 1  | -      | -  | -  | -  | -       | -       | -     | -     | -     | -     | -      |
| H14                       | -       | -  | 1  | -      | -  | -  | -  | -       | -       | -     | -     | -     | -     | -      |
| H15                       | -       | -  | 1  | -      | -  | -  | -  | -       | -       | -     | -     | -     | -     | -      |
| H16                       | -       | -  | 1  | -      | -  | -  | -  | -       | -       | -     | -     | -     | -     | -      |
| H17                       | -       | -  | -  | 1      | -  | -  | -  | -       | -       | -     | -     | -     | -     | -      |
| H18                       | -       | -  | -  | -      | -  | -  | -  | 1       | -       | -     | -     | -     | -     | -      |
| H19                       | -       | -  | -  | -      | -  | -  | -  | 1       | -       | -     | -     | -     | -     | -      |
| H20                       | -       | -  | -  | -      | -  | -  | -  | 1       | -       | -     | -     | -     | -     | -      |

Apêndice 3. Frequência de haplótipos (continuação)

[illegible]



Apêndice 4. Média e desvio-padrão dos sítios sinônimos e não-sinônimos presentes nos genes *matK*, *rbcL* e *rps16* em Lentibulariaceae. Os valores em vermelho aponta o acúmulo de mutações não-sinônimas como resultado de seleção positiva. E em oposição à estes, os valores em verde indicam conservação dos fenótipos.

|                    |                                | Média dN/dS | Desvio-padrão | Máximo      | Mínimo |
|--------------------|--------------------------------|-------------|---------------|-------------|--------|
| <i>matK</i>        |                                |             |               |             |        |
| <i>Pinguicula</i>  | <i>Genlisea</i>                | 0.85        | -             | 0.85        | 0.85   |
| <i>Pinguicula</i>  | <i>Utricularia</i>             | 0.58        | 0.16          | 0.85        | 0.39   |
| <i>Genlisea</i>    | <i>Utricularia</i>             | 0.80        | 0.27          | 1.29        | 0.55   |
| <i>Pinguicula</i>  | <i>Utricularia amethystina</i> | 0.61        | 0.03          | 0.65        | 0.56   |
| <i>Genlisea</i>    | <i>Utricularia amethystina</i> | <b>1.57</b> | 0.32          | <b>1.98</b> | 1.12   |
| <i>Utricularia</i> | <i>Utricularia amethystina</i> | 0.57        | 0.21          | <b>1.17</b> | 0.25   |
| PA                 | PB                             | 0.61        | 0.24          | 0.72        | 0.09   |
| PA                 | PC                             | 0.74        | 0.04          | 0.81        | 0.72   |
| <b>PA</b>          | <b>WA</b>                      | <b>0.09</b> | 0.00          | 0.09        | 0.09   |
| PA                 | WB                             | 0.26        | 0.00          | 0.26        | 0.26   |
| PA                 | WD                             | 0.60        | 0.00          | 0.60        | 0.60   |
| PA                 | YA                             | 0.39        | 0.00          | 0.39        | 0.39   |
| <b>PB</b>          | <b>PC</b>                      | <b>0.08</b> | 0.18          | 0.53        | 0.00   |
| PB                 | WA                             | 0.38        | 0.18          | 0.46        | 0.00   |
| PB                 | WB                             | 0.64        | 0.17          | 0.72        | 0.26   |
| <b>PB</b>          | <b>WD</b>                      | <b>1.93</b> | 0.71          | 2.24        | 0.42   |
| <b>PB</b>          | <b>YA</b>                      | <b>1.43</b> | 0.49          | 1.64        | 0.39   |
| PC                 | WA                             | 0.48        | 0.03          | 0.53        | 0.46   |
| PC                 | WB                             | 0.69        | 0.19          | 0.81        | 0.00   |
| <b>PC</b>          | <b>WD</b>                      | <b>2.29</b> | 0.12          | 2.52        | 2.24   |
| <b>PC</b>          | <b>YA</b>                      | <b>1.70</b> | 0.12          | 1.93        | 1.64   |
| WA                 | WB                             | 0.26        | 0.00          | 0.26        | 0.26   |
| WA                 | WD                             | 0.42        | 0.00          | 0.42        | 0.42   |
| WA                 | YA                             | 0.39        | 0.00          | 0.39        | 0.39   |
| WB                 | WD                             | 0.60        | 0.00          | 0.60        | 0.60   |
| WB                 | YA                             | 0.39        | 0.00          | 0.39        | 0.39   |
| WD                 | YA                             | 0.96        | 0.00          | 0.96        | 0.96   |
| <i>rbcL</i>        |                                |             |               |             |        |
| <i>Pinguicula</i>  | <i>Genlisea</i>                | 0.27        | 0.00          | 0.27        | 0.27   |
| <i>Pinguicula</i>  | <i>Utricularia</i>             | 0.28        | 0.06          | 0.38        | 0.20   |
| <i>Genlisea</i>    | <i>Utricularia</i>             | 0.27        | 0.11          | 0.39        | 0.12   |
| <i>Pinguicula</i>  | <i>Utricularia amethystina</i> | 0.16        | 0.05          | 0.32        | 0.13   |
| <i>Genlisea</i>    | <i>Utricularia amethystina</i> | 0.12        | 0.06          | 0.32        | 0.07   |
| <i>Utricularia</i> | <i>Utricularia amethystina</i> | 0.26        | 0.08          | 0.61        | 0.00   |
| PA                 | PB                             | 0.12        | 0.09          | 0.33        | 0.00   |
| PA                 | PC                             | 0.16        | 0.07          | 0.33        | 0.00   |
| PA                 | WA                             | 0.13        | 0.27          | 0.99        | 0.00   |
| PA                 | WB                             | 0.13        | 0.35          | 1.34        | 0.00   |
| PA                 | WC                             | 0.23        | 0.02          | 0.28        | 0.18   |
| PA                 | WD                             | 0.23        | 0.02          | 0.28        | 0.18   |
| PA                 | YA                             | 0.54        | 0.41          | 1.52        | 0.00   |
| <b>PB</b>          | <b>PC</b>                      | <b>0.04</b> | 0.07          | 0.19        | 0.00   |
| <b>PB</b>          | <b>WA</b>                      | <b>0.08</b> | 0.12          | 0.66        | 0.00   |
| <b>PB</b>          | <b>WB</b>                      | <b>0.07</b> | 0.17          | 0.99        | 0.00   |
| PB                 | WC                             | 0.20        | 0.03          | 0.28        | 0.18   |

## Apêndice 4. (continuação) Sítios sinônimos e não-sinônimos

| <i>rbcL</i> (continuação) |                                | Média dN/dS | Desvio-padrão | Máximo | Mínimo |
|---------------------------|--------------------------------|-------------|---------------|--------|--------|
| PB                        | WD                             | 0.20        | 0.03          | 0.28   | 0.18   |
| PB                        | YA                             | 0.38        | 0.29          | 1.35   | 0.00   |
| PC                        | WA                             | 0.05        | 0.07          | 0.16   | 0.00   |
| PC                        | WB                             | 0.03        | 0.08          | 0.22   | 0.00   |
| PC                        | WC                             | 0.18        | 0.00          | 0.18   | 0.18   |
| PC                        | WD                             | 0.18        | 0.00          | 0.18   | 0.18   |
| PC                        | YA                             | 0.37        | 0.27          | 1.17   | 0.16   |
| WA                        | WB                             | 0.15        | 0.26          | 0.99   | 0.00   |
| WA                        | WC                             | 0.19        | 0.02          | 0.23   | 0.18   |
| WA                        | WD                             | 0.19        | 0.02          | 0.23   | 0.18   |
| WA                        | YA                             | 0.39        | 0.34          | 1.35   | 0.00   |
| WB                        | WC                             | 0.20        | 0.06          | 0.32   | 0.18   |
| WB                        | WD                             | 0.20        | 0.05          | 0.32   | 0.18   |
| WB                        | YA                             | 0.37        | 0.35          | 1.31   | 0.00   |
| WC                        | WD                             | 0.00        | 0.00          | 0.00   | 0.00   |
| WC                        | YA                             | 0.21        | 0.08          | 0.42   | 0.16   |
| WD                        | YA                             | 0.21        | 0.08          | 0.42   | 0.16   |
| <i>rps16</i>              |                                |             |               |        |        |
| <i>Utricularia</i>        | <i>Utricularia amethystina</i> | 1.15        | 0.36          | 2.41   | 0      |
| PA                        | PB                             | 0.57        | 0.47          | 1.36   | 0.00   |
| PA                        | PC                             | 0.86        | 0.10          | 1.08   | 0.81   |
| PA                        | WA                             | 0.03        | 0.08          | 0.27   | 0.00   |
| PA                        | YA                             | 0.28        | 0.04          | 0.41   | 0.27   |
| PB                        | PC                             | 0.17        | 0.35          | 1.08   | 0.00   |
| PB                        | WA                             | 0.00        | 0.00          | 0.00   | 0.00   |
| PB                        | YA                             | 0.71        | 0.29          | 1.08   | 0.27   |
| PC                        | WA                             | 0.00        | 0.00          | 0.00   | 0.00   |
| PC                        | YA                             | 0.86        | 0.10          | 1.09   | 0.82   |
| WA                        | YA                             | 0.54        | 0.00          | 0.54   | 0.54   |

## CAPÍTULO 5 – Evolução da via dos flavonoides em Lentibulariaceae

### Resumo

A via de síntese dos flavonoides é responsável pela produção de antocianinas, mas sua expressão também afeta a adaptabilidade da planta ao estresse hídrico, térmico, deficiência de fósforo, proteção UV e defesa contra patógenos e herbívoros. Estudá-la é bastante atrativo não apenas pela sua importância sistêmica, mas por ser possível correlacionar alterações na sua estrutura e regulação à pigmentação floral. A simples observação das transições evolutivas na pigmentação floral, podem dar pistas sobre mutações deletérias ou subregulação da expressão dos genes “core”. Utilizando-se dos genomas e transcriptomas disponíveis para espécies de Lentibulariaceae, identificamos cópias homólogas a três dos genes codificadores de enzimas essenciais na síntese dos flavonoides: chalcona sintase, flavonol sintase e dihidroflavonol 4-redutase. Paralelamente, investigamos a frequência das transições de pigmentação floral em Lentibulariaceae a partir das filogenias disponíveis. Encontramos alta divergência nos genes estudados para a família Lentibulariaceae, indícios de seleção positiva sobre o gene codificador da chalcona sintase, e, por outro lado, pressão negativa para o gene de dihidroflavonol 4-redutase. Finalmente, discutimos a relevância destes genes para a adaptação das espécies de Lentibulariaceae às condições de estresse hídrico e térmico (sujeito a condições sazonais), ambientes pobres em nitrogênio e fósforo, e sob alta radiação UV.

**Palavras-chave:** antocianinas, dihidroflavonol 4-redutase, polimorfismo floral, transição da coloração floral.

### Introdução

A carnivoría em Lamiales (*sensu* APG III, 2009) evoluiu independentemente pelo menos três vezes — em Plantaginaceae, Byblidaceae e Lentibulariaceae — (PEREIRA *et al.*, 2012; SCHAEFERHOFF *et al.*, 2010; MÜLLER *et al.*, 2004) e é reconhecida como uma adaptação para captura de macronutrientes de suas presas, especialmente nitrogênio e fósforo, em resposta a ambientes pobres em nutrientes (KRÓL *et al.*, 2012). A monofilia de Lentibulariaceae é altamente suportada, mas a relação com as demais famílias da ordem é ainda controversa (SCHAEFERHOFF *et al.*, 2010; MÜLLER *et al.*, 2004). Trata-se da maior família de angiospermas carnívoras, com cerca de 380 espécies distribuídas em três gêneros: *Pinguicula* L. (≈

100 spp.; RODONDI *et al.*, 2010), *Genlisea* A.St.-Hil. ( $\approx$  30 spp.; FLEISHMANN *et al.*, 2011) e *Utricularia* L. ( $\approx$  250 spp.; FLEISHMANN, 2012), todos monofiléticos.

