

BIOLOGIA DA POLINIZAÇÃO DE *Utricularia neottioides* A.St.-  
Hil. & Girard (LENTIBULARIACEAE)

**HUGO DOLSAN**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica), Área de concentração: Morfologia e Diversidade Vegetal

**BOTUCATU – SP**

**2021**



**unesp**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"Júlio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

BIOLOGIA DA POLINIZAÇÃO DE *Utricularia neottioides* A.St.-  
Hil. & Girard (LENTIBULARIACEAE)

**HUGO DOLSAN**

**ORIENTADOR:**

DR. VITOR FERNANDES OLIVEIRA DE MIRANDA

**CO-ORIENTADORAS:**

DR<sup>a</sup>. ELZA MARIA GUIMARÃES SANTOS

DR<sup>a</sup>. SAURA RODRIGUES DA SILVA

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica), Área de concentração: Morfologia e Diversidade Vegetal

**BOTUCATU – SP**

**2021**

D665b Dolsan, Hugo  
Biologia da Polinização *Utricularia neottioides* A.St.-Hil. & Girard  
(Lentibulariaceae) / Hugo Dolsan. -- Botucatu, 2021  
74 p. : il., tabs., fotos, mapas

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),  
Instituto de Biociências, Botucatu  
Orientador: Vitor Fernandes Oliveira de Miranda  
Coorientadora: Elza Maria Guimarães Santos

1. Biologia da Polinização. 2. Lentibulariaceae. 3. Miofilia. 4.  
Ceratopogonidae. 5. Diptera. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de  
Biociências, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

## **FOLHA DE APROVAÇÃO**

**HUGO DOLSAN**

Biologia da Polinização de *Utricularia neottioides* A.St.-Hil. & Girard  
(Lentibulariaceae)

### **Orientador**

Dr. Vitor Fernandes Oliveira de Miranda

### **Coorientadoras**

Dra. Elza Maria Guimarães Santos

Dra. Saura Rodrigues da Silva

Dissertação apresentada ao Instituto de  
Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP,  
para obtenção do título de Mestre no  
Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Biológicas (Botânica), Área de concentração:  
Morfologia e Diversidade Vegetal

### **Banca examinadora**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Helena Maura Torezan Silingardi

---

Prof<sup>a</sup> Dr. Vitor Fernandes Oliveira de Miranda

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>.Isabel Alves dos Santos

**BOTUCATU – SP**

**2021**

## Agradecimentos

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

Agradecemos também a Fapesp (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) e o CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo apoio às pesquisas de nosso grupo.

Agradeço à minha família, que me apoiou durante este trabalho, em especial meu pai, Wallace Ribeiro, e minha mãe, Magaly Dolsan.

Agradeço à meus orientadores, co-orientadoras e todos os colaboradores que tornaram possível a execução deste trabalho.

Agradeço também às voluntárias que nos auxiliaram durante o trabalho de campo, em especial à Suellen Nunes, e à Fernanda Rodrigues, que me ajudou desde o planejamento até a execução das atividades e escrita do trabalho.

## Resumo

*Utricularia* L. (Lentibulariaceae) é um grande gênero cosmopolita de plantas carnívoras. A família está presente em diferentes habitats e apresenta uma morfologia floral diversificada. Parte dessa diversidade possivelmente se deve às altas taxas de substituição de nucleotídeos, que, associadas às pressões seletivas, provavelmente desempenham um papel importante na diversificação do gênero *Utricularia*. Estudar a biologia da polinização desse gênero é importante para uma melhor compreensão da ecologia planta-polinizador em habitats extremos, como nas rochas de corredeiras. Poucos estudos de polinização se concentraram em espécies reófitas, e nenhum deles envolveu Lentibulariaceae. O objetivo deste estudo é investigar o sistema reprodutivo de *U. neottioides* e descrever sua ecologia da polinização, com foco nas dimensões das flores (ajustes), características florais visuais e químicas (anúncios) e recursos florais (atrativos primários), a fim de caracterizar os mecanismos envolvidos na interação com diferentes visitantes florais e suas consequências para a reprodução sexual da espécie. O estudo foi realizado em cinco grupos de *U. neottioides* crescendo em dois córregos rasos diferentes. Descrevemos os eventos florais durante a antese e as funções masculinas e femininas ao longo da vida das flores. Os visitantes florais foram observados durante o dia e a noite, e seu comportamento e frequência de visitas foram registrados. Além disso, a refletância das corolas foi medida e o aroma floral (durante o dia e a noite) caracterizado, a fim de entender melhor a relação entre essa espécie de planta e seus visitantes florais. O estigma em *U. neottioides* é sensível e receptivo desde o estágio de botão pré-antese até a senescência da flor. Pela primeira vez no gênero, dípteros não-sirfídeos foram registrados como polinizadores legítimos, capazes de transportar pólen entre diferentes flores. Além disso, pela primeira vez, a polinização noturna foi relatada para a família, especificamente por dípteros noturnos. As características florais de *U. neottioides* não representam claramente uma síndrome de polinização para moscas, mesmo assim, as três espécies de dípteros mais representativas foram da família Ceratopogonidae, Tipuloidea e uma mosca não identificada. Os dados de refletância e os dados de aroma floral foram coletados e ainda serão analisados. Os resultados dos tratamentos do sistema reprodutivo não foram coletados, e os experimentos serão repetidos (os experimentos foram interrompidos devido à pandemia). As flores eram protóginas, abriam de dia ou de noite e duravam cinco dias. Com base nos dados de refletância, os dípteros provavelmente veem a flor como verde, mas provavelmente não diferenciam as pétalas do pólen branco. O aroma floral tornava-se mais doce à noite e era principalmente polinizado por uma espécie de Ceratopogonidae (a ser identificada), uma espécie de mosca (a ser identificada) e possivelmente uma Tipuloidea. A taxa de visitação foi maior entre 11:00 e 12:00 h e entre 13:00 e 14:00 h. Pela primeira vez, esse padrão de polinização foi relatado para o gênero *Utricularia*.

## Abstract

*Utricularia* L. (Lentibulariaceae) is a large cosmopolitan genus of carnivorous plants. The family is present in different habitats and has diverse flower morphology. Part of this diversity is possibly due to high nucleotide substitution rates, which, associated with the selective pressures, probably have an important role in *Utricularia* diversification. Studying the pollination biology of the genus is important to better understand the plant-pollinator ecology in extreme habitats, such as stream rocks. Few pollination studies focused on rheophytic species, and none of those regarding Lentibulariaceae. The aim of this study is to investigate the reproductive system of *U. neottioides* and to describe the pollination ecology, with focus on flower dimensions (adjustments), floral, visual, and chemical traits (advertisements), and floral resource (primary attractant) in order to characterize the pathways involved in the interaction with different floral visitors and their consequences for the species sexual reproduction. The study was conducted within five patches of *U. neottioides* growing in two different shallow streams (Supl. Mat. 1). We described the floral events during anthesis, and male and female functions along flower lifespan. Floral visitors were observed during the day and night time, and their behaviour and frequency of visits were recorded. Additionally, corolla reflectance was measured, and floral scent (at day and night) characterized, in order to better understand the relation between this plant species and its floral visitors. The stigma in *U. neottioides* is sensitive and receptive since pre-anthesis bud stage until flower senescence. For the first time in the genus, non-syrphid Diptera were recorded as legitimate pollinators for the genus, able to transport pollen between different flowers. Also, for the first time, nocturnal pollination was reported for the family, specifically by nocturnal Diptera. Floral characteristics of *U. neottioides* do not clearly represent pollination syndrome for flies, even so, the three most representative visitors were Diptera species: Ceratopogonidae, Tipuloidea and one unidentified fly. Reflectance data and the floral scent data were sampled and are still going to be analysed. The results of the reproductive system treatments were not collected, and the treatments will be made again (the experiments were aborted due to the pandemic). Flowers were protogynous, opened at day or night and lasted for five days. Based on the reflection data, Diptera possibly see the flower as green, but probably do not differentiate the petals from the white pollen. The flower scent became sweeter at night, and it was mainly pollinated by one species of Ceratopogonidae (to be identified), one species of fly (to be identified), and possibly a Tipuloidea. The visit rate was higher between 11:00 and 12:00 h, and between 13:00 and 14:00 h. For the first time this pattern of pollination was reported for the *Utricularia*.

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	1
Plantas carnívoras.....	1
A família Lentibulariaceae.....	3
O gênero <i>Pinguicula</i> . ....	4
O gênero <i>Genlisea</i> . ....	9
O gênero <i>Utricularia</i> .....	13
<i>Utricularia neottioides</i> .....	21
Justificativa.....	23
Referências Bibliográficas.....	24
CAPÍTULO I: Pollination ecology of a rheophyte carnivorous species: <i>Utricularia neottioides</i> A.St.-Hil. & Girard (Lentibulariaceae).....	34
Abstract.....	35
Introduction.....	36
Material and methods.....	38
Results.....	42
Discussion.....	47
Conclusion.....	51
References.....	54
Figure captions.....	66

# 1 Introdução geral

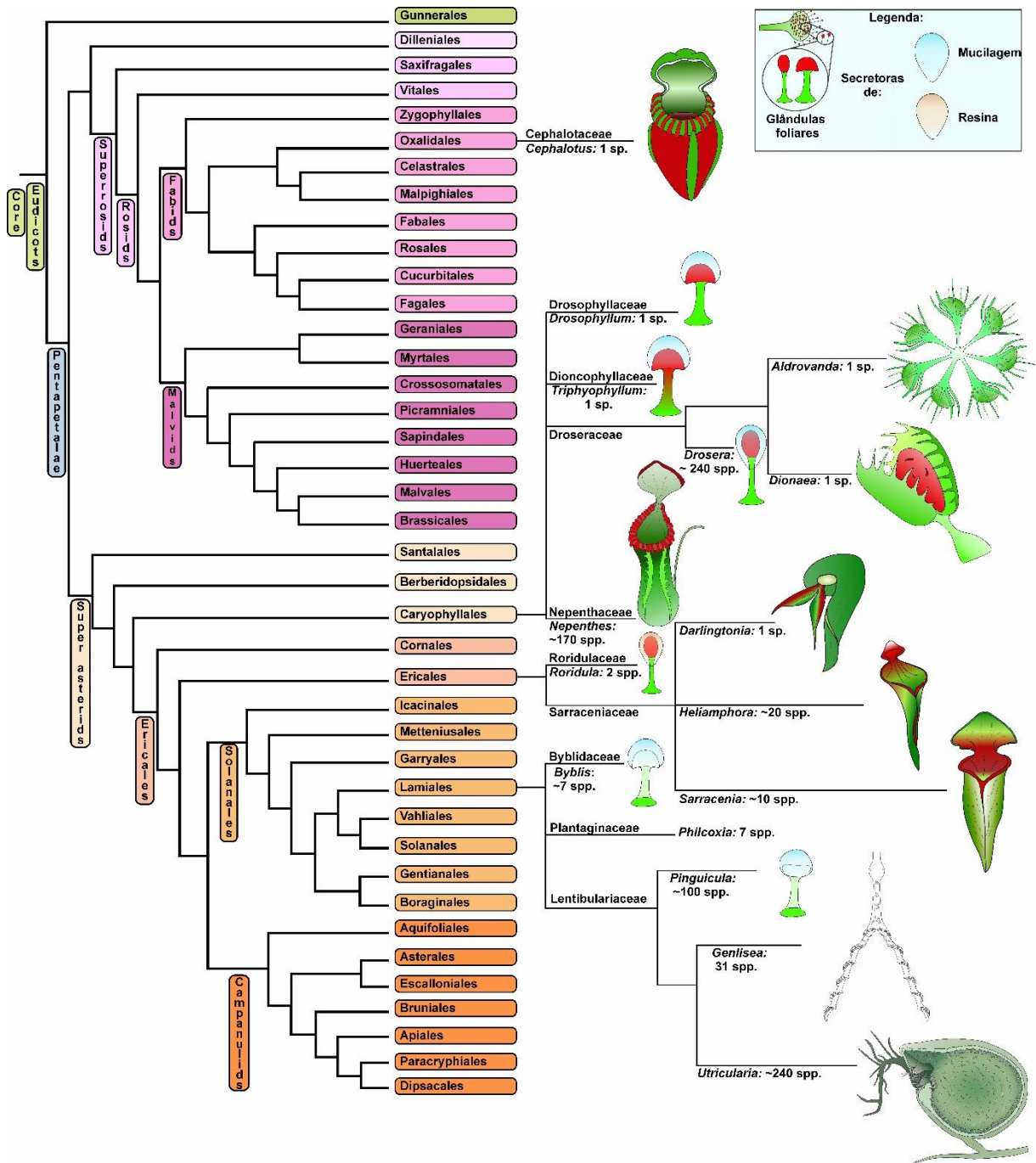
## 2 1. Plantas carnívoras

3 A carnivoría em plantas é a síndrome caracterizada pela capacidade de atrair, capturar,  
4 digerir e absorver os nutrientes de presas (sejam estas crustáceos, algas, protozoários,  
5 artrópodes ou outros organismos), e surgiu independentemente nas angiospermas diversas  
6 vezes em cerca de 800 espécies, distribuídas em 18 gêneros, 11 famílias e 5 ordens distintas:  
7 Poales (protocarnívoras), Caryophyllales, Oxalidales, Ericales e Lamiales (Fig.1; DARWIN,  
8 1875; JUNIPER et al., 1989; GIVINISH, 2015; ELLISON & ADAMEC, 2018). As plantas  
9 carnívoras podem possuir armadilhas passivas em forma de ascídios, como em *Cephalotus*,  
10 *Nepenthes*, *Darlingtonia*, *Heliamphora* e *Sarracenia*; armadilhas adesivas, como em *Drosera*,  
11 *Drosophyllum*, *Pinguicula*, *Roridula*, *Philcoxia*, *Byblis* e *Triphyophyllum*; armadilhas em  
12 forma de “saca-rolhas” como em *Genlisea*; e armadilhas ativas, em forma de utrículos ou  
13 vesículas, como em *Utricularia*, ou com dois lobos, as “snap-traps”, como *Aldrovanda* e  
14 *Dionaea* (JUNIPER et al., 1989; GIVINISH, 2015; ELLISON & ADAMEC, 2018).

15 Dentre todas as famílias de plantas carnívoras, Lentibulariaceae é a que conquistou  
16 mais ambientes (terrestre, aquático, litofítico, reofítico e epifítico), e uma das mais diversas  
17 morfologicamente (TAYLOR, 1989). A família possui elevado polimorfismo estrutural entre  
18 os gêneros e espécies, sendo o gênero *Utricularia* o mais morfologicamente diverso de todos.  
19 A morfologia floral do gênero varia consideravelmente em forma, cor, odor e tamanho;  
20 diversidade que, quando aliada aos diferentes ambientes onde as espécies ocorrem, nos instiga  
21 a estudar e compreender melhor a dinâmica reprodutiva das plantas nestes diversos ambientes.

22 Mesmo diante da alta plasticidade fenotípica, quando comparados os órgãos  
23 vegetativos dentro de cada gênero de Lentibulariaceae, as diferenças na morfologia floral  
24 entre as espécies não são tão intensas, variando seu padrão floral de maneira mais sutil.

1 Pensando nisso, decidimos fazer uma breve introdução sobre a família. Nela descrevemos  
 2 seus gêneros e apresentamos uma revisão sobre a biologia reprodutiva e polinização de cada  
 3 um deles (com enfoque em *Utricularia*). Durante a descrição, apresentamos as características  
 4 de *Utricularia neottiioides*, que é a espécie foco do presente trabalho, comparando estas  
 5 características com as mais comuns ao gênero.



6  
 7 **Fig. 1.** Árvore filogenética das eudicotiledôneas (sensu APG IV) destacando as plantas  
 8 carnívoras de suas respectivas ordens. Adaptado de APG IV (2016) e Hatcher et al. (2020).

## 1 2. A família Lentibulariaceae

2 Lentibulariaceae Rich. é uma família de plantas carnívoras da ordem Lamiales  
3 (SCHÄFERHOFF et al., 2010) pertencente ao clado das asterídeas (APG IV, 2016). A família  
4 possui cerca de 370 espécies distribuídas em três gêneros: *Genlisea* A.St-Hil., *Pinguicula* L. e  
5 *Utricularia* L., sendo *Pinguicula* um grupo irmão do clado *Genlisea-Utricularia* (MÜLLER  
6 et al., 2000; 2004; JOBSON & ALBERT, 2002). No Brasil, foram descritas até o momento 86  
7 espécies de Lentibulariaceae (30 endêmicas), sendo que 67 destas espécies pertencem ao  
8 gênero *Utricularia* (22 endêmicas) (MIRANDA et al., 2005; BFG, 2015; FLORA DO  
9 BRASIL, 2020 em construção).

10 Quanto à morfologia floral, as espécies dos gêneros *Pinguicula*, *Genlisea* e  
11 *Utricularia* possuem algumas características florais similares: os três gêneros possuem flores  
12 zigomorfas com cinco pétalas e um cálcio, sendo que, em *Genlisea* e *Utricularia*, duas pétalas  
13 são fusionadas em um lábio superior, e três em um lábio inferior, apresentando quase sempre  
14 uma protuberância, além de formar o cálcio; *Genlisea* e *Pinguicula* possuem cinco sépalas,  
15 enquanto *Utricularia* possui duas (TAYLOR, 1989; FLEISCHMANN et al., 2010; ELLISON  
16 & ADAMEC, 2018; MOLANO-FLORES et al., 2018). Os órgãos reprodutivos se apresentam  
17 da mesma maneira nos três gêneros, usualmente com hercogamia de aproximação: as anteras  
18 logo abaixo do lábio inferior do estigma, de modo que o estigma é apresentado ao polinizador  
19 antes das anteras (LLOYD, 1942; TAYLOR, 1989; LEGENDRE, 2000; CLIVATI et al.,  
20 2014; MOLANO-FLORES et al., 2018).

21 No que se diz respeito ao pólen de Lentibulariaceae, existem diversos estudos sobre os  
22 padrões morfológicos dentro dos três gêneros da família (e.g. THANIKAIMONI, 1966;  
23 HUYNH, 1968; SOHMA, 1975; TAYLOR, 1989; LOBREAU-CALLEN, 1999; RODONDI  
24 et al., 2010; CRUZ et al., 2018). O pólen de *Utricularia* normalmente apresenta 15-48µm de  
25 comprimento e 17-51µm largura (polar em vista polar × equatorial em vista polar), sendo que

1 algumas espécies são caracterizadas por possuírem “gigapólen”, como as com diâmetros polar  
2 em vista polar de 35-45µm observados em alguns espécimes de *U. intermedia*, *U. vulgaris*  
3 (CASPER & MANITZ, 1975) e *U. stygia*, e “micropólen”, com diâmetro polar em vista polar  
4 de ~20µm, observado em *U. ochroleuca* (BERETTA et al., 2014). Ambas as formas anômalas  
5 de pólen se dão possivelmente devido a anomalias na esporogênese (CASPER & MANITZ,  
6 1975). Outras espécies também apresentam grãos diminutos, dentre elas *U. neottioides*,  
7 medindo 20×20µm (HUYNH, 1968). O pólen das espécies de *Utricularia* é normalmente  
8 desprovido de ornamentação, sendo que as espécies reófitas (que habitam rochas úmidas) da  
9 seção *Avesicaria* são uma exceção, como *U. neottioides* e *U. oliveriana*, que possuem  
10 ornamentação microequinada (LOBREAU-CALLEN, 1999).

11 Lentibulariaceae possui morfologia vegetativa muito distinta entre seus gêneros, e  
12 variados padrões de morfologia floral dentro dos mesmos (mais diversos em *Pinguicula* e  
13 especialmente em *Utricularia*). Caracterizar cada gênero individualmente, dando enfoque às  
14 estratégias reprodutivas e padrões morfológicos que eles tenham em comum, é a melhor  
15 maneira de contextualizar a polinização da família Lentibulariaceae. Pensando nisso,  
16 apresentamos a biologia de cada gênero, com a intenção contextualizar o objetivo de nosso  
17 trabalho, e o motivo da escolha do nosso objeto de estudo.

18

## 19 2.1. O gênero *Pinguicula*

20 *Pinguicula* é um gênero de plantas herbáceas rosetadas com aproximadamente 105  
21 espécies anuais ou perenes, distribuídas em todos os continentes exceto a Oceania e Antártida,  
22 com maior diversidade no hemisfério ocidental, pelas Américas, especialmente nas regiões  
23 tropicais do México, América Central e Caribe, encontradas em rochas, areia ou terra  
24 (CASPER et al., 1966; FLEISCHMANN & ROCCIA, 2018). É o único gênero da família  
25 Lentibulariaceae com raízes, e suas espécies possuem folhas rosetadas cobertas por tricomas

1 secretores de mucilagem (CASPER et al., 1966; LEGENDRE, 2000; FLEISCHMANN &  
2 ROCCIA, 2018; LUSTOFIN et al., 2020).

3 As folhas de *Pinguicula* se encontram em forma de roseta sobre o solo, com tricomas  
4 sésseis e pedunculadas normalmente na face adaxial secretando mucilagem e enzimas  
5 digestivas, de modo que caso um animal pequeno pouse ou passe próximo às folhas, ficará  
6 preso. Suas glândulas não são capazes de se movimentar, como em outros gêneros de plantas  
7 carnívoras, porém as folhas de algumas espécies são capazes de se dobrar levemente, de modo  
8 a facilitar o aprisionamento e digestão da presa (LLOYD, 1942; JUNIPER et al., 1989;  
9 HESLOP-HARRISON, 2004).

10 A reprodução de *Pinguicula* pelo destaque de folhas é relativamente simples e  
11 comercialmente utilizada para a produção de mudas. Além da reprodução por folhas e gemas,  
12 é comum haver em espécies que passam por longos períodos de seca ou frio, a presença de  
13 hibernáculos, que são estruturas de dormência, formadas por um agrupamento de folhas  
14 suculentas não carnívoras (homófilas ou heterófilas), que ajudam a planta a sobreviver ao  
15 estresse dos períodos de inverno ou estiagem (LEGENDRE, 2000; HESLOP-HARRISON,  
16 2004; MCPHERSON, 2010). É comum haver gemas em volta do hibernáculo, que irão ser  
17 dispersadas e gerar novas plantas clone após este período (LEGENDRE, 2000). Além disso,  
18 as espécies epífitas *Pinguicula lignicola* e *P. casabitoana* apresentam viviparidade verdadeira,  
19 e após fecundadas, as plântulas se desenvolvem fixadas à planta mãe através de um funículo,  
20 para posteriormente serem dispersadas (TEMPLE et al., 2020).

