

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

**GENÉTICA MOLECULAR DE POPULAÇÕES BRASILEIRAS  
E CUBANAS DE *Utricularia* L. E MORFOLOGIA POLÍNICA  
DE LENTIBULARIACEAE EM CUBA**

**Dasmiliá Cruz Arozarena**

Licenciada em Educação especialidade Biologia

**2016**

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

**GENÉTICA MOLECULAR DE POPULAÇÕES BRASILEIRAS  
E CUBANAS DE *Utricularia* L. E MORFOLOGIA POLÍNICA  
DE LENTIBULARIACEAE EM CUBA**

**Dasmiliá Cruz Arozarena**

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

**Coorientadora: Profa. Dra. Cristina Mercedes Panfet Valdés**

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

**2016**

Cruz Arozarena, Dasmiliá  
C957g Genética molecular de populações brasileiras e cubanas de  
*Utricularia* L. e morfologia polínica de Lentibulariaceae em Cuba /  
Dasmiliá Cruz Arozarena. -- Jaboticabal, 2016  
iv, 112 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de  
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016

Orientador: Vítor Fernandes Oliveira de Miranda

Banca examinadora: Fabio Pinheiro, Maurício Bacci Junior,  
Alessandro de Mello Varani, Rinaldo Cesar de Paula

Bibliografia

1. Biogeografia. 2. Genética de populações. 3. Pólen. 4.  
Dispersão. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e  
Veterinárias.

CDU 631.52:581.137.2

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

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: GENÉTICA MOLECULAR DE POPULAÇÕES BRASILEIRAS E CUBANAS DE Utricularia L. E MORFOLOGIA POLÍNICA DE LENTIBULARIACEAE EM CUBA

**AUTORA: DASMILIÁ CRUZ AROZARENA**


**ORIENTADOR: VITOR FERNANDES OLIVEIRA DE MIRANDA**

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

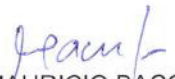


Prof. Dr. VITOR FERNANDES OLIVEIRA DE MIRANDA  
Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

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



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



Prof. Dr. MAURICIO BACCI JUNIOR  
CEIS / Instituto de Biociências de Rio Claro - SP



Prof. Dr. RINALDO CESAR DE PAULA  
Departamento de Produção Vegetal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 21 de dezembro de 2016

## DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Dasmiliá Cruz Arozarena é natural da Habana, Cuba, nascida em 7 de dezembro de 1977. Fez faculdade em *Licenciatura en Educación en la especialidad de Biología* no *Instituto Superior Pedagógico Enrique José Varona*, em Havana. Depois de se formar, trabalhou durante três como professora de biologia para o ensino médio. No ano de 2004 começou a trabalhar como técnica de laboratório para docência e investigação no Herbario Johannes Bisse do *Jardín Botánico Nacional de Cuba* onde obteve o título de *Máster en Botánica: Mención Plantas Superiores*. Posteriormente, no ano de 2010, começou a trabalhar como museóloga especialista no *Museo Nacional de Historia Natural de Cuba* onde obteve a categoria de pesquisador. Participou do curso *Espacios Naturales protegidos frente al cambio global* na Bolívia com patrocínio da Agência Espanhola de Cooperação Internacional. No ano de 2013 ingressou no doutorado em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) na Universidade Estadual Paulista - UNESP, Câmpus Jaboticabal, com bolsa PEC-PG da CAPES sob orientação do Prof. Dr. Vitor Fernandes Oliveira de Miranda e co-orientação da Profa. Dra Cristina Mercedes Panfet Valdés. Durante o doutorado tem participado de vários cursos, em projetos do Laboratório de Sistemática Vegetal (Unesp/FCAV/DBAA) e fez parte do projeto Bioblitz da Unesp/FCAV. Interessa-se pela ecologia molecular de populações de *Utricularia*, além da sistemática e morfologia polínica da família Lentibulariaceae.

Produce una inmensa tristeza pensar que la naturaleza habla mientras el género humano no la escucha.

**Victor Hugo**

Estudia la naturaleza, ama la naturaleza, acércate a la naturaleza. Nunca te fallará.

**Frank Lloyd Wright**

A minha mãe e minha irmã pelo carinho e o amor incondicional.  
A meu pai e minha avó, embora longe dos vivos estão me olhando.

## AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Capes e o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (processo n.14795-12-4) pelo suporte financeiro durante estes anos e meu orientador Prof. Dr. Vitor F. Oliveira de Miranda e coorientadora Profa Dra. Cristina M. Panfet Valdés, pela ajuda, amizade e orientação durante todo o período de doutorado. A Gabriel Santos García pelos materiais coletados e doados para este estudo. Aos herbários do *Jardín Botánico Nacional de Cuba* (HAJB) e *Instituto de Ecología e Sistemática* (HAC) pelos materiais doados e a disponibilização de armazenar as exsicatas.

Ao Prof. Eduardo Gasparino, por tirar todas minhas dúvidas sempre que eu precisei e a Profa. Adriana C. Morales pelas sugestões para fazer as análises. Os professores, técnicos e funcionários do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária em especial a Profa. Janete Desidério, Prof. Manoel Victor, Profa. Cíntia Erbert, Roseli, Eliane, Aldo, Dona Lu, Aracyara e as duas Marcia (técnico e secretária). O pessoal do Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO) particularmente a Agda.

Pela ajuda e companheirismo, momentos de muita alegria, mas difíceis também agradeço os colegas do laboratório: Nestor (José) sempre incondicional comigo, Yani, Guillermo (Mijito), Fernanda, Lucas, Saura e Cristine e meu amigo Yoannis por me ajudar em tudo desde que morava em Cuba. Agradeço Lorryne, Cíntia pela ajuda com o pólen e Amanda, Nara e Maria Cecilia pelas dicas nas análises estatísticas.

Aos meus amigos de vários países por me apoiarem e me darem forças, Claudia, Olga Flora, Olga Vianka, Maimé, Dora, Alfredo, Frander, Eldis, Andrea, Lorena, Malú, Ricardito, Alisbet, Haider Wolfram, Giovanni, Fiallo, Sandro, Michel, Manuel, aos professores Carlos Sánchez do *Jardín Botánico Nacional de Cuba*, Antonio López do *Museo de Historia Natural de Cuba* e a pesquisadora Ramona Oviedo, sempre disposta a ajudar nas coletas em Cuba.

Aos colegas Vidal e Luis do *Jardín Botánico de Pinar del Río* nas viagens de campo em Cuba e Osbel de *Ecología e Sistemática*, mesmo sem me conhecerem, pela ajuda na coleta da *Ciénaga de Zapata e Pinar del Río*.

A minha linda família, minha mãe Juliana e irmã Ismenis que me apoiaram com seus conselhos, força, sabedoria, sempre junto comigo nas dificuldades. A minha sobrinha Roselí pela alegria e as palavras engraçadas que fala para mim. A minha tia Henayda, Silvia, e a prima Yurietta.

Obrigada mesmo!!!

## SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 Revisão da literatura.....	6
2.1 Marcadores moleculares em estudos populacionais.....	6
2.2 Diversidade populacional e estudos filogeográficos.....	8
2.3 Variabilidade polínica em espécies de Lentibulariaceae.....	10
3 REFERÊNCIAS.....	11
CAPÍTULO 2 – DIVERSIDADE GENÉTICA E DINÂMICA DE POPULAÇÕES DE <i>Utricularia foliosa</i> L. (LENTIBULARIACEAE) BASEADAS NO ESPAÇADOR <i>trnS-trnG</i> DO DNA CLOROPLASTIDIAL E NA REGIÃO ITS DO DNA NUCLEAR RIBOSSOMAL.....	19
1 INTRODUÇÃO.....	19
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	21
2.1 Análises moleculares.....	23
2.1.1 Extração do DNA.....	23
2.1.2 Amplificação.....	23
2.1.3 Purificação e sequenciamento dos produtos amplificados.....	24
2.1.4 Alinhamento e análise de sequências.....	25
2.2 Análises de diversidade, estrutura genética e demográfica.....	26
2.3 Análises filogenéticas e filogeográficas.....	27
3 RESULTADOS.....	27
3.1 Sequências do espaçador cloroplastidial e da região nuclear.....	27
3.2 Diversidade genética e distribuição de haplótipos.....	28
3.3 Demografia.....	31
3.4 Estrutura genética.....	32
3.5 Filogenia e filogeografia.....	34
4 DISCUSSÃO.....	38
4.1 Diversidade genética.....	38
4.2 Estrutura demográfica.....	40
4.3 Estrutura genética.....	41
4.4 Reconstruções filogeográficas.....	43
5 CONCLUSÕES.....	44
6 REFERÊNCIAS.....	45
CAPÍTULO 3 – GENÉTICA E DINÂMICA POPULACIONAL DE <i>Utricularia gibba</i> L. (LENTIBULARIACEAE) BASEADAS EM ANÁLISES DO ESPAÇADOR <i>trnS-trnG</i> DO DNA CLOROPLASTIDIAL E DA REGIÃO ITS DO DNA NUCLEAR RIBOSSOMAL.....	51
1 INTRODUÇÃO.....	51
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	53
2.1 Análises moleculares.....	54
2.1.1 Extração do DNA.....	54
2.1.2 Amplificação.....	55
2.1.3 Purificação e sequenciamento dos produtos amplificados.....	56
2.1.4 Alinhamento e análise de sequências.....	56
2.2 Análises de diversidade, estrutura genética e história demográfica.....	57

2.3 Análises filogeográficas e filogenéticas.....	57
3 RESULTADOS.....	58
3.1 Sequências do cpDNA e o nrDNA.....	58
3.2 Diversidade genética e distribuição de haplótipos.....	58
3.3 Análises demográficas.....	62
3.4 Estrutura genética.....	62
3.5 Filogenia e filogeografia.....	65
4 DISCUSSÃO.....	69
4.1 Diversidade genética.....	69
4.2 Demografia.....	70
4.3 Estrutura genética.....	71
4.4 Reconstruções filogeográficas.....	72
5 CONCLUSÕES.....	74
6 REFERÊNCIAS.....	75
CAPÍTULO 4 – PALINOMORFOLOGIA DE LENTIBULARIACEAE RICH. DA REGIÃO OCIDENTAL DE CUBA.....	80
1 INTRODUÇÃO.....	80
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	83
2.1 Material Vegetal.....	83
2.2 Microscopia optica de luz (MO) e microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	84
2.3 Medidas analisadas.....	84
3 RESULTADOS.....	86
3.1 Descrições morfológicas e tipos polínicos.....	86
3.1.1 Lentibulariaceae Rich.....	86
3.1.2 <i>Genlisea</i> A. St.-Hil.....	86
3.1.3 <i>Pinguicula</i> L. ser. <i>Albidae</i> .....	86
3.1.4 <i>Utricularia</i> L.....	91
3.2. Chave dos tipos de pólen dos táxons estudados.....	95
3.3. Análise dos dados quantitativos.....	95
4 DISCUSSÃO.....	97
5 CONCLUSÃO.....	102
6 REFERÊNCIAS.....	103
CAPÍTULO 5 – Considerações finais.....	108
APÊNDICES.....	109
Apêndice 1A. Sequências de Lentibulariaceae empregadas para o enraizamento das filogenias do espaçador <i>trnS-trnG</i> e a região ITS.....	110

## GENÉTICA MOLECULAR DE POPULAÇÕES BRASILEIRAS E CUBANAS DE *Utricularia* L. E MORFOLOGIA POLÍNICA DE LENTIBULARIACEAE EM CUBA

**RESUMO** –*Utricularia foliosa* e *U. gibba* são espécies pertencentes à seção *Utricularia* e apresentam ampla distribuição e variabilidade morfológica. A ocorrência das duas espécies no Brasil e Cuba, a grande distância geográfica entre as regiões, assim como, as diversas barreiras e eventos demográficos ocorridos na região Neotropical podem ter desencadeado processos evolutivos nas espécies que poderiam ser elucidados mediante estudos genéticos de dinâmica populacional. Além destes estudos, trabalhos polínicos também constituem uma importante ferramenta para estabelecer diferenças entre espécies. Partindo destas considerações, o presente estudo teve como objetivos analisar a diversidade genética de populações de *U. foliosa* e *U. gibba* do Brasil e Cuba utilizando caracteres moleculares para posteriormente estabelecer relações entre as áreas de distribuição assim como inferir padrões demográficos e filogeográficos para ajudar compreender a história evolutiva de cada espécie. Além disso, caracterizar a morfologia polínica dos táxons de Lentibulariaceae que ocorrem na região ocidental de Cuba. Os resultados mostraram que *U. foliosa* possui altas taxas de diversidade genética, o que poderia estar condicionado pelo fluxo genético entre populações. As duas espécies mostraram compartilhamento de haplótipos entre as populações e as áreas geográficas (Brasil-Cuba), o que pode estar condicionado por recentes processos de dispersão influenciados pelo *habitat* aquático onde ocorrem. Por outro lado, a morfologia polínica da família Lentibulariaceae na região ocidental de Cuba mostrou variação entre *Genlisea*, *Pinguicula* e *Utricularia*, sendo descrito pela primeira vez para o gênero *Pinguicula* ser. *Albidae* a presença de endoaberturas com fastígios.