*Genlisea* e *Utricularia* formam um clado bem suportado (JOBSON & ALBERT, 2002; JOBSON *et al.*, 2003; MÜLLER *et al.*, 2004) e compartilham a ausência de raízes (FLEISHMANN, 2012; JOBSON *et al.*, 2003; TAYLOR, 1989) e cotilédones (KONDO *et al.* 1978; PŁACHNO & ŚWIĄTEK, 2009). Além disso, nesta linhagem também foram identificadas altas taxas mutacionais em muitos *loci* dos três compartimentos genômicos (WICKE *et al.*, 2013; IBARRA-LACLETTE *et al.*, 2011; MÜLLER *et al.*, 2004; JOBSON & ALBERT, 2002) e os menores genomas dentre as angiospermas: *Genlisea aurea* A.St.-Hil. (GREILHUBER *et al.*, 2006) e *Genlisea tuberosa* Rivadavia, Gonella & A.Fleischm. (FLEISCHMANN *et al.*, 2014). A miniaturização do genoma é uma tendência compartilhada entre ambos gêneros (VELEBA *et al.*, 2014; LEUSHKIN *et al.*, 2013; IBARRA-LACLETTE *et al.*, 2012; GREILHUBER *et al.*, 2006) associada ao baixo conteúdo GC e drástica redução das regiões intergênicas (VELEBA *et al.*, 2014; GREILHUBER *et al.*, 2006), mas com redução de apenas 3% das regiões codificadoras (IBARRA-LACLETTE *et al.*, 2012). *Pinguicula* é o gênero basal, caracteriza-se por possuir folhas dispostas em rosetas e armadilhas adesivas, além de outros caracteres plesiomórficos como sementes com um ou dois cotilédones (DEGTJAREVA *et al.*, 2004) e raízes, ainda que temporárias (ADLASSNIG *et al.*, 2005). Ao contrário do observado para o clado *Genlisea+Utricularia*, *Pinguicula* não apresenta drástica redução do genoma ou aceleração das taxas de mutação.

Tanto as características relacionadas à carnivoría quanto as características genômicas de Lentibulariaceae têm, nos últimos anos, resultado em um aumento considerável na quantidade de publicações relacionadas. Além da disponibilização de dados de transcriptoma (IBARRA-LACLETTE *et al.*, 2011), genomas completos (LEUSHKIN *et al.*, 2013; IBARRA-LACLETTE *et al.*, 2013) genomas cloroplastidiais (WICKE *et al.*, 2013), e outros projetos de genomas em curso (VARANI & MIRANDA; MICHAEL, T.P; comunicação *pessoal*), que abrem possibilidades de, a partir desta crescente base de dados, investigar outros mecanismos ou vias metabólicas até agora inexplorados.

Um modelo interessante para investigação é a via de síntese dos flavonoides, que entre outras funções é responsável pela produção de antocianinas, o mais importante grupo de pigmentos encontrados em flores e frutos. As antocianinas são glicosídeos flavonoides produzidos ao final de uma longa via de síntese de compostos secundários importantes para a defesa da planta contra a herbivoria, patógenos e proteção UV (ANDERSEN & JORDHEIM, 2010; RAUSHER, 2006; HARBORNE, 1977). Além disso, os flavonoides produzidos por esta via estão relacionados a outras funções como germinação do tubo polínico, transporte de auxinas, resposta aos estresses hídrico e térmico, assim como à deficiência de fósforo (Pi) (MISSION *et al.*, 2005).

A proteção aos danos da radiação UV-B tem sido atribuída a algumas das enzimas produzidas pela via das antocianinas devido ao seu espectro de absorbância — que agiria como um filtro. Contudo, recentes observações feitas em *Arabidopsis thaliana* sugerem uma função adicional à estes metabólitos: a inibição da formação de radicais livres e do acúmulo de espécies reativas ao oxigênio (ROS – “reactive oxygen species”) (EMILIANI *et al.*, 2013). O acúmulo de ROS em células é, em geral, evitado pela ação do complexo enzimático citocromo oxidase (COX), que cataliza a reação de conversão do oxigênio derivado da respiração em água. Contudo, Laakkonen *et al.* (2006) propuseram uma alteração no funcionamento deste complexo enzimático na linhagem *Genlisea+Utricularia*, devido a mutações previamente identificadas na sua sequência codificadora (JOBSON *et al.*, 2004), e tem-se especulado a relevância desta alteração para aumento da taxa respiratória (LAAKKONEN *et al.*, 2006) — especialmente nas armadilhas de *Utricularia* — e miniaturização do genoma neste clado (ALBERT *et al.*, 2010).

Portanto, se trata de uma via metabólica muito importante e que paralelamente é relativamente fácil de estudar devido à expressão da pigmentação nas flores. A mudança da cor das corolas entre espécies evolutivamente próximas tem sido frequentemente acompanhada da alteração do polinizador, devido à cor ser uma das características que compõem as síndromes de polinização (HOPKINS & RAUSHER, 2012; HOBALLAH *et al.*, 2007; GALLIOT *et al.*, 2006; FENSTER *et al.*, 2004). Tais transições de cor das corolas são resultado de deleções, perda de função ou subregulação dos genes estruturais da via das antocianinas na evolução

das linhagens de plantas (SMITH & RAUSHER, 2011; QUATTROCCHIO *et al.*, 1999). Nos casos em que ocorre a transição de uma condição pigmentada (púrpura, vermelho, amarelo ou outro) para despigmentada (branco), podem haver efeitos negativos que não se restringem à discriminação do polinizador, mas relacionados à diminuição da sobrevivência dos descendentes (COBERLY & RAUSHER, 2008) e viabilidade polínica (TANG *et al.*, 2008; NAPOLI *et al.*, 1999) devido à perda de enzimas e subprodutos importantes da via das antocianinas.

De modo geral, os genes relacionados à via das antocianinas estão presentes em poucas cópias no genoma das plantas, e podem ter sua expressão tecido-específica regulada por fatores de transcrição — como bHLH e R2R3-MYB (BOGS *et al.*, 2011). Mudanças nestes fatores não fixam o fenótipo no processo evolutivo, portanto podem ocorrer reversões à cor ancestral. O mesmo não acontece quando ocorrem alterações nos genes “core” da via, que são rapidamente fixadas (STREISFELD & RAUSHER, 2009; COBERLY & RAUSHER, 2008). Rausher (2008) observou que as transições de cor das flores são assimétricas em muitas famílias, o que significa que as linhagens com flores despigmentadas (ou brancas) se originam sempre a partir de ancestrais pigmentados e, uma vez perdido o pigmento, são raras as reversões para a condição plesiomórfica pigmentada. Com isso é possível mapear as transições por meio de hipóteses filogenéticas e assim inferir possíveis causas relacionadas às transições de cores.

Lentibulariaceae, assim como outras plantas carnívoras, crescem em ambientes hostis com alta umidade e radiação UV (ELLISON & GOTELLI, 2001), pobres em nitrogênio e fósforo, ácidos e frequentemente instáveis devido a condições sazonais (vide exemplo em HOBHANN *et al.*, 2006), portanto a pressão por compostos secundários pode ser alta. Além disso, *Utricularia* apresenta um grande polimorfismo na pigmentação floral (de espécies vermelhas a púrpuras, amarelas e brancas), intra e interespecífico (TAYLOR, 1989). Em campo é raro observar plantas predadas, especialmente àquelas com flores púrpuras, apesar de se tratar de plantas herbáceas de tecido geralmente frágil. Portanto, investigar as origens do polimorfismo na pigmentação floral permite compreender aspectos da fisiologia das carnívoras até o momento inexplorados: sua adaptação às condições

ambientais hostis e proteção contra herbivoria, patógenos e danos causados pela radiação UV.

Portanto, nossos objetivos foram estudar a evolução da pigmentação floral em Lentibulariaceae. Para isso, estimamos as taxas de transições de cor de flor na família, buscando inferir sobre processos evolutivos responsáveis pelas transições entre e dentro dos gêneros. Além disso, investigamos alterações em alguns genes “core” da via das antocianinas nos genomas e transcriptomas disponíveis para Lentibulariaceae.

## Materiais e Métodos

### *Quantificação das transições de cor de flor em Lentibulariaceae*

As transições foram estimadas baseado nas filogenias atualmente disponíveis para a família e gêneros (CIESLAK et al., 2005; FLEISCHMANN et al., 2010; JOBSON; ALBERT, 2002; JOBSON et al., 2003; MÜLLER; BORSCH, 2005; REUT; JOBSON, 2010). Devido aos diferentes padrões de pigmentação presentes na família, foram consideradas “púrpuras” flores com qualquer dos tons produzidos pelas antocianinas (laranja, vermelho, rosa, lilás, roxo ou azul), e em qualquer disposição (desde manchas, venação ou cobertura completa da flor). Isto porque em qualquer destes casos há expressão dos genes da via das antocianinas, ainda que restrito a porções da corola.

As matrizes de Reut & Jobson (2010) foram alteradas, com a inclusão de sequências de morfotipos intraespecíficos de *Utricularia amethystina*. Esta espécie produz flores brancas, amarelas e púrpuras (em diferentes tonalidades) e tem sido alvo de outros estudos de nosso grupo (vide capítulo 4) buscando compreender a manutenção deste polimorfismo intraespecífico. O objetivo com esta inclusão foi verificar se ao nível intraespecífico a evolução da pigmentação seguiria o mesmo padrão observado entre as espécies.

As transições foram tabuladas e, posteriormente, calculada a frequência média, conforme recomendação de Rausher (2006).



### *Obtenção das sequências dos genes a partir de genomas*

Através de uma busca no GenBank, foram selecionadas sequências de aminoácidos (Apêndice 1) e para os genes chalcona sintase (CHS), dihidroflavonol-4-redutase (DFR) e flavonol sintase (FLS), restringindo os resultados a espécies de Lamiales.

As sequências de aminoácidos (Apêndice 1) foram utilizadas como *query* para uma busca no genoma de *Utricularia gibba* L. (IBARRA-LACLETE *et al.*, 2013) e *Genlisea aurea* (LEUSHKIN *et al.*, 2013) utilizando o algoritmo tblastn (GERTZ *et al.*, 2006). Também foram utilizados os “reads” do sequenciamento parcial do transcriptoma de *Pinguicula vulgaris* e *Utricularia intermedia* (utilizado como auxiliar para a montagem do genoma de *G. aurea*: LEUSHKIN *et al.*, 2013) para busca de sequências dos genes-alvo.

### *Alinhamento das sequências*

Após a busca de sequências similares aos genes-alvo, descrita no item anterior, foram alinhadas as sequências obtidas de Lentibulariaceae empregando o aplicativo Geneious® v.5.4.6 (Biomatters Ltd.), com suas configurações-padrão (peso 12 para abertura de gaps e 3 para extensão). O mesmo procedimento foi adotado para construir um alinhamento de aminoácidos de Lamiales e Lentibulariaceae. As sequências de aminoácidos ortólogas aos genes-alvo de Lentibulariaceae foram obtidas da anotação dos genomas. Na ausência de anotação dos genes, as sequências obtidas pela busca do algoritmo tblastn foram traduzidas, testando todos os seis “frames” para excluir sequências contendo “stop codons” prematuros.

### *Análise dos genes: substituições sinônimas e não-sinônimas*

As substituições sinônimas e não sinônimas entre os gêneros de Lentibulariaceae foram investigadas, com emprego do aplicativo DNAsp (LIBRADO

& ROZAS, 2009). Para isso foi utilizado um alinhamento contendo apenas sequências de Lentibulariaceae para cada um dos genes-alvo identificados.

Paralelamente, os alinhamentos de aminoácidos foram utilizados para verificar a conservação dos resíduos entre os gêneros de Lentibulariaceae e com as demais Lamiales, ou alterações importantes como a mudança da polaridade próximo a sítios de ligação.