21 *Pinguicula* possui inflorescência terminal, com 1-3 flores casmógamas (normalmente  
22 uma), com cálice pentâmero, corola bilabiada, zigomórfica e pentâmera, podendo ter o cálcar  
23 e fauce delgados (restringindo o acesso de visitantes por tamanho do corpo ou probóscide aos  
24 recursos florais e órgãos reprodutivos) ou cálcar e fauce abertos (não limitando o acesso à  
25 recompensa e órgãos reprodutivos), estames sempre em dois, inseridos juntos entre o lábio




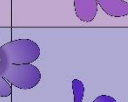
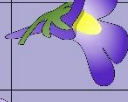


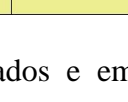
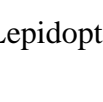
1 superior, inferior e pistilo, com estigma bilabiado sensitivo ou não (CASPER, 1966;  
2 LEGENDRE, 2000; FLEISCHMANN, 2016; FLEISCHMANN & ROCCIA, 2018). As  
3 espécies podem apresentar hercogamia completa ou parcial servindo de barreira para a  
4 autopolinização espontânea (e.g. MOLAU, 1993; ZAMORA, 1999; HESLOP-HARRISON,  
5 2004; PUSHKAREVA et al., 2018; VILLEGAS & ALCALÁ, 2018). Durante o período  
6 noturno as flores se fecham de maneira incompleta, podendo até mesmo curvar o escapo,  
7 sempre de maneira nástica, cessando o movimento ao atingir a maturidade floral (quando o  
8 estigma e anteras estão maduros), ou até a senescência, nos casos de *P. caerulea*, *P. ionantha*,  
9 *P. lutea*, *P. primuliflora* e *P. pumila* (FLEISCHMANN, 2016; MOLANO-FLORES et al.,  
10 2018).

11 Apesar da hercogamia em *Pinguicula* normalmente dificultar a autopolinização,  
12 diversas espécies estudadas se demonstraram capazes de realizar autopolinização espontânea,  
13 podendo inclusive aproximar as anteras do estigma ao final da antese: e.g. *P. villosa*  
14 (HESLOP-HARRISON, 2004), *P. lusitanica* (HESLOP-HARRISON, 2004;  
15 FLEISCHMANN, 2016), *P. vulgaris* (HESLOP-HARRISON, 2004; PUSHKAREVA et al.,  
16 2018), *P. sharpii* e *P. takakii* (FLEISCHMANN, 2016). Ademais, todas as espécies estudadas  
17 exceto *P. alpina* (MOLAU, 1993), *P. pumila* e *P. filifolia* (FLEISCHMANN, 2016) se  
18 demonstraram autocompatíveis (MOLAU, 1993; ZAMORA, 1999; ZAMORA, 2002;  
19 MOLANO-FLORES et al., 2018; VILLEGAS & ALCALÁ, 2018). Adicionalmente, a razão  
20 pólen:óvulo pode ser muito discrepante. Exemplos dentro do gênero variam de  $19 \pm 2$  para *P.*  
21 *ionantha* a  $77.711 \pm 6.630$  para *P. lutea* (MOLANO-FLORES et al., 2018). Em *Pinguicula*, há  
22 apenas relato da presença de estíma sensitivo (capaz de se movimentar após estímulo  
23 mecânico) em *P. vulgaris* (WILLIS & BURKILL, 1903; NEWCOMBE, 1922; 1924;  
24 HESLOP-HARRISON, 2004).

1 Muitas espécies de *Pinguicula* possuem guias florais ou tricomas que mimetizam  
2 pólen em seu palato, situados no lábio inferior das flores, de modo a guiar o inseto até a fauce  
3 da flor, onde poderão, no interior, encontrar recursos, como o néctar (ZAMORA, 1999;  
4 FLEISCHMANN, 2016; ABRAHAMCZYK et al., 2017; LUSTOFIN et al., 2019; 2020) ou  
5 tricomas alimentadores, sendo estes últimos localizados no lábio inferior próximos à fauce  
6 (FLEISCHMANN, 2016; LUSTOFIN et al., 2020). Tais tricomas podem ser uma pré-  
7 adaptação aos tricomas mimetizantes de pólen (FLEISCHMANN, 2016). Esta hipótese foi  
8 testada por Lustofin et al. (2020), que encontraram reservas de amido (mas não lipídios e  
9 proteínas) nos tricomas das espécies *Pinguicula agnata*, *P. albida*, *P. ibarrae*, *P. martinezii*,  
10 *P. filifolia* e *P. gigantea*, que possivelmente são polinizadas por abelhas, mas não em espécies  
11 que seriam polinizadas por Lepidoptera.

12 O gênero *Pinguicula* possui uma variedade de visitantes e polinizadores associados às  
13 suas cores e recursos, o que corrobora com sua diversa morfologia floral (LUSTOFIN et al.,  
14 2020; Fig. 2). O gênero pode apresentar flores azuladas, lilases e amarelas, com fauce larga,  
15 normalmente visitadas por himenópteros (especialmente abelhas) e ocasionalmente outros  
16 insetos (e.g. lepidópteros, dípteros e coleópteros) em *P. ionantha*, *P. lutea*, *P. planifolia*  
17 (MOLANO-FLORES et al., 2018); Flores lilases ou violeta-azuladas com fauce larga,  
18 visitadas por Lepidoptera, Diptera, Hymenoptera e Coleoptera, como *P. vulgaris* (MÜLLER,  
19 1881; POPPIUS, 1903; WILLIS & BURKILL, 1903; MOLAU, 1993; HESLOP-  
20 HARRISON, 2004; PUSHKAREVA et al., 2018); flores brancas apresentando mimetismo de  
21 pólen na entrada da flor com cálcio e fauce largas, possuindo relatos majoritariamente na  
22 visita por Diptera (incluindo Syrphidae), como *P. alpina* (MÜLLER, 1881; MOLAU, 1993),  
23 flores alvo-azuladas que mesmo visitadas por Hymenoptera, têm como principais  
24 polinizadores os Thysanoptera e Coleoptera, como no caso de *P. vallisneriifolia* (ZAMORA,  
25 1999), e até mesmo flores vermelhas de fauce larga, provavelmente polinizadas por pássaros  
26 (LUSTOFIN et al., 2020).

1 Apesar da utilização de predição por características florais no gênero ser interessante  
 2 para espécies com cálcio fino e alongado, corroborando com a polinização por insetos de  
 3 probóscide longa, como no caso de *Pinguicula moranensis* (VILLEGAS & ALCALÁ, 2018),  
 4 isto não é necessariamente válido para todas as espécies de flores similares, e deve ser  
 5 utilizado com cautela para o gênero, uma vez que a presença de autocompatibilidade diminui  
 6 a pressão seletiva dos polinizadores, implicando em possíveis variações da morfologia floral  
 7 não associadas à seleção por polinizadores (ROSAS-GUERRERO et al., 2014). No caso de *P.*  
 8 *vallisneriifolia*, mesmo possuindo características florais associadas à polinização por  
 9 Hymenoptera, a ausência de um polinizador deste tipo, que carregue muito pólen, foi  
 10 compensada pela presença de um longo período de floração e muita visita de Thysanoptera e  
 11 Coleoptera, que são menores, porém mais frequentes (ZAMORA, 1999).

Espécie	Visitantes	Trabalho	Flores	
<i>Pinguicula moranensis</i> Kunth	<b>Hym, Lep</b> , Dip & Col	Villegas & Alcalá 2017. <i>Plant Biology</i> 20: 205-212		
<i>Pinguicula villosa</i> L.	<b>Dip (culex)</b>	Poppius 1903 <i>Bombiologische iakttagelser</i> ; Willis & Burkill 1903; Molau, 1993. <i>Nord. J. Bot.</i> 13;		
<i>Pinguicula planifolia</i> Chapm.	<b>Hym</b>	Molano-Flores et al. 2018. <i>Plant Species Biology</i> 33: 129-139		
<i>Pinguicula longifolia</i> Ramond ex DC.	<b>Hym, Lep, Dip</b> & Col	Garcia et al. 1994. <i>Acta. Bot. Gallica</i> 141: 343-349		
<i>Pinguicula vulgaris</i> L.	Hym, Lep, <b>Dip</b> & Col	Garcia et al. 1994. <i>Acta. Bot. Gallica</i> 141: 343-349		
<i>Pinguicula vallisneriifolia</i> Webb	Hym, Lep, Dip, Col & <b>Thys</b>	Zamora et al. 1999. <i>Ecology</i> 80: 786-195; Zamora et al. 2002 <i>Revista Chilena de Historia natural</i> 75: 17-26		
<i>Pinguicula ionantha</i> R.K. Godfrey	<b>Hym</b> & Lep	Molano-Flores et al. 2018. <i>Plant Species Biology</i> 33: 129-139		
<i>Pinguicula alpina</i> L.	Lep, <b>Dip</b> & Col	Müller, 1881 <i>Alpenblumen</i> ; Molau, 1993. <i>Nord. J. Bot.</i> 13		
<i>Pinguicula lutea</i> Walter	<b>Hym</b> & Lep	Molano-Flores et al. 2018. <i>Plant Species Biology</i> 33: 129-139		

12  
 13 **Fig. 2.** Flores, visitantes e polinizadores de *Pinguicula*; Polinizadores sublinhados e em  
 14 negrito; Col- Coleoptera; Dip- Diptera; Hym- Hymenoptera; Lep- Lepidoptera; Thys-  
 15 Thysanoptera;

## 1 2.2. O gênero *Genlisea*

2 *Genlisea* é um gênero de herbáceas rosetadas com 31 espécies divididas em 2  
3 subgêneros (FROMM-TRINTA, 1977; FLEISCHMANN, 2010; FLEISCHMANN, 2012;  
4 SILVA et al., 2020). As espécies são perenes ou anuais, desprovidas de raízes, distribuídas  
5 pelas regiões tropical e subtropical da América Central e América do Sul, África Subsaariana  
6 e Madagascar, desde o nível do mar até 2700m (no alto do Monte Roraima), fixadas em  
7 rochas ou em substrato úmido (FROMM-TRINTA, 1979; JUNIPER et al., 1989;  
8 FLEISCHMANN, 2012; FLEISCHMANN & ROCCIA, 2018). Elas possuem dois tipos de  
9 folhas, uma que se desenvolve subterraneamente e normalmente aclorofilado, chamada  
10 rizófilo, e outra que se desenvolve sobre o solo, fotossintetizante (FROMM-TRINTA, 1979;  
11 MCPHERSON, 2010; FLEISCHMANN & ROCCIA, 2018).

12 As folhas fotossintetizantes de *Genlisea* são pecioladas e espiraladas em rosetas,  
13 variando em tamanho, forma e número. Em contrapartida, as folhas subterrâneas (rizófilos)  
14 são aclorofiladas, e extremamente modificadas para a captura de organismos. Estes rizófilos  
15 possuem formato de Y invertido, com sua bifurcação orientada para baixo gerando dois lobos.  
16 Cada lobo é torcido espiraladamente, como um saca-rolhas congestionado, formando apenas  
17 algumas pequenas aberturas lateralizadas para a entrada de presas, sendo a parte interna deste  
18 saca-rolhas portadora de tricomas direcionados para a intersecção do Y invertido, onde existe  
19 uma região entumescida denominada ampola, onde são secretadas enzimas digestivas e  
20 tricomas que irão digerir e absorver os nutrientes da presa capturada, respectivamente  
21 (FROMM-TRINTA, 1979; JUNIPER et al., 1989; PŁACHNO et al., 2007; MCPHERSON,  
22 2010; FLEISCHMANN, 2012).

23 Com exceção de *Genlisea repens*, não há reprodução por estolão no gênero, sendo os  
24 indivíduos rosetados e raramente apresentando gemas axilares, o que resulta em pouca  
25 dispersão por reprodução vegetativa (PŁACHNO et al., 2020a). Após a floração, é comum o

1 surgimento de um ou mais indivíduos lateralmente à planta mãe e, excepcionalmente em  
2 *Genlisea tuberosa*, há a formação de tubérculos, presentes já nas fases iniciais da germinação,  
3 capazes de resistir à seca armazenando água (CASPER, 1966; FLEISCHMANN, 2012;  
4 RIVADAVIA et al., 2013; PŁACHNO et al., 2020a).

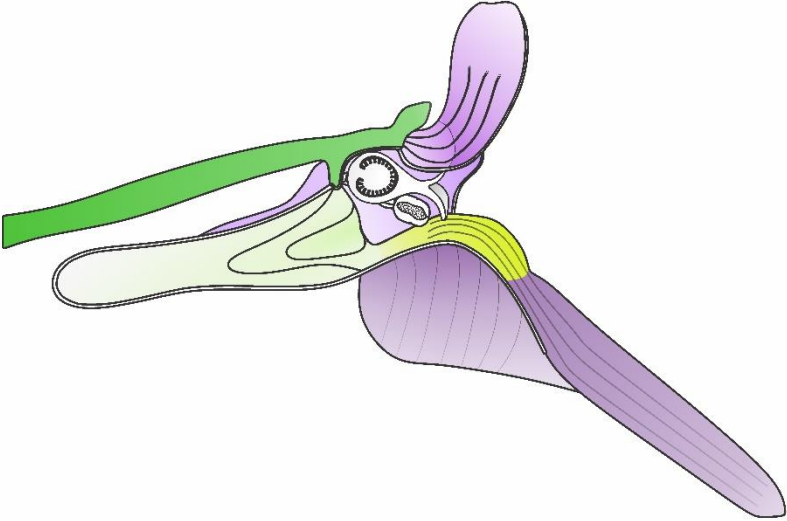
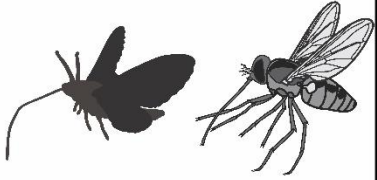

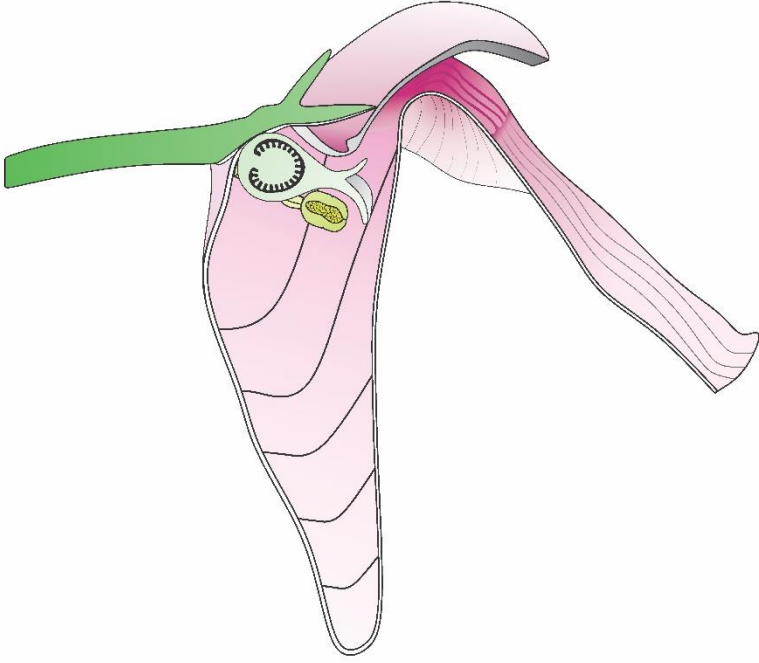
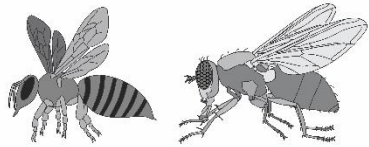
5 *Genlisea* possui inflorescência racemosa, portando normalmente uma ou mais flores  
6 casmógamas (FROMM-TRINTA, 1979; 1981; FLEISCHMANN, 2018). Seu cálice é  
7 pentâmero, como em *Pinguicula* (mas diferente de *Utricularia*), enquanto sua corola segue o  
8 padrão morfológico do grupo, sendo bilabiada, zigomórfica, pentâmera, com cálcar surgindo  
9 no lábio inferior, estames sempre em dois, inseridos juntos entre o lábio superior, inferior e  
10 pistilo, com estigma bilabiado (FROMM-TRINTA, 1979; FROMM-TRINTA, 1981;  
11 TAYLOR, 1989; FLEISCHMANN, 2018). Baseando-se na deiscência do fruto, o gênero pode  
12 ser dividido em dois subgêneros monofiléticos (subgen. *Tayloria* e *Genlisea*), de modo que as  
13 espécies do subgênero *Tayloria* possuem fruto com deiscência longitudinal e morfologia  
14 floral mais próxima do gênero *Pinguicula*, enquanto o as espécies do subgênero *Genlisea*  
15 possuem fruto com deiscência circuncisa, e um padrão floral mais parecido com as  
16 *Utricularia* (FROMM-TRINTA, 1977; FISCHER et al., 2000).

17 As flores de *Genlisea* são entomofílicas, e podem apresentar néctar como recurso,  
18 secretado por tricomas e acumulado no cálcar (ARANGUREN et al., 2018), mas não no  
19 palato (PŁACHNO et al., 2018c), como proposto por FLEISCHMANN (2012). As espécies  
20 do subgênero *Tayloria* possuem padrão morfológico floral mais similar ao de de *Pinguicula*,  
21 sem giba proeminente e com cálcar reto, oposto à fauce e de diâmetro quase uniforme, padrão  
22 comum em flores tipicamente polinizadas por insetos com longas probóscides (FAEGRI &  
23 VAN DER PIJL 1976; FLEISCHMANN et al., 2010; FLEISCHMANN, 2012). Já as flores do  
24 subgênero *Genlisea* possuem padrão floral mais similar às de *Utricularia*, com gibosidade  
25 proeminente no palato, de modo que, para entrar na flor, o inseto deve forçar sua entrada ou

1 abri-la com seu peso aplicado no lábio inferior (FROMM-TRINTA, 1981; FLEISCHMANN,  
2 2012; CLIVATI et al, 2014; ARANGUREN et al., 2018).

3 Poucos estudos sobre a biologia reprodutiva de *Genlisea* foram realizados, se  
4 limitando a um estudo sobre as estruturas florais, em que o palato é associado a uma área com  
5 grande produção de voláteis (PŁACHNO et al., 2018a), e um sobre a biologia reprodutiva e  
6 da polinização em *Genlisea violacea*, em que são descritos os polinizadores e biologia  
7 reprodutiva da espécie, que é auto compatível e polinizada majoritariamente por abelhas  
8 (ARANGUREN et al., 2018).

9 Dentro do gênero, *G. violacea* e *G. stapfi* são as únicas espécies nas quais foram  
10 observados os visitantes, mas apenas *G. violacea* possui estudo dedicado à biologia  
11 reprodutiva, com descrição dos visitantes forais (ARANGUREN et al., 2018). O subgênero  
12 *Tayloria* possui uma morfologia tipicamente hipocrateriforme, de flores polinizadas por  
13 insetos com probóscide longa (VAN DER PIJL, 1979; FLEISCHMANN, 2012). Entretanto,  
14 observações realizadas em duas populações em diferentes pontos de cerrado, realizadas em  
15 três anos diferentes (nas estações chuvosa e seca), totalizando 279 horas de observação  
16 contradiz o esperado (ARANGUREN et al. 2018). O estudo de ARANGUREN et al. (2018)  
17 registrou uma abelha generalista de língua curta como polinizador efetivo da espécie *G.*  
18 *violacea* (subgen. *Tayloria*), e não um inseto com longa probóscide, que aparentemente seria  
19 mais adequado pela morfologia floral, fato confirmado pela ausência de pólen na probóscide  
20 dos lepidópteros coletados. Assim, sugere-se que a predição de polinizadores por meio de  
21 síndromes neste grupo pode não ser uma ferramenta muito acurada quando focada na  
22 morfologia da corola apenas (Fig. 3).

<i>Genlisea</i> subgen. <i>Tayloria</i>	
	<p>Predição</p> 
	<p>Observado</p> 
<i>Genlisea</i> subgen. <i>Genlisea</i>	
	<p>Predição</p> 
	<p>Observado</p> <p><b>N/A</b></p>

1

2 **Fig. 3.** Predição de polinizadores (FLEISCHMANN, 2012) para cada subgênero de *Genlisea*,  
3 de acordo com o padrão de morfologia floral, *versus* o observado (ARANGUREN et al.,  
4 2018).

5

### 1 2.3. O gênero *Utricularia*

2 O gênero *Utricularia* é composto por ervas anuais ou perenes, ca. 240 espécies  
3 subdivididas em três subgêneros e 35 seções (TAYLOR, 1989; MÜLLER et al., 2006;  
4 FLEISCHMANN, 2015; SILVA et al., 2018; COSS et al., 2020) distribuídas pelo mundo  
5 todo, exceto polos e ilhas oceânicas (TAYLOR, 1989). São encontradas em diversos  
6 ambientes, podendo ser terrícolas, litófitas, reófitas, epífitas ou aquáticas, ocorrendo desde  
7 locais arenosos a locais pantanosos. Têm como habitats principais locais com disponibilidade  
8 de água, tais como poças, lagos e rios (TAYLOR, 1989), sendo que o habitat terrestre e  
9 aquático são os mais comuns (TAYLOR, 1989; SILVA et al., 2018). De acordo com a  
10 classificação morfológica clássica, os órgãos vegetativos das *Utricularia* compõem folhas,  
11 caules (breves ou na forma de estolão) e não apresentam raízes. Ademais, para algumas  
12 estruturas podem ser adotadas nomenclaturas diferenciadas para facilitar a identificação dos  
13 órgãos da planta, como: rizoides, tubérculos e armadilhas (também conhecidas como  
14 utrículos; TAYLOR, 1989). As espécies do gênero *Utricularia* apresentam morfologia FAM  
15 (*Fuzzy Arberian Morphology*), uma abordagem proposta por Agnes Arber entre 1920 e 1957,  
16 a qual se difere da morfologia clássica por propor que há um gradiente sem delimitação entre  
17 os órgãos vegetativos (LLOYD, 1942; JUNIPER et al., 1989; TAYLOR, 1989;  
18 RUTISHAUSER, 2001, 2006.).