**Palavras chaves:** biogeografia, genética de populações, pólen, dispersão

**MOLECULAR GENETICS OF BRAZILIAN AND CUBAN POPULATIONS OF  
*Utricularia* L. AND POLLEN MORPHOLOGY OF LENTIBULARIACEAE FROM  
CUBA**

**ABSTRACT-** *Utricularia foliosa* and *U. gibba* are species that belong to the section *Utricularia* and present a wide distribution and morphological variability. The occurrence of the two species in Brazil and Cuba, the geographic distance between the regions, as well as the different barriers and demographic events occurred in the Neotropical region may have caused evolutionary processes in the species that could be elucidated by genetic studies of population dynamics. Besides these studies, pollen analysis also constitutes an important tool to establish differences between these species. Based on these considerations, the present study aimed to analyze the genetic diversity of *U. foliosa* and *U. gibba* populations present in Brazil and Cuba using molecular characters to later establish relationships between the distribution areas as well as to infer demographic and phylogeographic patterns that may help to understand the evolutionary history of each species, and to characterize the pollen morphology of the Lentibulariaceae taxa that occur in western Cuba. The results showed that *U. foliosa* has high rates of genetic diversity, which could be conditioned by the genetic flow between populations. The two species showed shared haplotypes between populations and geographical areas (Brazil-Cuba), which may be conditioned by recent dispersal processes influenced by the aquatic habitat where they occur. On the other hand, the pollen morphology of the family Lentibulariaceae in the western region of Cuba showed variation between *Genlisea*, *Pinguicula* and *Utricularia*, being described for the first time for the genus *Pinguicula* ser. *Albidae*, the presence of endo-apertures with fastigia.

Key words: biogeography, population genetics, pollen, dispersion

## CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

### 1 INTRODUÇÃO

Com aproximadamente 350 espécies, Lentibulariaceae apresenta-se como a família de maior diversidade entre as plantas carnívoras. As espécies desenvolveram diversas adaptações fisiológicas além de estruturas consideradas complexas entre as plantas com flores (WICKE et al., 2014). É uma família cosmopolita agrupada em 3 gêneros: *Pinguicula* L., *Genlisea* A.St.-Hil. e *Utricularia* L. (APG IV, 2016; FROMM-TRINTA, 1981; GUISANDE et al., 2007; MÜLLER et al., 2004) (Figura 1). Lentibulariaceae apresenta diversos hábitos de vida, o que geralmente está relacionado ao ambiente onde ocorre, assim as plantas podem ser aquáticas, epífitas, reófitas ou terrestres (TAYLOR, 1989).

No Brasil, a família Lentibulariaceae está representada pelos gêneros *Utricularia* (65) e *Genlisea* (17) e juntos somam 82 espécies de angiospermas carnívoras (FLORA DO BRASIL, 2020; BFG, 2015; MIRANDA et al., 2015). No entanto, o gênero *Pinguicula* distribui-se principalmente no Hemisfério Norte, nas regiões tropicais e subtropicais, apesar de alguns táxons serem nativos de regiões frias e montanhosas da América do Sul (CASPER; STIMPER, 2009; LEGENDRE, 2000). Em Cuba ocorrem 28 espécies pertencentes os três gêneros de Lentibulariaceae, apresentando o maior número de espécies o gênero *Utricularia* (14) e o menor *Genlisea* (1), sendo endêmicos todos os representantes do gênero *Pinguicula* (CASPER, 2007; SHIMAI et al., 2007; TAYLOR, 1989).

Dentre a família Lentibulariaceae o gênero *Utricularia* é o mais diversificado e possui aproximadamente 235 espécies (FLEISCHMANN, 2015) distribuídas em quase todo o mundo e inclui espécies terrestres, epífitas, reófitas e aquáticas. A grande maioria das espécies encontra-se nas regiões tropicais e subtropicais, especialmente em áreas úmidas ou alagadas e com abundantes precipitações (GUISANDE et al., 2007; TAYLOR, 1989).



Figura 1. Espécies de Lentibulariaceae. *Pinguicula filifolia* subsp. *alba* Y. Domínguez, Panfet & V.Miranda (A), *Genlisea violacea* A.St.-Hil. (B), *Utricularia amethystina* Salzm. ex A.St.-Hil. & Girard. (C). Créditos: Equipe do Laboratório de Sistemática Vegetal (LSV).

Das espécies de *Utricularia* descritas, 85 são nativas do neotrópico e algumas delas são encontradas somente nesta região (GUISANDE et al., 2007). O gênero tem populações em toda América do Sul exceto nas regiões muito áridas (TAYLOR, 1989). Reconstruções filogenéticas (JOBSON et al., 2003; MÜLLER; BORSCH, 2005; MÜLLER et al., 2004) têm apontado a região neotropical como centro de origem do gênero, demonstrando que a maior linhagem teve origem neotropical em concordância com a ampla distribuição das espécies na América do Sul (MÜLLER; BORSCH, 2005).

*Utricularia foliosa* L. ocorre na América tropical e África e *U. gibba* L. está amplamente distribuída no mundo. Baseado em caracteres tanto morfológicos quanto moleculares, estão arranjadas dentro da seção *Utricularia* (MÜLLER; BORSCH, 2005; TAYLOR, 1989). Essa seção é definida pelos tipos de armadilhas uniformes, *habitat* aquático e cápsulas com deiscência circular (na maioria das espécies), valvadas e indeiscentes (TAYLOR, 1989) e encontra-se entre as linhagens mais derivadas dentro do gênero *Utricularia* baseado em características polínicas (TAYLOR, 1989) sendo esses resultados corroborados com base em caracteres moleculares (MÜLLER et al., 2004).

*Utricularia foliosa* (Figura 2A e B) é uma erva aquática livre flutuante, com estolões longos e robustos, folhas alternas, pinadas de até 45 cm de comprimento; inflorescências emergentes, eretas, corola amarela, às vezes com nervuras púrpuras. Ocorre amplamente na África e na América tropical sendo encontrada em zonas de

baixas altitudes (TAYLOR, 1989). No Brasil *U. foliosa* distribui-se em todas as regiões (MIRANDA et al., 2015) e em Cuba estende-se por quase toda a ilha (PANFET, 2008).



Figura 2. *Utricularia foliosa* L. Inflorescência (A), utrículos (B). *Utricularia gibba* L. Flor (C). Créditos: Equipe LSV.

*Utricularia gibba* (Figura 2C) é uma erva aquática fixa ou suspensa, com numerosos estolões muito ramificados, folhas dicotomicamente ramificadas com 0,5-1,5 cm de comprimento, inflorescências emergentes, eretas ou às vezes submersas (muito reduzidas e com flores cleistógamas), e corola amarela com nervuras castanho-avermelhadas. Tem distribuição principalmente pantropical (TAYLOR, 1989) e no Brasil estende-se amplamente em todas as regiões do país (MIRANDA et al., 2015) e em Cuba distribui-se ao longo do arquipélago (PANFET, 2008).

Ambas espécies apresentam uma ampla variabilidade morfológica dada principalmente pelos caracteres vegetativos, embora em *Utricularia foliosa* o grande número de sementes na cápsula seja variável. Por esta razão tornou-se difícil para diversos autores conseguir distingui-las morfológicamente (TAYLOR, 1989). A classificação do gênero feita por Taylor (1989) foi baseada em caracteres vegetativos e inclui características polínicas das espécies, apontadas por estudos palinológicos (HUYNH, 1968; THANIKAIMONI, 1966).

Tanto *Utricularia foliosa* quanto *U. gibba* podem ocorrer em *habitat* antropizados ou que têm sofrido modificações devido à ação de mudanças climáticas tais como secas prolongadas ou longos períodos de inundações (MIRANDA et al., 2015; PANFET, 2008). Apesar de estas espécies não terem sido consideradas sob categoria de ameaça no Brasil (MIRANDA et al., 2013), na flora de Cuba *U. foliosa* é considerada “Quase ameaçada” e *U. gibba* encontra-se sob categoria “Em perigo crítico” (GONZÁLEZ TORRES et al., 2016). Os estudos populacionais são uma importante ferramenta para conhecer o estado de conservação das populações; desta forma, dados moleculares permitem inferir processos microevolutivos ocorridos e permitem entender a dinâmica das populações (AVISE, 2000).

Para *Utricularia* tem sido estudada a dinâmica populacional das espécies *Utricularia longifolia* Gardner (MENEZES, 2010), *U. reniformis* A.St.-Hil. (CLIVATI, 2012), *U. amethystina* Salzm. ex A.St.-Hil. & Girard (MENEZES, 2015) e *U. australis* R. Br (ARAKI; KADONO, 2003; KAMEYAMA; OHARA, 2006a, 2006b; KAMEYAMA; TOYAMA; OHARA, 2005). Mesmo assim, é de grande importância realizar estudos com outras espécies do gênero. Outras pesquisas realizadas para a família Lentibulariaceae (ARANGUREN, 2016; DOMÍNGUEZ, 2014; ZAYA et al., 2016) mostram variações nas taxas de diversidade genética das populações, sendo relacionadas fundamentalmente às formas de reprodução das espécies e padrões de distribuição geográficos.

A grande distância geográfica entre Brasil e Cuba além das diversas barreiras e eventos demográficos inferidos na região Neotropical podem ter desencadeado diversos processos evolutivos que poderiam ser esclarecidos mediante estudos biogeográficos. Tais estudos oferecem informação sobre os princípios e processos que regem a distribuição geográfica de linhagens, entre e dentro de grupos de

espécies relacionadas, além de esclarecer a conexão entre a diversidade genética com processos de dispersão histórica (AVISE, 2000).

Além da importância dos trabalhos populacionais e biogeográficos, os estudos polínicos constituem uma ferramenta para estabelecer diferenças entre as categorias taxonômicas. Alguns estudos em Lentibulariaceae têm sido focados na análises comparativas de grãos de pólen apontando algumas analogias e diferenças morfológicas entre cada um dos gêneros e espécies (BERETTA et al., 2014; FROMM-TRINTA, 1981, 1979; HUYNH, 1968; RODONDI; BERETTA; ANDREIS, 2010). Sabe-se que as características polínicas auxiliam em muitos grupos de plantas a distinção dos gêneros e em muitos casos das espécies.

Os estudos sobre a palinologia de Lentibulariaceae apontam similaridade entre os grãos de pólen de *Genlisea* e *Utricularia* (FROMM-TRINTA, 1979, 1981) e entre *Pinguicula* e *Utricularia* (SOHMA, 1975a, 1975b). Além disso tem sido descrito que algumas seções dentro do gênero *Utricularia* apresentam caracteres mais derivados e outras representam cladogêneses mais basais (LOBREAU-CALLEN; JÉRÉMIE; SUAREZ-CERVERA, 1999; TAYLOR, 1989). Levando em conta que *Utricularia foliosa* e *U. gibba* são espécies pertencentes à seção *Utricularia* e destacam-se pela grande variabilidade morfológica (HUYNH, 1968; TAYLOR, 1989) foi de nosso interesse, além de estudar a dinâmica populacional destas espécies, conhecer a variabilidade polínica delas, sendo as características polínicas das duas espécies pouco conhecidas.

Devido ao fato de que para um estudo palinomorfológico duas espécies não são suficientes, considerou-se incluir as demais espécies da família Lentibulariaceae que ocorrem na região ocidental do arquipélago cubano. Escolheu-se Cuba para este estudo, porque além de Lentibulariaceae se encontrar com ampla ocorrência no Brasil, não têm sido encontrados representantes do gênero *Pinguicula* no país. Desta forma, o ocidente de Cuba representa uma das áreas mais ricas quanto à diversidade biológica da ilha (BORHIDI, 1996), sendo os três gêneros da família Lentibulariaceae distribuídos nesta área (ALAIN, 1957). Embora o gênero *Utricularia* ocorra nas outras duas regiões de Cuba (Central e Oriental), a região ocidental apresenta o maior número de espécies (PANFET, 2008), sendo esta área a mais representativa em Cuba para realizar um estudo da família Lentibulariaceae.

## Objetivos

Estimar a diversidade e estrutura genética das populações de *Utricularia foliosa* L. e *U. gibba* L. utilizando sequências de DNA cloroplastidiais e nucleares;

Estabelecer possíveis relações entre a distribuição geográfica e a diversidade genética das espécies de *Utricularia* estudadas;

Inferir padrões demográficos e filogeográficos entre as populações das espécies estudadas nas diferentes áreas de amostragem;

Caracterizar a morfologia polínica dos táxons de Lentibulariaceae que ocorrem na região ocidental de Cuba.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Marcadores moleculares em estudos populacionais

Com o recente desenvolvimento e disponibilidade de várias técnicas moleculares, os estudos sobre genética de populações com diversos grupos de plantas têm aumento. Polimorfismos do DNA em regiões não codificadoras mostram suficiente variabilidade para serem utilizados em estudos intraespecíficos, análises filogenéticas estabelecendo relações entre subespécies e variedades, ou para analisar a estrutura de populações (PLEINES; JAKOB; BLATTNER, 2009).

Nas plantas são mais comumente utilizados marcadores de DNA nuclear e cloroplastidial (cpDNA) (BORSCH; QUANDT, 2009; LOGACHEVA et al., 2010; TABERLET et al., 1991). Sequências de DNA mitocondrial (mtDNA), apesar de serem utilizadas para traçar histórias filogeográficas e de genética populacional (RENTARÍA, 2007) são mais utilizadas para elucidar questões filogeográficas entre os animais (ZINK; DROVETSKI; ROHWER, 2006) uma vez que em plantas podem causar recombinação intramolecular. Estes marcadores exibem baixas taxas de substituição nucleotídica e *locis* específicos não contem suficiente variação para filogenias intraespecíficas, sendo uma limitação na reconstrução de histórias populacionais (SCHAAL et al., 1998; VÁZQUEZ-DOMÍNGUEZ et al., 2009).