Os domínios e sítios de ligação presentes nas sequências foram identificados com emprego das ferramentas “on-line” InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>) e PredictProteinOpen (<https://www.predictprotein.org/>). Estas ferramentas empregam classificam as proteínas baseado nos principais bancos de dados de proteínas (Pfam, PRINTS, PROSITE, ProDom, CATH-Gene3D, HAMAP, PANTHER, PIRSF, SMART, SUPERFAMILY, eTIGRFAMs).

## Resultados

### *Quantificação das transições da coloração floral em Lentibulariaceae*

As transições mais frequentes foram do púrpura para o branco, seguido da transição do púrpura para o amarelo. Todas as demais transições foram muito menos frequentes (Quadro 1). Dentre os gêneros, *Genlisea* apresenta apenas duas transições do púrpura para o amarelo, e uma do amarelo para corola púrpura, sendo a cor da corola uma sinapomorfia para os clados. As flores de *Pinguicula* são de modo geral púrpuras (em diferentes tonalidades) e ocorre polimorfismo intraespecífico do púrpura para branco, mas apenas uma transição do púrpura para o amarelo foi identificada. *Utricularia* apresenta a maior quantidade de transições de cor de flor, sendo mais comuns as transições do púrpura para o branco e do púrpura para o amarelo (Quadro 1).

Dentre os morfotipos de *Utricularia amethystina* os resultados das duas regiões do DNA cloroplastidial foram divergentes: *trnL* aponta o amarelo como estado plesiomórfico, já *rps16* aponta as corolas amarelo e branco como derivadas de um ancestral púrpura (dados não apresentados).

Quadro 1. Quantificação das transições de cor de corola na família Lentibulariaceae, baseado nas filogenias disponíveis. Transições intraespecíficas não foram contabilizadas, exceto nos casos em que os morfotipos tenham sido incluídos na filogenia. P: púrpura ou outros tons conferidos pelas antocianinas (lilás, rosa, vermelho, azul); B: branco; A: amarelo.

| Transições                             | Jobson et al. (2002) |                 |                    | Jobson et al. (2003) |                 |                    | Müller & Borsh (2005) |                 |                    | Reut & Jobson (2010) * - trnF-L |                 |                    | Reut & Jobson (2010) * - rps16 |                 |                    | Fleishmann et al. (2010) |                 |                    | Cieslak et al. (2005) |                 |                    | Frequência média |
|----------------------------------------|----------------------|-----------------|--------------------|----------------------|-----------------|--------------------|-----------------------|-----------------|--------------------|---------------------------------|-----------------|--------------------|--------------------------------|-----------------|--------------------|--------------------------|-----------------|--------------------|-----------------------|-----------------|--------------------|------------------|
|                                        | <i>Pinguicula</i>    | <i>Genlisea</i> | <i>Utricularia</i> | <i>Pinguicula</i>    | <i>Genlisea</i> | <i>Utricularia</i> | <i>Pinguicula</i>     | <i>Genlisea</i> | <i>Utricularia</i> | <i>Pinguicula</i>               | <i>Genlisea</i> | <i>Utricularia</i> | <i>Pinguicula</i>              | <i>Genlisea</i> | <i>Utricularia</i> | <i>Pinguicula</i>        | <i>Genlisea</i> | <i>Utricularia</i> | <i>Pinguicula</i>     | <i>Genlisea</i> | <i>Utricularia</i> |                  |
| B > A                                  | -                    | -               | -                  | -                    | -               | -                  | -                     | -               | -                  | -                               | -               | 1                  | -                              | -               | 0                  | -                        | -               | -                  | -                     | -               | -                  | 0.01             |
| B > P                                  | -                    | -               | -                  | 2                    | -               | -                  | -                     | -               | -                  | -                               | -               | 1                  | -                              | -               | 0                  | -                        | -               | -                  | -                     | -               | -                  | 0.03             |
| A > B                                  | -                    | -               | 1                  | -                    | -               | 1                  | -                     | -               | 4                  | -                               | -               | 1                  | -                              | -               | 1                  | -                        | -               | -                  | -                     | -               | -                  | 0.09             |
| A > P                                  | -                    | -               | 1                  | -                    | -               | 1                  | -                     | -               | 2                  | -                               | -               | 2                  | -                              | -               | 2                  | -                        | 1               | -                  | -                     | -               | -                  | 0.10             |
| P > A                                  | -                    | 1               | 7                  | -                    | 1               | 5                  | -                     | -               | 3                  | -                               | -               | 4                  | -                              | -               | 6                  | -                        | 2               | -                  | 1                     | -               | -                  | 0.33             |
| P > B                                  | 7                    | -               | 6                  | 4                    | -               | 6                  | -                     | -               | 4                  | -                               | -               | 5                  | -                              | -               | 5                  | -                        | -               | -                  | 3                     | -               | -                  | 0.44             |
| Total de transformações contabilizadas |                      |                 |                    |                      |                 |                    |                       |                 |                    |                                 |                 |                    |                                |                 |                    |                          |                 |                    |                       |                 |                    | 91               |
| Total de táxons                        | 12                   | 3               | 54                 | 12                   | 5               | 58                 | -                     | -               | 31                 | -                               | -               | 55                 | -                              | -               | 74                 | -                        | 24              | -                  | 42                    | -               | -                  |                  |

\* as matrizes foram alteradas para incluir os morfotipos púrpura, branco e amarelo de *Utricularia amethystina*

### Identificação dos genes-alvo nos genomas de Lentibulariaceae

Em alguns casos mais de uma sequência foi identificada pelas buscas com tblastn. As sequências que apresentavam códons de parada prematuros em todos os 6 “frames” foram excluídas da análise.

Para o gene da enzima chalcona sintase foram identificadas três sequências para *Utricularia intermedia*, e uma única sequência para *Genlisea aurea*, *Pinguicula vulgaris* e *Utricularia gibba*. Para o gene codificador da enzima dihidroflavonol 4-redutase não foram identificadas sequências para *Pinguicula vulgaris*; e a busca pelos genes de flavonol sintase tiveram sucesso apenas para *Genlisea aurea* e *Utricularia gibba*. As sequências nucleotídicas foram investigadas quanto às substituições sinônimas e não sinônimas (Tabela 1). A razão entre substituições

não-sinônimas e sinônimas podem sugerir a intensidade da seleção a que cada fenótipo esteja submetido.

Tabela 1. Análise par-a-par de sítios sinônimos e não-sinônimos para os genes chalcona sintase (CHS), dihidroflavonol 4-redutase (DFR) e flavonol sintase (FLS) em *Lentibulariaceae*.

| Gene       | Total de sítios | Sequência 1           | Sequência 2           | Dif. Sin. | Sítios Sin. | dS   | Dif. Ñ Sin. | Sít. Ñ Sin. | dN   | dN/d S      |
|------------|-----------------|-----------------------|-----------------------|-----------|-------------|------|-------------|-------------|------|-------------|
| <b>CHS</b> | 1035            |                       |                       |           |             |      |             |             |      |             |
|            |                 | <i>P. vulgaris</i>    | <i>G. aurea</i>       | 16,33     | 245,50      | 0,07 | 64,67       | 783,50      | 0,08 | 1,24        |
|            |                 | <i>P. vulgaris</i>    | <i>U. intermedia1</i> | 16,92     | 245,75      | 0,07 | 70,08       | 783,25      | 0,09 | 1,30        |
|            |                 | <i>P. vulgaris</i>    | <i>U. intermedia2</i> | 18,58     | 245,42      | 0,08 | 71,42       | 783,58      | 0,09 | 1,20        |
|            |                 | <i>P. vulgaris</i>    | <i>U. intermedia3</i> | 16,92     | 245,58      | 0,07 | 70,08       | 783,42      | 0,09 | 1,30        |
|            |                 | <i>P. vulgaris</i>    | <i>U. gibba</i>       | 17,92     | 246,25      | 0,07 | 75,08       | 782,75      | 0,10 | 1,32        |
|            |                 | <i>G. aurea</i>       | <i>U. intermedia1</i> | 20,08     | 247,25      | 0,08 | 71,92       | 781,75      | 0,09 | 1,13        |
|            |                 | <i>G. aurea</i>       | <i>U. intermedia2</i> | 19,42     | 246,92      | 0,08 | 70,58       | 782,08      | 0,09 | 1,15        |
|            |                 | <i>G. aurea</i>       | <i>U. intermedia3</i> | 20,08     | 247,08      | 0,08 | 76,92       | 781,92      | 0,10 | 1,21        |
|            |                 | <i>G. aurea</i>       | <i>U. gibba</i>       | 19,42     | 247,75      | 0,08 | 74,58       | 781,25      | 0,10 | 1,22        |
|            |                 | <i>U. intermedia1</i> | <i>U. intermedia2</i> | 2,67      | 247,17      | 0,01 | 5,33        | 781,83      | 0,01 | 0,63        |
|            |                 | <i>U. intermedia1</i> | <i>U. intermedia3</i> | 2         | 247,33      | 0,01 | 10          | 781,67      | 0,01 | 1,58        |
|            |                 | <i>U. intermedia2</i> | <i>U. intermedia3</i> | 3,67      | 247,00      | 0,01 | 13,33       | 782,00      | 0,02 | 1,15        |
|            |                 | <i>U. intermedia1</i> | <i>U. gibba</i>       | 1         | 248,00      | 0,00 | 7           | 781,00      | 0,01 | 2,22        |
|            |                 | <i>U. intermedia2</i> | <i>U. gibba</i>       | 2         | 247,67      | 0,01 | 10          | 781,33      | 0,01 | 1,58        |
|            |                 | <i>U. intermedia3</i> | <i>U. gibba</i>       | 3         | 247,83      | 0,01 | 15          | 781,17      | 0,02 | 1,59        |
| <b>DFR</b> | 508             |                       |                       |           |             |      |             |             |      |             |
|            |                 | <i>G. aurea</i>       | <i>U. intermedia</i>  | 89,5      | 114,92      | 0,78 | 39,5        | 383,08      | 0,10 | <b>0,13</b> |
|            |                 | <i>G. aurea</i>       | <i>U. gibba</i>       | 63,5      | 115,75      | 0,55 | 40,5        | 382,25      | 0,11 | <b>0,19</b> |
|            |                 | <i>U. intermedia</i>  | <i>U. gibba</i>       | 59,5      | 112,83      | 0,53 | 19,5        | 385,17      | 0,05 | <b>0,10</b> |
| <b>FLS</b> | 535             |                       |                       |           |             |      |             |             |      |             |
|            |                 | <i>G. aurea</i>       | <i>U. gibba</i>       | 32,25     | 127,92      | 0,25 | 97,75       | 385,1       | 0,25 | 1,01        |

Dif.Sin.: diferenças sinônimas entre o par de sequências analisado

Sit. Sin.: sítios sinônimos

dS: Razão entre substituições sinônimas por sítio sinônimo

Dif.ÑSin.: diferenças não sinônimas entre o par de sequências analisado

Sit. Ñ Sin.: sítios não sinônimos

dN: Razão entre substituições não sinônimas por sítio não sinônimo

De modo geral, as taxas de  $dN/dS$  para enzima chalcona sintase, entre todas as comparações, resultaram em valores acima de 1, ou seja, há um acúmulo de substituições não-sinônimas entre os gêneros. Contudo, a maior taxa de  $dN/dS$  foi encontrada entre as sequências de *Utricularia gibba* e *U. intermedia* (1,58–2,22; Tabela 1), sugerindo que esta enzima esteja sob seleção positiva ou que as pressões sob esta enzima estejam relaxadas na linhagem *Utricularia*, permitindo alteração das sequências. Estes resultados são coerentes com as rápidas taxas

evolutivas identificadas para a linhagem *Utricularia* (WICKE *et al.*, 2013; IBARRA-LACLETTE *et al.*, 2011; MÜLLER *et al.*, 2004; JOBSON & ALBERT, 2002). O alinhamento entre as sequências de aminoácidos de chalcona sintase obtidas para Lentibulariaceae com sequências de outras Lamiales apresentou cerca de 50% de sítios idênticos. Foram identificados dois domínios (N-terminal e C-terminal) e 13 sítios de ligação a proteínas, dos quais apenas um sítio dentro do domínio C-terminal teve uma modificação de um resíduo de leucina para uma metionina (ambos aminoácidos apolares).