19 As armadilhas de *Utricularia* podem surgir nas folhas, caules, estolões ou rizoides,  
20 originando-se a partir da expansão e dobra de um primórdio foliar (LLOYD, 1942; TAYLOR,  
21 1989; WHITEWOODS et al., 2020). Estas armadilhas ativas são vesículas ovoides,  
22 translúcidas ou levemente pigmentadas, com uma porta que abre caso alguma presa se  
23 aproxime dos tricomas gatilho próximos à sua entrada (REIFENRATH et al., 2006;  
24 GUISANDE et al., 2007). Para poder funcionar, o utrículo expelle toda a água de seu interior  
25 através de tricomas quadrífidos, criando uma pressão interna negativa e comprimindo suas

1 paredes, que armazenam energia elástica ao ficar tensionadas para dentro do utrículo  
2 (REIFENRATH et al., 2006; LLORENS et al., 2012 MÜLLER et al., 2020). Quando uma  
3 presa se aproxima e ativa seus tricomas gatilho, a porta do utrículo se abre, de modo que a  
4 água próxima à entrada é succionada rapidamente para dentro da vesícula, levando consigo  
5 com o fluxo quaisquer presas que estejam nesta água, enquanto, simultaneamente, suas  
6 paredes previamente pressionadas retomam rapidamente à sua posição inicial, liberando toda  
7 a energia elástica acumulada (LLOYD, 1942; ADAMEC, 2011a; POPPINGA et al., 2015).  
8 No interior do utrículo, os tricomas bífidos e quadrífidos, que excretam o conteúdo interno  
9 para sua ativação, irão secretar enzimas digestivas para digerir o material orgânico do meio, e  
10 depois absorvê-los (LLOYD, 1942; JUNIPER et al., 1989; SIROVÁ et al., 2003).

11 As espécies de *Utricularia* possuem reprodução vegetativa, representada  
12 majoritariamente pela reprodução por estolões (muito importante para as espécies terrestres)  
13 que se espalham pelo substrato, gerando novos indivíduos cada vez que ele se segmenta  
14 (TAYLOR, 1989; PHILBRICK & LES, 1996). Além dos estolões, algumas espécies também  
15 são capazes de se reproduzir por folhas destacadas ou cortadas, gerando um ou mais  
16 indivíduos por folha cortada (dependendo do tamanho da folha), sendo que todas as espécies  
17 de *Utricularia* têm hábitat associado à água e folhas flutuantes, de modo que com a variação  
18 de nível da água, e sua facilidade em reprodução vegetativa por meio do destaque de estolões,  
19 sua dispersão assexuada por vias aquáticas se torna extremamente importante para o gênero  
20 (BEAL & QUAY, 1966; TAYLOR, 1989; GRACE, 1993; KAMEYAMA & OHARA, 2006a;  
21 2006b).

22 Em espécies aquáticas flutuantes de *Utricularia*, a reprodução vegetativa e dispersão  
23 são fortemente representadas pela simples quebra de seu estolão gerando dois indivíduos, mas  
24 pode também haver reprodução por meio de tubérculos (DARWIN, 1875; PŁACHNO et al.,  
25 2020a), ou hibernáculos (*turions*). Os *turions* são ápices modificados em órgãos vegetativos

1 de dormência (com metabolismo reduzido, e capazes de armazenar amido) produzidos por  
2 ervas aquáticas perenes (ADAMEC, 1999; 2018; 2020). Nas plantas, estão localizados nos  
3 ápices caulinares de algumas *Utricularia* flutuantes de zonas subtropicais a polares, e irão  
4 surgir conforme os dias se tornam mais curtos e a temperatura diminui, podendo se formar em  
5 temperaturas de 18-20°C, mas amadurecendo por completo apenas a 8-10°C e dias curtos  
6 (WINSTON & GORHAM, 1979; ADAMEC, 1999). Conforme o inverno se aproxima, a  
7 planta mãe se decompõe fixada aos *turions*, seus restos decompostos os carregam para o  
8 fundo, protegendo-os da água mais fria da superfície, de modo que com a chegada do calor, os  
9 *turions* retornam à superfície, garantindo a sobrevivência do indivíduo (ADAMEC, 1999;  
10 2011b; 2018). Por serem estruturas de resistência, *turions* também podem ser formados em  
11 períodos de seca (porém não dormentes), voltando a crescer na presença da água, como no  
12 caso de *U. vulgaris* (ADAMEC, 1999; 2011b; 2018). Do ponto de vista filogenético, estes  
13 *turions* surgiram uma única vez dentro da seção *Utricularia*, diferentemente dos tubérculos  
14 (PŁACHNO et al., 2020a).

15 Tubérculos podem estar presentes em espécies epífitas, litófitas e algumas aquáticas  
16 (TAYLOR, 1989; PŁACHNO et al., 2020a), e podem ser responsáveis por ajudar a planta a  
17 sobreviver durante longos períodos de dessecação, além de garantir que o clone sobreviva  
18 mesmo em caso de seca (TAYLOR, 1989). Os tubérculos são estruturas de armazenamento  
19 que surgiram independentemente diversas vezes no gênero *Utricularia*, que podem ter função  
20 de armazenar água e/ou carboidratos para resistir a condições adversas (e.g. estiagem,  
21 congelamento e queimadas), tanto em plantas anuais, como em plantas perenes (WINSTON  
22 & GORHAM, 1979; ADAMEC, 1999; PŁACHNO et al., 2020a). Em *Utricularia* os  
23 tubérculos evoluíram a partir de estolões comuns na maioria das linhagens, com exceção da  
24 seção *Orchidioides*, em que provavelmente os tubérculos evoluíram a partir de estolões  
25 espessos (presentes em diversas espécies da seção), previamente adaptados ao armazenamento  
26 de substâncias (PŁACHNO et al., 2020a).

1           *Utricularia* possui inflorescência racemosa com número variado de flores  
2 (casmógamas, cleistógamas ou ambas), podendo ser inclusive reduzido a uma flor, cálice com  
3 duas sépalas e corola zigomórfica e bilabiada, sendo o lábio superior menor e o inferior bem  
4 desenvolvido, sempre com cálcar; estames sempre em dois, inseridos juntos entre o lábio  
5 superior, inferior e pistilo, com estigma bilabiado, que pode ou não ser sensitivo  
6 (NEWCOMBE, 1922; TAYLOR, 1989). Com exceção de algumas espécies, o lábio inferior  
7 de *Utricularia* possui uma protuberância que dificulta o acesso ao cálcar, e conseqüentemente  
8 ao néctar e órgãos reprodutivos, de modo que os polinizadores precisam possuir uma  
9 probóscide suficientemente longa, ou serem fortes o bastante para forçar sua entrada na flor  
10 para poder acessar o néctar no fundo do cálcar, usando o lábio inferior da corola como  
11 plataforma (Fig. 4). Além de poder apresentar flores casmógamas e cleistógamas (TAYLOR,  
12 1989; GUISANDE et al., 2007), suas flores cleistógamas podem ser oportunistas, surgindo  
13 em condições desfavoráveis do ambiente, e garantindo a sobrevivência do genótipo mesmo na  
14 ausência de polinizadores, o que facilita a colonização de novos ambientes por reprodução  
15 assexuada ou autopolinização (KONDO, 1972; RAYNAL-ROQUES & JÉRÉMIE, 2005),  
16 como em *U. benjaminiana* (RAYNAL-ROQUES & JÉRÉMIE, 2005), *U. dimorphanta*  
17 (YAMAMOTO e KADONO, 1990), *U. hydrocarpa* (RAYNAL-ROQUES & JÉRÉMIE,  
18 2005), *U. subulata* (TAYLOR, 1989) e *U. uliginosa* (JÉRÉMIE, 1989), ou então  
19 cleistógamas arquiteturais, de modo que cada inflorescência de flores casmógamas pode  
20 também apresentar flores cleistógamas, como no caso de *U. hydrocarpa* (RAYNAL-  
21 ROQUES & JÉRÉMIE, 2005) e *U. juncea* (KONDO, 1972).

22           O gênero pode ser dividido em três subgêneros, *Polypompholyx*, *Utricularia* e  
23 *Bivalvaria*, sendo o primeiro um grupo-irmão dos outros dois (JOBSON & ALBERT, 2002;  
24 JOBSON et al., 2003; REUT & JOBSON, 2010; SILVA et al., 2018). No subgênero  
25 *Polypompholyx* já existem espécies que produzem e armazenam néctar no cálcar, indicando  
26 que seu ancestral provavelmente também produzia e armazenava néctar (SILVA et al., 2018;

1 PŁACHNO et al., 2019). O néctar está presente sempre em pequenas quantidades na maioria  
2 das espécies estudadas, mas pode também estar ausente em outras espécies, ou até mesmo  
3 deixar de ser produzido quando há presença de muitas flores no entorno (ANAND et al.,  
4 2007; CHAUDHARY et al., 2018).

5 Em *Utricularia* pode também ocorrer reprodução assexuada via agamospermia em  
6 algumas espécies, com a formação de frutos (HOBBHAHN et al., 2006). Para as espécies  
7 *Utricularia alpina*, *U. babui* e *U. reniformis*, não ocorre a agamospermia (JÉRÉMIE, 1989;  
8 CLIVATI et al., 2014; CHAUDHARY et al., 2018); entretanto, para as espécies *U. babui* e *U.*  
9 *reticulata*, a agamospermia poderia chegar a formar frutos em 16% das flores emasculadas  
10 (HOBBHAHN et al., 2006; CHAUDHARY et al., 2018). Em algumas espécies, variedades ou  
11 híbridos, podem existir populações estéreis, dependendo fortemente da reprodução vegetativa  
12 para se perpetuar, como no caso de *U. australis* f. *australis*, que é descrita como um híbrido  
13 infértil entre *U. australis* f. *tenuicaulis* × *macrorhiza* (KAMEYAMA et al., 2005) e uma  
14 população infértil de *U. vulgaris* var. *japonica* (sinônimo de *Utricularia australis*;  
15 YAMAMOTO & KADONO, 1990). Um possível híbrido entre *U. australis* e *U. vulgaris*  
16 também existe, no lago Michurinskoye, proposto a partir de dados de morfometria (ASTUTI  
17 & PERUZZI, 2018). Adicionalmente, por meio da abordagem de DNA *barcoding*, existem  
18 evidências de que *U. bremii* possivelmente teve uma origem híbrida, tendo *U. minor* como um  
19 de seus parentais, e evidências corroborando a hipótese de que as espécies estéreis *U.*  
20 *ochroleuca* e *U. stygia* também podem ter origem híbrida (ASTUTI et al., 2019).

21 A reprodução sexuada em *Utricularia* pode ocorrer entre indivíduos diferentes  
22 (alogamia) ou não (autogamia), e apesar de diversas espécies serem autocompatíveis  
23 (NEWCOMBE, 1922; KONDO, 1972; JÉRÉMIE, 1989; YAMAMOTO & KADONO, 1990;  
24 KHOSLA et al., 1998; ARAKI & KADONO, 2003; KAMEYAMA et al., 2005; RAYNAL-  
25 ROQUES & JÉRÉMIE, 2005; HOBBHAHN et al., 2006; CLIVATI et al., 2014), e o período

1 de receptividade do estigma ser sobreposto ao de disponibilidade de pólen, nem todas foram  
2 capazes de se autopolinizar espontaneamente (KAUSIK, 1955; JÉRÉMIE, 1989;  
3 YAMAMOTO & KADONO, 1990; HOBBAHN et al., 2006; CLIVATI et al., 2014;  
4 CHAUDHARY et al., 2018). Isto se dá principalmente pelo fato de haver hercogamia de  
5 aproximação em muitas espécies, impedindo que as anteras entrem em contato com o estigma  
6 (KNUTH, 1899; JÉRÉMIE, 1989; CLIVATI et al., 2014), ou hercogamia de movimento,  
7 podendo no final da antese haver aproximação entre as anteras e o estigma, de modo a induzir  
8 a autopolinização espontânea em caso de não fecundação mediada por vetor de pólen  
9 (YAMAMOTO & KADONO, 1990; KHOSLA et al., 1998; CHAUDHARY et al., 2018). Em  
10 contrapartida às estratégias para evitar autopolinização, algumas espécies podem não  
11 apresentar nenhum distanciamento entre anteras e estigma, podendo até mesmo possuir as  
12 anteras de frente para a superfície receptiva do estigma, disposição que facilita a  
13 autopolinização (JÉRÉMIE 1989; YAMAMOTO e KADONO, 1990; KHOSLA et al., 1998).

14 Uma vez dentro da flor, o primeiro órgão reprodutivo que o polinizador entra em  
15 contato é o estigma, especificamente a sua porção externa do lábio inferior, fazendo com que  
16 caso haja pólen de outra flor, este pólen seja depositado no lábio do estigma logo na entrada,  
17 aumentando as chances de polinização cruzada. As espécies de *Utricularia* estudadas  
18 apresentaram razão pólen:óvulo de 4:1 a 64:1 (YAMAMOTO e KADONO, 1990; KHOSLA  
19 et al., 1998; HOBBAHN et al., 2006), sendo que a maioria das espécies do gênero são  
20 plurióvulas, com exceção das espécies *U. olivacea* (que possui apenas 1 ou 2 óvulos) e *U.*  
21 *biovularioides* ca. 7 óvulos (BEAL & QUAY, 1966; TAYLOR, 1989).

22 A transferência do pólen para o estigma da mesma flor pode ocorrer espontaneamente  
23 ou mediada por um visitante floral. Dentro de *Utricularia*, comumente é descrita a presença  
24 de mobilidade no lábio inferior e alongado do estigma em resposta a estímulos mecânicos  
25 (estigma sensitivo), sendo descrito como presente na literatura em 12 das 15 espécies de

1 *Utricularia* observadas (HILDEBRAND, 1865; NEWCOMBE, 1922; NEWCOMBE, 1924;  
2 KONDO, 1972; JÉRÉMIE, 1989; ABRAHAMCZYK et al., 2017; CHAUDHARY et al.,  
3 2018) e *U. neottioides* (apresentado nesse trabalho), sendo este um caráter possivelmente  
4 plesiomórfico, uma vez que aparece também em seu grupo irmão *Pinguicula* e em outras  
5 Lamiales (WILLIS & BURKILL, 1903; NEWCOMBE, 1922; NEWCOMBE, 1924). Porém,  
6 a presença de estigma sensitivo não irá necessariamente impedir a autopolinização, uma vez  
7 que, mesmo com estigma sensitivo, as anteras ainda podem se aproximar do estigma durante  
8 o final da antese, induzindo a autopolinização (CHAUDHARY et al., 2018). A reprodução  
9 por polinização cruzada é comum no gênero, e muitas espécies de *Utricularia* são capazes de  
10 gerar frutos por reprodução sexuada entre indivíduos diferentes (NEWCOMBE, 1922;  
11 KONDO, 1972; YAMAMOTO & KADONO, 1990; ARAKI & KADONO, 2003;  
12 KAMEYAMA et al., 2005; HOBBAHN et al., 2006; ABRAHAMCZYK et al., 2017;  
13 CHAUDHARY et al., 2018). Entretanto, dentro da mesma espécie, populações ou variedades  
14 diferentes podem possuir sistemas diferentes, podendo até mesmo ser totalmente estéreis em  
15 alguns casos, dependendo totalmente da reprodução assexuada (YAMAMOTO e KADONO,  
16 1990; KAMEYAMA et al., 2005).

17 *Utricularia* possui variações drásticas e sutis em sua morfologia floral, tendo flores  
18 com menos de 1cm a flores com mais de 5cm (TAYLOR, 1989). Muitas espécies de  
19 *Utricularia* são consideradas melitófilas (FAEGRI & VAN DER PIJL, 1979) devido às suas  
20 cores e padrão morfológico floral, quase sempre dependente de um inseto suficientemente  
21 forte ou pesado, para conseguir abaixar o lábio inferior da flor e ter acesso aos recursos  
22 florais. Não existe ainda relação clara e direta entre os visitantes e a cor ou forma das espécies  
23 estudadas, com exceção de *U. menziesii* que apresenta flores de corola vermelha (de  
24 morfologia similar ao padrão mais comum do gênero com giba proeminente, porém com  
25 pétalas e calcar de parede mais espessa) que é polinizada por aves (LOWRIE & PLACE,  
26 2001; PŁACHNO et al., 2018b). Flores de calcar alongado com corola roxa ou amarela e giba

1 proeminente não restringiram os visitantes de *Utricularia* a insetos de longa probóscide,  
2 todavia, flores de menor porte provavelmente restringem os tipos de visitantes capazes de  
3 acessar seus recursos, sendo necessário estudar as espécies com flores mais diminutas do  
4 gênero, como as da secção *Avesicaria*, *Avesicarioides* para compreender a relação entre  
5 polinizadores e a diversidade de tamanhos de flores presente em *Utricularia*. Além do  
6 tamanho, espécies com morfologia floral de variação dentro do gênero também existem como  
7 exceção, que é o caso do complexo *capilliflora* (*U. capilliflora* F. Muell., *U. dunlopii* P.  
8 Taylor, *U. dunstaniae* F. Lloyd e *U. antennifera* P. Taylor), cuja polinização foi predita ser  
9 por pseudocópula, porém sem evidência empírica (LOWRIE, 1995; LOWRIE & PLACE,  
10 2001; PŁACHNO et al., 2016).

11 Os trabalhos já publicados sobre polinização em *Utricularia* abordaram espécies com  
12 diferentes formas de flores (Fig. 4.), como flores púrpuras de fauce estreita e gibosidade  
13 proeminente, em ambiente terrestre: *U. albocaerulea*, *U. purpurascens* e *U. reticulata*,  
14 polinizadas por himenópteros, especialmente abelhas, e lepidópteros, especialmente  
15 borboletas (HOBBAHN et al., 2006); *U. praeterita* (sem visita observada) e *U. babui*,  
16 visitada majoritariamente por abelhas, Syrphidae e vespas (CHAUDHARY et al., 2018); e *U.*  
17 *reniformis* A.St-Hil., polinizada por abelhas (CLIVATI et al., 2014). Espécies com flor  
18 amarela também foram observadas sendo visitadas por abelhas em trabalhos não dedicados à  
19 biologia da polinização (e.g. *Utricularia bremii* em PŁACHNO et al., 2017a; *Utricularia*  
20 *vulgaris* em PŁACHNO et al., 2018b). Estudar espécies de padrão floral e hábitat raros no  
21 grupo é necessário para compreender melhor a relação entre polinização e os padrões florais  
22 do gênero. Dentro deste contexto, a espécie *Utricularia neottioides*, de flores brancas,  
23 diminuta e confinada a corredeiras em cachoeiras, é um excelente modelo para se descrever a  
24 biologia floral e reprodutiva, justamente por possuir características raras no gênero.

Espécie	Visitantes	Trabalho	Flores		Visitantes e Polinizadores		
<i>Utricularia albocerulea</i> Dalzell	Hym, Lep & Dip	Hobbhahn <i>et al.</i> 2006. Plant Biology 8(6): 791-804					
<i>Utricularia graminifolia</i> Vahl	Hym, Lep & Dip	Hobbhahn <i>et al.</i> 2006. Plant Biology 8(6): 791-804					
<i>Utricularia reticulata</i> Sm.	Hym, Lep & Dip	Hobbhahn <i>et al.</i> 2006. Plant Biology 8(6): 791-804					
<i>Utricularia amethystina</i> Salzm ex A.St.-Hil. & F. Girard	Hym & Lep	Rodrigues <i>et al.</i> , unpublished					
<i>Utricularia babui</i> S.R. Yadav, Sardesai & S.P. Gaikwad	Hym & Lep	Chaudhary <i>et al.</i> 2018. Jour. of Plant Research 131: 599-610					
<i>Utricularia laciniata*</i> A. St.-Hil & Girard	Dip	Aranguren <i>et al.</i> 2018. Plant Biology 20: 591-601					
<i>Utricularia reniformis</i> A. St.-Hil.	Hym	Clivati <i>et al.</i> 2014. Plant biology 16: 677-682					
<i>Utricularia multifida*</i> R. Br.	Hym	Plachno <i>et al.</i> 2019. Protoplasma 256: 1531-1543					
<i>Utricularia neottioides</i> A. St.-Hil & Girard	Dip	Dolsan <i>et al.</i> , unpublished					
<i>Utricularia foliosa*</i> L.	Hym	Plachno <i>et al.</i> 2018. Protoplastma 255: 1053-1064					
<i>Utricularia vulgaris*</i> L.	Hym, Dip & Thys	Plachno <i>et al.</i> 2018. Protoplastma 255: 1053-1064					
<i>Utricularia triloba*</i> Benj.	Dip	Aranguren <i>et al.</i> 2018. Plant Biology 20: 591-601					
<i>Utricularia menziesii*</i> R. Br.	Passeriforme	Keighery 1982. Bird-pollinated plants in western Australia; Plachno <i>et al.</i> 2018. Annals of Botany 123: 213-220					

1

2 **Fig. 4.** Flores, visitantes e polinizadores de *Utricularia*; Polinizadores sublinhados e  
3 destacado com quadrado vermelho; Dip- Diptera; Hym- Hymenoptera; Lep- Lepidoptera;  
4 Thys- Thysanoptera;

5 4. *Utricularia neottioides*

6 *Utricularia neottioides* A.St.-Hil. & Girard é uma das poucas espécies com hábito  
7 reofítico torrentícola (RAYNAL-ROQUES & JÉRÉMIE, 2005; PŁACHNO et al., 2020b),  
8 isto é, que cresce confinada às rochas em água corrente contínua de rios, até o limite de água  
9 das enchentes, mas não superior a ele (VAN STEENIS, 1952; 1987). Dentre as espécies  
10 reofíticas de *Utricularia*, apenas *U. neottioides* e *U. oliveriana* estão presentes na América do  
11 Sul, sendo a primeira com folhas filamentosas e a segunda não, ademais, *U. neottioides* pode  
12 ser encontrada na Venezuela, Bolívia, Colômbia e Brasil (Taylor, 1989; BFG, 2015; FLORA  
13 DO BRASIL, 2020 em construção). *U. rigida* e *U. tetraloba* possuem morfologia floral,  
14 vegetativa e hábitos similares, ocorrendo no continente africano (seção *Avesicarioides*), tendo

1 assim surgido o hábito reofítico pelo menos duas vezes independentemente na filogenia de  
2 *Utricularia* (MÜLLER et al., 2006; SILVA et al., 2018). Dentro destas seções, a forma e cor  
3 das flores são muito similares, além de seu estigma e anteras serem visíveis na entrada da flor,  
4 característica incomum no gênero, que normalmente possui os órgãos sexuais escondidos  
5 (TAYLOR, 1989; GUISANDE et al., 2007). A espécie detém algumas modificações  
6 morfológicas que possibilitam sobreviver nas correntezas. Para se manter estável na  
7 correnteza, ela possui estolões modificados em forma de apressórios, que se fixam nas rochas  
8 por meio de tricomas adesivos em sua face abaxial, e “folhas” filamentosas, maleáveis,  
9 cobertas de tricomas multicelulares hidrofóbicos, e capazes de se flexionarem com a  
10 correnteza sem que se rompam (PŁACHNO et al., 2020b). *Utricularia neottioides* possui três  
11 tipos de estolões (PŁACHNO et al., 2020b). Dois tipos assimétricos ricos em esclerênquima  
12 (logo, resistentes à água corrente): os modificados em apressórios de fixação, e os que se  
13 espalham pelo substrato rochoso (também ajudando na fixação) gerando novas rosetas  
14 (PŁACHNO et al., 2020b); e um terceiro tipo, sem esclerênquima (se movendo junto à água),  
15 que concentra as “folhas” filamentosas, sendo os dois últimos tipos de estolão portadores de  
16 utrículos (PŁACHNO et al., 2020b).