Os espaçadores internos transcritos (ITS) do DNA nuclear ribossomal estão localizados entre sequências altamente conservadas dos genes do RNA ribossomal 18S, 5,8S e 26S (LARENA et al., 1999; OLMSTEAD; PALMER, 1994). São regiões que apresentam uma alta taxa de mutação, mas seu tamanho e variabilidade permitem que sejam utilizados na comparação de sequências homólogas. Nos genomas nucleares diploides ainda podem surgir processos de recombinação interalélica e heterozigidade (SCHAAL et al., 1998).

A região ITS é amplamente utilizada em estudos filogenéticos de plantas, proporcionando caracteres informativos (BALDWIN et al., 1995; HILLIS; DIXON, 1991; LISTON et al., 1999; LOGACHEVA et al., 2010) e também tem sido utilizada em estudos populacionais. Apesar do risco das sequências ITS poderem envolver sequências ortólogas e parálogas nos genes e dar origem a incongruências filogenéticas (FELINER; ROSSELLÓ, 2007), os *loci* ITS têm sido muito usados em plantas. Eles têm grandes vantagens nas reconstruções de histórias filogenéticas, tais como: a universalidade, variabilidade intergenômica, baixa restrição funcional, além de ser biparentalmente herdáveis (ÁLVAREZ; WENDEL, 2003; FELINER; ROSSELLÓ, 2007).

Os marcadores de cpDNA, apesar de se apresentarem com taxas de evolução de moderadas até baixas e ter herança biparietal em alguns táxons, têm sido muito utilizados, sendo uma grande opção para desenvolver estudos filogeográficos intraespecíficos e filogenéticos interespecíficos em plantas (SHAW et al., 2007, 2005; SOLTIS; SOLTIS; MILLIGAN, 1992).

A herança materna no cpDNA tem um papel muito importante porque permite estabelecer comparações entre o fluxo gênico de sementes e pólen, além da identificação de eventos de hibridização (BONATELLI et al., 2013). Os genomas de organelas são amplamente utilizados uma vez que são herdados uniparentalmente em plantas com sementes (CHIES, 2003; AVISE, 2009) e apresentam vantagens em comparação aos marcadores nucleares que são biparentalmente herdados (BONATELLI et al., 2013; PLEINES; JAKOB; BLATTNER, 2009). Assim, permitem fazer a reconstrução da linhagem materna (AVISE, 2009; BEHEREGARAY, 2008; NIELSEN; BEAUMONT, 2009; SCHAAL et al., 1998), sendo a principal vantagem dos

genomas cloroplastidiais a presença de um alelo por célula, portanto não existindo recombinação.

Muitas variações na diferenciação genética das populações estão determinadas pelas diferentes distâncias de dispersão dos genomas herdados de maneira materna, paterna ou biparentalmente, particularmente os genomas herdados maternalmente, que mostram subdivisão populacional muito maior (PETIT et al., 2005).

Entre os marcadores cloroplastidiais mais frequentemente utilizados encontram-se o íntron *trnL* e o espaçador intergênico *trnL-trnF*, muitas vezes usados em combinação (KOCH et al., 2006). Além disso, são variáveis os espaçadores intergênicos *trnH-psbA* (WHITLOCK; HALE; GROFF, 2010) e *atpB-rbcL* (BÄNFER et al., 2006). Porém, estudos comparativos entre as diferentes regiões não codificadoras do genoma de cloroplasto para definir as potencialidades dos marcadores determinaram que não existe região em particular que seja mais adequada para definir linhagens taxonômicas (SHAW et al., 2007, 2005).

O espaçador cloroplastidial *trnS-trnG* é igualmente utilizado em estudos filogenéticos, de estrutura populacional e fluxo gênico para detectar variações nas populações (HAMILTON, 1999) e tem gerado importantes resultados em nível taxonômico para vários grupos de plantas (SHAW et al., 2007, 2005). Além disso, existem registros desta região em estudos filogeográficos (WANG et al., 2016; ZHANG et al., 2005) o que sugere que é uma ferramenta de grande importância para analisar padrões filogenéticos e biogeográficos no nível interespecífico e intraespecífico.

## **2.2 Diversidade populacional e estudos filogeográficos**

A genética das populações está determinada pelas variações nas frequências de alelos entre e dentro das populações, e para calcular tais frequências é preciso definir os indivíduos e utilizar seus genótipos (EVANNO; REGNAUT; GOUDET, 2005). A variabilidade genética é frequentemente observada em populações que se encontram em perigo de extinção e populações de grande tamanho; tais variações, poderiam estar relacionadas a mutações entre sítios heterozigóticos e homozigóticos e mudanças no controle dos genes que induzem a coevolução (AMOS; HARWOOD,

1998). Muitas das angiospermas aquáticas têm a capacidade de se reproduzir por clonagem, ou seja, produzir progênies idênticas por meio da propagação vegetativa, sendo uma adaptação às condições aquáticas. Assim, a reprodução clonal exerce influência na variação genética, tamanho e dinâmica das populações; portanto considera-se que as plantas aquáticas têm menor variação genética ou tamanho efetivo populacional (KAMEYAMA; OHARA, 2006a).

Dentre os estudos realizados no gênero *Utricularia*, poucos têm tido como objetivo a análise da diversidade genética das populações, embora vários dos táxons estão nas listas de espécies ameaçadas, tanto em Cuba quanto no Brasil (e.g. GONZÁLEZ TORRES et al., 2016; MIRANDA et al., 2013) devido às transformações e perda dos *habitat*, principalmente causado pela atividade humana. Assim, o estudo de populações naturais destas espécies é de grande importância uma vez que pode contribuir para a conservação dos táxons e além disso pode derivar em novas propostas de áreas de preservação. Observações de campo têm chamado a atenção sobre a grande variabilidade das espécies nos caracteres morfológicos, tanto no nível inter quanto intrapopulacionais. Sabe-se que as variações fenotípicas expressadas pelos indivíduos podem ser devido às variações ambientais, mas também podem ter uma base genética sendo essa uma das premissas fundamentais para que exista evolução adaptativa (TEMPLETON, 2006).

As novas técnicas moleculares inicialmente utilizadas em estudos filogenéticos têm se revelado como uma ferramenta útil também para as análises populacionais. Algumas destas técnicas envolvem a análise de regiões codificadoras e não-codificadoras do DNA nuclear e também do DNA cloroplastidial e mitocondrial (FELINER; ROSSELLÓ, 2007; SHAW et al., 2007, 2005; VÁZQUEZ-DOMINGUEZ et al., 2009). Os estudos filogeográficos constituem uma ferramenta muito útil em estudos de populações visando investigar estruturas populacionais e padrões de fluxo genético em relação à distribuição geográfica dos táxons; além disso, se encarregam dos princípios e processos que regem as linhagens genealógicas entre e dentro de espécies relacionadas (AVISE, 2000).

Para fins de conservação, têm sido utilizadas com êxito análises baseadas em cpDNA por meio de métodos filogeográficos e construção de redes de haplótipos, podendo identificar divergência entre localidades (CAVERS; NAVARRO; LOWE,

2004) e estruturação genética em diferentes ecótipos (CAVERS; NAVARRO; LOWE, 2003a). Por isso, as análises filogeográficas são de grande utilidade para propor estratégias de conservação (CAVERS; NAVARRO; LOWE, 2003b, 2004).

### **2.3 Variabilidade polínica em espécies de Lentibulariaceae**

Os estudos de pólen constituem uma ferramenta muito importante para inferir a história da vegetação e conseguir reconstruir o passado e o clima, sendo uma base importante para conhecer o ambiente, assim como as mudanças resultantes dos processos geológicos (MONCADA; HERNÁNDEZ; CABRERA, 1990).

Os primeiros estudos relacionados à morfologia polínica da família Lentibulariaceae basearam-se fundamentalmente em observações feitas ao microscópio de luz (FROMM-TRINTA, 1981, 1979; SOHMA, 1975a, 1975b). Segundo Sohma (1975a), o pólen de *Pinguicula* tem similaridade com o pólen de *Utricularia*, além disso, Fromm-Trinta (1981, 1979) encontrou semelhanças entre os grãos de pólen de *Utricularia* e *Genlisea*. Estudos mais recentes começaram a abordar a morfologia do pólen na família Lentibulariaceae usando técnicas modernas como a microscopia eletrônica de varredura e a microscopia eletrônica de transmissão (BERETTA et al., 2014; LOBREAU-CALLEN; JÉRÉMIE; SUAREZ-CERVERA, 1999; RODONDI; BERETTA; ANDREIS, 2010).

Os grãos de pólen de *Pinguicula* foram caracterizados por Rodondi; Beretta e Andreis (2010), sendo encontradas como as principais características diagnósticas nas espécies alpinas variações no tamanho, forma, número de colpos e ornamentação da exina.

Thanikaimoni (1966) caracterizou as espécies de *Utricularia* e correlacionou a estreita relação que existe entre sementes, *habitat* e morfologia separando as espécies em três grupos: aquáticas, epífitas e terrestres. Lobreau-Callen; Jérémie e Suarez-Cervera (1999) abordaram a palinologia do gênero *Utricularia* e analisaram 39 espécies distribuídas em 26 das 35 seções caracterizadas por Taylor (1989), e incluíram no estudo espécies distribuídas em diversos *habitat* e regiões do mundo. No entanto, Tsybalyuk; Mosyakin e Bezusko (2008) focaram seus estudos na análise comparativa dos grãos de pólen das espécies ucranianas. Posteriormente, foi

abordada a morfologia polínica das espécies europeias do gênero *Utricularia* (BERETTA et al., 2014) obtendo-se como resultado variações na estrutura do pólen que poderiam ser de grande importância na reconstrução da história evolutiva do grupo, associada à história geológica das áreas.

Estudos biogeográficos baseados em reconstruções climáticas, utilizaram pólen fóssil e atual e demonstraram mudanças acontecidas na temperatura e ciclos de precipitações nas diversas eras geológicas sobretudo no período Quaternário (MARTINS et al., 2003; TENEB et al., 2004). Para a família Lentibulariaceae, principalmente para o gênero *Utricularia*, têm sido feitos estudos que mostram as analogias entre a morfologia dos grãos de pólen fóssil e a influência geoclimática principalmente no período Holoceno e Pleistoceno (SOHMA, 1975a) sendo menor os registros dessas relações no Pre-Quaternário (BERETTA et al., 2014).

Em Lentibulariaceae tem sido observado o fenômeno do sincolpismo em espécies do gênero *Genlisea* (FROMM-TRINTA, 1979, 1981) e em *Utricularia*, além de ser um gênero euripolínico, tem-se observado anomalias ou malformações nos grãos de pólen em algumas espécies tais com *Utricularia bremii* Heer, *U. ochroleuca* R.W.Hartm. e *U. stygia* G.Thor e é conhecido que nas espécies mais derivadas a quantidade de aberturas no pólen é maior do que nas espécies de cladogêneses mais basais e variam em número inclusive na mesma espécie (BERETTA et al., 2014; LOBREAU-CALLEN; JÉRÉMIE; SUAREZ-CERVERA, 1999; TAYLOR, 1989).

### 3 REFERÊNCIAS

ALAIN, HNO. **Flora de Cuba 4. Dicotiledóneas: Melastomataceae a Plantaginaceae**. Cont. Ocas. Mus. Hist. Nat. Colegio “De La Salle”. 16. La Habana. 1957.

AMOS, W.; HARWOOD, J. Factors affecting levels of genetic diversity in natural populations. **Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences**, v. 353, p. 177–186, 1998.

ÁLVAREZ, I.; WENDEL, J. F. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 29, n. 3, p. 417–434, 2003.

APG IV. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. **Botanical Journal of the Linnean Society**, p. 1–20, 2016.

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

ARANGUREN, Y. **Genética molecular de *Genlisea violacea* A.St.-Hil. e *Genlisea aurea* A.St.-Hil. (Lentibulariaceae)**. 2016. Tese (Doutorado em Agronomia Genética e Melhoramento de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2015.

AVISE, J. C. Phylogeography: retrospect and prospect. **Journal of Biogeography**, v. 36, n. 1, p. 3–15, 2009.

AVISE, J. C. **Phylogeography: the history and formation of species**. Harvard University Press, Cambridge, MA, 2000. p. 447.

BÄNFER, G.; MOOG, U.; FIALA, B.; MOHAMED, M.; WEISING, K.; BLATTNER, F. R. A chloroplast genealogy of myrmecophytic *Macaranga* species (Euphorbiaceae) in Southeast Asia reveals hybridization, vicariance and long-distance dispersals. **Molecular Ecology**, v. 15, n. 14, p. 4409–4424, 2006.

BALDWIN, B. G.; BALDWIN, B. G.; SANDERSON, M. J.; PORTER, J. M.; WOJCIECHOWSKI, M. F.; CAMPBELL, C. S.; DONOGHUE, M. J. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: A valuable source of evidence on Angiosperm phylogeny. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 82, n. 2, p. 247–277, 1995.

BEHEREGARAY, L. B. Twenty years of phylogeography: the state of the field and the challenges for the Southern Hemisphere. **Molecular Ecology**, v. 17, n. 17, p. 3754–3774, 2008.

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

BFG. Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. **Rodriguésia**, v. 66, n. 4, p. 1085–1113, 2015.

BONATELLI, I. A. S.; ZAPPI, D. C.; TAYLOR, N. P.; MORAES, E. M. Usefulness of cpDNA markers for phylogenetic and phylogeographic analyses of closely related cactus species. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 4, p. 4579–4585, 2013.

BORHIDI, A. **Phytogeography and vegetation ecology of Cuba**. Budapest: Akadémiai Kiadó, 1996. p. 29–32.