O gene da enzima dihidroflavonol 4-redutase apresentou taxas de dN/dS que sugerem pressão seletiva contrária à alteração das sequências (taxas dN/dS entre 0,10 e 0,19; Tabela 1). Apesar, do alinhamento com sequências de aminoácidos apresentar muitas mutações em relação às demais Lamiales. As sequências obtidas para dihidroflavonol 4-redutase apresentaram um único domínio NAD(P), congruente com caracterizações desta enzima como NAD(P) dependente. Dentre os 16 sítios de ligação identificados para, 12 foram alterados e um sítio foi deletado comparado às demais Lamiales. As alterações incluem trocas por aminoácidos com polaridade diferente da condição ancestral em alguns dos sítios. Será necessário investigar posteriormente como tais alterações poderiam afetar a interação desta enzima com seus substratos. Além disso, a sequência obtida para *Genlisea aurea*, assim como para FLS, está incompleta ou sofreu redução da sequência com perda de 192 resíduos, incluindo parte do domínio NAD(P).

Flavonol sintase apresentou dN/dS próximo a um (Tabela 1), o que sugere que este gene esteja sob pressão relaxada ou livre de pressão. As sequências de aminoácidos de Lentibulariaceae homólogas à flavonol sintase apresentaram dois domínios: não-heme dioxigenase e oxoglutarato/ ferro-dependente desidrogenase. A sequência para este gene obtida de *Genlisea aurea* parece estar incompleta, comparada à *Utricularia gibba* e as demais Lamiales. Nela, está ausente a região homóloga ao domínio não-heme identificado para *Utricularia gibba* — portanto, 157 resíduos iniciais. Provavelmente parte da sequência tenha sido perdida por problemas na anotação e montagem do genoma, ou então a estrutura desta proteína foi sensivelmente alterada na linhagem *Genlisea*. Os sítios de ligação identificados

na região do domínio oxoglutarato/ ferro-dependente desidrogenase estão conservados tanto em *Genlisea* quanto em *Utricularia*.

## Discussão

A via de síntese dos flavonoides surgiu entre os ancestrais das briófitas contando com apenas três dos genes encontrados entre as angiospermas atuais (chalcona sintase, flavonol sintase e flavanona 3-hidroxilase), mantendo-se altamente conservada entre os grupos derivados (RAUSHER, 2006). Esta via tornou-se mais longa passo-a-passo entre os grupos derivados, produzindo flavonoides com importante papel na proteção contra radiação UV e também contra patógenos e herbívoros.

As antocianinas surgiram apenas a partir das gimnospermas (RAUSHER, 2006). Neste grupo, estruturas relacionadas à dispersão das sementes — como tecidos carnosos desenvolvidos a partir de diferentes estruturas: sarcotesta (*Cycas* e *Gynkgo*), arilo (*Taxus* e *Cephalotaxus*), brácteas (*Juniperus* e *Ephedra*) e pedúnculo (*Podocarpus*) — evoluíram independentemente em Cycadales, Ginkgoales, Coniferales e Gnetales (LOVISETTO *et al.*, 2012). Isto corrobora a proposta de que a evolução da via das antocianinas seja resultado do equilíbrio entre duas pressões distintas: além da proteção da planta, como função primitiva de muitos dos produtos desta via, a coevolução de um conjunto de características de sinalização e atração com polinizadores e dispersores, dentre as quais a produção de antocianinas e pigmentação de flores e frutos tem importante papel.

A cor das flores é um caráter altamente homoplástico no gênero *Utricularia*, contudo, a cor púrpura é o estado ancestral do qual surgiram independentemente corolas amarelas e corolas brancas. Esse mesmo padrão evolutivo foi encontrado em *Genlisea* (FLEISCHMANN *et al.*, 2010) e *Pinguicula* (CIESLAK *et al.*, 2005), mas o fenótipo amarelo surgiu poucas vezes independentemente nestes gêneros, diferente do observado para *Utricularia*. A figura 2 resume as frequências das transições de cor de flor observadas na família Lentibulariaceae (descritas no Quadro 1), ficando evidente que a transição para a condição despigmentada é

frequentemente irreversível, e está possivelmente ligada à perda de função de algum dos genes da via das antocianinas.

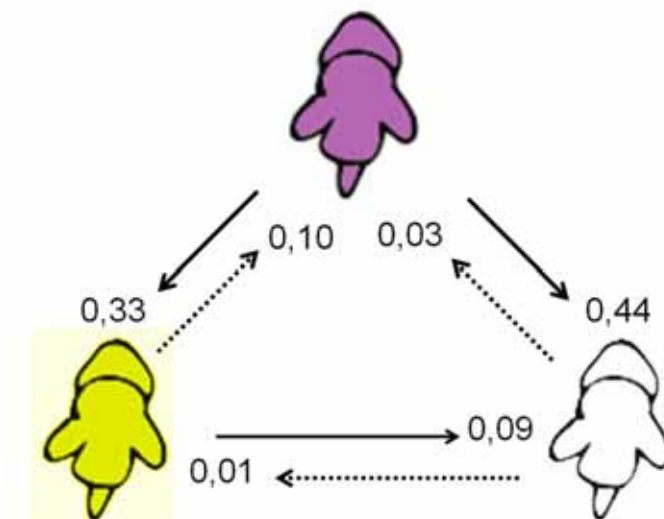


Figura 2. Esquema representativo da frequência das transições de cor de flor na família Lentibulariaceae. O estado púrpura representa qualquer das tonalidades expressas pelas antocianinas (laranja, vermelho, rosa, azul ou púrpura), cobrindo total ou parcialmente a corola. Apenas flores totalmente brancas foram consideradas despigmentadas. Para saber quais filogenias foram consultadas, vide Quadro 1.

Transições de cor em flores são frequentemente associadas a alterações na estrutura ou regulação dos genes da via das antocianinas. E devido à facilidade de relacionar o polimorfismo na coloração floral com alterações nesta via metabólica que a regulação da via dos flavonoides tem sido amplamente estudada. É possível relacioná-la à adaptatividade e resposta das plantas sob estresse hídrico, térmico, resistência à patógenos e herbívoros, esterilidade masculina, entre outras questões (para revisão veja HICHRI *et al.*, 2011, RAUSHER, 2006, 2008). Além disso, qualquer dos genes integrantes da via das antocianinas, ou de seus reguladores, pode alterar a pigmentação floral.

O morfotipo branco (ou despigmentado), contudo, envolve geralmente a perda de função de algum dos genes da via ou de seus genes reguladores (RAUSHER, 2008; JOHNSON *et al.*, 2001), e como observado (Figura 2) esta alteração é frequentemente irreversível. Por este motivo, chama atenção o polimorfismo intra-específico púrpura/branco ser tão comum, inclusive em Lentibulariaceae

(especialmente em *Pinguicula* e *Utricularia*). Estas alterações podem resultar desde a substituição de um único aminoácido (JOHNSON *et al.*, 2001) à deficiência em chalcona sintase e seus derivados (NAPOLI *et al.*, 1999; SPRIBILLE & FORKMANN, 1981), dentre outras enzimas integrantes da via dos flavonoides. Além disso, o motivo pelo qual este polimorfismo é mantido em populações naturais permanece sem resposta. Em *Raphanus sativus* (Brassicaceae, IRWIN *et al.*, 2003) observou-se que embora não existam diferenças na atratividade de polinizadores ou sucesso reprodutivo entre os morfotipos pigmentados e despigmentados, estes últimos sofrem maior predação por herbívoros, já que acumulam concentrações menores de compostos secundários nas folhas.

Por outro lado, quase tão frequentes quanto as transições do púrpura para o branco, foram as transições de corolas púrpuras para amarelas em Lentibulariaceae. Corolas amarelas são geralmente associadas ao acúmulo de carotenoides nas células, e as transições de amarelo para púrpura foram apenas investigadas quanto à sinalização para os polinizadores (GORI, 1989). Recentemente discutiu-se a relevância do acúmulo de flavonóis — kaempferol, quercetina e miriocetina — no citosol para a expressão da cor amarela em flores (MARKHAM *et al.*, 2001). Neste caso, a enzima flavonol sintase (FLS), que produz os flavonóis kaempferol, quercetina e miriocetina, deve ter um importante papel (Figura 3).

A enzima FLS compete pelos mesmos substratos com a enzima dihidroflavonol 4-redutase (DFR), portanto uma alteração na especificidade da enzima DFR aos substratos poderia favorecer o acúmulo de substrato e a produção de flavonóis (DAVIES *et al.*, 2003). De outro modo, a partir da chalcona sintase podem ser produzidas moléculas de 4'-O-glicosiltransferase (ONO *et al.*, 2006) que são essenciais para o funcionamento da enzima auresidina sintase (AUS), sendo a responsável pela produção de 6'-O-glicosídeos de aurona que podem conferir a cor amarela à pétala (HARBORNE, 1977; ONO *et al.*, 2006).

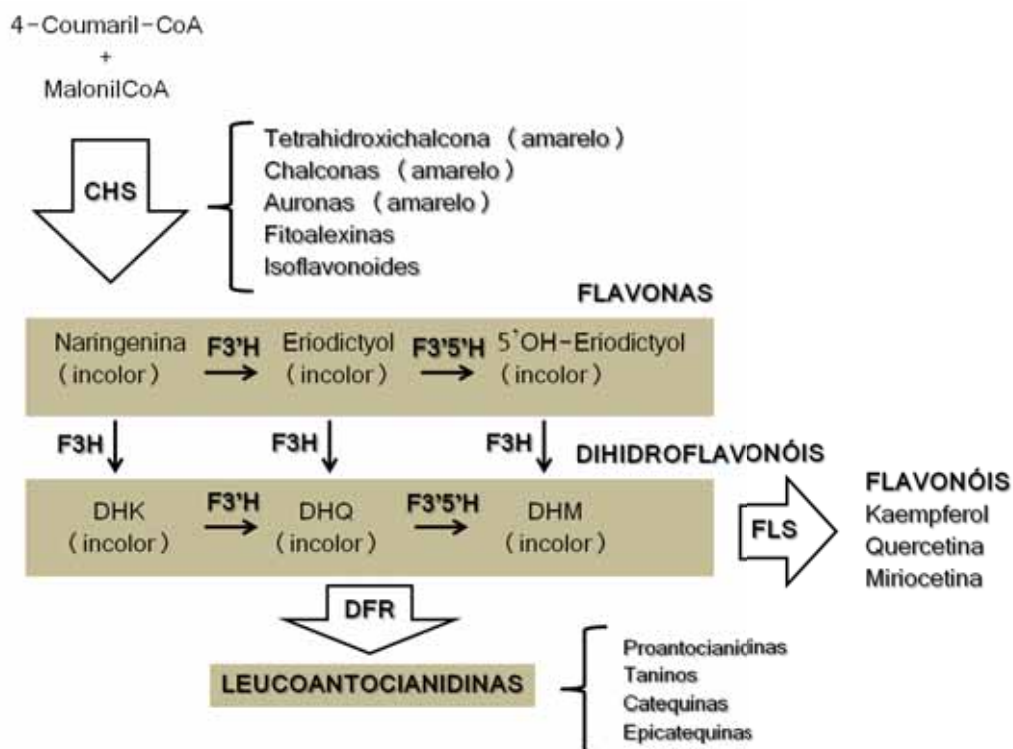


Figura 3. Esquema parcial da via de síntese dos flavonoides. A produção dos pigmentos de antocianina foi omitida. As setas largas indicam as enzimas estudadas a partir dos genomas de *Lentibulariaceae*. As enzimas estão identificadas pelas siglas: CHS (chalcona sintase), F3'H (flavanoide 3' hidroxilase), F3'5'H (flavanoide 3' 5' hidroxilase), F3H (flavanona 3-hidroxilase), DFR (dihidroflavanol 4-redutase) e FLS (flavonol sintase). As chaves indicam moléculas produzidas a partir de substratos da via principal. Adaptado de Chopra *et al.* 2008.