17 As populações de *U. neottioides* são distribuídas em manchas pelos rios,  
18 principalmente em locais com grande quantidade de rochas próximas da superfície da água,  
19 estando os indivíduos distribuídos dentro de manchas de tamanho extremamente variado (de 5  
20 a mais de 100 inflorescências), com populações passíveis de submersão temporária devido às  
21 alterações no nível do rio, crescendo como perene em córregos que não secam, ou como anual  
22 em córregos intermitentes (TAYLOR, 1989; PŁACHNO et al., 2020b; observação pessoal;  
23 Fig. 5.).



1

2 **Fig. 5.** A) Mancha de *Utricularia neottioides* A.St.-Hil. & Girard fixada em rochas em curso  
3 d'água raso. B) Vista frontal de flor de *U. neottioides* (Fotos: Equipe do Laboratório de  
4 Sistemática Vegetal, Unesp/FCAV).

5

## 6 5. Justificativa

7 Tendo em vista a carência de estudos sobre biologia da polinização de *Utricularia* e a  
8 necessidade de documentar as relações ecológicas nos biomas brasileiros, estudar a  
9 polinização de uma espécie que habita corredeiras se torna interessante, uma vez que há  
10 pouquíssimos estudos na área sobre plantas que ocupam este tipo de hábitat (e.g.  
11 PHILBRICK, 1984; PHILBRICK & RETANA, 1998; GUPTA & SEGHAL, 2009; SOBRAL-  
12 LEITE et al., 2011; KHANDURI ET A., 2014), sendo que nenhum deles envolve a família  
13 Lentibulariaceae. Por *Utricularia neottioides* possuir características florais raras no gênero, e  
14 similares a algumas outras espécies (incluindo outras reofíticas) do grupo, estudá-la irá nos  
15 ajudar a compreender a diversidade de polinizadores associados aos diferentes padrões de  
16 morfologia floral do gênero.

17

1 6. Referências bibliográficas

2

3 ABRAHAMCZYK, S. et al. **Pollinator adaptation and the evolution of floral nectar sugar**  
4 **composition**. Journal of Evolutionary Biology, v. 30, nº1, p.112-127, 2017.

5 ADAMEC, L. **Ecophysiological characteristics of turions of aquatic plants: A review**.  
6 Aquatic Botany, v. 148, p. 64–77, 2018.

7 ADAMEC, L. **The smallest but fastest: Ecophysiological characteristics of traps of**  
8 **aquatic carnivorous *Utricularia***. Plant Signaling & Behavior, v. 6, nº 5, p. 640-6, 2011.

9 ADAMEC, L. **Turion overwinter of Aquatic Carnivorous Plants**. Carnivorous plants  
10 newsletter, v. 28, p.19-24. 1999.

11 ADAMEC, L.; KUČEROVÁ, A.; JANEČEK, Š. **Mineral nutrients, photosynthetic**  
12 **pigments and storage carbohydrates in turions of 21 aquatic plant species**. Aquatic  
13 Botany, 2020.

14 ANAND, C. et al. **Presence of two types of flowers with respect to nectar sugar in two**  
15 **gregariously flowering species**. Journal of biosciences, v. 32, nº 4, p.769-774, 2007.

16 APG IV. **An Update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the order and**  
17 **families of Flowering plants: APG IV**, Botanical Journal of Linnean Society, v. 181, p. 1-20,  
18 2016.

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

22 ARANGUREN, Y. et al. **Reproductive biology and pollination of the carnivorous**  
23 ***Genlisea violacea* (Lentibulariaceae)**. Plant Biology, v. 20, p. 591-601, 2018.

24 ASTUTI, G. & PERUZZI, L. **Are shoots of diagnostic value in Central European**  
25 **bladderworts (*Utricularia* L., Lentibulariaceae)?** Plant Biosystems-An International  
26 Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology, v. 152, nº6, p. 1214-26, 2018.

27 ASTUTI, G. et al. **DNA barcoding approach fails to discriminate Central European**  
28 **bladderworts (*Utricularia*, Lentibulariaceae), but provides insights concerning their**

- 1 **evolution.** Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant  
2 Biology, v. 28, p. 1-1, 2019.
- 3 BEAL, E.O. & QUAY, T.L. **A review of *Utricularia olivacea* Wright ex Grisebach**  
4 **(Lentibulariaceae).** Journal of the Elisha Mitchell Scientific Society, v. 1, p. 462-466, 1968.
- 5 BERETTA, M. et al. **Pollen morphology of European bladderworts (*Utricularia* L.,**  
6 **Lentibulariaceae).** Review of Palaeobotany and Palynology, v. 205, p. 22-30, 2014.
- 7 BFG. **Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil.** Rodriguésia,  
8 v.66, n°4, p.1085-1113, 2015.
- 9 CASPER, S.J. **Monographie der Gattung *Pinguicula* L.** Bibliotheca Botanica, v. 127-128,  
10 p. 1-209, 1966.
- 11 CASPER, S.J.; MANITZ, H. **Beiträge zur Taxonomie und Chorologie der**  
12 **mitteleuropäischen *Utricularia*-Arten 2. Androsporogenese, Chromosomenzahlen und**  
13 **Pollenmorphologie.** Feddes Repertorium, v. 86, n° 4, 1975.
- 14 CHAUDHARY, A.; YADAV, S.R. & RAJESH, T. **Delayed selfing ensures reproductive**  
15 **assurance in *Utricularia praeterita* and *Utricularia babui* in Western Ghats.** Journal of  
16 Plant Research, v. 131, p. 599–610, 2018.
- 17 CLIVATI, D. et al. **Reproductive biology and pollination of *Utricularia reniformis* A.St.-**  
18 **Hil. (Lentibulariaceae).** Plant Biology, v. 16, p. 677-682, 2014.
- 19 CROSS, A.T. et al. **Conservation of carnivorous plants in the age of extinction.** Global  
20 Ecology and Conservation, 2020.
- 21 CRUZ, D. et al. **Pollen morphology of selected species of Lentibulariaceae Rich. from**  
22 **Western Cuba based on light microscopy and its taxonomic implications.** Phytotaxa, v.  
23 350, p. 187-200, 2018.
- 24 DARWIN, C. **Insectivorous plants.** London: Murray, 1875.
- 25 ELLISON, A.M. & ADAMEC, L. **Carnivorous Plants: physiology, ecology, and evolution.**  
26 Oxford University Press, 2018.
- 27 FAEGRI, K. & VAN DER PIJL, L. **The Principles of Pollination Ecology.** 3rd edn.  
28 Pergamon, 1979.

- 1 FISCHER, E., POREMBSKI, S. & BARTHLOTT, W. **Revision of the genus *Genlisea***  
2 **(*Lentibulariaceae*) in Africa and Madagascar with notes on ecology and**  
3 **phytogeography.** Nordic Journal of Botany, v. 20, n° 3, p. 291-318, 2000.
- 4 FLEISCHMANN, A. & ROCCIA, A. Systematics and Evolution of *Lentibulariaceae*: I.  
5 *Pinguicula*. In: ELLISON AM & ADAMEC L. **Carnivorous Plants: physiology, ecology,**  
6 **and evolution.** Oxford University Press, 2018. Cap. 6, p. 70-80.
- 7 FLEISCHMANN, A. **A Monograph of the Genus *Genlisea*.** Poole: Redfern Historia Natural  
8 Productions Ltd., 2012.
- 9 FLEISCHMANN, A. et al. **Phylogenetics and character evolution in the carnivorous plant**  
10 **genus *Genlisea* A. St.-Hil. (*Lentibulariaceae*).** Molecular Phylogenetics and Evolution, v.  
11 56, p. 768-783 2010.
- 12 FLEISCHMANN, A. ***Pinguicula* flowers with pollen imitations close at night – some**  
13 **observations on butterwort flower biology.** Carnivorous Plants Newsletter, v. 45, p. 84-92,  
14 2016.
- 15 FLEISCHMANN, A. **Taxonomic *Utricularia* news.** Carnivorous Plants Newsletter, v. 44, p.  
16 13-16, 2015.
- 17 FROMM-TRINTA, E. **Revisão das espécies do gênero *Genlisea* st.—hil. (*lentibulariaceae*)**  
18 **das regiões sudeste e sul do brasil.** Rodriguésia, pp.17-139, 1979.
- 19 FROMM-TRINTA, E. **Revisão do gênero *Genlisea* st.- hil. (*lentibulariaceae*) no brasil.**  
20 boletim do museu nacional rio de janeiro, botanica, v. 61, p. 1–21, 1981.
- 21 FROMM-TRINTA, E. ***Tayloria* Fromm-Trinta - Nova Seção do gênero *Genlisea* St.-Hil.**  
22 **(*Lentibulariaceae*).** Boletim do Museu nacional do Rio de Janeiro n. s. Botânica, v. 44, p. 1-  
23 4, 1977.
- 24 GIVINISH, T. J. **New evidence on the origin of carnivorous plants.** Proceedings of the  
25 National Academy of Sciences, v. 112, n° 1, p. 10-11, 2015.
- 26 GRACE, J.B. **The adaptive significance of clonal reproduction in angiosperms: an**  
27 **aquatic perspective.** Aquatic Botany, v. 44, p. 159–180, 1993.

- 1 GUISANDE, C. et al. **Bladderworts**. Functional Plant Science and Biotechnology, v. 1, p.  
2 58–68, 2007.
- 3 GUPTA, C.K. & SEHGAL, A. **Pollination biology of *Indotristicha ramosissima***  
4 **(Podostemaceae: Tristichoideae)**. Aquatic botany, v. 91, n° 1, p. 51-56, 2009.
- 5 HATCHER, C.R.; RYVES, D.B. & MILLETT, J. **The function of secondary metabolites in**  
6 **plant carnivory**. Annals of Botany, v. 125, n° 3, p. 399-411, 2020.
- 7 HESLOP-HARRISON, Y. ***Pinguicula* L.** Journal of Ecology, v. 92, n° 6, p. 1071-118, 2004.
- 8 HILDEBRAND, F. **Weitere Beobachtungen fiber die Bestäubungsverhldtnisse an**  
9 **Bliithen. *Utricularia vulgaris***. Bot. Zeit., v. 27, p. 505, 1869.
- 10 HOBBAHN, N.; KÜCHMEISTER, H. & POREMBSKI, S. **Pollination Biology of Mass**  
11 **Flowering Terrestrial *Utricularia* Species (Lentibulariaceae) in the Indian Western**  
12 **Ghats**. Plant Biology, v. 8, p. 791-804, 2006.
- 13 HUYNH, K.L. **Étude de la morphologie du pollen du genre *Utricularia* L.** Pollen et spores,  
14 v. 10, p. 11-55, 1968.
- 15 JÉRÉMIE, J. **Autogamie dans le genre *Utricularia* L. (Lentibulariaceae)**. Bulletin du  
16 Muséum National d'Histoire Naturelle, section B, Adansonia, v. 11, p. 17–28, 1989.
- 17 JOBSON, R.W. & ALBERT, V.A. **Molecular Rates Parallel Diversification Contrasts**  
18 **between Carnivorous Plant Sister Lineages**. Cladistics, v. 18, n° 2, p.127-136, 2002.
- 19 JOBSON, R.W.; PLAYFORD, J.; CAMERON, K.M.; ALBERT, V.A. **Molecular**  
20 **phylogenetics of Lentibulariaceae inferred from plastid rps16 intron and trnL-F DNA**  
21 **sequences: implications for character evolution and biogeography**. Systematic Botany, v.  
22 1, p. 157-171, 2003.
- 23 JUNIPER, B.E.; ROBINS, R.J. & JOEL, D.M. **The Carnivorous Plants**. Academic Press  
24 Ltd., London, 1989.

- 1 KAMEYAMA, Y.; TOYAMA, M. & OHARA, M. **Hybrid origins and F1 dominance in**  
2 **the freefloating, sterile bladderwort, *Utricularia australis f. australis* (Lentibulariaceae).**  
3 American Journal of Botany, v. 92, n° 3, p. 469-476, 2005.
- 4 KAMEYAMA, Y.; TOYAMA, M. & OHARA, M. **Genetic Structure in Aquatic**  
5 **Bladderworts: Clonal Propagation and Hybrid Perpetuation.** Annals of Botany, v. 98, p.  
6 1017-1024, 2006a.
- 7 KAMEYAMA, Y.; TOYAMA, M. & OHARA, M. **Predominance of clonal reproduction,**  
8 **but recombinant origins of new genotypes in the free-floating aquatic bladderwort**  
9 ***Utricularia australis f. tenuicaulis* (Lentibulariaceae).** Journal of Plant Research, v. 19, n° 4,  
10 p. 357-362, 2006b.
- 11 KAUSIK, S.B. & RAJU, M.V. **A contribution to the floral morphology and embryology**  
12 **of *Utricularia reticulata* Smith.** Proceedings of the Indian Academy of Sciences, Springer  
13 India, v. 41, n° 4, p. 155-166, 1955.
- 14 KHANDURI, P. et al. **Reproductive biology of *Willisia arekaliana* (Podostemaceae), a**  
15 **freshwater endemic species of India.** Aquatic botany, 119:57-65, 2014.
- 16 KHOSLA, C. et al. **Pollination in the aquatic insectivore *Utricularia inflexa* var. *stellaris*.**  
17 Phytomorphology, v. 48, p. 417-425, 1998.
- 18 KNUTH, P. **Handbuch der blütenbiologie: unter zugrundelegung von Hermann Müllers**  
19 **werk:" Die befruchtung der blumen durch insekten".** W. Engelmann, v. 2, 1989.
- 20 KONDO, K. **A comparison of variability in *Utricularia cornuta* and *Utricularia juncea*.**  
21 American Journal of Botany, v. 59, n° 1, p. 23-37, 1972.
- 22 LEGENDRE, L. 2000. **The genus *Pinguicula* L. (Lentibulariaceae): an overview.** Acta  
23 Botanica Gallica, v. 147, n° 1, p. 77-95.
- 24 ***Lentibulariaceae* in Flora do Brasil 2020 em construção.** Jardim Botânico do Rio de  
25 Janeiro disponível em <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB146>>. Acesso  
26 em 23 set. 2020
- 27 LLORENS, C. et al. **A dynamical model for the *Utricularia* trap.** Journal of the Royal  
28 Society Interface, v. 9, n° 76, p. 3129-3139, 2012.

- 1 LLOYD, F. E. **The carnivorous plants**. Waltham, MA: Chronica Botanica, 1942.
- 2 LOBREAU-CALLEN, D. et al. **Morphologie et ultrastructure du pollen dans le genre**  
3 ***Utricularia* L. (Lentibulariaceae)**. Carnivorous Journal Of Botany, v. 77, p. 744-767, 1999.
- 4 LOWRIE, A. & PLACE, G. **Floral mimicry & pollinator observations in carnivorous**  
5 **plants**. Bulletin of Australian Carnivorous Plants Society, v. 20, n° 2, p. 10-15, 2001.
- 6 LOWRIE, A. **The *Utricularia capilliflora* complex**. Bull. of Australian CP Society, v. 14,  
7 1995.
- 8 LUSTOFIN, K. et al. **Do food trichomes occur in *Pinguicula* (Lentibulariaceae) flowers?**  
9 Annals of Botany, 2020.
- 10 LUSTOFIN, K. et al. **Flower nectar trichome structure of carnivorous plants from the**  
11 **genus butterworts *Pinguicula* L. (Lentibulariaceae)**. Protoplasma, v. 257, p. 245–259,  
12 2019.
- 13 MCPHERSON, S. **Carnivorous Plants and their Habitats**. Poole, Dorset, England: Redfern  
14 Historia Natural Productions Ltd., 2010.
- 15 MIRANDA, V.F.O et al **Lentibulariaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim  
16 Botânico do Rio de Janeiro, 2015.
- 17 MOLANO-FLORES, B. et al. **Reproductive ecology of three rare North American**  
18 ***Pinguicula* species**. Plant Species Biology, v. 33, p. 129-139, 2018.
- 19 MOLAU, U. **Reproductive ecology of the three Nordic *Pinguicula* species**  
20 **(Lentibulariaceae)**. Nord. J. Bot., v. 13, p. 149-157, 1993.
- 21 MÜLLER, H. **Alpenblumen, ihre Befruchtung durch Insekten und ihre Anpassung an**  
22 **dieselben**. Wilhelm Engelmann, Leipzig, 1881.
- 23 MÜLLER, K. et al. **Phylogeny of Lentibulariaceae based on sequences of *matK* and**  
24 **adjacent noncoding regions**. American Journal of Botany, v. 87, p. 145–146, 2000.
- 25 MÜLLER, K. et al. **Evolution of carnivory in Lentibulariaceae and the Lamiales**. Plant  
26 Biology, v. 6, p. 477–490, 2004.

- 1 MÜLLER, K.F.; BORSCH, T. & BARTHLOTT, W. **Recent progress in understanding the**  
2 **evolution of carnivorous Lentibulariaceae (Lamiales)**. *Plant Biology*, v. 8, 2006.
- 3 MÜLLER, U.K. et al. **Bladderworts, the smallest known suction feeders, generate inertia-**  
4 **dominated flows to capture prey**. *New Phytologist*, 2020.
- 5 NEWCOMBE, F.C. **The significance of the behavior of sensitive stigmas I**. *American*  
6 *Journal of Botany*, v. 9, p. 99-120, 1922
- 7 NEWCOMBE, F.C. **The significance of the behavior of sensitive stigmas II**. *American*  
8 *Journal of Botany*, v. 11, p. 85-93, 1924
- 9 PHILBRICK, C.T. & LES, D.H. **Evolution of aquatic angiosperm reproductive systems**.  
10 *Bioscience*, v. 46, n° 11, p. 813-26, 1996.
- 11 PHILBRICK, C.T. & RETANA, A.N. **Flowering phenology, pollen flow, and seed**  
12 **production in *Marathrum rubrum* (Podostemaceae)**. *Aquatic Botany*, v. 62, n° 3, p. 199-  
13 206, 1998.
- 14 PHILBRICK, C.T. **Aspects of floral biology, breeding system, and seed and seedling**  
15 **biology in *Podostemum ceratophyllum* (Podostemaceae)**. *Systematic Botany*, 166-74,  
16 1984.
- 17 PŁACHNO, B.J. et al. **Floral micromorphology of the Australian carnivorous**  
18 **bladderwort *Utricularia dunlopiae*, a putative pseudocopulatory species**. *Protoplasma*, v.  
19 253, p. 1463-1473, 2016.
- 20 PŁACHNO, B.J. et al. **Floral micromorphology of the bird-pollinated carnivorous plant**  
21 **species *Utricularia menziesii* R.Br. (Lentibulariaceae)**. *Annals of Botany*, v. 20, p. 1-8,  
22 2018a.
- 23 PŁACHNO, B.J. et al. **Flower palate structure of the aquatic bladderworts *Utricularia***  
24 ***bremii* Heer and *U. minor* L. from section *Utricularia* (Lentibulariaceae)**. *Protoplasma*, v.  
25 254, n° 5, p. 2007-2015, 2017.
- 26 PŁACHNO, B.J. et al. **Flower palate ultrastructure of the carnivorous plant *Genlisea***  
27 ***hispidula* Stapf with remarks on the structure and function of the palate in the subgenus**  
28 ***Genlisea* (Lentibulariaceae)**. *Protoplasma*, v. 255, p. 1139-1146, 2018c.