BORSCH, T.; QUANDT, D. Mutational dynamics and phylogenetic utility of noncoding chloroplast DNA. **Plant Systematics and Evolution**, v. 282, n. 3-4, p. 169–199, 2009.

CASPER, S. J. *Pinguicula lippoldii* nova spec. and *Pinguicula toldensis* nova spec. – two endemic *Pinguicula* species (Lentibulariaceae) from East Cuba new to science. **Wulfenia**, v. 14, p. 75 –96, 2007.

CASPER, S. J.; STIMPER, R. Chromosome numbers in *Pinguicula* (Lentibulariaceae): survey, atlas, and taxonomic conclusions. **Plant Systematics and Evolution**, v. 277, n. 1-2, p. 21–60, 2009.

CAVERS, S.; NAVARRO, C.; LOWE, A. J. Targeting genetic resource conservation in widespread species: A case study of *Cedrela odorata* L. **Forest Ecology and Management**, v. 197, n. 1-3, p. 285–294, 2004.

CAVERS, S.; NAVARRO, C.; LOWE, A. J. Chloroplast DNA phylogeography reveals colonization history of a neotropical tree, *Cedrela odorata* L., in Mesoamerica. **Molecular Ecology**, v. 12, n. 6, p. 1451–1460, 2003a.

CAVERS, S.; NAVARRO, C.; LOWE, A. J. A combination of molecular markers identifies evolutionarily significant units in *Cedrela odorata* L. (Meliaceae) in Costa Rica. **Conservation Genetics**, v. 4, n. 5, p. 571–580, 2003b.

CHIES, T. T. S. Genomas vegetais. In: FREITAS, L. B.; BERED, F. (Eds). **Genética: Evolução Vegetal**. Porto Alegre: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003. p. 243-261.

CLIVATI, D. **Ecologia molecular de *Utricularia reniformis* A.St.-Hil. (Lentibulariaceae)**. 2012. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade de Mogi das Cruzes, 2012.

DOMÍNGUEZ, Y. **Taxonomia e filogeografia de *Pinguicula* L. ser. *Albidae* Casper (Lentibulariaceae)**. 2014. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade de Mogi das Cruzes, 2014.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. **Molecular Ecology**, v. 14, n. 8, p. 2611–2620, 2005.

FELINER, G. N.; ROSSELLÓ, J. A. Better the devil you know ? Guidelines for insightful utilization of nrDNA ITS in species-level evolutionary studies in plants. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 44, n. 2, p. 911–919, 2007.

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

FLORA DO BRASIL 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/> >. Acesso em: 04 Nov. 2016.

FROMM-TRINTA, E. Revisão do gênero *Genlisea* St.-Hil (Lentibulariaceae) no Brasil. **Boletim do museu nacional**, n. 61, p. 1–20, 1981.

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

GONZÁLEZ TORRES, L. R.; PALMAROLA, A.; GONZÁLEZ OLIVA, L.; BÉCQUER, E. R.; TESTÉ, E.; BARRIOS, D. Lista roja de la flora de Cuba. Jardín Botánico Nacional/Sello Editorial AMA: **Bissea**, v. 10, n. 1, 2016. 352 p. Edição Especial.

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

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

HUYNH, K. L. Étude de la morphologie du pollen du genre *Utricularia* L. **Pollen et Spore**, v. 10, n. 1, p. 11–55, 1968.

JOBSON, R. W.; PLAYFORD, J.; CAMERON, K. M.; ALBERT, V. A.; Molecular Phylogenetics of Lentibulariaceae Inferred from Plastid rps16 Intron and trnL-F DNA Sequences: Implications for Character Evolution and Biogeography. **Systematic Botany**, v. 28, n. 1, p. 157–171, 2003.

KAMEYAMA, Y.; OHARA, M. Predominance of clonal reproduction, but recombinant origins of new genotypes in the free-floating aquatic bladderwort *Utricularia australis* f. *tenuicaulis* (Lentibulariaceae). **Journal of Plant Research**, v. 119, n. 4, p. 357–362, 2006a.

KAMEYAMA, Y.; OHARA, M. Genetic Structure in Aquatic Bladderworts: Clonal Propagation and Hybrid Perpetuation. **Annals of Botany**, v. 98, n. 5, p. 1017–1024, 2006b.

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

KOCH, M. A.; KIEFER, C.; EHRICH, D.; VOGEL, J.; BROCHMANN, C.; MUMMENHOFF, K. Three times out of Asia Minor: the phylogeography of *Arabis alpina* L. (Brassicaceae). **Molecular Ecology**, v. 15, n. 3, p. 825–839, 2006.

LARENA, I.; SALAZAR, O.; GONZÁLEZ, V.; JULIÁN, M. C.; RUBIO, V. Design of a primer for ribosomal DNA internal transcribed spacer with enhanced specificity for ascomycetes. **Journal of Biotechnology**, v. 75, n. 2-3, p. 187–194, 1999.

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

LISTON, A.; ROBINSON, W. A.; PIÑERO, D.; ALVAREZ-BUYLLA, E. R. Phylogenetics of *Pinus* (Pinaceae) Based on Nuclear Ribosomal DNA Internal Transcribed Spacer Region Sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 11, n. 1, p. 95–109, 1999.

LOBREAU-CALLEN, D.; JÉRÉMIE, J.; SUAREZ-CERVERA, M. Morphologie et ultrastructure du pollen dans le genre *Utricularia* L. (Lentibulariaceae). **Canadian Journal of Botany**, v. 77, n. 5, p. 744–767, 1999.

LOGACHEVA, M. D.; VALIEJO-ROMAN, C. M.; DEGTJAREVA, G. V.; STRATTON, J. M.; DOWNIE, S. R.; SAMIGULLIN, T. H.; PIMENOV, M. G. Molecular Phylogenetics and Evolution Short Communication A comparison of nrDNA ITS and ETS loci for phylogenetic inference in the Umbelliferae: An example from tribe *Tordylieae*. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 57, n. 1, p. 471–476, 2010.

MARTINS, S. V.; SILVA, N. R. S.; SOUZA, A. D.; MEIRA NETO, J. A. A. Distribuição de espécies arbóreas em um gradiente topográfico de Floresta Estacional Semidecidual em Viçosa, MG. **Scientia Forestalis/Forest Sciences**, v. 64, p. 172–181, 2003.

MENEZES, C. G. **Sistemática, evolução e biologia reprodutiva de *Utricularia* com ênfase para *Utricularia amethystina* Salzm. ex A.St.-Hil. & Girard (Lentibulariaceae)**. 2015. Tese (Doutorado em Agronomia Genética e Melhoramento de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2015.

MENEZES, C. G. **Dinâmica e estrutura de populações de *Utricularia* (Lentibulariaceae): comparação entre espécies ameaçadas e não ameaçadas**. 2010. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia, subárea Taxonomia Molecular) – Universidade de Mogi das Cruzes, 2010.

MIRANDA, V. F. O.; MENEZES, C. G.; SILVA, S. R.; DÍAZ, Y. C. A.; RIVADAVIA, F. 2015. Lentibulariaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB146>>. Acesso em: 11 Ago. 2016.

MIRANDA, V. F. O.; BORGES, R. A.; HERING, R. L.; MONTEIRO, N.; DOS SANTOS FILHO, L. A. Lentibulariaceae. In: Martinelli, G; Avila Moraes M. **Livro Vermelho da Flora do Brasil**. 1. ed. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013. p. 1100.

MONCADA, M.; HERNÁNDEZ, E.; CABRERA, M. Análisis polínico de sedimentos marinos del occidente de la Isla de la Juventud (Cuba). **Acta Botánica Hungárica**, v. 36, p. 145-161. 1990.

MÜLLER, K.; BORSCH, T. Phylogenetics of *Utricularia* (Lentibulariaceae) and molecular evolution of the trnK intron in a lineage with high substitutional rates. **Plant Systematics and Evolution**, v. 250, n. 1-2, p. 39–67, 2005.

MÜLLER, K.; BORSCH, T.; LEGENDRE, L.; POREMBSKI, S.; THEISEN, I.; BARTHLOTT, W. Evolution of Carnivory in Lentibulariaceae and the Lamiales. **Plant Biology**, v. 6, n. 4, p. 477–490, jul. 2004.

NIELSEN, R.; BEAUMONT, M. A. Statistical inferences in phylogeography. **Molecular Ecology**, v. 18, n. 6, p. 1034–1047, 2009.

OLMSTEAD, R. G.; PALMER, J. D. Chloroplast DNA systematics: A review of methods and data analysis. **American Journal of Botany**, v. 81, n. 9, p. 1205-1224, 1994.

PANFET, C. M. El género *Utricularia* (Lentibulariaceae) en las Antillas Mayores. **Revista del Jardín Botánico Nacional**, v. 29, p. 11–19, 2008.

PETIT, R. J.; VENDRAMIN, G. G. Plant phylogeography based on organelle genes : an introduction. In: WEISS, S.; FERRAND, N. (Eds.). **Phylogeography of Southern European Refugia**. Heidelberg, Germany: Springer, 2007. p. 25.

PETIT, R. J.; DUMINIL, J.; FINESCHI, S.; HAMPE, A.; SALVINI, D.; VENDRAMIN, G. G. Comparative organization of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant populations. **Molecular Ecology**, v. 14, n. 3, p. 689–701, 2005.

PLEINES, T.; JAKOB, S. S.; BLATTNER, F. R. Application of non-coding DNA regions in intraspecific analyses. **Plant Systematic Evolution**, v. 282, n. 3-4, p. 281–294, 2009.

RENTARÍA, M. Breve revisión de los marcadores moleculares. In: EGUIARTE, L. E.; SOUZA, V.; AGUIRRE, X. (Eds). **Ecología Molecular**. 1. ed. México, D. F. Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales, 2007. p. 543.

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

SCHAAL, B. A.; HAYWORTH, D. A.; OLSEN, K. M.; RAUSCHER, J. T.; SMITH, W. A. Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. **Molecular Ecology**, v. 7, n. 4, p. 465–474, 1998.

SHAW, J.; LICKEY, E. B.; SCHILLING, E. E.; SMALL, R. L. Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms : the tortoise and the hare III<sup>1</sup>. **American Journal of Botany**, v. 94, n. 3, p. 275–288, 2007.

SHAW, J.; LICKEY, E. B.; BECK, J. T.; FARMER, S. B.; LIU, W.; MILLER, J.; SIRIPUN, K. C.; WINDER, C. T.; SCHILLING, E. E. SMALL, R. L. Tortoise and the Hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. **American Journal of Botany**, v. 92, n. 1, p. 142–166, 2005.

SHIMAI, H.; MASUDA, Y.; VALDÉS, C. M. P.; KONDO, K. Phylogenetic analysis of Cuban *Pinguicula* (Lentibulariaceae) based on internal transcribed spacer (ITS) region. **Chromosome Botany**, v. 2, n. 4, p. 151–158, 2007.

SOHMA, K. Polen morphology of the Japanese species of *Utricularia* L. and *Pinguicula* L. with notes on fossil pollen of *Utricularia* from Japan (1)\*\*. **The Journal Japanese Botany**, v. 50, n. 6, p. 164–179, 1975a.

SOHMA, K. Polen morphology of the Japanese species of *Utricularia* L. and *Pinguicula* L. with notes on fossil pollen of *Utricularia* from Japan (2)\*\*. **The Journal Japanese Botany**, v. 50, n. 7, p. 193–208, 1975b.

SOLTIS, D. E., SOLTIS P. S, MILLIGAN B. J. Intraspecific chloroplast DNA variation: systematic and phylogenetic implications. In: SOLTIS P. S.; DOYLE J. J. (Eds.). **Molecular systematics of plants**. New York: Chapman & Hall, 1992. p. 117- 150.

TABERLET, P.; GIELLY, L.; PAUTOU, G.; BOUVET, J. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. **Plant Molecular Biology**, v. 17, n. 5, p. 1105–1109, 1991.

TAYLOR, P. **The genus *Utricularia* - a taxonomic monograph**. London: Office of Public Sector Information, 1989. p. 3-5, 24, 46, 52, 565-566, 679.

TEMPLETON, A. R. **Population genetics and microevolutionary theory**. New Jersey: Jhon Wiley & Sons, 2006. p. 720.

TENEB, E. A.; CAVIERES, L. A.; PARRA, M. J.; MARTICORENA, A. Patrones geográficos de distribución de árboles y arbustos en la zona de transición climática mediterráneo-templada de Chile. **Revista chilena de historia natural**, v. 77, n. 1, p. 51–71, 2004.

THANIKAIMONI, G. Pollen morphology of the genus *Utricularia*. **Pollen et Spore**, v. 8, n. 2, p. 265–284, 1966.

TSYMBALYUK, Z. M.; MOSYAKIN, S. L.; BEZUSKO, L. G. Comparative morphological characterization of pollen grains of species of *Pinguicula* L. and *Utricularia* L. in the flora ukraine. **Ukrainian Botanical Journal**, v. 65, n. 4, p. 520–534, 2008.

VÁZQUEZ-DOMÍNGUEZ, E.; CASTAÑEDA-RICO, S.; GARRIDO-GARDUÑO, T.; GUTIÉRREZ-GARCÍA, T. A. Avances metodológicos para el estudio conjunto de la información genética, genealógica y geográfica en análisis evolutivos y de distribución. **Revista Chilena de Historia Natural**, v. 82, n. 2, p. 277–297, 2009.

WANG, P.; ZHANG, X.; TANG, N.; LIU, J.; XU, L.; WANG, K. Phylogeography of *Libanotis buchtormensis* (Umbelliferae) in Disjunct Populations along the Deserts in Northwest China. **PLoS ONE**, v. 11, n. 7, p. 1–18, 2016.