Em *Lentibulariaceae* foram estudadas apenas três destas enzimas, sendo duas pertencentes ao eixo “primitivo” — CHS e FLS — e uma enzima evolutivamente mais recente (DFR). Esta separação se justifica, uma vez que a regulação destas enzimas são controladas em módulos: a expressão das enzimas “primitivas” é induzida por radiação UV, já as enzimas derivadas possuem um sistema de regulação distinto, que parece depender do gene *TTG1* (“transparent testa glabra”) (WILKER *et al.*, 1999), proteínas MYB e fatores de transcrição bHLH (“basic helix-loop-helix”) (FELLER *et al.*, 2011). Mas, o controle coordenado entre estes dois “módulos” de enzimas, apesar de ainda pouco compreendido, deve envolver proteínas MYB (RAUSHER, 2006).

Apesar destas enzimas não participarem diretamente da produção das antocianinas, estão relacionadas a transições de condições pigmentadas para a

condição despigmentada, e podem estar relacionadas direta ou indiretamente com a expressão do fenótipo amarelo (ONO *et al.*, 2006; MARKHAM *et al.*, 2001; NAKAYAMA *et al.*, 2000; MARKHAM & OFMAN, 1993).

O acúmulo de substituições não-sinônimas para o gene codificador da enzima chalcona sintase, chama atenção justamente devido à sua origem precoce na evolução das plantas (RAUSHER, 2006). Contudo a conservação de 50% dos sítios idênticos ao de outras Lamiales, dentre eles quase todos os sítios de ligação identificados, sugerem que tais alterações não modificaram drasticamente sua função.

Por outro lado, a enzima dihidroflavonol 4-redutase (DFR) apresentou alta divergência das demais Lamiales, embora entre as sequências identificadas para Lentibulariaceae aparentemente encontram-se sob forte pressão seletiva, contrária à modificação. O gene *dfr* pertence a uma pequena família de genes, muitas vezes representadas por apenas uma cópia, como em Lentibulariaceae, ou com algumas poucas cópias (XIE *et al.*, 2004). A enzima DFR é responsável pela produção de leucoantocianidinas, precursores incolores das antocianinas. Mas, além disso, está relacionada à produção de taninos condensados, catequinas e outras moléculas importantes para a defesa da planta à patógenos e herbívoros.

Em *Petunia* são conhecidas quatro cópias do gene DFR (*dfrA*, *dfrB*, *dfrC* e *dfrD*), mas somente o *dfrA* é expresso em flores. Em *Antirrhinum* este gene é determinado pelo *locus pallida* (*pal*) que determina flores despigmentadas ou parcialmente pigmentadas (HOLTON & CORNISH, 1995). A atividade da enzima DFR também foi correlacionada ao padrão de acumulação de antocianinas em corolas de *Gerbera hybrida*, se restritas às células da epiderme ou base da pétala, por exemplo (HELARIUTTA *et al.*, 1993). E a manipulação da expressão da enzima FLS — que compete pelos mesmos substratos utilizados pela enzima DFR — permitiu aumentar a concentração de antocianinas produzidas em *Petunia* (DAVIES *et al.*, 2003).

Apesar das poucas cópias, a expressão do gene *dfr* pode ser regulada por múltiplos fatores de transcrição. Tanto mutações no próprio gene *dfr* quanto em seus reguladores já foram descritos para *Arabidopsis thaliana*, resultando em morfotipos despigmentados (WINKEL-SHIRLEY *et al.*, 1995; WALKER *et al.*, 1999; NESI *et al.*,

2000, 2001). Em *Antirrhinum majus* foram identificados pelos menos três *loci* reguladores para *dfr* (*Delila*, *Eluta* e *Rosea*) (HOLTON & CORNISH, 1995).

A enzima DFR tem a capacidade de ligar-se, de acordo com a disponibilidade, a três substratos distintos: dihidrokaempferol (DHK), dihidroquercetina (DHQ) e dihidromiriocetina (DHM). Isso é possível devido às similaridades entre estas moléculas, que diferem apenas quanto ao número de hidroxilas ligadas ao anel aromático B, onde não se localiza o sítio enzimático (JOHNSON *et al.*, 2001). Além disso, cópias distintas de DFR, identificadas para outras famílias, podem ter expressão tecido-específica e maior especificidade a um destes três substratos (TANG *et al.*, 2008).

Em *Petunia* identificou-se uma região, bastante variável, mas crucial para a determinação da especificidade da enzima DFR ao substrato (JOHNSON *et al.*, 2001). Uma modificação em um único resíduo está associada à capacidade da DFR ligar-se ao um de seus substratos preferencialmente; no caso de *Petunia*, explica a ausência de flores vermelhas pela incapacidade da enzima ligar-se ao dihidrokaempferol. Uma região homóloga à identificada em *Petunia* foi localizada no alinhamento de Lentibulariaceae com outras Lamiales. Esta região variável, e potencialmente crítica para a especificidade do substrato, localiza-se entre os resíduos 158 e 183 de Lentibulariaceae (Figura 4).

O resíduo de asparagina (N, em azul na figura 4) observou-se ser crítico para a afinidade com DHQ e DHM (JOHNSON *et al.*, 2001). O resíduo de glutamato (Q, em vermelho na figura 4) foi previamente identificado apenas em enzimas capazes de ligar-se à DHK (JOHNSON *et al.*, 2001). Em *Utricularia intermedia* esta posição sofreu mutação para um resíduo de prolina (P), um aminoácido apolar. Portanto, possivelmente a DFR identificada para *U. gibba* é capaz de ligar-se a qualquer dos três substratos, mas a enzima obtida de *U. intermedia* perdeu a capacidade de ligar ao dihidrokaempferol. E em *Genlisea aurea*, a sequência obtida não possui esta região, seja por deleção ou problemas na anotação do gene, impedindo a avaliação entre os gêneros.

À exceção de *Pinguicula vulgaris*, as demais espécies de Lentibulariaceae empregadas aqui possuem flores amarelas. Ainda é preciso investigar se a pigmentação amarela é devido ao acúmulo de flavonoides ou carotenoides, contudo

é interessante notar a variação contida na sequência de aminoácidos de CHS e FLS, justamente as duas enzimas que poderiam produzir fenótipos amarelos. Paralelamente, a intensa pressão detectada para as sequências de DFR pode sugerir a importância do funcionamento desta enzima, que se não está associada ao acúmulo de antocianinas nas flores, pode estar relacionada à produção de taninos e catequinas.

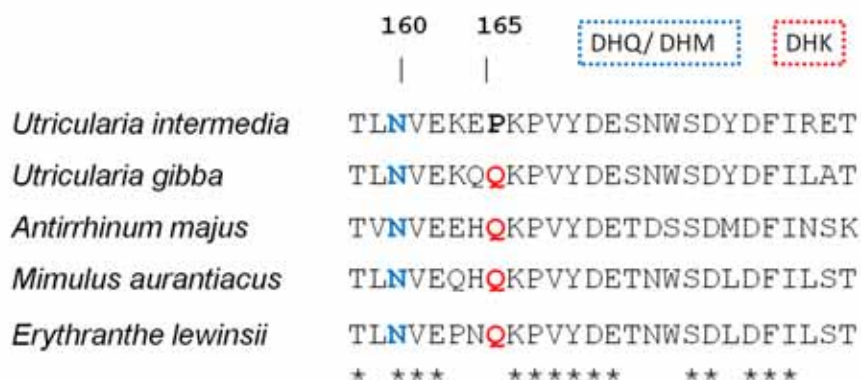


Figura 4. Alinhamento de sequências de aminoácidos da enzima DFR, obtida para espécies de Lentibulariaceae e outras Lamiales. Apresentado apenas as posições 158 a 183 do alinhamento, identificada previamente como região responsável pela determinação da especificidade da interação entre enzima DFR e seus substratos. Em azul, o resíduo de asparagina crucial para interação com DHQ e DHM que produzirão leucocianidina e leucodelphinidina. Em vermelho o resíduo de glutamato importante para a interação com o DHK para a produção de leucopelargonidinas. Os asteriscos indicam os resíduos conservados entre todas as espécies.

## Conclusões

*Pinguicula* e *Genlisea* tiveram menos transições evolutivas do caráter cor de flor, quando comparado à *Utricularia*. Neste gênero, o caráter cor de flor é altamente homoplástico. Tais transições devem estar relacionadas à adaptação das espécies às diferentes formas de vida e *habitats*, visto que o gênero é cosmopolita e qualquer alteração na síntese de flavonoides têm efeito sistêmico, não restrita à alteração da coloração floral. A baixa frequência de transições da condição despigmentada à pigmentada sugere que, no primeiro caso, houve uma alteração diretamente sobre a estrutura de algum dos genes “core”, presentes em poucas cópias, e por este motivo

irreversível. Dentre os genes “core”, chalcona sintase apresentou alta conservação dos sítios de ligação e domínios. Contudo, os resultados para o gene *dfr* chamou atenção por apresentar alta pressão negativa em Lentibulariaceae e alta divergência em relação às demais Lamiales.

Se considerarmos que, de modo geral, os ambientes ocupados pelas espécies de Lentibulariaceae — pobres em nutrientes, com alta umidade e radiação UV (ELLISON & GOTELLI, 2001) e a raridade de observação de plantas predadas em campo — é possível supor que um sistema de defesa seja tão importante quanto é a carnivorismo como adaptação a estes ambientes (ELLISON et al., 2003). Em *Arabidopsis*, por exemplo, foi observada a superexpressão de toda a via dos flavonoides em plantas sob privação de fósforo (Pi). Especialmente os genes codificadores das enzimas dihidroflavonol 4-redutase, antocianidina sintase e flavonona 3-hidroxilase, que estiveram 5-6 vezes mais expressos nesta condição (MISSION et al., 2005).

A deficiência desta enzima também está relacionada à esterilidade masculina, problemas na formação do tubo polínico e coloração do grão de pólen. *Utricularia* possui alta viabilidade polínica, com raros casos de problemas com o gametófito masculino registrados, portanto, tais observações são congruentes com efeitos da expressão do gene *dfr* em organismos-modelo (*Antirrhinum*, *Arabidopsis*, *Petunia* e outros). É notável ainda que *Utricularia gibba* possua sítios importantes para ligação com os três possíveis substratos da enzima dihidroflavonol 4-redutase e também seja uma das poucas espécies cosmopolitas do gênero.

## Referências

- ADLASSNIG, W.; PEROUTKA, M.; LAMBERS, H.; LICHTSCHEID, K. I. The roots of carnivorous plants. **Plant and Soil**, v. 274, p.127–140, 2005. Disponível em <10.007/s11104-004-2754-2>
- AKAIKE, H. Information theory and an extension of the maximum likelihood principle. In: Petrov BN, Csaki F. eds. **Second International Symposium on Information Theory**. Budapest: Akademiai Kiado, p. 267–281. 1973.
- ALBERT, V. A.; JOBSON, R. W.; MICHAEL, T. P.; TAYLOR, D. J. The carnivorous bladderwort (*Utricularia*, Lentibulariaceae): a system inflates. **Journal of Experimental Botany**, v. 61, n. 1, p. 5–9, 2010. Disponível em <10.1093/jxb/erp349>
- ANDERSEN, Ø.M., M. JORDHEIM. Chemistry of Flavonoid-Based Colors in Plants. In L. Mander, and H.-W. (Ben) Liu, **Comprehensive Natural Products II - Chemistry and Biology**, 547–614. Elsevier, Oxford, 2010.
- BURNHAM, K. P. & ANDERSON, D. R. **Model Selection and Multimodel Inference: A Practical Information-Theoretic Approach** (2nd ed.), Springer-Verlag., 2002.
- CIESLAK, T.; POLEPALLI, J. S.; WHITE, A.; MÜLLER, K.; BORSCH, T.; BARTHLOTT, W.; STEIGER, J.; MARCHANT, A.; LEGENDRE, L. Phylogenetic analysis of *Pinguicula* (Lentibulariaceae): chloroplast DNA sequences and morphology support several geographically distinct radiations. **American Journal of Botany**, v. 92, n. 10, p. 1723–1736, 2005.
- CHOPRA, S.; HOSHINO, A.; BODDU, J.; IIDA, S. Flavonoid pigments as tools in molecular genetics. In E. Grotewold, **The Science of Flavonoids**, p.147–173. Springer, Ohio. 2006.
- COBERLY, L.C. & M.D. RAUSHER. Pleiotropic effects of an allele producing white flowers in *Ipomoea purpurea*. **Evolution**, v. 62, p.1076–85, 2008.
- DARRIBA, D.; TABOADA, G.L.; DOALLO, R.; POSADA, D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature Methods**, v. 9, p. 772–772, 2012. Disponível em <10.1038/nmeth.2109>
- DAVIES, K. M.; SCHWINN, K. E.; DEROLE, S. C.; MANSON, D. G.; LEWIS, D. H., BLOOR, J. S.; BRADLEY, M. J. Enhancing anthocyanin production by altering competition for substrate between flavonol synthase and dihydroflavonol 4-reductase. **Euphytica**, v. 131, p. 259–268, 2003.