- 1 PŁACHNO, B.J. et al. **Life in the Current: Anatomy and Morphology of *Utricularia***  
2 ***neottioides***. International Journal of Molecular Sciences, v. 21, n° 12, 2020b.
- 3 PŁACHNO, B.J. et al. **Nectar trichome structure of aquatic bladderworts from the**  
4 **section *Utricularia* (Lentibulariaceae) with observation of flower visitors and pollinators.**  
5 Protoplasma, v. 255, p. 1053-1064, 2018b
- 6 PŁACHNO, B.J. et al. **Structural Features of Carnivorous Plant (*Genlisea*, *Utricularia*)**  
7 **Tubers as Abiotic Stress Resistance Organs.** International journal of molecular sciences, v.  
8 21, n. 14, p. 5143, 2020a.
- 9 PŁACHNO, B.J.; KOZIERADZKA-KISZKURNO, M. & ŚWIĄTEK, P. **Functional**  
10 **ultrastructure of *Genlisea* (Lentibulariaceae) digestive hairs.** Annals of Botany, v. 100, n°  
11 2, p. 195-203, 2007.
- 12 POPPINGA, S. et al. **Fastest predators in the plant kingdom: functional morphology and**  
13 **biomechanics of suction traps found in the largest genus of carnivorous plants.** Annals of  
14 Botany Plants, v. 8, p.1-25 2015.
- 15 POPPIUS, B.R. **Blombiologiska iakttagelser.** Acta Societatis pro fauna et flora fênica, v. 25,  
16 n°1, p. 1-53, 1903.
- 17 PUSHKAREVA et al. **Reproductive biology in *Pinguicula vulgaris* (Lentibulariaceae) in**  
18 **Leningrad region.** Botanicheskiy Zhurnal, 2018
- 19 RAYNAL-ROQUES, A. & JÉRÉMIE, J. **Biologic diversity in the genus *Utricularia*.** Acta  
20 Botanica Gallica, v. 152, n° 2, p. 177-186, 2005.
- 21 REIFENRATH, K. et al. **Trap architecture in carnivorous *Utricularia* (Lentibulariaceae).**  
22 Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants, v. 201, n° 8, p. 597-605, 2006.
- 23 REUT, M.S. & JOBSON, R.W. **A phylogenetic study of subgenus *Polypompholyx*: a**  
24 **parallel radiation of *Utricularia* (Lentibulariaceae) throughout Australasia.** Australian  
25 Systematic Botany, v. 23, n° 3, p. 152-161, 2010.
- 26 RIVADAVIA, F.; GONELLA P.M. & FLEISCHMANN, A. **A new and tuberous species of**  
27 ***Genlisea* (Lentibulariaceae) from campos rupestres of Brazil.** Systematic Botany, v. 38, n°  
28 2, p. 464-470, 2013.

- 1 RODONDI, G.; BERETTA, M.; ANDREIS, C. **Pollen morphology of alpine butterworts**  
2 **(*Pinguicula* L., Lentibulariaceae)**. Review of Palaeobotany and Palynology, v. 162, p. 1–10,  
3 2010.
- 4 RUTISHAUSER, R. & ISLER, B. **Developmental Genetics and Morphological Evolution**  
5 **of Flowering Plants, Especially Bladderworts (*Utricularia*): Fuzzy Arberian Morphology**  
6 **complements Classical Morphology**. Annals of Botany, v. 88, p. 1173-1202, 2001.
- 7 SCHÄFERHOFF, B. et al. **Towards resolving Lamiales relationships: insights from**  
8 **rapidly evolving chloroplast sequences**. BMC Evolutionary Biology, v. 10 n° 1, 2010.
- 9 SEGHAL, A. & GUPTA, C.K. **Pollination biology of *Indotristicha ramosissima***  
10 **(Podostemaceae: Tristichoideae)**. Aquatic Botany, v. 91, p. 5-56, 2009
- 11 SILVA, S.R. et al. **Molecular phylogeny of bladderworts: a wide approach of *Utricularia***  
12 **(Lentibulariaceae) species relationships based on six plastidial and nuclear DNA**  
13 **sequences**. Molecular phylogenetics and Evolution, v. 118, p. 244-64, 2018.
- 14 SILVA, S.R, et al. ***Genlisea hawkingii* (Lentibulariaceae), a new species from Serra da**  
15 **Canastra, Minas Gerais, Brazil**. Plos one, v. 15, 2020.
- 16 SIROVÁ, D.; ADAMEC, L. & VRBA, J. **Enzymatic activities in traps of four aquatic**  
17 **species of the carnivorous genus *Utricularia***. New Phytologist. 2003.
- 18 SOBRAL-LEITE, M. et al. **Anthecology and reproductive system of *Mourera fluviatilis***  
19 **(Podostemaceae): Pollination by bees and xenogamy in a predominantly anemophilous**  
20 **and autogamous family?** Aquatic Botany, v. 95, n° 2, p. 77-87, 2011.
- 21 SOHMA, K. **Pollen morphology of the japanese species of *Utricularia* L. and *Pinguicula***  
22 **L. with notes on fossil pollen of *Utricularia* from Japan**. Jour. Jap. Bot., v. 50, n°6, p. 165-  
23 179 & v. 50, n°7, p. 193-208, 1975.
- 24 TAYLOR, P. **The genus *Utricularia* - a taxonomic monograph**. Kew Bulletin Additional  
25 series XIV, 1989.
- 26 TEMPLE, P. et al. **True vivipary in two remarkable *Pinguicula* (Lentibulariaceae) from**  
27 **the Caribbean, *P. lignicola* and *P. casabitoana***. Carniv. Pl. Newslett., v. 49, n° 2, p. 75-83,  
28 2020.

- 1 THANIKAIMONI, G. **Pollen morphology of the genus *Utricularia***. Pollen et spores, v. 8, n°  
2 2, 1966.
- 3 VAN STEENIS, C.G.G.J. **Rheophytes of the world**: Supplement. Allertonia, v. 4, n° 5, p.  
4 267-330, 1987.
- 5 VAN STEENIS, C.G.G.J. **Rheophytes**. Proceedings of the Royal Society of Queensland, v.  
6 62, n° 6, 1952.
- 7 VILLEGAS, S.G. & ALCALÁ, R.E. **Reproductive ecology of the carnivorous plant**  
8 ***Pinguicula moranensis* (Lentibulariaceae)**. Plant Biology, 2018.
- 9 WHITEWOODS, C.D. et al. **Evolution of carnivorous traps from planar leaves through**  
10 **simple shifts in gene expression**. Science, v. 367, p. 91-6, 2020.
- 11 WILLIS, J.C. & BURKILL, I.H. **Flowers and Insects in Great Britain. Part III.**  
12 **Observations on the most Specialized Flowers of the Clova Mountains**. Annals of Botany,  
13 v. 17, n° 67, p. 539-570, 1903.
- 14 WINSTON, R.D. & GORHAM, P.R. **Turions and dormancy states in *Utricularia vulgaris***.  
15 Canadian Journal of Botany, v. 57, n° 24, p. 2740-2749, 1979.
- 16 YAMAMOTO, I. & KADONO, Y. **A study on reproductive biology of aquatic *Utricularia***  
17 **species in southwestern Japan**. Acta Phytotaxonomica et Geobotanica, v. 41, p. 189-200,  
18 1990.
- 19 ZAMORA, R. **Conditional outcomes of interactions: the pollinator-prey conflict of an**  
20 **insectivorous plant**. Ecology, v. 80, p. 786-795, 1999.
- 21 ZAMORA, R. **Importancia de la heterogeneidad ambiental en la ecología de plantas**  
22 **carnívoras mediterráneas: implicaciones para la conservación**. Revista chilena de historia  
23 natural, v. 75, n° 1, p. 17-26, 2002.

24  
25  
26  
27  
28  
29  
30

1

2

3 **Pollination ecology of a rheophyte carnivorous species: *Utricularia neottioides* A.St.-Hil.**

4

**& Girard (Lentibulariaceae)<sup>1</sup>**

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19 \*hugodolsan@gmail.com

20 **Running title:** Pollination ecology of *Utricularia neottioides*

---

<sup>1</sup> Formatado na forma de artigo científico para o periódico Flora. As normas estão anexadas no fim desse documento.

## 1 **Abstract**

2 *Utricularia* L. (Lentibulariaceae) is a large cosmopolitan genus of carnivorous plants. The  
3 family is present in different habitats, and has diverse flower morphology. Part of this  
4 diversity is possibly due to high nucleotide substitution rates, which, associated with the  
5 selective pressures, probably have an important role in *Utricularia* diversification. Studying  
6 the pollination biology of the genus is important to better understand the plant-pollinator  
7 ecology in extreme habitats, such as stream rocks. Few pollination studies focused on  
8 rheophytic species, and none of those regarding Lentibulariaceae. The aim of this study is to  
9 investigate the reproductive system of *U. neottioides* and to describe the pollination ecology,  
10 with focus on flower dimensions (adjustments), floral, visual and chemical traits  
11 (advertisements), and floral resource (primary attractant) in order to characterize the pathways  
12 involved in the interaction with different floral visitors and their consequences for the species  
13 sexual reproduction. The study was conducted within five patches of *U. neottioides* growing  
14 in two different shallow streams (Supl. Mat. 1). We described the floral events during  
15 anthesis, and male and female functions along flower lifespan. Floral visitors were observed  
16 at day and night time, and their behaviour and frequency of visits were recorded.  
17 Additionally, corolla reflectance was measured and floral scent (at day and night)  
18 characterized, in order to better understand the relation between this plant species and its  
19 floral visitors. The stigma in *U. neottioides* is sensitive and receptive since pre-anthesis bud  
20 stage until flower senescence. For the first time in the genus, non-syrphid Diptera were  
21 recorded as legitimate pollinators for the genus, able to transport pollen between different  
22 flowers. Also, for the first time, nocturnal pollination was reported for the family, specifically  
23 by nocturnal Diptera. Floral characteristics of *U. neottioides* do not clearly represent  
24 pollination syndrome for flies, even so, the three most representative visitors were Diptera  
25 species: Ceratopogonidae, Tipuloidea and one unidentified fly. Reflectance data and the floral  
26 scent data were sampled and are still going to be analysed. The results of the reproductive

1 system treatments were not collected, and the treatments will be made again (the experiments  
2 were aborted due to the pandemic). Flowers were protogynous, opened at day or night and  
3 lasted for five days. Based on the reflection data, Diptera possibly see the flower as green, but  
4 probably do not differentiate the petals from the white pollen. The flower scent became  
5 sweeter at night, and it was mainly pollinated by one species of Ceratopogonidae (to be  
6 identified), one species of fly (to be identified), and possibly a Tipuloidea. The visit rate was  
7 higher between 11:00 and 12:00 h, and between 13:00 and 14:00 h. For the first time this  
8 pattern of pollination was reported for the *Utricularia*.

9 **Keywords:** Ceratopogonidae; Diptera; floral scent; floral reflectance; Miophily; Brazil.

10

## 11 **1. Introduction**

12 The scarcity of pollinator reports in the family Lentibulariaceae is not consistent with  
13 its apparently attractive entomophilous floral characteristics, such as zygomorphic symmetry,  
14 throat-like corolla divided in two lips (upper and lower) that hide the reproductive organs,  
15 presence of spur, vibrant corolla colours, the presence of floral guides in many species and a  
16 wide palate with glandular trichomes that may act as osmophores (ungentarius) (Taylor, 1989;  
17 Płachno et al. 2016; 2017a; 2017b; 2018; 2019b; Fleischmann and Rocca, 2018; Jobson et al.  
18 2018).

19 *Utricularia*, which is the genus of Lentibulariaceae with the highest flower variation,  
20 has several studies regarding its reproductive biology without focusing on its pollinators  
21 (Jérémie, 1989; Kausik and Raju, 1995; Khosla et al., 1998; Araki and Kadono, 2003;  
22 Kameyama et al., 2005; Raynal-Roques and Jérémie, 2005; Kameyama et al., 2006a;  
23 Kameyama et al., 2006b; Płachno et al., 2017b). To date, only four studies provided detailed  
24 empirical data about the pollination of the genus (Hobbhahn et al., 2006; Clivati et al., 2014;

1 Aranguren et al., 2018; Chaudhary et al., 2018), reporting always bees as at least one of the  
2 main pollinators of the species.

3 *Utricularia neottioides* is one of the four torrenticolous rheophytes (Taylor, 1989;  
4 Adamec et al., 2015; Płachno et al., 2020) in the genus, confined to rocks in water streams,  
5 vulnerable to sudden changes in water level (Van Steenis, 1952; 1987). *U. neottioides* has  
6 anchor stolons that fixate the plant on the rocks with adhesive trichomes, preventing the  
7 individuals from being taken by the strong river flows of the summer rains (Rutishauser,  
8 2016; Płachno et al., 2020). The seed of rheophytic *Utricularia* normally present mucilage  
9 (Taylor, 1989), characteristic that is important for fixation on stream rocks, and possibly for  
10 fluctuation (Veloso et al. – in prep.). Among the *Utricularia* rheophytic species, there are two  
11 sections: sect. *Avesicaria* (from South America) and sect. *Avesicarioides* (from Africa). Both  
12 sections possess a very similar flower morphology, and similar vegetative morphology (such  
13 as claw-like rhizoids, and thin leaves) (Taylor, 1989). While most of *Utricularia* species have  
14 personate flowers with a gibbosity on the lower lip occluding the flower entrance (Taylor,  
15 1989; Guisande et al., 2007) and hiding its reproductive organs, some species have an  
16 entrance that shows up its reproductive organs, similarly to *U. neottioides* (Płachno et al.,  
17 2017b), suggesting that some of the shared features might be a selection not only for similar  
18 habitat, but also for similar pollinators associated to the same habitat.

19 Therefore, a study approaching the pollination ecology, correlating floral  
20 characteristics with floral visitors is important in order to increase our knowledge regarding  
21 the evolutionary adaptations to pollinators in the genus *Utricularia*. The aim of this work was  
22 to establish the most relevant pollinators for *U. neottioides*, and the role of each floral visitor  
23 of the species, connecting them and their behaviour with the species flower morphology and  
24 dimensions, and visual and chemical traits.

25

## 1 **2. Material and methods**

### 2 **2.1. Study site**

3 The study was conducted in a population of *Utricularia neottioides* located in the  
4 Serra da Canastra National Park, São Roque de Minas Municipality, Minas Gerais State  
5 (collecting under permits ICMBio/MMA/SISBIO #70131-1). The population is situated in a  
6 typical rupestrian grassland from savanna vegetation, with rocky and grassy formations,  
7 represented by families like Eriocaulaceae, Velloziaceae and Xyridaceae (Conceição et al.,  
8 2016; Silveira et al., 2016).

9 In this population, five patches in two different rivers ~400m between each other  
10 (Supl. Mat. 1) were discriminated as areas with high density of *Utricularia neottioides* to  
11 work with (>1000 flowers/m<sup>2</sup>). Flower samples were collected at site, fixed in alcohol and as  
12 exsiccate, and deposited in the JABU Herbarium, located in the São Paulo State University  
13 (Unesp), Jaboticabal (Brazil), as “Dolsan 41, 42 & 43”.

### 14 **2.2. Floral micromorphology and morphometry**

15 For the scanning electron microscopy (SEM), flowers were fixed in a mixture of 2.5%  
16 (v/v) or 5% (v/v) glutaraldehyde with 2.5% (v/v) formaldehyde in a 0.05-M cacodylate buffer  
17 (pH 7.2; Sigma), and some part of the material was fixed in 70% (v/v) ethanol, dehydrated,  
18 and subjected to critical drying point using liquid CO<sub>2</sub>. The samples were sputter-coated with  
19 gold and examined at an accelerating voltage of 20 kV using a Hitachi S-4700 scanning  
20 electron microscope (Hitachi, Tokyo, Japan) at the Institute of Geological Sciences,  
21 Jagiellonian University in Kraków. The SEM analyses were carried by Prof. Dr. Bartosz J.  
22 Płachno (Jagiellonian University, Poland) which is the collaborator of this study.

23 We will use plants fixed in 70% ethanol to measure the palate, diameter of throat  
24 entrance, height between the lower lip of the stigma and the lower lobe of the corolla,

1 diameter of the entrance of the calcar and end of the calcar will be done to describe the  
2 morphological adjustments between the flowers and visitors.

### 3 **2.3. Corolla reflectance**

4 A spectrophotometer was used to measure the reflectance in the wavelengths between  
5 300 and 700 nm (Jaz UV/Vis, Ocean Optics Inc., Florida, USA), and for the measurement,  
6 only the lower lip's lobes were used, because the small curvy parts of the corolla could not be  
7 measured by the device. Additionally, a photographic camera was used with a modified  
8 sensor, allowing the capture of light in the UV wavelengths (301 – 400 nm), so that it would  
9 be possible to see if there was any UV absorption/reflection pattern on the corolla.

10 To calculate the colour loci of the samples the categorical colour vision model of  
11 Troje (1993) for the Diptera was used. A green reflectance background (Chittka and Kevan,  
12 2005) with the standard daylight illumination D65 (Wysecki and Stiles, 1982) was applied.  
13 The colour represented by each locus was based on the colour discrimination capacities of  
14 *Lucilla* sp. considering the spectral sensitivity of *Musca domestica* (Hardie and Kirschfeld,  
15 1983; Troje, 1993; Lunau, 2014). According to this model, the colour vision of the fly is  
16 defined by the relative excitation value between four receptors of the two categories: Pale-  
17 type (R7p-R8p) and Yellow-type (R7y-R8y). The excitation value may result in four different  
18 categories of colours depending on which receptor of each category is more excited (UV = p+  
19 y+; purple = p+ y-; blue = p- y+; green = p- y-) (Lunau, 2014). The flies are also unable to  
20 distinguish colours within the same category (Troje, 1993).

### 21 **2.4. Floral scent**

22 Samples were collected from five freshly opened flowers of *U. neottioides* from  
23 morning to day time (07:00 to 17:00 h), and five from early night time (18:00 to 20:00 h),  
24 following the protocol of Dötterl et al. (2005). The flowers were previously wrapped with

1 polyethylene bags and the volatile compounds accumulated inside the bag (10 min) were  
2 collected in small tubes containing adsorbents, with the aid of an air suction pump with a flow  
3 of 200 mL / min. The duration of active collection was twenty minutes.

4 The adsorbent tubes were made from microtubes of 20 mm long and 2 mm internal  
5 diameter. These tubes were filled with a 1:1 mixture of Tenax-TA (60–80 mesh) and  
6 Carbotrap B (20–40 mesh), contained by glass wool. In addition to the volatile samples  
7 collected directly from the flowers, samples from the environment were also collected from  
8 the air near the populations to discriminate against possible contaminants and to check the  
9 unique volatiles of the flowers. Since vegetative parts of the plants were submerged, its  
10 volatiles were not collected.

11 The samples were stored in a freezer at approximately -20 °C until the time of analysis  
12 in a gas chromatograph coupled to a mass spectrometer (CG-EM). The volatile compounds  
13 will be identified through the interpretation and comparison between the mass spectra of the  
14 registered peaks and those of the library. We will use PERMANOVA to evaluate if there are  
15 differences between the volatiles emitted during daytime and nighttime. Finally, we will use  
16 Non-Metric Multidimensional Scaling (NMDS) to graphically represent such differences.  
17 This data is still being analysed.

## 18 **2.5. Floral biology**

19 The anthesis duration was registered by marking flowers with sewing thread and any  
20 change in flower colour, reproductive structures position, and functionality of male and  
21 female components throughout anthesis were observed and registered daily. The receptivity of  
22 the stigma surface was determined in pre-anthesis buds and functional flowers (n=10), using  
23 hydrogen peroxide on the stigma surface according to Dafni et al. (2005). Flowers were  
24 observed through anthesis every day to verify if there was any change in the position of  
25 anthers or stigma and to check the moment of anther dehiscence. For pollen viability, an

1 optimum germination media was obtained empirically following Dafni (1992) in September  
2 of 2019 using plants from Delfinópolis (Minas Gerais State). Later, pollen was set to  
3 germinate in March and April of 2020 using the optimum media and plants from the Serra da  
4 Canastra National Park. Additionally, triphenyl tetrazolium chloride (TTC) and acetic  
5 carmine were used to evaluate pollen viability (Dafni, 1992; Radford et al., 1974). Pollen was  
6 observed under light microscope (Leica) for counting the viable and inviable dyed pollen  
7 grains, and to evaluate the presence or not of pollen kit keeping grains together.

8

## 9 **2.6. Reproductive system**

10 Isolating flowers with bags is not possible due to the water level fluctuations (river  
11 floods). Treatments were conducted inside an isolation cage designed specially to isolate a  
12 whole patch of flowers in the river. Rocks with inflorescences from other populations were  
13 put inside the isolation cage, and all previously opened flowers were removed. The treatments  
14 involving manual pollen transfer were done using a beard hair glued to a sanded toothpick and  
15 magnifying glasses. The experiments had to be paralyzed in march of 2020 due to the  
16 COVID-19 pandemic.

## 17 **2.7. Floral visitors**

18 The five *U. neottioides* patches were observed in order to record the floral visitors  
19 from February 18<sup>th</sup> until March 21<sup>st</sup> of 2020. The numbers of visiting rounds (sequence of  
20 flowers visited within a patch), number of flowers visited in each round, the time spent in  
21 each flower during the visit and the insect behaviour during the visit were registered. Visitors  
22 were photographed and collected with a bridal veil net for taxonomic identification.

23 Observations were made on three different locations, and two different watercourses  
24 for 154 h during the daylight (between 07:00 and 18:00), and 10h at night and dusk, between

1 18:00-19:45 h. Observation hours were concentrated at the hottest hours between 08:00 and  
2 17:00 h (Supl. Mat. 2). Due to the intense visit rate, the small size of visitors (~0,3cm), their  
3 quick passage among flowers and their fast-visiting behaviour, each observer focused on one  
4 visitor, following it as long as possible and describing its behaviour immediately after.  
5 Measurements of the head length, head lateral size, dorsiventral thorax thickness, latero-  
6 lateral thorax thickness, mouthparts of the insects will be done and compared to the  
7 measurements of the flower in order to check if the body parts with deposited pollen touch the  
8 lower lip of the stigma, and if the visitor can access the rewards with its mouthparts. Visitors'  
9 samples will also be analysed using SEM to evaluate if they are carrying *Utricularia*  
10 *neottioides* pollen, and the where in the body it is being carried.

11 The number of visits per hour per patch was plotted in a LOESS regression with 95%  
12 confidence intervals, conducted using the R version 3.5.2 (R Development Core Team, 2018)  
13 with the “msir” package (Scrucca, 2011). The number of flowers from each patch was  
14 estimated by counting the number of flowers and was always superior to 500 flowers in every  
15 patch studied. Visitors were photographed and collected with a bridal veil net for taxonomic  
16 identification.

17

### 18 **3. Results**

#### 19 **3.1. Floral morphology and dimensions**

20 *Utricularia neottiodies* flowers have white to cream petals with papillae and glandular  
21 trichomes on the surface (increasing in number close to the throat), and a very small and bent  
22 spur (Fig. 1A, B, D and E and Fig. 2A). It also has a bilabiate stigma with a much bigger and  
23 sensitive lower lip, that bends upwards after being touched (resetting from 30 minutes to two  
24 and half hours later) (Fig. 1D and E). After bending up, the stigma reveals the anthers by

1 moving away from the entrance, therefore decreasing the chances of being self-pollinated by  
2 the visitor while it is leaving the flower.