WHITLOCK, B. A.; HALE, A. M.; GROFF, P. A. Intraspecific Inversions Pose a Challenge for the trnH-psbA Plant DNA Barcode. **PLoS ONE**, v. 5, n. 7, p. 1–8, 2010.

WICKE, S.; SCHÄFERHOFF, B.; DEPAMPHILIS, C. W.; MÜLLER, K. F. Disproportional Plastome-Wide Increase of Substitution Rates and Relaxed Purifying Selection in Genes of Carnivorous Lentibulariaceae. **Molecular Biology and Evolution**, v. 31, n. 3, p. 529–545, 2014.

ZAYA, D. N.; MOLANO-FLORES, B.; FEIST, M. A.; KOONTZ, J. A.; COONS, J. Assessing genetic diversity for the USA endemic carnivorous plant *Pinguicula ionantha* RK Godfrey (Lentibulariaceae). **Conservation Genetics**, p. 1-10, 2016.

ZHANG, Q.; CHIANG, T. Y.; GEORGE, M.; LIU, J. Q.; ABBOTT, R. J. Phylogeography of the Qinghai-Tibetan Plateau endemic *Juniperus przewalskii* (Cupressaceae) inferred from chloroplast DNA sequence variation. **Molecular Ecology**, v. 14, n. 11, p. 3513–3524, 2005.

ZINK, R. M.; DROVETSKI, S. V.; ROHWER, S. Selective neutrality of mitochondrial ND2 sequences, phylogeography and species limits in *Sitta europaea*. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 40, n. 3, p. 679–686, 2006.

## **CAPÍTULO 2 - Diversidade genética e dinâmica de populações de *Utricularia foliosa* L. (Lentibulariaceae) baseadas no espaçador *trnS-trnG* do DNA cloroplastidial e na região ITS do DNA nuclear ribossomal**

**RESUMO** – *Utricularia foliosa* L. é uma planta carnívora distribuída na América tropical e África. A espécie ocorre em áreas que têm sido afetadas por diversos fatores ambientais podendo isto influenciar a dinâmica populacional. O presente estudo visou estimar a diversidade genética e estrutura populacional de populações de *U. foliosa* do Brasil e de Cuba, com o emprego do espaçador *trnS-trnG* do DNA cloroplastidial e da região ITS do DNA nuclear ribossomal, e assim poder inferir processos demográficos e filogeográficos. Foram analisadas sete populações de *U. foliosa* coletadas nos Estados de São Paulo e Rio Grande do Norte (Brasil) e na região ocidental de Cuba. Foram encontradas altas taxas de diversidade genética sendo inferida a presença de vários fatores demográficos atuando nas populações. Além disso foi possível verificar que as populações não estão estruturadas geneticamente sendo as principais diferenciações observadas dentro das populações. As populações de *U. foliosa* podem ter se diversificado recentemente sendo observado compartilhamento de haplótipos entre populações do Brasil e de Cuba.

**Palavras-chave:** demografia, estrutura populacional, história evolutiva, haplótipos

### **1 INTRODUÇÃO**

*Utricularia foliosa* L. é uma espécie de planta carnívora aquática pertencente à família Lentibulariaceae distribuída na América tropical e África e ocorre especialmente em águas pouco profundas de lagos, rios e pântanos de baixa altitude demais espécies da seção *Utricularia* pela presença de estolões aplanados e sementes lenticulares estreitas com uma asa tênue e regular (TAYLOR, 1989). Pela inusual complexidade morfológica e desenvolvimento desta espécie, não tem sido encontrada uma clara diferenciação estrutural entre caules e folhas como em outras

espécies de plantas. Segundo Sattler e Rutishauser (1990) em *Utricularia foliosa* o desenvolvimento e crescimento de estruturas tais como ramos, inflorescências e brácteas está determinado pela combinação de processos morfológicos e ontogenéticos. Recentemente Silva et al. (2016) descreveram o plastoma de *U. foliosa* sendo que o genoma de cloroplasto da espécie possui 150,851 bp de tamanho e além disso, foi suportado filogeneticamente o posicionamento da espécie junto com outras carnívoras aquáticas da seção *Utricularia*, tais como *U. gibba* e *U. macrohiza*.

Em Cuba, *Utricularia foliosa* estende-se por quase toda a ilha, sendo o ocidente do país a região que apresenta maior riqueza de espécies de Lentibulariaceae (PANFET, 2008). Esta região de Cuba tem uma ampla variedade paisagística e quanto à diversidade é uma das áreas mais ricas do arquipélago (BORHIDI, 1996). Em Cuba, alguns *habitat* aquáticos onde ocorre *U. foliosa* têm sofrido alterações no pH devido ao derramamento de poluentes, fertilizantes e outros compostos químicos, além do uso indiscriminado da água para a irrigação de diferentes culturas (PANFET, 2008). Portanto, é preciso um estudo das populações com o objetivo de conhecer melhor a espécie e o manejo das áreas onde ocorre.

No Brasil, a espécie tem uma ampla distribuição e também ocorre na maioria dos estados do país. Abrange vários domínios fitogeográficos (Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica e Pantanal) e se encontra em áreas antropizadas (MIRANDA et al., 2015). Embora não tenha sido considerada como uma espécie sob categoria de ameaça segundo o Livro Vermelho da Flora do Brasil (MIRANDA et al., 2013) é importante conhecer o estado de conservação das populações devido ao fato de se encontrar em áreas que têm sido afetadas pela ocupação territorial, sofrido invasão biológica causada por espécies exóticas e da exploração desordenada dos recursos naturais (KLINK; MACHADO, 2005; PINTO et al., 2006).

A filogeografia estuda as relações evolutivas e enfatiza aspectos históricos da distribuição geográfica atual de linhagens de genes, que têm sido possível obter mediante a análise e uso da informação contida no DNA (VÁZQUEZ-DOMÍNGUEZ et al., 2009). Estudos com DNA mitocondrial (mtDNA), cloroplastidial (cpDNA) e nuclear (nDNA), particularmente ITS, têm mostrado excelentes resultados em estudos filogenéticos com uma alta taxa de diferenciação genética e estrutura

filogenética ao longo da distribuição das espécies (KOCH et al., 2006). Os estudos demográficos encontram-se muito relacionados aos estudos fitogeográficos, podendo por meio deles inferir mudanças históricas do tamanho populacional a partir de sequências de DNA de populações atuais e, ao ser combinada a informação filogenética e genealógica, pode-se determinar se as populações se mantêm estáveis ou se têm sofrido crescimento (VÁZQUEZ-DOMÍNGUEZ et al., 2009). Portanto, os estudos filogeográficos são uma importante ferramenta para estabelecer relações entre a filogenia e a genética de populações.

Os estudos populacionais no gênero *Utricularia* são escassos (e.g. CLIVATI et al., 2012; KAMEYAMA; OHARA, 2006a, 2006b; KAMEYAMA; TOYAMA; OHARA, 2005; MENEZES, 2015, 2010;) e para as populações cubanas não existem pesquisas relacionadas à diversidade genética, estrutura populacional e filogeografia dos táxons e sua relação com processos evolutivos. Portanto, o objetivo deste estudo foi determinar a diversidade genética e estrutura populacional de *Utricularia foliosa* mediante análise do espaçador *trnS-trnG* do DNA cloroplastidial e da região ITS do DNA nuclear ribossomal para inferir processos demográficos e filogeográficos.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram amostradas 7 populações de *Utricularia foliosa* L. que ocorrem no Brasil e na região ocidental de Cuba (Figura 1). As coletas dos espécimes foram realizadas entre os anos 2013 e 2015 em populações naturais (Tabela 1). Levando em conta que *U. foliosa* tem hábito aquático, foram considerados indivíduos da mesma população todos aqueles amostrados num raio de 1 km, sendo variável o número de indivíduos coletados por população em virtude do número de espécimes encontrados. As amostras de tecido vegetal foram conservadas em sílica gel (CHASE; HILLS, 1991) para posterior extração de DNA. De cada população amostrada foram depositados *vouchers* nos herbários do *Instituto de Ecología y Sistemática* (HAC) e na Universidade Estadual Paulista - UNESP, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (JABU).

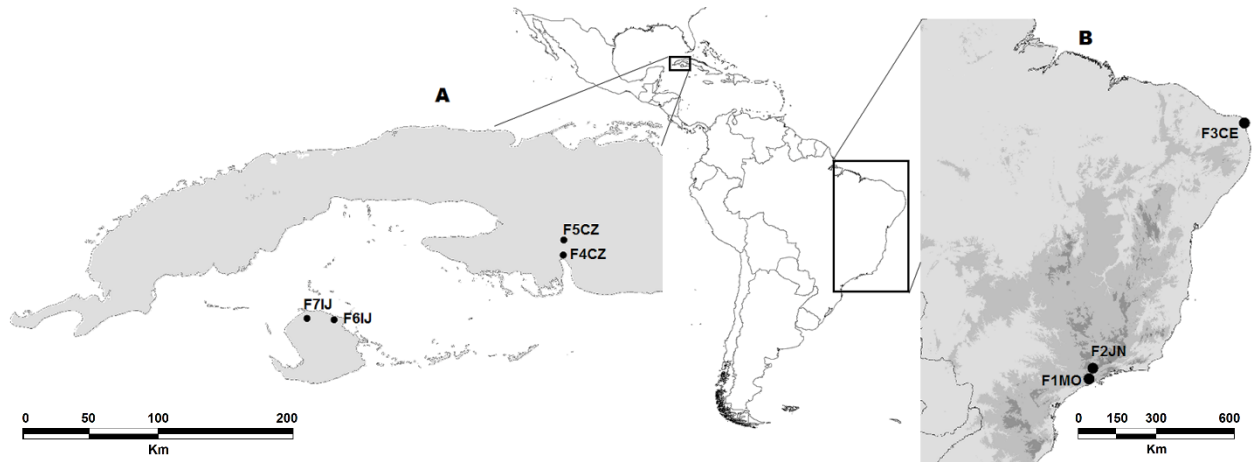


Figura 1. Localização geográfica das populações amostradas de *Utricularia foliosa* L. da região ocidental de Cuba (A) e Brasil (B). Os pontos representam as localidades das populações. Populações: Mogi das Cruzes (F1MO), Jardim Norma (F2JN), Ceará Mirim (F3CE), *Ciénaga de Zapata* (F4CZ e F5CZ) e *Isla de la Juventud* (F6IJ e F7IJ).

Tabela 1. Populações de *Utricularia foliosa* incluídas neste estudo.

Populações	Localidades	Coordenadas e altitude (m)	Herbários
F1MO	Brasil, São Paulo. Mogi das Cruzes. Rodovia Professor Alfredo Rolim de Moura	23°33'27.10" S; 46°8'14.82" W / 748m	JABU
F2JN	Brasil, São Paulo. São Paulo. Jardim Norma	23°32'21.98" S; 46°8'35.77" W / 750m	JABU
F3CE	Brasil, Rio Grande do Norte. Ceará Mirim. Jacumã.	5°34'59.99" S; 35°13'59.99" W / 10m	JABU
F4CZ	Cuba, Matanzas. <i>Ciénaga de Zapata</i> . 3 km antes de Palpite	22°19'55.25" N; 81°10'56.16" W / 7m	HAC
F5CZ	Cuba, Matanzas. <i>Ciénaga de Zapata</i> . 1 km antes de Palpite	22°19'32.16" N; 81°11'7.07" W / 6m	HAC
F6IJ	Cuba, <i>Isla de la Juventud</i> . Gerona. Laguna Fuente Luminosa	21°52'26.22" N; 82°45'20.16" W / 14m	HAC
F7IJ	Cuba, <i>Isla de la Juventud</i> . Gerona Próximo al Río las Nuevas	21°52'57.72"N; 82°56'24.57" W / 7m	HAC

## 2.1 Análises moleculares

### 2.1.1 Extração do DNA

A extração de DNA genômico foi feita mediante o método CTAB (DOYLE; DOYLE 1987; CULLINGS, 1992) com modificações de Lodhi et al. (1994). Foram utilizados 25-30 mg de tecido desidratado previamente higienizado para minimizar a presença de micro-organismos presentes na superfície vegetal. As amostras foram expostas em nitrogênio líquido e posteriormente maceradas. A quantidade e qualidade do DNA obtido foi estimada por meio do espectrofotômetro (NanoDrop®) e as amostras armazenadas a -20 °C.

### 2.1.2 Amplificação

Foram amplificadas três regiões do DNA cloroplastidial (*trnS-trnG*, *rpl20-5'-rps12* e *rbcL*) e uma do DNA nuclear ribossomal (ITS). Os iniciadores empregados assim como a temperatura de anelamento para cada uma das regiões estão descritos na Tabela 2. As reações foram feitas com volume total de 25 µL no termociclador PTC-100 (MJ Research).

As reações de PCR foram otimizadas para *rpl20-5'-rps12* e *rbcL* para empregar 2U Taq DNA polimerase (Dream Taq™ Sinapse), 0,1 vol. de tampão 10 x com MgCl<sub>2</sub> mM, 0,08 mM de nucleotídeos (dNTPs, 10 mM), 0,4 µM de cada iniciador, 30 ng de DNA *template*. O programa de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) incluiu desnaturação inicial a 92 °C por 3 min seguido de 29 ciclos a 92°C /30 s, 50 °C/ 40-50 s de anelamento, 72 °C / 5 min e extensão final a 72 °C / 10 min.