DEGTJAREVA, G.; CASPER, J.; HELLWIG, F.; SOKOLOFF, D. Seed morphology in the genus *Pinguicula* (Lentibulariaceae) and its relation to taxonomy and phylogeny. **Botanische Jahrbücher**, v. 125, p. 431–452, 2004.

ELLISON, A. M., GOTELLI, N. J. Evolutionary ecology of carnivorous plants. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 16, p.623–629, 2001.

ELLISON, A.M.; GOTELLI, N. J.; BREWER, J. S.; COCHRAM-STAFIRA, D. L.; KNEITEL, J. M.; MILLER, T. E.; WORLEY, A. C.; ZAMORA, R. The evolutionary ecology of carnivorous plants. **Advances in Ecological Research**, v. 33, p.1–74, 2003.

EMILIANI, J.; GROTEWOLD, E.; FERREYRA, M. L. F.; CASATIA, P. Flavonols protect *Arabidopsis* plants against UV-B deleterious effects. **Molecular Plant Advance**, v.6, n. 4, p. 1376-1379, 2013. Disponível em < 10.1093/mp/sst021>

FELLER, A; MACHEMER, K.; BRAUN, E. L.; GROTEWOLD, E. Evolutionary and comparative analysis of MYB and bHLH plant transcription factors. **The Plant Journal**, v. 66, p. 94–116, 2011. Disponível em < 10.1111/j.1365-313X.2010.04459.x>

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

FENSTER, C.B., W.S. ARMBRUSTER, P. WILSON, M.R. DUDASH, J.D. THOMSON. Pollination Syndromes e Floral Specialization. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, v. 35, p.375–403, 2004.

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, p. 768–783, 2010. Disponível em <10.1016/j.ympev.2010.03.009>

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

FLEISHMANN, A. The new *Utricularia* species described since Peter Taylor's monograph. **Carnivorous Plant Newsletter**, v. 41, p. 67–76, 2012.

GALLIOT, C., J. STUURMAN, C. KUHLEMEIER. The genetic dissection of floral pollination syndromes. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 9, p.78–82, 2006.

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

GORI, D. F. 1989. Floral Color Change in *Lupinus argenteus* (Fabaceae): why should plants advertise the location of unrewarding flowers to pollinators? **Evolution**, v. 43, n. 4, p. 870–881.

GREILHUBER, J., T. BORSCH, K. MÜLLER, A. WORBERG, S. POREMBSKI, W. BARTHLOTT. Smallest angiosperm genomes found in Lentibulariaceae, with chromosomes of bacterial size. **Plant Biology**, v.8, p.770–7, 2006.

HARBORNE, J.B. Flavonoids the Evolution of the Angiosperms. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 5, p.7-22, 1977.

HELARIUTTA, Y.; ELOMAA, P.; KOTILAINEN, M; SEPPÄNEN, P. TEERI, T. H. Cloning of CDNA coding for *dfr* expression in corollas of *Gerbera hybrid* var. Regina (Compositae). **Plant Molecular Biology**, v. 22, n. 2, p. 183–193, 1993.

HICHRI, I.; BARRIEU, F.; BOGS, J.L KAPPEL, C.; DELROT, S.; LAUVERGEAT, V. Recent advances in the transcriptional regulation of the flavonoid biosynthetic pathway. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 8, p. 2465–2483, 2011. Disponível em <doi:10.1093/jxb/erq442>

HOBALLAH, M.E. ET AL. Single gene-mediated shift in pollinator attraction in Petunia. **The Plant Cell**, v.19, p.779–90, 2007.

HOLTON, T. A. & CORNISH, E. C. Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. **The Plant Cell**, v. 7, p. 1071–1083, 1995.

HOPKINS, R., M.D. RAUSHER. Pollinator-mediated selection on flower color allele drives reinforcement. **Science**, v. 335, p.1090–2, 2012.

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

IBARRA-LACLETE, E.; LYONS, E.; HERNÁNDEZ-GUZMÁN, G.; PÉREZ-TORRES, C.A.; CARRETERO-PAULET, L.; CHANG, T.H.; LAN, T.; WELCH, A.J.; JUÁREZ, M.J.A.; SIMPSON, JUNE; FERNÁNDEZ-CORTÉS, A.; ARTEAGA-VÁSQUEZ; GÓNGORA-CASTILLO, E.; ACEVEDO-HERNÁNDEZ, G.; SCHUSTER, S. C.; HIMMELBAUER, H.; MINOCHE, A.E.; XU, S.; LYNCH, M.; OROPEZA-ABURTO, A; CERVANTES-PÉREZ, S.A.; ORTEGA-ESTRADA, M.DE J.; CERVANTES-LUEVANO, J. I.; MICHAEL, T.P.; MOCKLER, T.; BRYANT, D.; HERRERO-ESTRELLA, A.; ALBERT, V.A.; HERRERA-ESTRELLA, L. Architecture and evolution of a minute plant genome. **Nature Letter**, 2013. Disponível em <10.1038/nature12132>.

IBARRA-LACLETTE, E.; ALBERT, V. A.; PÉREZ-TORRES, C. A.; ZAMUDIO-HERNÁNDEZ, F.; ORTEGA-ESTRADA, M. J.; HERRERA-ESTRELLA, A.; HERRERA-ESTRELLA, L. Transcriptomics and molecular evolutionary rate analysis of the bladderwort (*Utricularia*), a carnivorous plant with a minimal genome. **BMC**

**Plant Biology**, v. 11, p. 101, 2011. Disponível em <<http://www.biomedcentral.com/1471-2229/11/101>>

IRWIN, E. R.; STRAUSS, S. Y.; STORZ, S.; EMERSON, A.; GUIBERT, G. The role of herbivores in the maintenance of a flower color polymorphism in wild radish. *Ecology*, v. 84, n.7, p. 1733–1743, 2003.

JOBSON, R. W. & ALBERT, V. A. Molecular Rates Parallel Diversification Contrasts between Carnivorous Plant Sister Lineages. **Cladistics** v.18, p.127–136, 2002. Disponível em <[10.1006/clad.2001.0187](http://dx.doi.org/10.1006/clad.2001.0187)>

JOBSON, R. W.; PLAYFORD, J.; CAMERON, K. M.; ALBERT, V. A. Molecular phylogenetics of Lentibulariaceae inferred from plastid *rps16* intron and *trnI-F* DNA sequences: implications for character evolution and biogeography. **Systematic Botany**, v. 28, n.1, p. 157–171, 2003.

JOBSON, R.; NIELSEN, R.; LAAKKONEN, L.; WIKSTRÖM, W.; ALBERT, V. A.; GRAY, H. B. Adaptive evolution of cytochrome c oxidase: infrastructure for a carnivorous plant radiation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 52, p. 18064–18068, 2004. Disponível em <<http://www.jstor.org/stable/3374194>>

JOHNSON, E. T.; RYU, S.; YI, S.; SHIN, B.; CHEONG, H.; CHOI, G. Alteration of a single amino acid changes the substrate specificity of dihydroflavonol 4-reductase. **The Plant Journal**, v. 25, n.3, p. 325–333, 2001.

KONDO, K., SEGAWA, M., NEHIRA, K. Anatomical studies on seeds and seedlings of some *Utricularia* (Lentibulariaceae). **Brittonia**, v. 30, p. 89–95, 1978.

LAAKKONEN, 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, p. 758–764, 2006. Disponível em <[10.1055/s-2006-924459](http://dx.doi.org/10.1055/s-2006-924459)>

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, p. 476, 2013. Disponível em <<http://www.biomedcentral.com/1471-2164/14/476>>

LIBRADO, P. & ROZAS, J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, v. 25, p. 1451–1452.

LOVISETTO, A., F. GUZZO, A. TADIELLO, K. TOFFALI, A. FAVRETTO, G. CASADORO. Molecular analyses of MADS-box genes trace back to Gymnosperms the invention of fleshy fruits. **Molecular Biology and Evolution**, v. 29, p.409–19, 2012.

MARKHAM, K. R. & OFMAN, D. J. *Lisianthus* flavonoid pigments and factors influencing their expression in flower colour. **Phytochemistry**, v. 34, n. 3, p. 679–685, 1993.

MARKHAM, K.R., K.S. GOULD, K.G. RYAN. Cytoplasmic accumulation of flavonoids in flower petals e its relevance to yellow flower colouration. **Phytochemistry**, v. 58, p.403–413, 2001.

MISSION, J.; Raghothama, K. G.;Jain, A.; Jouhet, J.; Block, M.; Bligny, R.; Ortet, P.; Creff, A.; Somerville, S.; Rolland, N.; Doumas, P.; Nacry, P.; Herrerra-Estrella, L.; Nussaume, L.; Thibaud, M. C. A genome-wide transcriptional analysis using Arabidopsis thaliana Affymetrix gene chips determined plant responses to phosphate deprivation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 33, p. 11934–11939, 2005. Disponível em <10.1073/pnas.0505266102>

NAKAYAMA, T; Yonekura-Sakakibara, K.; Sato, T.; Kikuchi, S.; Fukui, Y.; Fukuchi-Mizutani, M.; Ueda, T.; Nakao, M.; Tanaka, Y.; Kusumi, T.; Nishino, T. Aureusidin synthase: a polyphenol oxidase homolog responsible for flower coloration. **Science**, v. 290, p. 1163–1166. Disponível em <10.1126/science.290.5494.1163>

MUELLER, K.; BORSCH, T.; LEGENDRE, L.; POREMBSKI, S.; THEISEN, I.; BARTHLOTT, W. Evolution of carnivory in Lentibulariaceae and the Lamiales. **Plant Biology**, v. 6, p. 1–14, 2004. Disponível em <10.1055/s-2004-817909>

MUELLER, K. & BORSCH, T. Phylogenetics of *Utricularia* (Lentibulariaceae) and molecular evolution of the *trnK* intron in a lineage with high substitutional rates. **Plant Systematic and Evolution**, v. 250, p. 39–67, 2005. Disponível em <10.1007/s00606-004-0224-1>

NAPOLI, C. A.; FAHY, D.; WANG, H.; TAYLOR, L. P. *white anther*: A *Petunia* mutant that abolishes pollen flavonol accumulation, induces male sterility, and is complemented by a chalcone synthase transgene. **Plant Physiology**, v. 120, p. 615–622, 1999.

NESI, N.; JOND, C.; DEBEAUJON, I.; CABOCHE, M.; LEPINIEC, L. The Arabidopsis TT2 gene encodes an R2R3 MYB domain protein that acts as a key determinant for proanthocyanidin accumulation in developing seed. **Plant Cell**, v. 13, p. 2099–2114, 2001.

ONO, E., M. FUKUCHI-MIZUTANI, N. NAKAMURA, Y. FUKUI, K. YONEKURA-SAKAKIBARA. Yellow flowers generated by expression of the aurone biosynthetic pathway. **Proceedings of the National Academy of Science**, 103: p.3–8, 2006.