3 Its flowers petals have a very high hydrophobicity, most likely to be a result of the  
4 high number of papillae present on the surface, varying from 150/mm<sup>2</sup> in the outer part of the  
5 palate, to 320/mm<sup>2</sup> near the throat (Fig. 2C and 3D); which allow the flower to form a  
6 protective bubble (Fig. 1F) when submerged, which possibly prevent the rinsing of the  
7 reproductive organs after river floods in the rainy season.

8 The floral morphometry analyses are still to be done.

### 9 **3.2. Corolla reflectance**

10 *Utricularia neottioides* corollas had a plateau of reflection between 480 and 700nm  
11 with almost 40% of reflectance (Fig. 4), falling within the visible spectrum of the flies as a  
12 green flower (Fig. 5).

### 13 **3.3. Floral scent**

14 The samples were not analysed yet because of the COVID-19 pandemic.

### 15 **3.4. Floral biology**

16 *Utricularia neottioides* patches were very dense (1500-3000 flowers/m<sup>2</sup>), measuring  
17 usually less than 2m length and up to 50cm width, bearing 1000-1500 inflorescences each.  
18 The new flower buds were constantly being generated at the top of each inflorescence (it only  
19 stops flowering when it dies), swinging and being shaken by the trembling stream, and even  
20 being sunk by river floods, being submerged for 5-12 h.

21 Each inflorescence was 1-3-flowered, flower opening was not synchronized among  
22 plants and occurred all along the day (from 07:00 to 20:00 h). The anthesis lasted for three to  
23 four days, after what the corolla detached from the plant and the ovary started swelling. After

1 seven days, the fruits were swollen, and will only drop their seeds if the plant dries out,  
2 usually because of the variation of the water level, caused by a few or many days without rain.  
3 Each capsule bears many seeds that float over the water and secrete sticky mucilage after wet.

4 The stigma was already receptive at flower buds, still receptive in mature flowers, and  
5 if stimulated, it closes and takes from 30 min to 2:30 h to return to its original opened state  
6 (n=10). The bending back to the original state took less than 30 minutes, even if it started  
7 returning two hours after stimulated. Flowers presented approach herkogamy (Webb and  
8 Lloyd, 1986) and the stigma bended after touch. The anthers were still closed when the flower  
9 started opening, and release the pollen within 24h. The pollen also contains pollen kit, which  
10 keeps the grains together. More than 90% of the pollen grains of *U. neottioides* germinated at  
11 10% sucrose, but the experiments made in July of 2019 (with plants from Delfinópolis, Minas  
12 Gerais State) and in March and April of 2020 (with plants from Serra da Canastra) were  
13 inconclusive: The pollen submitted to Acetyl acetate did not absorb the stain, and the pollen  
14 submitted to germination media did not germinate (two *Utricularia* species were submitted to  
15 these treatments simultaneously by other researches, and both failed to germinate).

16 During the anthesis, before the corolla drops, there is virtually no sign of flower  
17 senescence, and the smell of the flowers (to human perception) seems to differ between  
18 daytime and night-time, getting sweeter as night approaches.

### 19 **3.5. Reproductive system**

20 The experiment had to be paralyzed because of the COVID-19 pandemic.

### 21 **3.6. Floral visitors**

22 Many insects visited *Utricularia neottioides* flowers during the observation period,  
23 being most of them Diptera (Table 1). Three Diptera species apparently performed legitimate  
24 visits and were capable of transferring pollen from one flower to the stigma of different

1 flowers: one unidentified small fly, one species of Ceratopogonidae and one species  
2 belonging to Tipuloidea. Both the unidentified small fly and the one species of  
3 Ceratopogonidae were active day and night, having their peaks of visitation in the morning  
4 (9h) and midday (11h) respectively, while the Tipuloidea only visited the flowers at night  
5 (Fig. 3).

6 Even though the flies and the Ceratopogonidae species showed high frequency of  
7 visits, they visit  $1,92 \pm 1,17$  flowers per round (Table 1), and visited mostly sets of close  
8 flowers, occasionally visiting different patches sequentially. The Tipuloidea visited more  
9 flowers per round ( $8,5 \pm 0,5$ ), visiting different patches, but only between 19:00 and 20:00.

10 The unidentified small fly visits an average of three flowers per round (Table 1),  
11 jumping from one flower to another by going to a flower extremity (e.g. the lower lip),  
12 looking around for a target, lifting its rear end, and finally boosting itself in a straight line  
13 towards a new flower. The small fly spent more than a minute in each flower, touching the  
14 proboscis on the palate before going in, activating the sensitive stigma (usually the fly's head  
15 or prothorax touches the stigma first), and being pushed in the outside direction by it,  
16 sometimes being pressed a little against the petal, then entering and leaving the flower a few  
17 times, going as deep as possible, and finally leaving the flower with pollen on its arista, head  
18 and prothorax (Fig 6B). Before jumping to another flower, the fly usually cleans up the pollen  
19 from its body (probably eating it) by brushing its legs especially against the antennae (front  
20 legs), wings and back of the body (middle and back legs), but it did not remove the entire  
21 pollen, leaving part of the load attached to its body, even on the tip of its head. When many  
22 flies were foraging in the patch, they sometimes flew to a given flower, previously 'occupied'  
23 by another visitor, and displayed apparent territorial behaviour, fighting with other flies, and  
24 even other visitors (like the Ceratopogonidae). In order to avoid being hit by an incoming fly,  
25 the one that was already on the flower would kick the invading fly off using its back legs, so  
26 the invader couldn't land properly on the petals.

1           The Ceratopogonidae (*sp.4*) is usually much smaller than the unidentified small fly,  
2 but behaves similarly, pinching the palate with its proboscis before entering the flower, but  
3 differently from the heavier fly, the small biting midge have to push its body onto the stigma  
4 in order to get in, because the stigma in its relaxed state blocks its entrance, and its weight  
5 without force was not enough to activate the sensitive stigma, forcing the midge to push itself  
6 inside using its back legs. After the stigma bends upwards (often pushing the midge or  
7 pressing him against the flower wall), the path becomes clear and the midge can go inside the  
8 flower, entering and leaving many times, each time going deeper inside, sometimes  
9 completely disappearing, or showing only his rear end, then leaving with lots of pollen on its  
10 flagellum, head and prothorax (Fig. 6A). Before jumping to another flower (the same way as  
11 the small fly), the Ceratopogonidae cleaned up the pollen from its body by brushing its legs  
12 especially against the antennae (front legs), wings and back of the body (back legs), but it did  
13 not remove all of it, leaving grains even on its hairy flagellum.

14           The Tipuloidea had a very different behaviour, foraging at night and shaking every  
15 inflorescence it visits, even if the inflorescence wasn't being shaken by the stream, making it  
16 harder to acknowledge its presence between the thousand other shaky flowers. It has a fast-  
17 moving behaviour, spending fifteen seconds in each flower, then going to other ones in close  
18 inflorescences without flying, and finally flying to another patch nearby, where it usually  
19 performed other visit rounds. The only part of its body that gets in touch with the anthers and  
20 stigma is the long proboscis that is pushed and pulled from the flower a few times, shaking it  
21 and spreading out pollen through the whole body of the Tipuloidea, occasionally its legs also  
22 get stuck inside flowers for sustenance (Fig. 6C; Table 1).

23           Opportunists also appeared, such as praying mantis (Mantodea) and spiders (Fig 6F;  
24 Table 1), waiting for prey. Other Diptera species also showed up to steal floral resources (Fig.  
25 6E). The Muscidae were much bigger than the flower, and were not able to transfer pollen,  
26 but were still able to steal resources, including pollen, using their mouthparts; once, an ant

1 (Fig. 6F) and a beetle were also observed accessing resources, but every other time, these two  
2 were just stuck on the population, or passing by, just like Lepidoptera visitants (Fig. 6D). The  
3 patches were always surrounded by water, making it impossible for the ants to just come in or  
4 out of the patches without swimming or walking through any fallen twig, they would walk  
5 around inside the population looking for a way out for hours. The ants were neglected during  
6 the observations until one of them was seen inside a flower, apparently stealing resources  
7 (Fig. 6F).

### 8 **3.7. Visitors morphometry**

9 The visitors' data is still going to be collected.

10

## 11 **4. Discussion (Preliminary, based on partial data)**

### 12 **4.1. Floral morphology**

13 *Utricularia neottioides* has small flowers, ca. 2mm (Fig. 2A; Taylor 1989), with the  
14 papillae less concentrated on the petals outer surface (150/mm<sup>2</sup>), and more concentrated on  
15 the entrance of the flower (320/mm<sup>2</sup>), where the insects usually sip on for more time, but also  
16 many papillae can be found on the whole surface of the lower lip, differing from some other  
17 *Utricularia* with similar flowers with no gibbosity, like *Utricularia bremii* and *Utricularia*  
18 *minor* (Płachno et al., 2017b). These papillae are probably one factor responsible for the  
19 hydrophobicity that results in the bubble formation. The role of the bubble in other species is  
20 still unknown, but every other *Utricularia* and *Genlisea* flower submerged (*U. amethystina*,  
21 *U. laciniata*, *U. triloba*, *G. violaceae*) showed a similar, but less voluptuous bubble, raising  
22 questions about its origin and function. *U. neottioides* also has one of the smallest (and one of  
23 the few ornamented) microequinate pollen grains in the genus (Fig. 2B), measuring 15-  
24 20×17-20µm (Huynh 1968).

## 1 **4.2. Corolla reflectance**

2 The reflectance pattern of that the yellow pollen is the feature that triggers the most  
3 intense innate response in flies (Lunau, 2014), and *Utricularia neottioides* reflectance is  
4 within corolla is within the colour vision of the flies, also overlapping the yellow pollen  
5 reflectance pattern.

6 Because of the *U. neottioides* flowers' small size, and the limited vision capabilities of  
7 Diptera, the agglomeration of flowers and their shaking pattern in the running water may be  
8 extremely important for the Diptera to find the flowers, since it may strengthen the odour, and  
9 also many insects of this order are very good in perceiving fast-moving objects, being motile  
10 parts common attractants of Diptera (Troje, 1993; Woodcock et al., 2014).

## 11 **4.3. Floral scent**

12 The floral sent material is still going to be analysed

## 13 **4.4. Floral biology**

14 *Utricularia neottioides* showed approach herkogamy, a feature also present in all the  
15 other Lentibulariaceae, and some other *Utricularia* species (Knuth, 1899; Jérémie, 1989;  
16 Clivati et al., 2014; Chaudhary et al., 2018). The stigma protogyny (bud premature  
17 receptivity) is observed in other *Utricularia* species (Clivati et al., 2014; Chaudhary et al.,  
18 2018). Beyond the spatial separation of the reproductive organs, *U. neottioides* also has a  
19 sensitive stigma, which reduces the self-pollination chance, and increases the chance of cross-  
20 pollination (Webb and Lloyd, 1986; Newcombe, 1922). The sensitive stigma may be  
21 considered a plesiomorphic feature in the family, since it is already present in other Lamiales,  
22 and in the genus *Pinguicula* (Willis and Burkill, 1903; Newcombe, 1922; Newcombe, 1924;  
23 Heslop-Harrison, 2004).

1 Sensitive stigma is usually present in Bignoniaceae, Lentibulariaceae (*Utricularia*),  
2 Martyniaceae and Scrophulariaceae, being that hermaphroditic flowers, tubular corolla and  
3 bilabiate stigma are some common characteristics of species with sensitive stigma  
4 (Newcombe, 1922, 1924; Fetscher, 2002). In Lentibulariaceae there are only seven species  
5 reported as having sensitive stigma: *U. vulgaris* L. (Hildebrand, 1869), *U. alpina* Jaqc.  
6 (Jérémie, 1989), *U. reniformis* A. St.-Hil. (Clivati et al., 2014), *U. praeterita* P.Taylor, *U.*  
7 *reticulata* Sm., *U. babui* S.R.Yadav, Sardesai & S.P.Gaikwad , *U. albocaeruela* Dalzell  
8 (Chaudhary, 2018), and *U. neottioides* (present study).

#### 9 **4.5. Floral visitors**

10 Most of *Utricularia* species can be associated with the melitophilly syndrome, due to  
11 its colour and floral morphology (Faegri and Van der Pijl, 1979; Proctor and Yao, 1996),  
12 almost always depending on a strong insect to access its floral rewards and pollinate them,  
13 and most visitors already reported for *Utricularia* were considered generalists, since the  
14 insects that visited the flowers of *Utricularia* were usually seen visiting other similar flowers  
15 nearby or carrying other species pollen (Aranguren et al., 2018; Hobbhan et al., 2018).

16 Even though they are neglected, Diptera are important pollinators, for both crops  
17 (Ssybank et al., 2008) and native plants (Larson et al., 2001; Raguso, 2020). Diptera cannot  
18 be nested inside a pollination system due to their diversity of physiological characteristics  
19 (making them respond to stimuli in different ways) (Larson et al., 2001; Inouye et al., 2015;  
20 Raguso, 2020). The order is usually associated with a generalist Dipter syndrome (“small and  
21 open, flat or shallow bowl-shaped, radially symmetrical flowers, often clustered, white to  
22 cream petals; mild, sweet or musty smells; flower opens at daytime and nectar is exposed with  
23 high concentrations and low volume”; Willmer, 2011), or a highly specialized pollination  
24 syndrome, almost always associated with rot smell and fungus or meat mimicry when we are  
25 not thinking about the long-tongued flies and Syrphidae (Faegri and Van der Pijl, 1979;

1 Manning and Goldblatt, 1996; Proctor and yao, 1996; Pauw et al., 2009; Endara et al., 2010).  
2 This study demonstrated that *U. neottioides* flower morphology fits into the miophily  
3 syndrome, and the species was very effective on attracting Diptera, apparently without  
4 appealing to visual mimicry (like motile or dark and purple appendages, rotten smell, fungi  
5 smell or meat-mimicry).

6 Ceratopogonidae can search flowers for nectar, pollen, oviposition site or even be  
7 deceived, and when they are the most relevant visitors (Larson et al., 2001; Blanco and  
8 Barboza, 2005; Diaz and Kite, 2006; Woodstock et al., 2014; Inouye et al., 2015; Garden,  
9 2019), the Ceratopogonidae are usually associated with flowers that simulate breeding sites,  
10 oviposition surfaces, blackish and violet colours or even pseudocopulatory systems (Larson et  
11 al., 2001; Blanco and Barboza, 2005; Diaz and Kite, 2006; Woodstock et al., 2014; Inouye et  
12 al., 2015; Garden, 2019). When the flower doesn't fit these characteristics, they are  
13 commonly irrelevant generalists, or secondary visitors, like in the cocoa plant (O' Doherty  
14 and Zoll, 2012) and in some palms (Knudsen et al., 2001). Ceratopogonidae can also be found  
15 as visitors in the Araceae family (Gibernau et al., 2004; Dötterl et al., 2012), Apocynaceae  
16 (Ollerton et al., 2009), Aristolochiaceae (Burgess et al., 2004), Ericaceae (Cutler et al., 2012),  
17 Iridaceae (Goldblatt et al., 2005), and Orchidaceae (Blanco and Barbosa, 2005; Bogarín et al.,  
18 2018, 2019; Garden, 2019). The fact that none of the many flowers of these families visited  
19 by Ceratopogonidae look like *U. neottioides* only proves that few is known about their role as  
20 pollinators.

21 The visiting flies are usually small flies, which are relatively common visitors of many  
22 flowers as generalists, since they can feed on exposed pollen and nectar (Larson et al., 2001;  
23 Woodstock et al., 2014; Inouye et al., 2015). Flies are found as visitors in many species of  
24 plants, in many families, acting as pollinators, generalists, predators or being deceived  
25 (Larson et al., 2001; O' Doherty and Zoll, 2012; Woodstock et al., 2014; Inouye et al., 2015).  
26 The capacity of *Utricularia neottioides* to attract several visitors at the same time is

1 impressive, even sometimes more than three visitors were present on the same inflorescence.  
2 The presence of many visitors would sometimes result in aggressive behaviour, with flies  
3 kicking each other and other visitors off the flowers, which may result in a single fly visiting  
4 all the flowers of an inflorescence, increasing the chances of geitonogamy (if this fly was the  
5 first visitor of the inflorescence). The flies bigger than the flowers of *U. neottioides* were not  
6 very representative, and seemed to only steal resources, but they did not stay much time in the  
7 population, probably due to the small amount of resources available (Larson et al., 2001;  
8 Willmer, 2001).

9 For the latter, not much is known about Tipuloidea as pollinators, except that they are  
10 usually nocturnal visitors and may feed on nectar frequently on flowers forming dense  
11 clusters, with exposed nectar or nectar stored inside small tubes (Primack, 1983; Proctor et al.,  
12 1996; Larson et al., 2001; Inouye et al., 2015). Tipuloidea can be efficient pollinators in  
13 orchids (Ackerman and Mesler, 1979; Nilsson, 1981; Singer, 2001; Singer et al., 2007) and  
14 Balanophoraceae (Vislobokov and Galinskava, 2018), but not much is known about their  
15 behaviour and preferences.

16 Among all the visitors, the ants were the most unexpected ones, because since the  
17 plants are in the middle of river streams, only ants that were swimming or fell in the water  
18 would be able to access the flowers and steal their resources. The ants were neglected at first,  
19 but at least two flower visits and six visits on the vegetative parts were observed (all  
20 apparently belonging the same ant species). The ants were seen floating on the water,  
21 grabbing on the floral axis and moving between them for long periods (more than one hour).  
22 The beetles also came from the water, without flying. Even though we only observed  
23 nocturnal floral visitors for five hours, we still could find direct evidence of night pollination  
24 (legitimate visitors) and indirect evidence (e.g. strong smell, predators near the flowers,  
25 flowers that open at day or night).

1

## 2 **5. Conclusion (partial)**

3 *Utricularia neottioides* flower opening was not synchronized among plants and  
4 occurred all along the day and lasted for five days, being primarily female, with its stigma  
5 receptive before the flower opens, and exposing the pollen in the first day of anthesis. The  
6 reflectance of the flower demonstrates that Diptera can see the flower (as a green flower, in  
7 their vision), but probably cannot differentiate the petals from the pollen. Its smell shifted  
8 between day and night (becoming sweeter at night), suggesting a shift in the visitors. It was  
9 mainly visited and possibly pollinated by non-syrphid Diptera, being a species of  
10 Ceratopogonidae its main potential pollinator, followed by an unidentified small fly, and  
11 possibly a Tipuloidea. The flowers had a high visit rate at the hottest hours of the day  
12 (between 11:00 and 12:00 h or between 13:00 and 14:00), decreasing the visit rate as night  
13 approaches, before finally shifting the visitors at night (from many Diptera bigger or smaller  
14 than the flower, beetles and ants, to only Ceratopogonidae sp.4., ‘unidentified small fly’,  
15 Tipuloidea and Lepidoptera). For the first time this pattern of Diptera-pollination was reported  
16 for the *Utricularia*, and has never been reported in any Lentibulariaceae.

17

## 18 **6. Next steps**

19 Future researches in other flowers of *Utricularia* with the same archetype of  
20 *Utricularia neottioides* (dense populations fixed in streams, shaking their clustered  
21 inflorescences bearing flowers ca. 1cm, with white to cream petals, reduced calcar and an no  
22 gibbosity hiding the reproductive organs) are necessary in order to understand why this  
23 uncommon floral morphology has evolved independently in different lineages, associated  
24 with the same torrenticolous rheophytic habitat, and if it could be indeed correlated with an  
25 adaptation to pollination by small Dipters.

1           The remaining experiments of stigma receptivity and pollen viability were paralyzed  
2 due to the COVID-19 pandemic, as well as the observations, identification of the insects by  
3 specialists, Scanning electron microscopy (SEM), morphometry, scent analysis, and  
4 reproductive systems. Since the Pandemic started in the middle of our field work, some  
5 experiments could not be replicated as much as desired, and the reproductive system  
6 (geitonogamy, autonomous self-pollination and xenogamy) works that were realized had to be  
7 abandoned before we could check the results. All the experiments and analyses that were  
8 paralysed will be realized after the COVID-19 pandemic is over.

9

## 10 **7. Acknowledgements**

11           Funding: The present work was done with the support of the “Coordenação de  
12 Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior -Brasil (CAPES)” – Code of funding 001.

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23

## 8. References

Ackerman, J.D., Mesler, M.R., 1979. Pollination biology of *Listera cordata* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 66, 820-824.

Araki, S., Kadono, Y., 2003. Restricted seed contribution and clonal dominance in a free-floating aquatic plant *Utricularia australis* R.Br. in southwestern Japan. *Ecological Research* 18, 599–609.

Aranguren, Y., Płachno, B.J., Stpiczynska, M., Miranda, V.F.O., 2018. Reproductive biology and pollination of the carnivorous *Genlisea violacea* (Lentibulariaceae). *Plant Biology* 20, 591-601.

Baillon, H., 1892. *Historie des plantes. Monographie des primulacées, Utriculariacées, Plombaginacées, Polygonacées, Juglandacées et Loranthacées.* Paris: Librairie de Hachette et C. ie, Boulevard de Saint-Germain 77, King William Street, Strad.

Blanco, M.A., Barboza, G., 2005. Pseudocopulatory pollination in *Lepanthes* (Orchidaceae: Pleurothallidinae) by fungus gnats. *Annals of Botany* 95, 763-772.