Para a região cloroplastidial *trnS-trnG* foram empregados: 2U Taq DNA polimerase (Dream Taq™ Sinapse), 0,1 vol. de tampão 10 x com MgCl<sub>2</sub> mM, 0,08 mM de nucleotídeos (dNTPs, 10 mM), 0,2 µM de cada iniciador, 30 ng de DNA *template*, (BSA) segundo recomendação de Miranda et al. (2010). O programa de PCR incluiu desnaturação inicial a 94 °C por 1 min seguido por 30 ciclos a 94 °C/30 s, 55 °C / 30 s de anelamento, 72 °C / 5 min e extensão final a 72 °C / 5 min.

Para o espaçador nuclear ribossomal ITS foram utilizados: 2U Taq DNA polimerase (Dream Taq™ Sinapse), 0,1 vol. de tampão 10 x com MgCl<sub>2</sub> mM, 0,08 mM de nucleotídeos (dNTPs, 10 mM), 0,1 μM de cada iniciador, 30 ng de DNA *template* e DMSO segundo recomendação de Miranda et al. (2010). O programa de PCR incluiu desnaturação inicial a 95°C por 3 min seguido por 30 ciclos a 95 °C /30 s, 54 °C / 30 s de anelamento, 72 °C / 1 min e extensão final a 72 °C / 10 min.

Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose a 1% sendo evidenciados com brometo de etídio e posteriormente revelados e fotografados.

Tabela 2. Iniciadores empregados na amplificação das regiões do DNA cloroplastidial e nuclear em *Utricularia foliosa*. (F="forward", R="reverse", TA=temperatura de anelamento, TE=tamanho esperado do *amplicon*).

Região	Sentido	Sequência	TE	TA	Refêrencia
<i>trnS-G</i>	F	5'-GACGCTTTAGTCCACTCAGC-3'	~844 pb	55 °C	HAMILTON (1999) modificado
<i>trnS-G</i>	R	5'-GAACGAATCACACTT TTACCA C-3'	~844 pb	55 °C	HAMILTON (1999)
<i>rps12</i>	F	5'-TTTGTCTACGTCTCCGA GC-3'	~782 pb	50 °C	HAMILTON, (1999)
<i>rpl20</i>	R	5'-GTCGAGGAACATGTACTA GG-3'	~782 pb	50°C	HAMILTON, (1999)
<i>rbclLa_f</i>	F	5'-ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC-3'	~599 pb	50 °C	CBOL (2009)
<i>rbclLa_rev</i>	R	5'-GTAAAATCAAGTCCACCRCG-3'	~599 pb	50 °C	CBOL (2009)
<i>ITS5</i>	F	5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'	~700 pb	54 °C	WHITE et al. (1990)
<i>28cc</i>	R	5'- ACT CGC CGT TAC TAG GGG AA-3'	~700 pb	54 °C	HILLIS; DIXON (1991)

### 2.1.3 Purificação e sequenciamento dos produtos amplificados

Para a purificação das amostras procedeu-se a lavagem com acetato de sódio e etanol. Acrescentaram-se ao volume da reação 100 μL de água Milli-Q lavando as paredes do tubo e a solução foi transferida para tubos de 1,5 mL. Adicionaram-se 12 μL de acetato de sódio e 330 μL de etanol 100% com inversão

dos tubos e deixaram-se repousar a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 3 horas. Posteriormente foram centrifugados a 14.000 rpm durante 30 min a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  seguidamente foram descartados o acetato de sódio e o etanol. Adicionou-se 1 mL de etanol 70% invertendo os tubos e centrifugou-se a 14.000 rpm durante 10 min a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Após feita a lavagem duas vezes o etanol foi descartado, quando o *pellet* estava seco foi diluído em 22  $\mu\text{L}$  de água. Os produtos purificados foram quantificados em espectrofotômetro (NanoDrop®).

Para as reações de sequenciamento foi utilizado 1  $\mu\text{L}$  (10 ng /  $\mu\text{L}$ ) do produto de PCR purificado, 4  $\mu\text{L}$  de água Milli-Q, 1  $\mu\text{L}$  (10mM) de cada iniciador 3  $\mu\text{L}$  de tampão de sequenciamento (*Save Money 2,5x*), 1  $\mu\text{L}$  de *Big Dye v 3.1* completando a reação para um volume final de 10  $\mu\text{L}$ . O programa de PCR de sequenciamento foi de  $96\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 1 min, seguidamente 39 ciclos a  $96\text{ }^{\circ}\text{C}$  / 15 s,  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  / 15 s,  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  / 4 min para finalizar as amostras foram mantidas a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente foram adicionados 80  $\mu\text{L}$  de isopropanol 75% em cada amostra, incubadas 15 min a temperatura ambiente e centrifugadas a 4.000 rpm em centrífuga com rotor para microplacas por 30 min a  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente foi descartado o isopropanol e adicionaram-se 200  $\mu\text{L}$  de etanol 70% e as placas centrifugadas a 4.000 rpm por 10 min a  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . A lavagem foi feita duas vezes. O sobrenadante foi descartado e para secagem das placas foram colocadas na centrífuga e posteriormente na bancada por 30 min para secar, ressuspendidas em 10  $\mu\text{L}$  de formamida, desnaturadas por 5 min a  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  e sequenciadas no sequenciador automático ABI 3730 XL DNA Analyzer (*Applied Biosystems*).

#### **2.1.4 Alinhamento e análise de sequências**

As fitas senso e antissenso foram sequenciadas para todos os marcadores. Analisaram-se os eletroferogramas e foram alinhadas cada uma das fitas complementares e obtida a sequência consenso com o Bioedit v. 7.0.9.0 (HALL, 1999) e ClustalW (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994). As sequências foram alinhadas empregando o aplicativo Mafft v. 7 (KATOH; STANDLEY, 2013). Os alinhamentos foram editados manualmente para excluir as extremidades e falsos *indels*.

## 2.2 Análises de diversidade, estrutura genética e demográfica

Para determinar o número de haplótipos ( $h$ ), mutações ( $\eta$ ), os índices de diversidade haplotípica ( $Hd$ ) e nucleotídica ( $\pi$ ) foram analisadas as matrizes com as sequências alinhadas por meio do aplicativo DnaSP v.5.10 (LIBRADO; ROZAS, 2009). A estrutura genética das populações foi estimada mediante a análise de variância molecular hierárquica (AMOVA; EXCOFFIER; SMOUSE; QUATTRO, 1992) mediante o aplicativo Arlequin v.3.5 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010). A análise foi dividida entre populações e entre grupos geográficos (Brasil e Cuba) para cada marcador separadamente. De acordo com a estatística  $F$  foram calculados os índices ( $F_{CT}$ ,  $F_{SC}$ ,  $F_{ST}$ ) significativos quando  $P < 0,05$ . A significância da análise foi obtida com 1.023 permutações. Os agrupamentos utilizados para a análise foram estabelecidos em relação aos haplótipos determinados.

Outra abordagem de estrutura populacional foi implementada por meio do aplicativo BAPS (*Bayesian Analysis of Population Structure*) (CORANDER; TANG, 2007; CORANDER et al., 2008). O programa estima o número máximo de *clusters* baseado no menor valor do  $\log(I_m)$ . Cada matriz de sequência dos marcadores foi analisada separadamente. Inicialmente foi feita a análise de agrupamento de mistura (*mixture analysis*) empregando múltiplos números máximos de agrupamento (1-20) com uma réplica para cada. Seguidamente, o resultado deste agrupamento foi utilizado para uma nova busca utilizando o modelo evolutivo *admixture* (CORANDER; MARTTINEN, 2006). Esta segunda busca considerou o tamanho mínimo de uma população igual ao menor número de sequências obtidas por população com 5.000 interações.

Foram realizados os testes de neutralidade  $D$  de Tajima (TAJIMA, 1989) e  $F_s$  (FU, 1997) utilizando o número total de sítios segregantes identificados em cada grupo de sequências visando inferir eventos demográficos nas populações por meio do aplicativo DnaSP v.5.10 (LIBRADO; ROZAS, 2009). Além disso, foi calculada a distribuição *mismatch* para se testar se as populações estão em equilíbrio ou em expansão (ROGERS; HARPENDING, 1992; SLATKIN; HUDSON, 1991).

## 2.3 Análises filogenéticas e filogeográficas

Foram elaboradas duas matrizes contendo os haplótipos, uma para *trnS-trnG* e outra para ITS, sendo empregadas como grupo-externo sequências de diferentes espécies do gênero *Utricularia* (Apêndice 1). Para as análises probabilísticas, foram testados os modelos evolutivos com ajuda do aplicativo jModelTest (POSADA, 2008). As relações filogenéticas entre os haplótipos do cpDNA e nrDNA de *Utricularia foliosa* foram inferidas utilizando a inferência bayesiana, implementada por meio do aplicativo MrBayes v. 3.1.2 (RONQUIST; HUELSENBECK, 2003).

As redes de haplótipos foram construídas utilizando o aplicativo NETWORK v. 5.0.0.0 (<http://www.fluxus-engineering.com>) mediante o método *median-joining* (BANDELT; FORSTER; RÖHL, 1999). A filogeografia da espécie foi representada com redes de haplótipos a fim de estudar as relações entre eles e sua distribuição geográfica. Os cladogramas foram desenhados com o programa TreeGraph 2 v. 2.0 (STÖVER; MÜLLER, 2010).

Para a reconstrução da história ancestral foram definidas duas regiões geográficas para *Utricularia foliosa*: Brasil e Cuba. Oito espécies de *Utricularia* de regiões geográficas diferentes foram definidas como grupo externo: *U. bisquamata* Schrank, *U. sandersonii* Oliv. que ocorrem na África; *U. dichotoma* Labill., *U. monanthos* Hook.f., *U. volubilis* R.Br na Austrália e *U. flaccida* A.DC., *U. neottioides* A.St.-Hil. & Girard, *U. longifolia* Gardner no Brasil. A reconstrução do ancestral foi implementada usando o software RASP (YU et al., 2015) utilizando o aplicativo S-DIVA (YU; HARRIS; HE, 2010).

## 3 RESULTADOS

### 3.1 Sequências do espaçador cloroplastidial e da região nuclear

Inicialmente foram testados 3 segmentos do cpDNA (*trnS-trnG*, *rps12-rpl20* e *rbcL*) e um do nrDNA (ITS). Determinou-se que o espaçador *trnS-trnG* e a região ITS são os mais apropriados por causa dos maiores níveis de variação (dados não apresentados) encontrados em relação aos outros *loci* pesquisados. O espaçador

cloroplastidial e a região nuclear variaram quanto à eficácia da amplificação e qualidade do sequenciamento trazendo como consequência amostragens desiguais entre populações de *Utricularia foliosa*. A quantidade de sequências obtidas por população, assim como dos haplótipos identificados são descritos nas Tabelas 3 e 4.

### 3.2 Diversidade genética e distribuição de haplótipos

As sequências alinhadas para o espaçador intergênico *trnS-trnG* e a região ITS variaram quanto ao número, tamanho e quantidade de sítios variáveis (*trnS-trnG*: 78 sequências, 611 pb / 58 sítios, ITS: 90 sequências 659 pb / 126 sítios). *Utricularia foliosa* apresenta uma alta taxa de diversidade genética tanto para o espaçador de cloroplasto quanto para a região nuclear, dada pelos índices de diversidade haplotípica ( $Hd$ ) e nucleotídica ( $\pi$ ) quando analisadas todas as populações (Tabela 3 e 4). Quando analisadas as populações separadamente, o espaçador *trnS-trnG* mostrou maiores taxas de diversidade genética nas populações de Cuba em comparação às do Brasil. Para a região ITS a população F1MO apresentou apenas um haplótipo; portanto esta população não contribui com as altas taxas de diversidade observada na espécie em geral.

Os haplótipos obtidos para *Utricularia foliosa* variaram quanto ao número para cada região analisada (*trnS-trnG*: 19, ITS: 27), a maioria deles de baixa frequência e restritos a uma única população (Tabela 5). Para o espaçador cloroplastidial apenas os haplótipos H1 e H7 foram compartilhados e para a região nuclear o haplótipo H7, além de apresentar alta frequência, foi compartilhado entre cinco das populações analisadas.

Tabela 3. Diversidade genética das populações de *Utricularia foliosa* e testes de neutralidade do espaçador intergênico *trnS-trnG* do cpDNA. Populações: Mogi das Cruzes (F1MO), Jardim Norma (F2JN), Ceará Mirim (F3CE), *Ciénaga de Zapata* (F4CZ e F5CZ) e *Isla de la Juventud* (F6IJ e F7IJ).

Populações	N	$\eta$	h	Hd	$\pi$	Testes de neutralidade	
						D	Fs
<b>BRASIL</b>							
F1MO	13	4	5	0,538±0,161	0,00104±0,00037	-1,77497	-3,060
F2JN	9	30	4	0,583±0,583	0,01600±0,00831	-1,89230*	3,474
F3CE	3	7	2	0,667±0,314	0,00783±0,00369	-	2,884
<b>CUBA</b>							
F4CZ	9	26	6	0,833±0,127	0,01686±0,00539	-1,16358	0,849
F5CZ	12	41	8	0,894±0,078	0,03068±0,01166	-1,63349	0,386
F6IJ	8	11	5	0,786±0,151	0,01307±0,00430	-1,54665	-0,336
F7IJ	24	21	11	0,812±0,072	0,00765±0,00194	-2,04783	-4,284
Total	78	67	19	0,648±0,051	0,01429±0,00384	-2,48293**	-6,397

Número de indivíduos (N), número de mutações ( $\eta$ ), número de haplótipos (h), diversidade haplotípica (Hd), diversidade nucleotídica ( $\pi$ ). Testes de neutralidade: D de Tajima, Fs de Fu. Significância: \*P < 0,05; \*\*P < 0,01.