PEREIRA, C. G.; ALMENARA, D. P.; WINTERB, C. E.; FRITSCHC, P. W.; LAMBERSD, H.; OLIVEIRAA, R. S. Underground leaves of *Philcoxia* trap and

digest nematodes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 4, p. 1154–1158, 2012. Disponível em < [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1114199109](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1114199109)>

PLACHNO, B. & ŚWIĄTEK, P. Unusual embryo structure in viviparous *Utricularia nelumbifolia*, with remarks on embryo evolution in genus *Utricularia*. **Protoplasma**, v. 239, n1–4, p. 69–80, 2009.

QUATTROCCHIO, F.; Wing, J.; Woude, K. van der; Souer, E.; Vetten, de N.; Mol, J.; Koes, R. Molecular analysis of the anthocyanin2 gene of petunia e its role in the evolution of flower color. **The Plant Cell**, 11: p.1433–44, 1999.

RAUSHER, M.D. The evolution of flavonoids e their genes. *In* E. Grotewold, **The Science of Flavonoids**, p.175–211. Springer, Ohio. 2006.

RAUSHER, M.D. Evolutionary Transitions in Floral Color. **International Journal of Plant Sciences**, v.169, p.7–21, 2008.

REID, J. B. & ROSS, J. J. Mendel's genes: toward a full molecular characterization. **Genetics**, v. 189, p. 3–10, 2011. Disponível em < [10.1534/genetics.111.132118](http://10.1534/genetics.111.132118)>

REUT, M. S. E JOBSON, R. W. A phylogenetic study of subgenus *Polypompholyx*: a parallel radiation of *Utricularia* (Lentibulariaceae) throughout Australasia. **Australian Systematic Botany**, v. 23, n. 3, p. 152–161, 2010.

RODONDI, G.; BERETTA, M.; ANDREIS, C. Pollen morphology of alpine butterworts (*Pinguicula* L., Lentibulariaceae). **Review of Palaeobotany and Palynology**, v. 162, p. 1–10, 2010.

SCHAEFERHOFF, B.; FLEISCHMANN, A.; FISCHER, E.; ALBACH, D. C.; BORSCH, T.; HEUBL, G.; MUELLER, K. F. Towards resolving Lamiales relationships: insights from rapidly evolving chloroplast sequences. **BMC Evolutionary Biology**, v. 10, p. 352, 2010. Disponível em <[10.1186/1471-2148-10-352](http://10.1186/1471-2148-10-352)>

SMITH, S.D., M.D. RAUSHER. Gene loss e parallel evolution contribute to species difference in flower color. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, p.2799–810, 2011.

SPRIBILLE, R. & FORKMANN, G. Conversion of dihydroflavonols to flavonols with enzyme extracts from flower buds of *Matthiola incana*. **Z. Naturforsch**, v. 39c, p. 714–719, 1984.

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.

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

STREISFELD, M. A & M.D. RAUSHER. Genetic changes contributing to the parallel evolution of red floral pigmentation among *Ipomoea* species. **The New Phytologist**, v. 183, p.751–63, 2009.

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

TANG, L. K.; CHU, H.; YIP, W. K.; YEUNG, E. C.; LO, C. An anther-specific dihydroflavonol 4-reductase-like gene (DRL1) is essential for male fertility in *Arabidopsis*. **New Phytologist**, v. 181, p. 576–587, 2009. Disponível em <10.1111/j.1469-8137.2008.02692.x>

TAYLOR, P. 1989. **The Genus *Utricularia* – a taxonomic monograph**. 1<sup>a</sup> ed. Royal Botanical Gardens, Kew, London.

VELEBA, A.; BURES, P.; ADAMEC, L.; SMARDA, 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.

XIE, D.; JACKSON, L. A.; COOPER, J. D.; FERREIRA, D.; PAIVA, N. L. Molecular and biochemical analysis of two cDNA clones encoding dihydroflavonol-4-reductase from *Medicago truncatula*. **Plant Physiology**, v. 134, p. 979–994, 2004.

WALKER, A.R.; DAVISON, P. A.; BOLOGNESI-WINFIELD, A. C.; JAMES, C. M.; SRINIVASAN, N.; BLUNDELL, T. L.; ESCH, J. J.; MARKS, M. D.; GRAY, J. C. The TRANSPARENT TESTA GLABRA1 locus, which regulates trichome differentiation and anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis*, encodes a WD40 repeat protein. **Plant Cell**, v. 11, p. 1337–1350, 1999.

WICKE, S.; SCHÄFERHOFF, B.; DEPAMPHILIS, C. W.; MÜLLER, K. F. Disproportional plastome-wide increase of substitution rates and relaxed purifying selection in genes of carnivorous Lentibulariaceae. **Molecular Biology and Evolution**, v. 31, n. 3, p. 529–45, 2013. Disponível em <10.1093/molbev/mst261>

WINKEL-SHIRLEY, B; KUBASEK, W.; STORZ, G.; BRUGGEMANN, E.; KOORNNEEF, M.; AUSUBEL, F. M. ; GOODMAN, H. M. Analysis of *Arabidopsis* mutants deficient in flavonoid biosynthesis. **Plant Journal**, v. 8, p. 659–671, 1995.

[illegible]

**Chalcona sintase (continuação)***Olea europaea* (acesso NCBI: 587652137)

|         |        |         |        |        |         |
|---------|--------|---------|--------|--------|---------|
| 1       | 10     | 20      | 30     | 40     | 50      |
|         |        |         |        |        |         |
| MFTVEEV | RRARQ  | RAEGPAT | IMAIGT | ATPSNC | VYQSTYP |
| DDYYFR  | ITNSEH | KT      |        |        |         |
| ELKEK   | FKRMC  | DKSMIR  | KRYMHL | TEEIL  | KENRH   |
| ICEYK   | APSLD  | ARQD    | IVVV   |        |         |
| EVPKL   | GKEAA  | QKAKE   | WGQPK  | SKITH  | LIFCTT  |
| SGVDM   | PGADY  | QLTKLL  | GGL    |        |         |
| RPSVK   | RFFMY  | QQGCF   | AGGT   | VLRMA  | KDLAEN  |
| NKGAR   | VLVVC  | SEIT    | AVT    | FRG    |         |
| PDDTH   | LDL    | SLVGQ   | ALFGD  | GAAAV  | IVGSD   |
| PVIGV   | ERPLF  | QLVSA   | AQTIL  | PDS    |         |
| EGAI    | DGHL   | REVGL   | TFFHL  | KDVP   | GLISK   |
| NIKS    | ITEAF  | QPLGI   | SDWNS  | IFW    |         |
| IAHP    | GGP    | AILDQ   | VEEKL  | ALNPE  | KLRST   |
| RHVL    | SEYGN  | MSSAC   | VLFI   | LD     | EMR     |
| KSAT    | KEG    | MTT     | TGEG   | LDW    | GVLF    |
| GFGP    | GLT    | VET     | TVLH   | SE     | PLN     |

*Scutellaria lateriflora* (acesso NCBI: 569533245)

|       |       |       |       |       |       |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1     | 10    | 20    | 30    | 40    | 50    |
|       |       |       |       |       |       |
| QRAEG | PATV  | LAIGT | ANPP  | NCIDQ | STYAD |
| YFRIT | KSEH  | KTDL  | KKK   | FQ    | RMC   |
| EKSYI | KKRC  | MHLT  | EEFL  | KEND  | NFTAY |
| EAPSL | DARQ  | DIVV  | VEI   | PKL   | GKEA  |
| AAQKA | KEW   | GQPK  | SKITH | LIFCT | TSGVD |
| MPGAD | YQLTK | LLGL  | RPSV  | KRF   | MMY   |
| QQGCF | AGGT  | VLRMA | KDLA  | ENNA  | GARV  |
| LVVC  | SEIT  | AVT   | FRG   | PSE   | THL   |
| DSL   |       |       |       |       |       |
| GQALF | GDG   | AGAVI | VGSD  | PVIG  | VERP  |
| LPLF  | QLVSA | HQTIL | PDSE  | GAID  | GHL   |
| RE    |       |       |       |       |       |
| GLT   | FHL   | KDVP  | GLISK | NIKS  | LKEA  |
| FAPL  | GVTD  | WNSL  | FWI   | VHP   | GGP   |
| PAILD | QVEE  | KLAL  | NPEK  | LRST  | RHVL  |
| GEYGN | MSSAC | VLFI  | LD    | EMR   | KAS   |
| AKEG  | CST   |       |       |       |       |
| TGEG  | KEW   | GVLF  | GFGP  | GLT   | MTVT  |

**Dihidroflavonol 4-redutase (DFR)***Scutellaria viscidula* (acesso NCBI: 257195163)

|       |      |      |      |      |       |
|-------|------|------|------|------|-------|
| 1     | 10   | 20   | 30   | 40   | 50    |
|       |      |      |      |      |       |
| MPLVT | TMA  | PPP  | PATV | CVTG | ASGFI |
| GSWLV | MRLL | QHGY | IVR  | ATV  |       |
| RD    | PNM  | EK   | VKHL | TELP | QADTK |
| LTLW  | KAD  | MSIQ | GSYD | KAV  | QGCE  |
| GVF   | HMA  | TPM  | DFES | NDP  | ENEVI |
| KPTV  | EGLN | NIIR | SCAK | AKTV | KKLI  |
| F     | T    | SAG  | T    | NVEE | HQK   |
| PVYD  | ETS  | WSD  | LDFI | YSK  | MTG   |
| WIFY  | LSKI |      |      |      |       |
| LA    | EKA  | A    | EAT  | KENN | INLIT |
| VI    | P    | PLV  | VGP  | FIM  | PTL   |
| P     | PSL  | ITAL | SP   |      |       |
| IT    | GNE  | AH   | YLLS | G    | FSD   |
| SHS   | Q    | GTR  | TGA  | EK   | D     |
| SYN   | LH   | L    | DR   | LL   | R     |

*Mimulus aurantiacus* (acesso NCBI: 167858129)

|       |      |      |      |      |       |
|-------|------|------|------|------|-------|
| 1     | 10   | 20   | 30   | 40   | 50    |
|       |      |      |      |      |       |
| MCVDQ | TTVA | APP  | PATV | CVTG | ATGFI |
| GSWIV | MRLL | ERGY | VV   | HAT  | VRD   |
| PEN   | M    |      |      |      |       |
| EKV   | DLI  | ELP  | RAD  | TNL  | KLW   |
| KAD   | MN   | VEGS | YDE  | AVK  | GCE   |
| GVF   | HMA  | TPM  | DFES | NDP  | ENEVI |
| KPTV  | EGLN | NIIR | SCAK | AKTV | KKLI  |
| F     | T    | SAG  | T    | NVEE | HQK   |
| PVYD  | ETS  | WSD  | LDFI | YSK  | MTG   |
| WIFY  | LSKI |      |      |      |       |
| LA    | EKA  | A    | EAT  | KENN | INLIT |
| VI    | P    | PLV  | VGP  | FIM  | PTL   |
| P     | PSL  | ITAL | SP   |      |       |
| IT    | GNE  | AH   | YLLS | G    | FSD   |
| SHS   | Q    | GTR  | TGA  | EK   | D     |
| SYN   | LH   | L    | DR   | LL   | R     |
| ED    | PTA  | EGRY | ICSS | HDE  | TIY   |
| GIAN  | MIRE | KW   | PEY  | QIP  | TEF   |
| E     | GID  | KD   | IP   | VVR  | F     |
| SSK   | LIG  | M    | GFSY | KYT  | LED   |
| M     | FTG  | A    | IET  | CRA  | KGL   |
| P     | YST  | K    | IHT  | N    | GE    |
| L     | TRGR |      |      |      |       |
| PLN   | P    | LEK  | H    | TDI  | QEK   |
| LHP   | ASE  | EKHA | EKG  | QSG  | LLS   |
| SDSY  | ATQ  | IHT  | N    | GEE  | KEV   |
| LLS   | L    | E    | KDP  | D    | QEK   |
| DL    | L    | T    | SNE  | KRI  | E     |
| V     | KET  | D    | L    | I    | P     |
| T     | S    | K    | G    | H    | A     |
| E     | E    | R    | H    | H    | L     |
| V     | P    |      |      |      |       |
| T     | SEE  | K    | H    | A    | G     |
| E     | Q    | E    | N    | D    | P     |
| L     | S    | D    | S    | A    | K     |