- 1 Bogarín, D., Fernández, M., Borkent, A. et al., 2018. Pollination of *Trichosalpinx*  
2 (Orchidaceae: Pleurothallidinae) by biting midges (Diptera: Ceratopogonidae). Botanical  
3 Journal of the Linnean Society 186, 510-543.
- 4 Bogarín, D., Fernández, M., Karremans, A., Pupulin, F., Smets, E., Gravendeel, B., 2019.  
5 Floral anatomy and evolution of pollination syndromes in *lepanthes* and close relatives.  
6 Systematics Conference papers.
- 7 Burgess, K.S., Singfield, J., Melendez, V., Kevan, P.G., 2004. Pollination biology of  
8 *Aristolochia grandiflora* (Aristolochiaceae) in Veracruz, Mexico. Annals of the Missouri  
9 Botanical Garden 1, 346-56.
- 10 Chaudhary, A., Yadav, S.R., Rajesh, T., 2018. Delayed selfing ensures reproductive assurance  
11 in *Utricularia praeterita* and *Utricularia babui* in Western Ghats. Journal of Plant Research  
12 131, 599–610.
- 13 Chittka, L., Kevan, P.G., 2005. Flower colour as advertisement. In: Dafni A, Kevan PG,  
14 Husband BC (eds) Practical pollination biology Environquest Ltd. Cambridge 157–196.
- 15 Clivati, D., Cordeiro, G.D., Płachno, B.J., Miranda, V.F.O., 2014. Reproductive biology and  
16 pollination of *Utricularia reniformis* A.St.-Hil. (Lentibulariaceae). Plant Biology 16, 677-682.
- 17 Conceição, A.A., Rapini, A., do Carmo, F.F. et al., 2016. Rupestrian grassland vegetation,  
18 diversity, and origin. In Ecology and conservation of mountaintop grasslands in  
19 Brazil. Springer 105-127.
- 20 Cutler, G.C., Reeh, K.W., Sproule, J.M., Ramanaidu, K., 2012. Berry unexpected: nocturnal  
21 pollination of lowbush blueberry. Canadian Journal of Plant Science 92, 707-711.
- 22 Dafni, A., 1992. Pollination ecology: a practical approach. Oxford University Press, Oxford,  
23 UK.

- 1 Diaz, A., Kite, G.C., 2006. Why be a rewarding trap? The evolution of floral rewards in *Arum*  
2 (*Araceae*), a genus characterized by saprophilous pollination systems. *Biological Journal of*  
3 *the Linnean Society* 88, 257-268.
- 4 Dötterl, S., Jahreiß, K., Jhumur, U.S., Juergens, A., 2012. Temporal variation of flower scent  
5 in *Silene otites* (*Caryophyllaceae*): a species with a mixed pollination system. *Botanical*  
6 *Journal of the Linnean Society* 169,3 447-460.
- 7 Dötterl, S., Wolfe, L.M., Jürgens, A., 2005. Qualitative and quantitative analyses of flower  
8 scent in *Silene latifolia*. *Phytochemistry* 66, 203-213.
- 9 Endara, L., Grimaldi, D., Roy, B., 2010. Lord of the flies: pollination of *Dracula*  
10 orchids. *Lankesteriana*.
- 11 Faegri, K., Van der Pijl, L., 1979. *The Principles of Pollination Ecology*. Oxford: Pergamon  
12 Press.
- 13 Fetscher, A.E., Rupert, S.M. and Kohn, J.R., 2002. Hummingbird foraging position is altered  
14 by the touch sensitive stigma of bush monkey flower. *Oecologia* 133, 551-558.
- 15 Fleischmann, A., Rocca, A., 2018. Systematics and evolution of *Lentibulariaceae*: I.  
16 *Pinguicula*. In: *Carnivorous plants: physiology, ecology, and evolution*. Oxford University  
17 Press 70-80.
- 18 Garden, L.B., 2019. The *Pleurothallidinae*: extremely high speciation driven by pollinator  
19 adaptation. *Systematics Conference paper*.
- 20 Gibernau, M., Macquart, D., Przetak, G., 2004. Pollination in the genus *Arum*— a  
21 review. *Aroideana* 27, 148-166.

- 1 Goldblatt, P., Manning, J.C., Bernhardt, P., 2005. The Floral Biology of *Melasphaerula*  
2 (Iridaceae: Crocoideae): Is This Monotypic Genus Pollinated by March Flies (Diptera:  
3 Bibionidae)? *Annals of the Missouri Botanical Garden* 1, 268-74.
- 4 Guisande, C., 2007. Bladderworts. *Funct Plant Sci Biotechnol* 1, 58-68.
- 5 Hardie, R.C., Kirschfeld K. 1983. Ultraviolet sensitivity of fly photoreceptors R7 and R8:  
6 evidence for a sensitising function. *Biophys Struct Mech* 9, 171–180.
- 7 Heslop-Harrison, Y., 2004. Biological flora of the british isles: *Pinguicula*. *Journal of ecology*  
8 92, 1071-1118.
- 9 Hildebrand, F. 1869. Weitere Beobachtungen fiber die Bestäubungsverhldtnisse an Bliithen.:  
10 *Utricularia vulgaris*. *Botanische Zeitung* 27.
- 11 Hobbahn, N., Küchmeister, H., Porembski, S., 2006. Pollination biology of mass flowering  
12 terrestrial *Utricularia* species (Lentibulariaceae) in the Indian Western Ghats. *Plant Biology*  
13 8, 791–804.
- 14 Huynh, K.L., 1968. Étude de la morphologie du pollen du genre *Utricularia* L. *Pollen et*  
15 *spores* 10, 11-55.
- 16 Inouye, D.W., Larson, B.M., Ssymank, A., Kevan, P.G., 2015. Flies and flowers III: ecology  
17 of foraging and pollination. *Journal of Pollination Ecology* 16, 115-133.
- 18 Jérémie, J., 1989. Autogamie dans le genre *Utricularia* L. (Lentibulariaceae). *Bulletin du*  
19 *Museum National d’Histoire Naturelle* 11, 17–28.
- 20 Jobson, R.W., Baleeiro, P.C., Guisande, C., 2018. Systematics and evolution of  
21 Lentibulariaceae: III. *Utricularia*. In: *Carnivorous plants: Physiology, ecology, and evolution*.  
22 Oxford University Press 89-104.

- 1 Kameyama, Y., Toyama, M., Ohara, M., 2005. Hybrid origins and F1 dominance in the  
2 freefloating, sterile bladderwort, *Utricularia australis* f. *australis* (Lentibulariaceae). American  
3 Journal of Botany 92, 469-476.
- 4 Kameyama, Y., Toyama, M., Ohara, M., 2006a. Genetic Structure in Aquatic Bladderworts:  
5 Clonal Propagation and Hybrid Perpetuation. Annals of Botany 98, 1017–1024.
- 6 Kameyama, Y., Toyama, M., Ohara, M., 2006b. Predominance of clonal reproduction, but  
7 recombinant origins of new genotypes in the free-floating aquatic bladderwort *Utricularia*  
8 *australis* f. *tenuicaulis* (Lentibulariaceae). Journal of Plant Research 19, 357-362.
- 9 Kausik, S.B., Raju, M.V., 1955. A contribution to the floral morphology and embryology of  
10 *Utricularia reticulata* smith. In: Proceedings of the Indian Academy of Sciences-Section B.  
11 Springer India 41, 155-166.
- 12 Khosla, C., Shivanna, K.R., Mohan Ram, H.Y., 1998. Pollination in the aquatic insectivore  
13 *Utricularia inflexa* var. *stellaris*. Phytomorphology 48, 417-425.
- 14 Knudsen, J.T., Tollsten, L., Ervik, F., 2001. Flower scent and pollination in selected  
15 neotropical palms. Plant Biology 3, 642-53.
- 16 Larson, B.M.H., Kevan, P.G., Inouye, D.W., 2001. Flies and flowers: taxonomic diversity of  
17 anthophiles and pollinators. The Canadian Entomologist 133, 439-465.
- 18 Lowrie, A., Place, G., 2001. Floral mimicry and pollinator observations in carnivorous plants.  
19 Bulletin of Australian Carnivorous Plants Society 20, 10-15
- 20 Lunau, K., 2014. Visual ecology of flies with particular reference to colour vision and colour  
21 preferences. Journal of Comparative Physiology A 200, 497-512.

- 1 Manning, J.C., Goldblatt, P., 1996. The *Prosoeca peringueyi* (Diptera: Nemestrinidae)  
2 pollination guild in southern Africa: long-tongued flies and their tubular flowers. *Annals of*  
3 *the Missouri Botanical Garden* 67-86.
- 4 Newcombe, F.C., 1922. The significance of the behaviour of sensitive stigmas I. *American*  
5 *Journal of Botany* 9, 99-120.
- 6 Newcombe, F.C., 1924. The significance of the behaviour of sensitive stigmas II. *American*  
7 *Journal of Botany* 11, 85-93.
- 8 Nilsson, L.A., 1981. The pollination ecology of *Listera ovata* (Orchidaceae). *Nordic Journal*  
9 *of Botany* 1, 461-480.
- 10 O' Doherty, D.C., Zoll, J.J., 2012. *Forcipomyia hardyi* (Diptera: Ceratopogonidae), a potential  
11 pollinator of cacao (*Theobroma cacao*) flowers in Hawaii. *Proceedings of the Hawaiian*  
12 *Entomology society* 44, 79-81.
- 13 Ollerton, J., Masinde, S., Meve, U., Picker, M., Whittington, A., 2009. Fly pollination in  
14 *Ceropegia* (Apocynaceae: Asclepiadoideae): biogeographic and phylogenetic  
15 perspectives. *Annals of Botany* 103, 1501-1514.
- 16 Pauw, A., Stofberg, J., Waterman, R.J., 2009. Flies and flowers in Darwin's race. *Evolution:*  
17 *International Journal of Organic Evolution* 63, 268-279.
- 18 Płachno, B.J., Adamec, L., Świątek, P., Kapusta, M., Miranda, V.F.O., 2020. Life in the  
19 Current: Anatomy and Morphology of *Utricularia neottioides*. *International Journal of*  
20 *Molecular Sciences* 21.
- 21 Płachno, B.J., Stpiczyńska, M., Adamec, L., Miranda, V.F.O., Świątek, P., 2018. Nectar  
22 trichome structure of aquatic bladderworts from the section *Utricularia* (Lentibulariaceae)  
23 with observation of flower visitors and pollinators. *Protoplasma*.

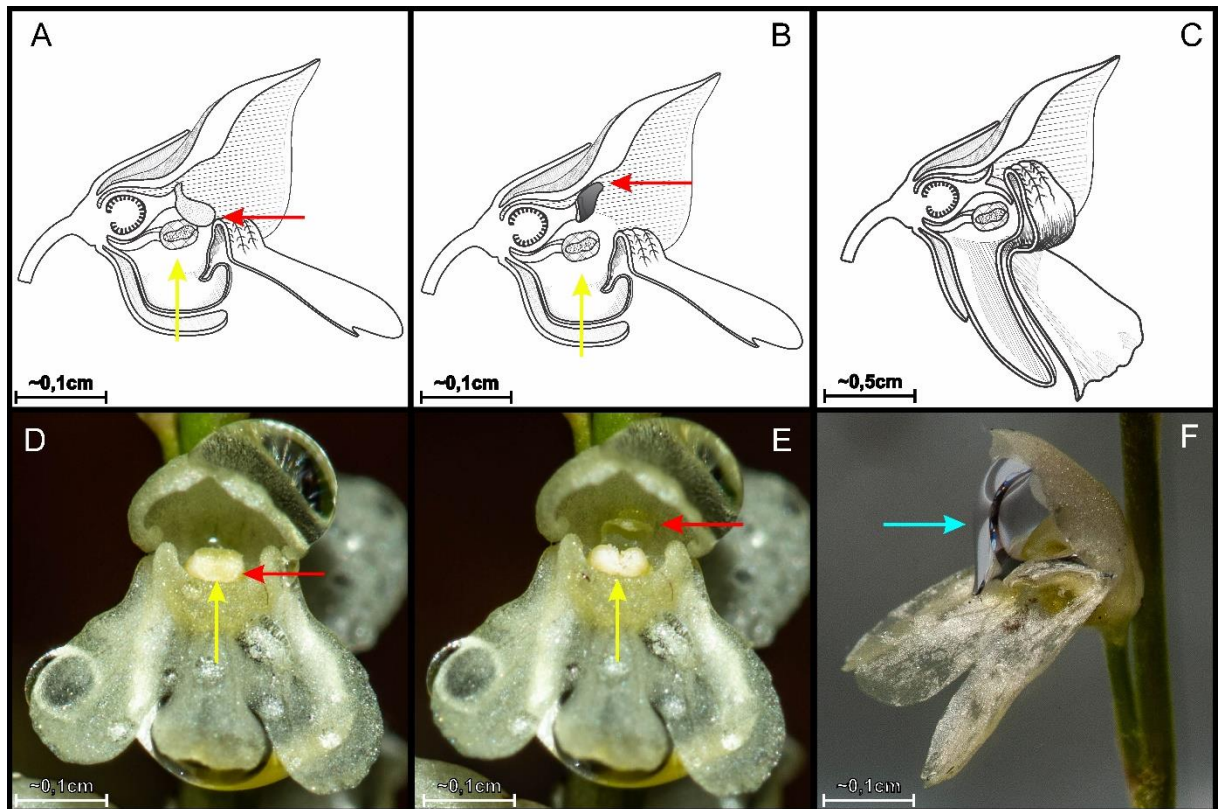
- 1 Płachno, B.J., Stpiczyńska, M., Davies KL, Świątek, P., Miranda, V.F.O., 2017a. Floral  
2 ultrastructure of two Brazilian aquatic-epiphytic bladderworts: *Utricularia cornigera*  
3 Studnička and *U. nelumbifolia* Gardner (Lentibulariaceae). Protoplasma.
- 4 Płachno, B.J., Stpiczyńska, M., Krajewski Ł, Świątek, P., Adamec L, Miranda, V.F.O.,  
5 2017b. Flower palate structure of the aquatic bladderworts *Utricularia bremii* Heer and *U.*  
6 *minor* L. from section *Utricularia* (Lentibulariaceae). Protoplasma.
- 7 Płachno, B.J., Stpiczyńska, M., Świątek, P., et al. 2019a. Floral micromorphology and nectar  
8 composition of the early evolutionary lineage *Utricularia* (subgenus *Polypompholyx*,  
9 Lentibulariaceae). Protoplasma.
- 10 Płachno, B.J., Stpiczyńska, M., Świątek, P., et al. 2019b. Floral micromorphology of the bird-  
11 pollinated carnivorous plant species *Utricularia menziesii* R. Br. (Lentibulariaceae). Annals of  
12 botany.
- 13 Płachno, B.J., Stpiczyńska, M., Świątek, P., Davies KL. 2016. Floral micromorphology of the  
14 Australian carnivorous bladderwort *Utricularia dunlopii*, a putative pseudocopulatory species.  
15 Protoplasma.
- 16 Primack, R.B., 1983. Insect pollination in the New Zealand mountain flora. New Zealand  
17 Journal of Botany 21, 317-333.
- 18 Proctor, M., Yeo, P., Lack, A., 1996. The natural history of pollination. HarperCollins  
19 Publishers.
- 20 R Development Core Team. 2018. R Software. R: a language and environment for statistical  
21 computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. <https://www.r-project.org/>.
- 22 Radford, A.E., Dickison, W.C., Massey, J.R., Bell C.R., Vascular Plant Systematics. Harper  
23 and Row Publishers, New York, p. 891, 1974.

- 1 Raguso, R.A., 2020. Don't forget the flies: dipteran diversity and its consequences for floral  
2 ecology and evolution. *Applied Entomology and Zoology*, 1-7.
- 3 Raynal-Roques, A. and Jérémie, J., 2005. Biologic diversity in the genus *Utricularia*. *Acta*  
4 *Botanica Gallica* 152, 177-186.
- 5 Rutishauser, R., 2016. Evolution of unusual morphologies in Lentibulariaceae (bladderworts  
6 and allies) and Podostemaceae (river-weeds): a pictorial report at the interface of  
7 developmental biology and morphological diversification. *Annals of Botany*.
- 8 Scrucca, L., 2011. Model-based {SIR} for dimension reduction. *Computational Statistics and*  
9 *Data Analysis* 5, 3010–3026.
- 10 Silveira, F.A.O., Negreiros, D., Barbosa, N.P.U. et al., 2016. Ecology and evolution of plant  
11 diversity in the endangered campo rupestre: a neglected conservation priority. *Plant and Soil*  
12 403, 129–152.
- 13 Singer, R.B., Breier, T.B., Flach, A., Farias-Singer, R., 2007. The pollination mechanism of  
14 *Habenaria pleiophylla* Hoehne and Schlechter (Orchidaceae: Orchidinae). *Functional*  
15 *Ecosystems and Communities* 1, 10-14.
- 16 Singer, R.B., 2001. Pollination biology of *Hebenaria Parviflora* (Orchidaceae: Habenariinae)  
17 in southeastern Brazil. *Darwiniana* 201-207.
- 18 Ssymank, A., Kearns, C.A., Pape, T., Thompson, F.C., 2008. Pollinating flies (Diptera): a  
19 major contribution to plant diversity and agricultural production. *Biodiversity* 9, 86-89.
- 20 Taylor, P., 1989. The genus *Utricularia*: a taxonomic monograph. London: HMSO.
- 21 Troje, N., 1993. Spectral categories in the learning behaviour of blowflies. *Zeitschrift für*  
22 *Naturforschung C* 48, 96-104.

- 1 Veloso, L.F., Seber, G.C., Płachno, B.J., Miranda, V.F.O., 2019. Aspectos morfológicos do  
2 desenvolvimento pós-seminal de *Utricularia neottioides* A.St.-Hil. and Girard  
3 (*Lentibulariaceae*). XXI Congresso de Iniciação Científica da Unesp.
- 4 Vislobokov, N.A., Galinskaya, T.V., 2018. Pollination ecology of two co-occurring species of  
5 *Balanophora*: differences in range of visitors and pollinators. International Journal of Plant  
6 Sciences 179, 341-349.
- 7 Webb, C.J., Lloyd, D.G., 1986. The avoidance of interference between the presentation of  
8 pollen and stigmas in angiosperms II. Herkogamy. New Zealand Journal of Botany 24,: 163–  
9 178.
- 10 Willis, J.C., Burkill, I.H., 1903. Flowers and Insects in Great Britain. Part III. Observations on  
11 the most Specialized Flowers of the Clova Mountains. Annals of Botany 17, 539-570.
- 12 Willmer, P., 2011. Pollination and floral ecology. Princeton University Press.
- 13 Woodcock, T.S., Larson, B.M., Kevan, P.G., Inouye, D.W., Lunau, K., 2014. Flies and  
14 flowers II: floral attractants and rewards. Journal of Pollination Ecology, 12, 63-94.
- 15
- 16
- 17
- 18
- 19
- 20
- 21
- 22

1 **9. Figure captions**

2

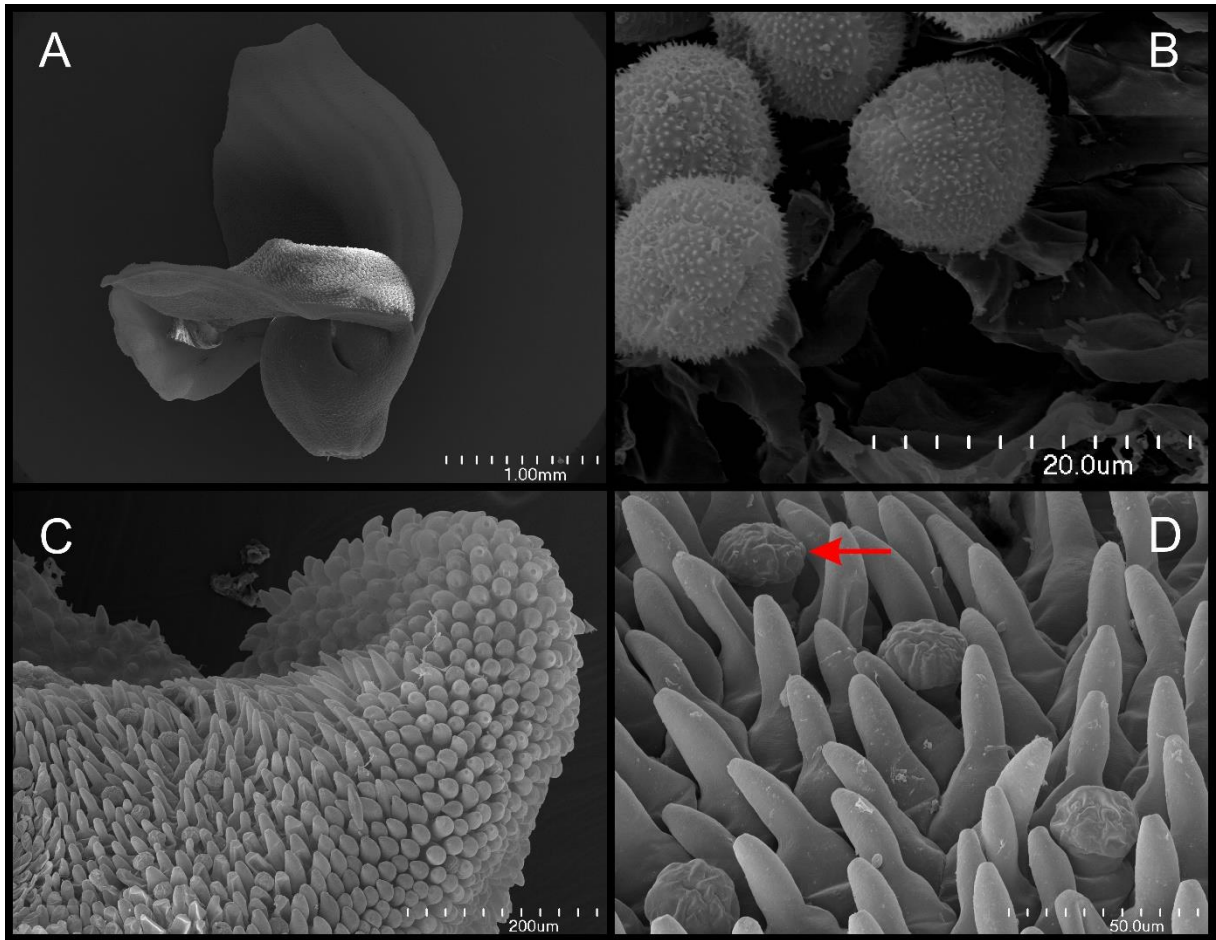


3

4 **Fig. 1.** *Utricularia neottioides* compared to *U. vulgaris* flower (most common pattern of  
5 flower morphology of the genus); sensitive stigma movement; and bubble hydrophobicity.  
6 Red arrows: Stigma; Yellow arrows: Anthers; Blue arrow: Bubble. A) Parts inside the flower  
7 representing *U. neottioides* with the stigma unbent (Inspired in Baillon, H., 1892); B) ) Parts  
8 inside the flower representing *U. neottioides* with the stigma bent (Inspired in Baillon, H.,  
9 1892); C) Parts inside the flower representing regular *Utricularia* morphotype (Inspired in  
10 Baillon, H., 1892); D) Unbent lower lip stigma in *U. neottioides*. E) Lower lip of the stigma  
11 bending in *U. neottioides*; F) Bubble formed underwater in *U. neottioides*.