Tabela 4. Diversidade genética das populações de *Utricularia foliosa* e testes de neutralidade na região ITS nrDNA. Populações: Mogi das Cruzes (F1MO), Jardim Norma (F2JN), Ceará Mirim (F3CE), *Ciénaga de Zapata* (F4CZ e F5CZ) e *Isla de la Juventud* (F6IJ e F7IJ).

Populações	N	$\eta$	h	Hd	$\pi$	Testes de neutralidade	
						D	Fs
<b>BRASIL</b>							
F1MO	16	0	1	0,000±0,000	0,00000±0,00000	-	-
F2JN	11	98	5	0,618±0,164	0,04904±0,02341	-0,85325	8,928
F3CE	3	51	3	1,000±0,272	0,07515±0,02276	-	2,398
<b>CUBA</b>							
F4CZ	6	55	4	0,800±0,172	0,04437±0,00925	0,92720	4,751
F5CZ	12	152	5	0,576±0,163	0,08704±0,03876	-1,82198*	9,974
F6IJ	19	177	7	0,544±0,136	0,08012±0,03221	-1,48885	12,383
F7IJ	23	69	15	0,858±0,073	0,02388±0,00815	-2,04517*	-2,435
Total	90	172	27	0,840±0,026	0,03337±0,00746	-2,36102**	-3,678

Número de indivíduos (N), número de mutações ( $\eta$ ), número de haplótipos (h), diversidade haplotípica (Hd), diversidade nucleotídica ( $\pi$ ). Testes de neutralidade: D de Tajima, Fs de Fu. Significância: \*P < 0,05; \*\*P < 0,01.

Tabela 5. Distribuição de haplótipos de *trnS-trnG* e ITS em *Utricularia foliosa*. Populações: Mogi das Cruzes (F1MO), Jardim Norma (F2JN), Ceará Mirim (F3CE), Ciénaga de Zapata (F4CZ e F5CZ) e Isla de la Juventud (F6IJ e F7IJ).

<i>trnS- trnG</i>	Haplótipos	Populações						Freq	
		F1MO	F2JN	F3CE	F4CZ	F5CZ	F6IJ		F7IJ
	H1	12	6						18
	H2	1							1
	H3		1						1
	H4		1						1
	H5		1						1
	H6			1					1
	H7			2	6	10	4	21	43
	H8				1				1
	H9				1				1
	H10				1				1
	H11					1			1
	H12					1			1
	H13						1		1
	H14						1		1
	H15						1		1
	H16						1		1
	H17							1	1
	H18							1	1
	H19							1	1
<hr/>									
ITS	H1	16							16
	H2		1						1
	H3		7						7
	H4		1						1
	H5		1						1
	H6		1						1
	H7			1	6	8	13	1	29
	H8			1					1
	H9			1					1
	H10					1			1
	H11					1			1
	H12					1			1
	H13					1			1
	H14						1		1
	H15						1		1
	H16						1		1
	H17						1		1
	H18						1		1
	H19						1		1
	H20							1	1
	H21							14	14
	H22							2	2
	H23							1	1
	H24							1	1
	H25							1	1
	H26							1	1
	H27							1	1

Freq = Frequência

### 3.3 Demografia

A figura 2 mostra os resultados da análise *mismatch* em populações que apresentam valores significativos quando realizados os testes de neutralidade.

A distribuição *mismatch* realizada para *Utricularia foliosa* baseada no espaçador de cloroplastos e a região nuclear se mostrou multimodal para a espécie quando consideradas todas as populações e quando analisada separadamente por populações, o que representa que estão em equilíbrio (Figura 2).

O teste *D* de Tajima para *trnS-trnG* e ITS forneceu predominantemente valores negativos para todas as populações exceto para F4CZ quando analisada com o nrDNA, não sendo este valor significativo (Tabelas 3 e 4). O espaçador cloroplastidial forneceu valor significativo para *Utricularia foliosa* quando consideradas todas as populações e para a população F2JN. A região nuclear mostrou valores significativos para *Utricularia foliosa* quando consideradas todas as populações e para F5CZ e F7IJ o que indica seleção purificadora ou polimorfismos de baixa frequência (expansão populacional). O teste *F<sub>s</sub>* de Fu para ambos marcadores mostrou valores negativos e positivos quando analisadas as populações.

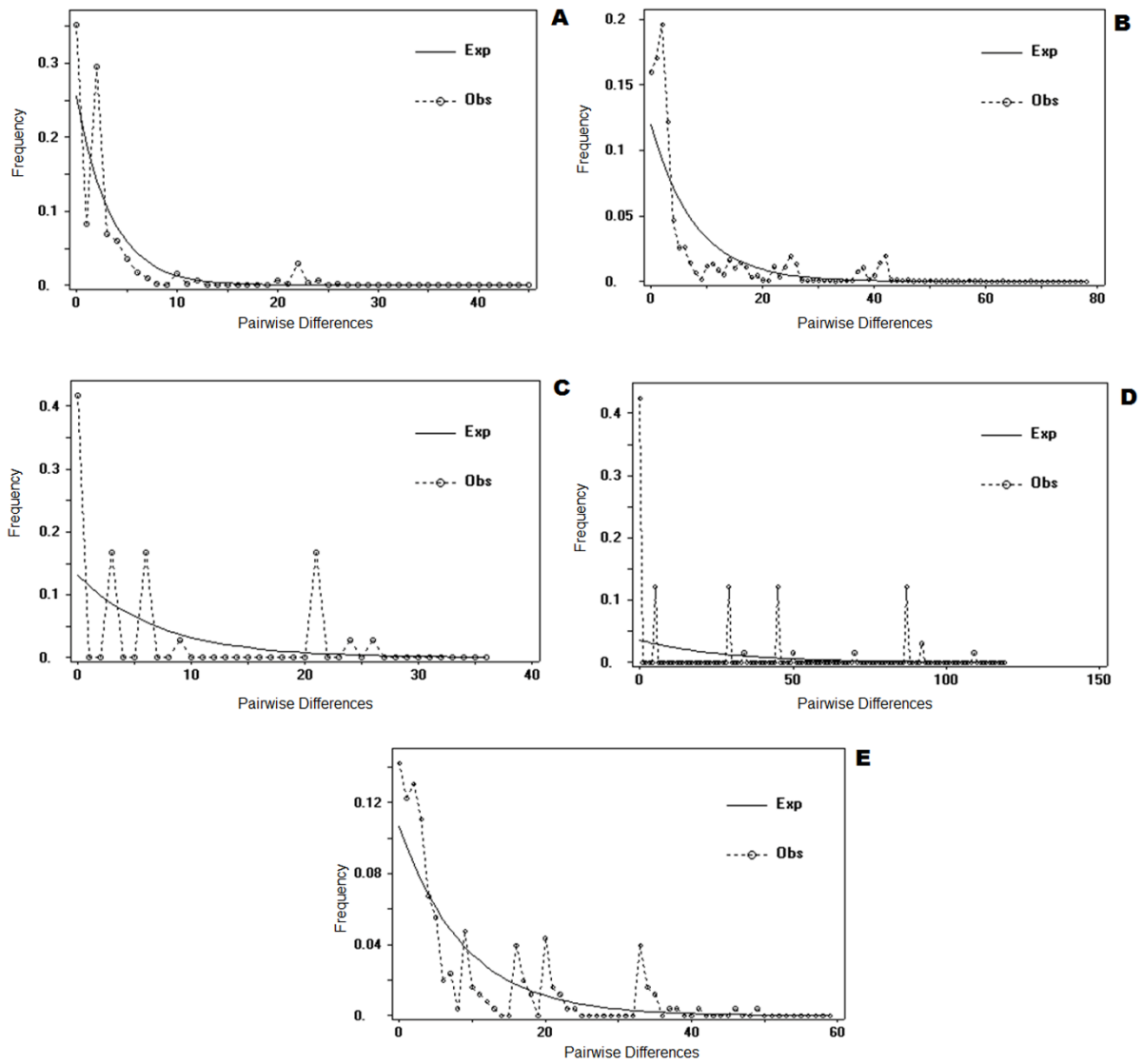


Figura 2. Análise da distribuição *mismatch* para todas as populações de *Utricularia foliosa* com base nas sequências no espaçador *trnS-trnG* (A) e ITS (B). Representação de três das populações analisadas. População F2JN baseada no espaçador *trnS-trnG* (C); F5CZ e F7IJ na região ITS (D-E, respectivamente).

### 3.4 Estrutura genética

A análise AMOVA forneceu valores significativos para todos os níveis analisados, exceto entre grupos geográficos quando analisada a região nuclear (Tabelas 6 e 7).

Foram testadas duas construções hierárquicas. Na primeira análise para *trnS-trnG* e ITS se evidenciou uma alta porcentagem de variação dentro das populações

com alto índice de  $F_{ST}$  (Tabelas 6 e 7). A análise hierárquica por grupos geográficos (Brasil e Cuba) revelou alta porcentagem de variação dentro das populações dos grupos geográficos, para *trnS-trnG* (56,13%) e para ITS (77,69%). Além disso o valor significativo de  $F_{ST}$  para o espaçador e a região nuclear evidenciou alta diferenciação dentro das populações.

Tabela 6. Análise de variância molecular (AMOVA) para populações e grupos geográficos de *Utricularia foliosa* baseadas no espaçador *trnS-trnG*.

Fonte de variação	GL	SQ	Componentes de variância	%	Índice de fixação	P
Entre populações	6	37,600	0,49280	32,07	$F_{ST} = 0,32069$	0,00000
Dentro das populações	71	74,118	1,04391	67,93		
Entre grupos geográficos	1	26,110	0,69365	37,30	$F_{CT} = 0,37298$	0,03226
Entre populações de grupos geográficos	5	11,491	0,12220	6,57	$F_{SC} = 0,10479$	0,00782
Dentro das populações de grupos geográficos	71	74,118	1,04391	56,13	$F_{ST} = 0,43869$	0,00000

GL: graus de liberdade, SQ: soma dos quadrados, %: porcentagem de variação, P: probabilidade ( $P < 0,05$ ).

Tabela 7. Análise de variância molecular (AMOVA) para populações e grupos geográficos de *Utricularia foliosa* baseadas na região ITS.

Fonte de variação	GL	SQ	Componentes de variância	%	Índice de fixação	P
Entre populações	6	76,944	0,79773	20,96	$F_{ST} = 0,20957$	0,00000
Dentro das populações	83	249,734	3,00885	79,04		
Entre grupos geográficos	1	19,244	0,14474	3,74	$F_{CT} = 0,03737$	0,06061
Entre populações de grupos geográficos	5	57,699	0,71931	18,57	$F_{SC} = 0,19294$	0,00000
Dentro das populações de grupos geográficos	83	249,734	3,00885	77,69	$F_{ST} = 0,22310$	0,00000

GL: graus de liberdade, SQ: soma dos quadrados, %: porcentagem de variação, P: probabilidades ( $P < 0,05$ ).

Na análise BAPS, os indivíduos amostrados foram separados em *clusters* de acordo com a estrutura genética encontrada nas populações (Figura 3). Foram identificados 5 *clusters* para o espaçador cloroplastidial e 6 para a região nuclear. Além disso, em ambas análises é possível observar populações não estruturadas que compartilham genótipos entre elas, exceto na população F7IJ da *Isla de la*

*Juventud* (Figura 3B) quando analisada a região ITS, a qual evidenciou um genótipo exclusivo da população e pouco compartilhado com as demais populações.

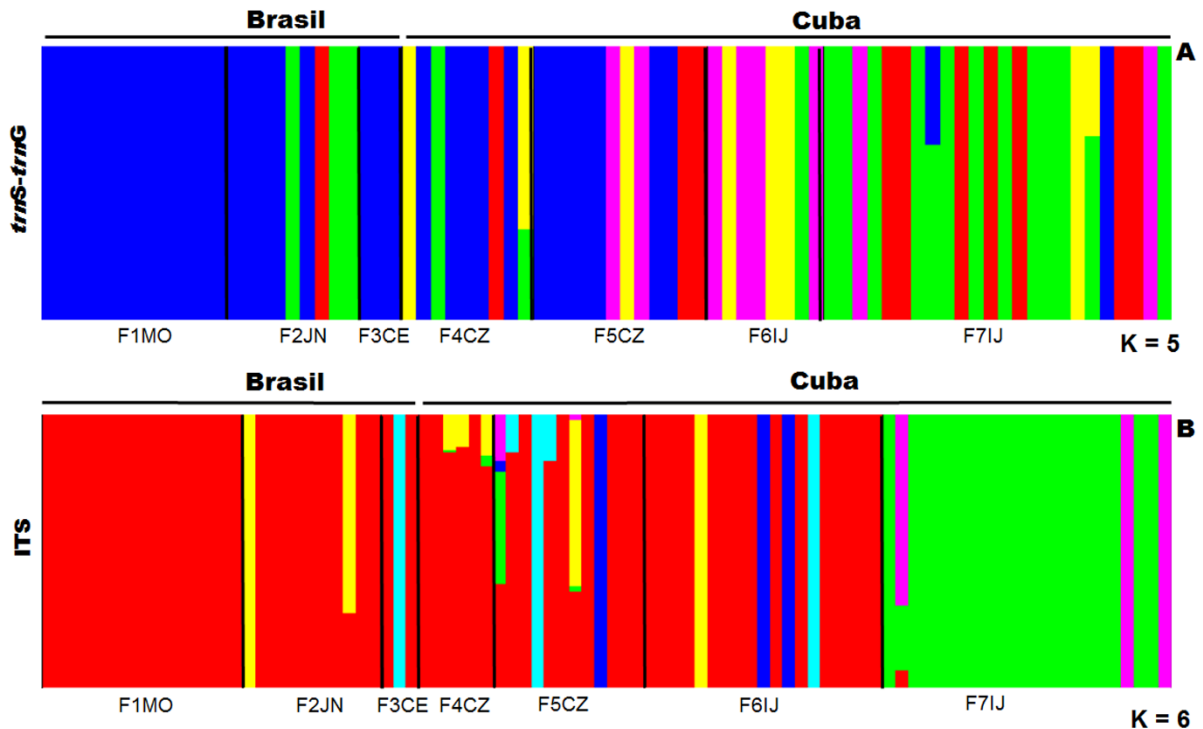


Figura 3. Estrutura genética de populações de *Utricularia foliosa* inferidas mediante a análise bayesiana (BAPS). Agrupamentos baseados em 78 sequências do espaçador *trnS-trnG* (A) e 90 sequências da região nuclear ITS (B). As cores indicam o número de *clusters* para cada marcador analisado. Populações: Mogi das Cruzes (F1MO), Jardim Norma (F2JN), Ceará Mirim (F3CE), *Ciénaga de Zapata* (F4CZ e F5CZ) e *Isla de la Juventud* (F6IJ e F7IJ).