*Erythranthe lewinsii* (acesso NCBI: 586829727)

|       |      |      |      |      |       |
|-------|------|------|------|------|-------|
| 1     | 10   | 20   | 30   | 40   | 50    |
|       |      |      |      |      |       |
| MCAET | SVAT | PP   | PATV | CVTG | AAGFI |
| GSWIV | MRLL | ERGY | IVR  | ATV  | RD    |
| PEN   | MSK  | VKHL | VGLP | KAD  | TNL   |
| TLW   | KAD  | MN   | IEGS | YDE  | AVQ   |
| GCE   | CVF  | H    |      |      |       |
| MAT   | P    | M    | D    | FES  | E     |
| D     | P    | ENE  | V    | I    | K     |
| P     | T    | I    | E    | G    | M     |
| S     | I    | I    | R    | S    | C     |
| A     | K    | A    | K    | T    | V     |
| K     | L    | I    | F    | T    | N     |
| S     | A    | G    | T    | N    | V     |
| E     | P    | N    | Q    | K    | P     |
| VYD   | E    | T    | N    | W    | S     |
| D     | L    | F    | I    | L    | S     |
| T     | K    | M    | T    | G    | W     |
| M     | F    | V    | S    | K    | I     |
| L     | A    | E    | K    | E    |       |
| H     | Y    | S    | I    | I    | K     |
| Q     | G    | F    | V    | H    | V     |
| D     | L    | C    | E    | A    | H     |
| I     | F    | L    | F    | E    | D     |
| P     | T    | A    | Q    | G    | R     |
| Y     | I    | C    | S    | S    | H     |
| D     | A    | T    | I    | Y    | D     |
| I     | A    | N    | M    | I    | R     |
| D     | K    | W    | P    | E    | S     |
| I     | P    | T    | E    | F    | E     |
| G     | I    | D    | K    | D    | I     |
| P     | V    | V    | S    | F    | S     |
| S     | K    | K    | L    | T    | E     |
| M     | G    | F    | S    | F    | K     |
| Y     | T    | L    |      |      |       |
| E     | D    | M    | F    | R    | E     |
| A     | I    | E    | T    | C    | R     |
| E     | K    | L    | P    | Y    | S     |
| T     | Q    | I    | H    | I    | N     |
| G     | E    | E    | K    | S    | R     |
| L     | N    | P    | V    | E    | K     |
| H     | T    | E    | T    | Q    | E     |
| K     | E    | L    | L    | P    | A     |
| S     | E    | K    | H    | A    | Q     |
| G     | Q    | E    | N    | G    | L     |
| L     | S    | E    | P    | Y    | S     |
| S     | Q    | I    | H    | T    | N     |
| G     | E    | E    | K    | E    | N     |
| L     | F    | E    | S    | L    | E     |
| K     | H    |      |      |      |       |
| L     | D    | D    | Q    | E    | K     |
| D     | L    | L    | P    | T    | S     |
| K     | E    | K    | Y    | A    | E     |
| G     | Q    | E    | T    | D    | L     |
| L     | P    | T    | S    | E    | K     |
| E     | H    | A    | E    | G    | Q     |
| E     | K    | D    | L    | V    | P     |
| T     | S    | K    |      |      |       |
| K     | E    | H    | A    | L    | G     |
| Q     | E    | N    | G    | L    | L     |
| L     | L    |      |      |      |       |

## Flavonol sintase (FLS)

*Scutellaria baicalensis* (acesso NCBI: 557640003)

```

1      10      20      30      40      50
|      |      |      |      |      |
MEVGRVQDIASASEHAGSIPSEFIRSEKEQPTKSTVHGVLVLPVIDVGG
CSDEEEMARLMSEASREWGIFQVNVHGIQDQVIAKLQLVGKEFFFEELPNE
EKELVAKTPHSGIQGYGTTLQKEIHGKKGWVDHLFHNWPPSAINYKFWP
NNPPSYREINEEYTKRLREVSDKLMKWLSTLGLGLEEHELEEAMGGEETIY
LMKINYPPCPRPDLALGVVPHDTMAGLTILVPNEVQGLQVERDGHWDV
KYIPNALIIHIGDQIEILSNGQYKAVFHRTTVNKESTRMSWPVFLEPPPE
LKVGPIPKLLNEETPPHYKTKKYKDYVYCKLNKLPQ

```

*Arabidopsis thaliana* (acesso NCBI: ATU84260)

```

1      10      20      30      40      50
|      |      |      |      |      |
MEVERVQDISSSSLLTEAIPLEFIRSEKEQPAITTFRGPTPAIPVVDLSD
PDEESVRRRAVVKASEEWGLFQVNVHGIPTTELIRRLQDVGRKFFELPSSEK
ESVAKPEDSKDIEGYGTKLQKDPEGKKAQVDHLFHRWPPSCVNYRFPWK
NPPEYREVNEEYAVHVKKLSETLLGILSDGLGLKRDALKEGLGGEMAEYM
MKINYPPCPRPDLALGVPAHTDLSGITLLVPNEVPGLQVFKDDHWFDAE
YIPSAVIVHIGDQILRLSNGRYKNVLHRTTVDEKSTRMSWPVFLEPPREK
IVGPLPELTGDDNPPKFKPFAFKDYSYRKLNLPLD

```

*Antirrhinum majus* (acesso NCBI: DQ272591.1)

```

1      10      20      30      40      50
|      |      |      |      |      |
MEGERVQAIASLSKYADTIPSEFIRSENEQPAATTLRGVVLVLPVIDLSD
DFNEKILVKNISEASRDWGIFQVNVHGISNEVISKLQKVGKEFFELPKEE
KEFVAKTPESGIEGYGTILQKEVEGKKGWVDHLFHKIWPPSAINYKFWPK
NNPPSYREANEYTKKIRDVSDKLTNWLSTLGLGIKHELKAAMGGDDTIFL
MKINYPPCPRPDLALGVVAHTDMSFLTILVPNEVQGLQVFRDEHWYDVK
YIPNALIVHIGDQIEILSNGKYKAVFHRTTVNKKNTRMSWPVFLEPHPEF
EVGPLPELVSEESPSKYKTKKYKDYVYCKLNKIPQ

```

*Arabidopsis thaliana* (acesso NCBI: ATU84259)

```

1      10      20      30      40      50
|      |      |      |      |      |
MEVERVQDISSSSLLTEAIPLEFIRSEKEQPAITTFRGPTPAIPVVDLSD
PDEESVRRRAVVKASEEWGLFQVNVHGIPTTELIRRLQDVGRKFFELPSSEK
ESVAKPEDSKDIEGYGTKLQKDPEGKKAQVDHLFHRWPPSCVNYRFPWK
NPPEYREVNEEYAVHVKKLSETLLGILSDGLGLKRDALKEGLGGEMAEYM
MKINYPPCPRPDLALGVPAHTDLSGITLLVPNEVPGLQVFKDDHWFDAE
YIPSAVIVHIGDQILRLSNGRYKNVLHRTTVDEKSTRMSWPVFLEPPREK
IVGPLPELTGDDNPPKFKPFAFKDYSYRKLNLPLD

```

## CAPÍTULO 6 – Considerações finais

*Utricularia amethystina* Salzm. ex A.St.-Hil. & Girard foi utilizada como modelo para investigar os efeitos do polimorfismo, observados por seus diferentes “morfotipos”, sobre a reprodução e fluxo gênico, além de inferir sobre a adequação da sua atual circunscrição. Contudo, para que fosse possível avaliar a extensão de seu polimorfismo, os resultados foram, sempre que possível, comparados à espécies de Lentibulariaceae “bem resolvidas” do ponto de vista taxonômico. Por este motivo, algumas de nossas conclusões são aplicáveis também ao gênero ou à família.

Características morfométricas como largura e comprimento das sementes foram pouco úteis para identificação de espécies da seção *Foliosa* (*sensu* MÜLLER; BORSCH, 2005). Contudo, características qualitativas como o formato da semente, a ornamentação nas paredes periclinais e o formato das células da testa foram úteis para identificação de espécies, porém não suficientes para distinguir entre *U. huntii*, *U. praelonga* e *U. tridentata* (capítulo 2). Assim como, as sementes de diferentes localidades de *Utricularia amethystina* evidenciaram alto polimorfismo também quanto aos caracteres qualitativos. Porém, a observação de superfícies reticuladas e outros padrões de ornamentação nos levou a sugerir que a dispersão das sementes pela água seria facilitada pelo acúmulo de bolhas de ar sobre tais reticulações — uma importante adaptação ao ambiente colonizado por espécies de *Utricularia*.

Outra importante adaptação à reprodução foi proposta no capítulo 3: a autopolinização mediada pelo polinizador. Este mecanismo foi proposto anteriormente, e aqui o consideramos responsável pela redução da razão pólen/óvulo em flor casmógama e incapaz de autogamia espontânea. Dessa forma, a autopolinização mediada pelo polinizador minimizaria os efeitos negativos da escassez de visitas do polinizador — identificado para *Utricularia amethystina* e observado por outros autores — e do comportamento generalista do polinizador. Além disso, revisamos as características morfológicas das flores de *Utricularia*; também descrevemos a presença de células cônicas sobre a epiderme da corola, assim como a presença de pedestal nos ovários.

À partir da observação da baixa frequência de visitação dos polinizadores, curto período de vida da flor, assim como o rápido decréscimo da viabilidade polínica hipotetizamos que as populações de *Utricularia amethystina* seriam geneticamente estruturadas. Esta hipótese se confirmou, contudo a riqueza de haplótipos encontrada superou as expectativas. Também observamos fluxo gênico entre os morfotipos de flores púrpuras e brancas entre, exclusivamente, duas populações. À exceção dos haplótipos obtidos para *rbcL*, não observamos compartilhamento de haplótipos entre morfotipos distintos para as demais populações. Também encontramos evidências de seleção positiva para o gene *matK*, e desvios da razão dN/dS para os demais genes, quando comparada a média entre outras Lentibulariaceae. De modo geral, as populações se agruparam em clados altamente suportados nas filogenias construídas com base em máxima parcimônia, máxima verossimilhança e probabilidade bayesiana. Portanto, concluímos que *Utricularia amethystina* é táxon parafilético. O polimorfismo observado nas sementes e em outras características morfológicas devem ser, portanto, o resultado deste agrupamento artificial sob o táxon *Utricularia amethystina* Salzm. ex A.St.-Hil. & Girard. Além disso, o caráter cor de flor é homoplástico entre as linhagens do complexo "*Utricularia amethystina*" e, por este motivo, não pode ser utilizado para distingui-las.

Filogeneticamente as transições de cor das flores seguiram o mesmo padrão tanto entre os gêneros quanto entre as linhagens de *Utricularia amethystina*: a cor púrpura é o estado ancestral e também o mais frequente. As transições ocorreram com maior frequência de um estado pigmentado (púrpura ou amarelo) para o despigmentado (branco), contudo as reversões foram raras. Este padrão sugere que a transição para a condição despigmentada deve envolver uma mutação deletéria em algum dos genes da via dos flavonoides que precedem a produção de antocianinas. Dentre estes genes, aquele responsável pela enzima dihidroflavonol 4-redutase foi o único com indícios de forte seleção negativa. Esta enzima pode produzir fenótipos florais brancos, mas também está relacionada à fertilidade masculina e produção de substâncias importantes para defesa contra radiação UV e herbívoros. Portanto, esta enzima pode desempenhar importante papel para a adaptação das espécies de Lentibulariaceae aos ambientes que ocupa.