12

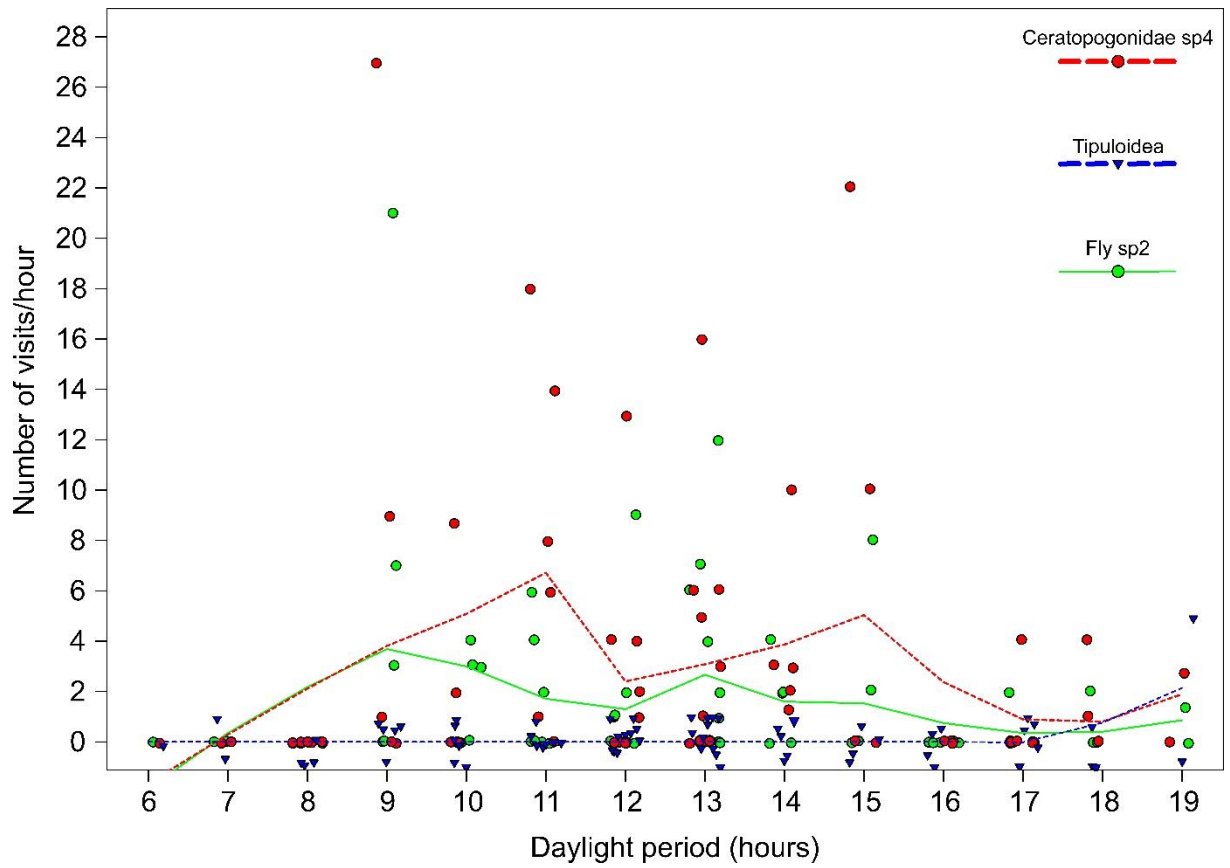
13



1

2 **Fig. 2.** Scanning electron microscopy (SEM) of *Utricularia neottioides* A) Whole flower  
3 SEM; B) Pollen grain details SEM; C) Papillae in the palate; D) Papillae and glandular  
4 trichomes (red arrow) on the palate.

5

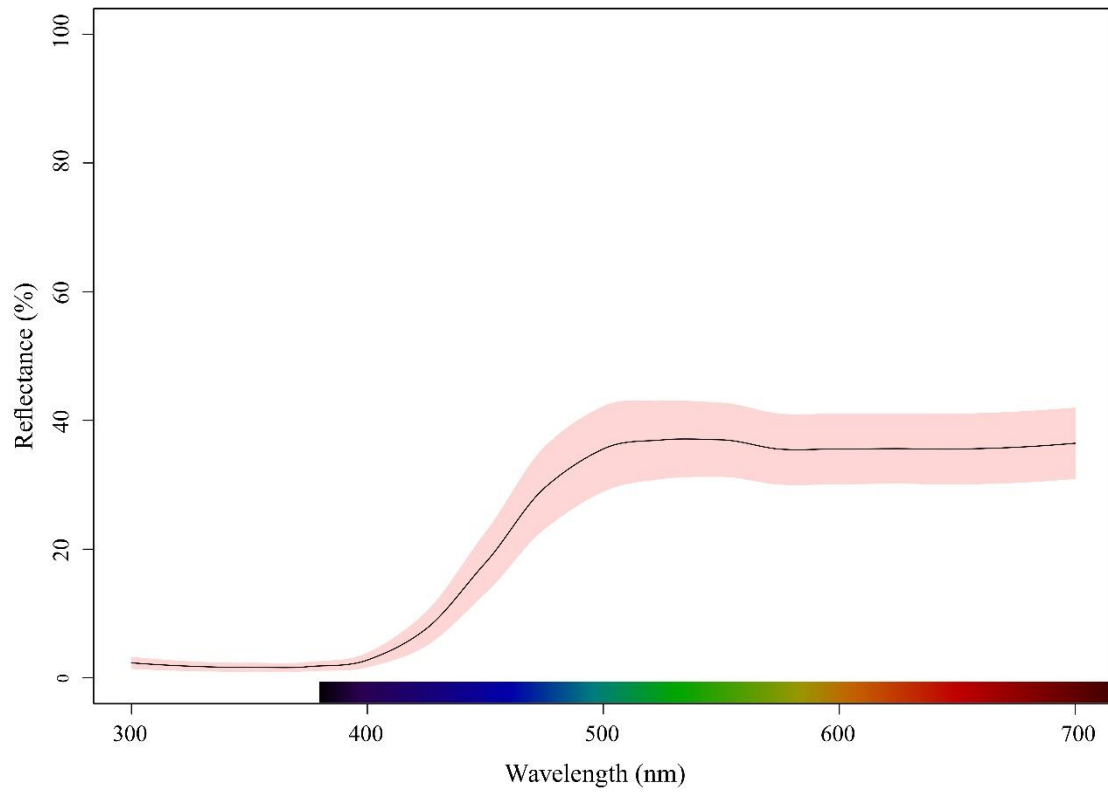


1

2 **Fig. 3.** Number of visits/hour per daylight period. The line for each pollinator represents a  
 3 visual relationship between the number of visitors per hour and time of the day based on the  
 4 lowest smoother using a locally weighted regression.

5

6

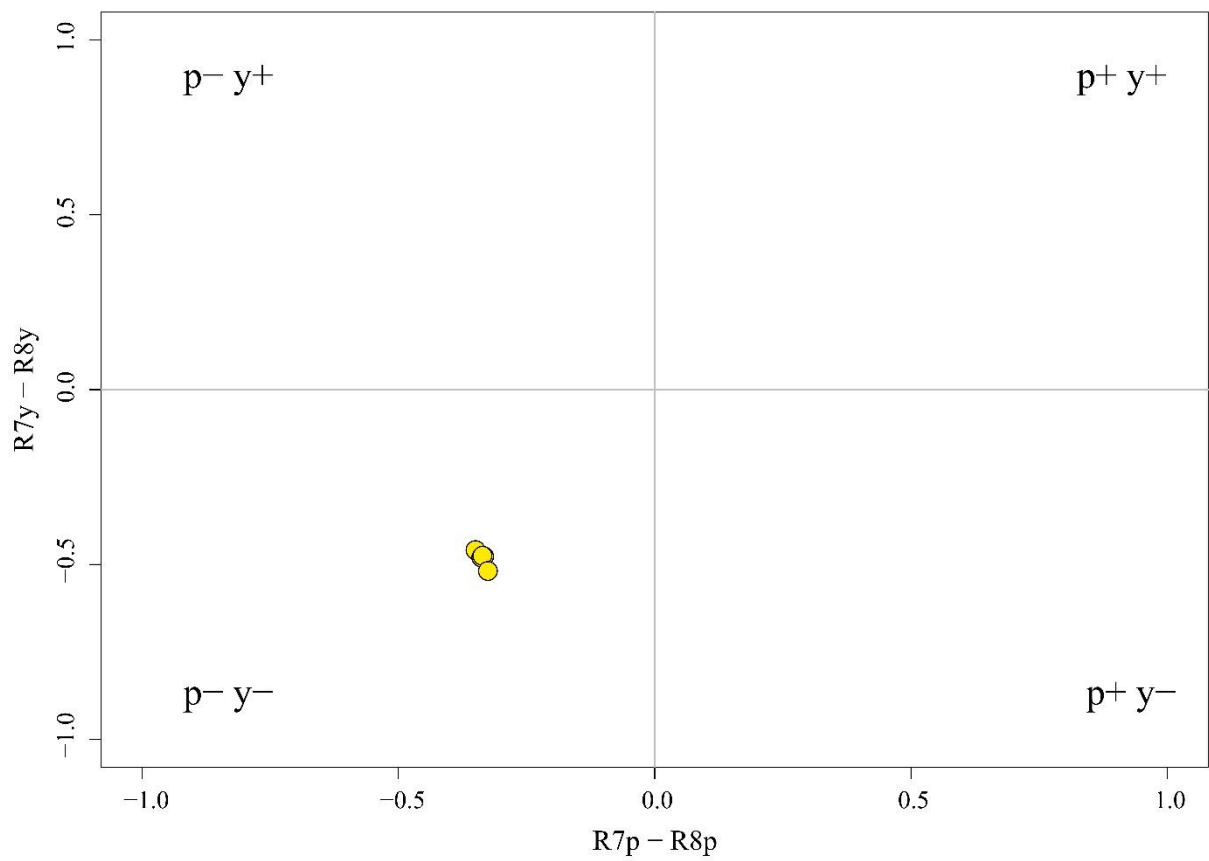


1

2 **Fig. 4.** Reflectance pattern of *Utricularia neottioides*. Mean (black line) and standard  
3 deviation (red area) of the reflectance curve of *U. neottioides*.

4

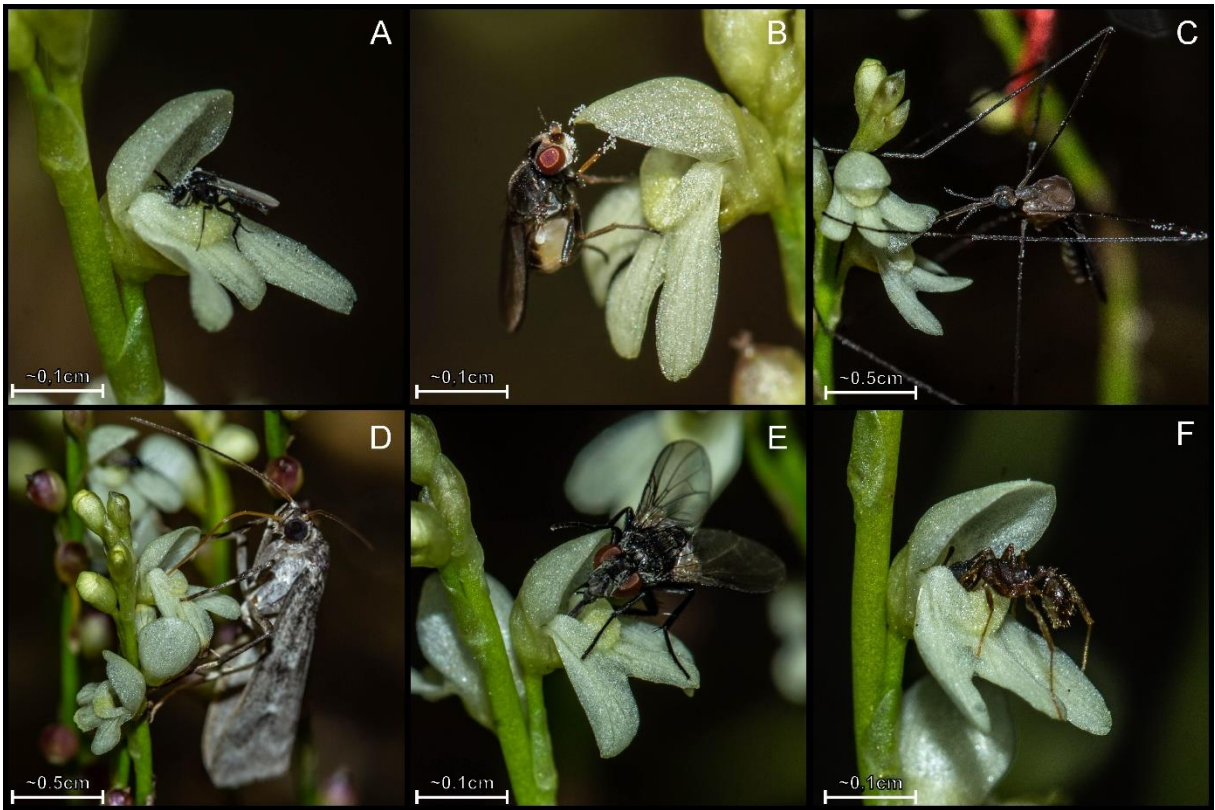
5



1

2 **Fig. 5.** *Utricularia neottioides* as perceived by the flies. Representation of *Utricularia*  
 3 *neottioides* reflectance in the colour space based on the photoreceptor sensibility of *Musca*  
 4 *domestica* (UV = p+ y+; purple = p+ y-; blue = p- y+; green = p- y-).

5



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15

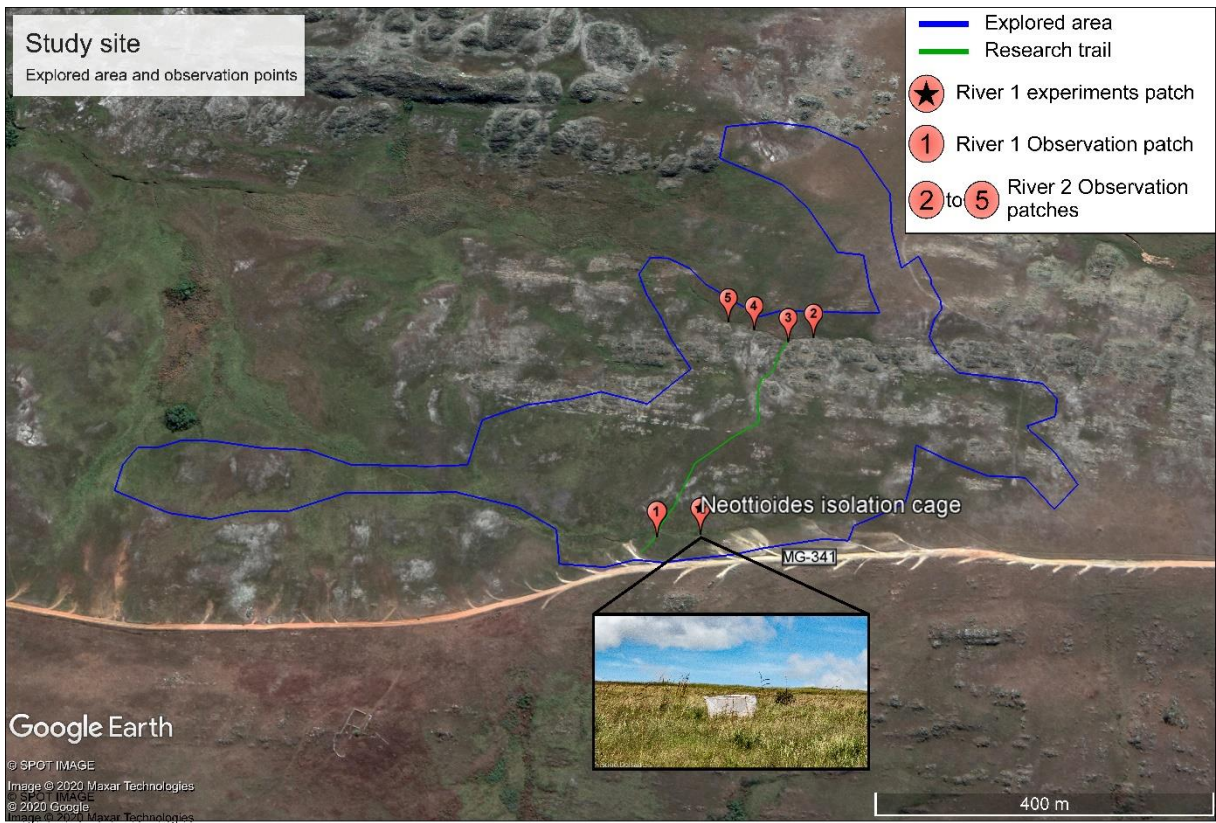
**Fig. 6.** *Utricularia neottioides* pollinators and visitors. A) *Ceratopogonidae* sp.4 with pollen, pinching the palate; B) *unidentified small fly* leaving the flower with pollen; C) Tipuloidea with its proboscis inside the flower; D) Lepidoptera on the flower at night; E) Fly sp.6 with its mouthparts inside the flower; F) Ant on the flower.

1 **Table 1.** Taxa of floral visitors, number of visit rounds performed by the insect, number of  
 2 flowers visited each turn and mean time spent per flower during a visit to *Utricularia*  
 3 *neottioides* flowers (SD showed only when N>1)  
 4

Floral visitors	Number of turns	Mean/ visit turn	
		Flowers (each turn)	Time/ flower (Minutes:Seconds)
<b>Diptera:</b>			
<b>Ceratopogonidae</b>			
Ceratopogonidae sp.1	1	n/a	00:15
Ceratopogonidae sp.3	18	2.4 +- 1.91	1:33 +- 1:19
Ceratopogonidae sp.4	135	1.92 +- 1.17	1:17 +- 00:59
<i>Unidentified small fly</i>	93	3.62 +- 2.07	1:36 +- 1:11
<i>Fly sp.5</i>	1	n/a	n/a
<i>Fly sp.10</i>	2	n/a	n/a
<i>Muscidae sp.6</i>	5	2	1:00
<i>Muscidae sp.7</i>	14	4	0:50
<b>Limoniinae (Tipuloidea)</b>			
<i>Geranomyia sp.</i>	4	8.5 +- 0.5	00:20 +- 0
<b>Lepidoptera:</b>			
Lepidoptera sp.1	18	3	00:30
<b>Coleoptera:</b>			
Coleoptera sp.1	2	2	n/a
<b>Hymenoptera:</b>			
Formicidae sp.	6	2	05:00

5

1

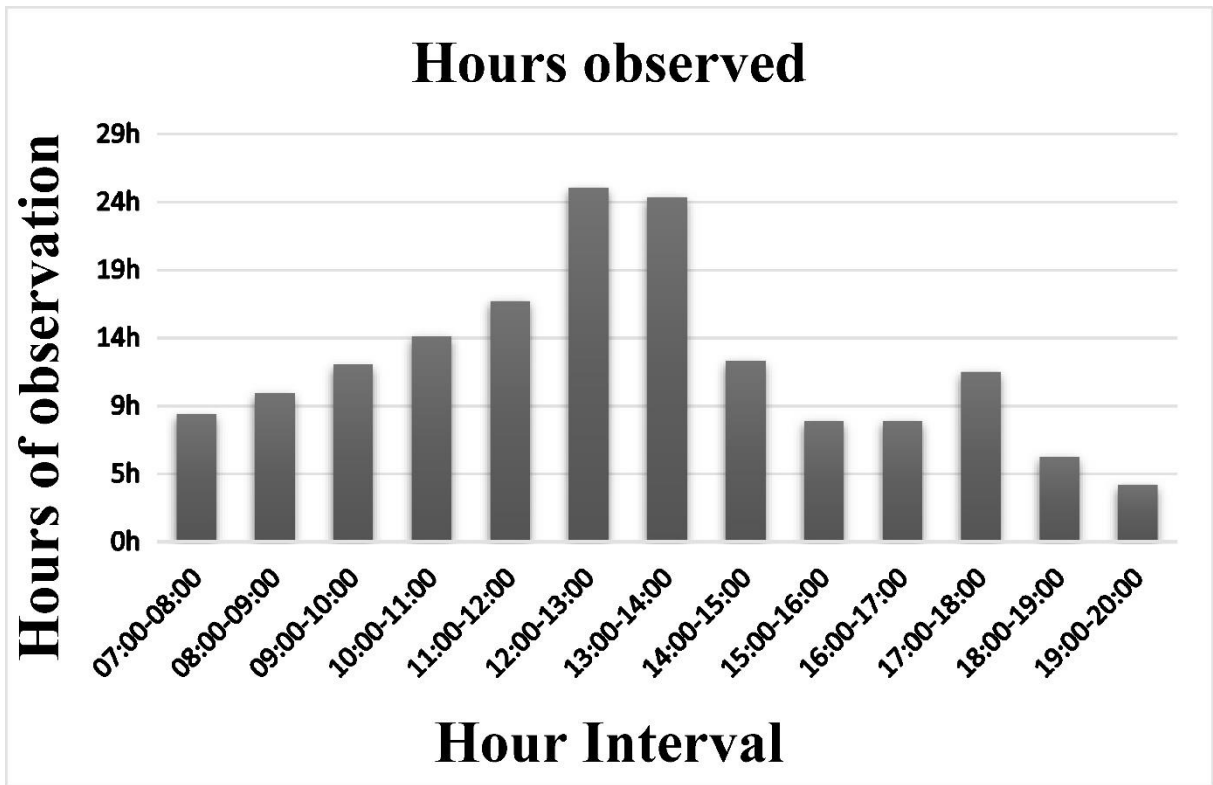


2

3 **Supl. Mat. 1.** Studied site map, discriminating each patch where observations or experiments

4 were made in each river.

5



1

2 **Supl. Mat. 2.** Total number of hours observed for each hour interval of the day. Less hours of

3 observations were done after the hottest hours of the day because of the rain.