### 3.5 Filogenia e filogeografia

A partir da inferência bayesiana foram construídas duas árvores filogenéticas para *Utricularia foliosa* baseadas nas sequências obtidas do cpDNA e do nrDNA, respectivamente (Figura 4 e 5). Ambas análises produziram árvores com valores consistentes nos ramos, sendo observadas diversas politomias em ambos casos. As reconstruções da distribuição geográfica de nós ancestrais recuperaram a etapa filogeográfica do cpDNA semelhante da obtida para o nrDNA, sendo Cuba a linhagem mais ancestral para ambos marcadores (Figura 4 e 5).



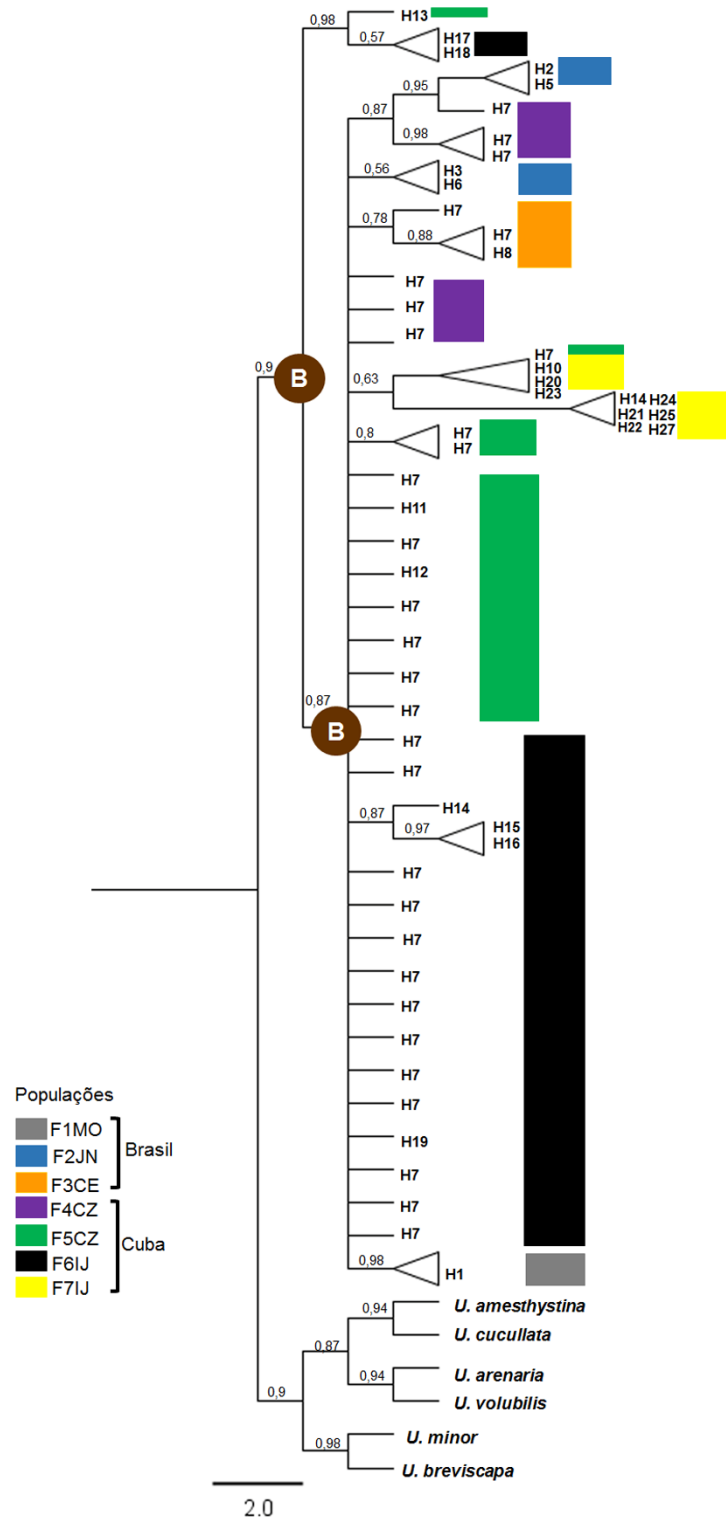


Figura 5. Árvore consenso estrito de hipóteses obtidas mediante Inferência bayesiana (IB) de seqüências de ITS. As cores indicam as populações amostradas de *Utricularia foliosa* e os valores indicam as probabilidades posteriores. Os círculos mostram as reconstruções filogenéticas da distribuição ancestral: Cuba (B). Populações: Mogi das Cruzes (F1MO), Jardim Norma (F2JN), Ceará Mirim (F3CE), Ciénaga de Zapata (F4CZ e F5CZ) e Isla de la Juventud (F6IJ e F7IJ).

As redes de haplótipos construídas mediante o método *median-joining* mostraram as relações filogenéticas dos haplótipos de *Utricularia foliosa* a partir de seqüências de *trnS-trnG* (Figura 6) e ITS (Figura 7). Em ambas análises foi observado compartilhamento de haplótipos entre as populações do Brasil e Cuba.

A rede baseada no espaçador cloroplastidial determinou H7 como o haplótipo de maior compartilhamento, presente em populações cubanas e na população (F3CE) do Rio Grande do Norte. A maioria dos haplótipos restantes mostraram frequências mais baixas. A região nuclear também determinou H7 como o haplótipo de maior frequência compartilhado entre populações do Brasil e Cuba além de haplótipos de baixas frequências.

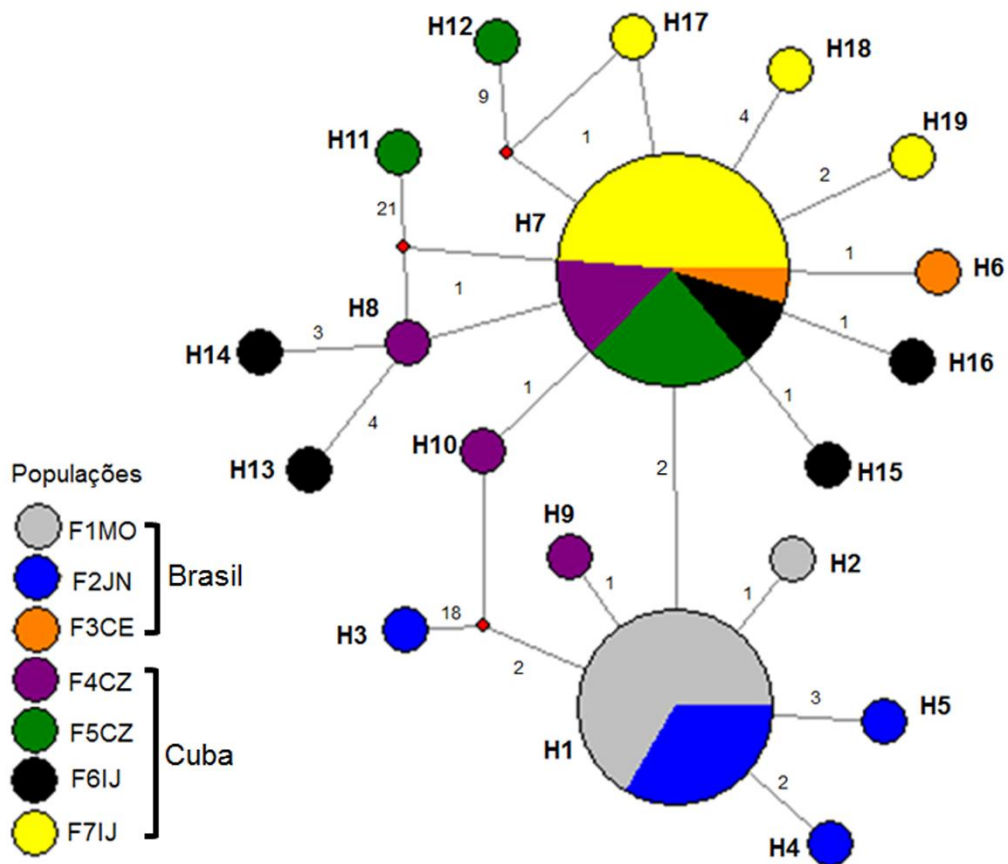


Figura 6. Rede de haplótipos do espaçador intergênico *trnS-trnG* identificados em *Utricularia foliosa*. O tamanho dos nós é proporcional à frequência de cada haplótipo (H). Os vetores médios (nós vermelhos) indicam haplótipos não detectados separados por mutações. Os valores nos ramos indicam a quantidade de mutações entre os haplótipos. Populações: Brasil (F1MO, F2JN, F3CE); Cuba (F4CZ, F5CZ, F6IJ, F7IJ).



quando comparados com os resultados para *U. amethystina* Salzm. ex A.St.-Hil. & Girard a partir de sequências cloroplastidiais *rps16*, *trnL-F*, *rbcL*, *trnS-trnG* e *matK* (MENEZES, 2015), *Pinguicula* L. ser. *Albidae* Casper a partir do espaçador cloroplastidial *psbA-trnH* (DOMÍNGUEZ, 2014) e populações de *Utricularia longifolia* Gardner com emprego do espaçador cloroplastidial *rpl20-rps12* (MENEZES, 2010).

Sabe-se que as angiospermas aquáticas têm capacidade para a reprodução clonal, produzindo progênie totalmente idêntica por reprodução vegetativa (ABRAHASOM, 1980; BARRET, 2015; KAMEYAMA; OHARA, 2006b), além de apresentar estolões altamente eficientes na obtenção de recursos e na dispersão em condições aquáticas (GRACE, 1993). Por esse motivo é razoável pensar que nas plantas aquáticas os níveis de variação genética e o tamanho efetivo da população sejam baixos, sendo maior nas plantas terrestres, porém estas relações têm sido raramente estudadas (BARRETT; ECKERT; HUSBAND, 1993; KAMEYAMA; OHARA, 2006b). Vários fatores podem ter influenciado a diversidade genética das populações. Dentre eles, um dos mais importantes em relação ao fluxo genético é o isolamento espacial dado pela distribuição fragmentada das populações (HARRISON; HASTINGS, 1996).

Em espécies com reprodução clonal da família Bromeliaceae também foram obtidos altos valores de diversidade genética, particularmente em *Aechmea tuitensis* Magana & E.J.Lott. Estes valores, provavelmente, estejam relacionados com eventos frequentes de reprodução sexual que permitem manter o alto polimorfismo (IZQUIERDO; PIÑERO, 2000).

Em nossos trabalhos de campo em Cuba, foi observado que as áreas onde ocorrem as populações de *Utricularia foliosa* estão sendo colonizadas por espécies invasoras aquáticas tais como *Ludwigia sedioides* (Humb. & Bonpl.) H.Hara e *Pistia stratiotes* L. o que poderia influenciar na perda da diversidade genética das populações. Entretanto, foram observados, ao analisar o espaçador cloroplastidial, que os maiores índices de diversidade haplotípica e nucleotídica encontram-se nas populações de Cuba. Provavelmente exista fluxo gênico entre as populações da *Isla de la Juventud* por se encontrarem próximas geograficamente; o mesmo poderia estar acontecendo entre as populações da *Ciénaga de Zapata*. Além disso a *Ciénaga de Zapata* é a maior área de pantanal de Cuba e um dos ecossistemas

mais importantes e conservados das Ilhas do Caribe (OVIEDO, 2013). Deste modo, o fluxo pode estar condicionado pela proximidade geográfica entre populações e estaria relacionado ao compartilhamento de diásporos. Neste aspecto, as cápsulas deiscentes de *Utricularia foliosa* caem da planta quando amadurecem e certamente podem flutuar (TAYLOR, 1989), assim como após a deiscência a própria placenta, auxilia na dispersão das sementes (RODRIGUES et al., in prep.).

Além de ter sido observados altos níveis de diversidade genética para *Utricularia foliosa* na análise da região ITS, foi obtido zero de diversidade para a população F1MO de Mogi das Cruzes. Este aspecto poderia estar condicionado por duas razões. Primeira, é muito difícil definir uma unidade populacional para plantas aquáticas que têm proliferação clonal pela dificuldade de se separar a partir de fragmentos de indivíduos geneticamente diferentes (ABRAHASOM, 1980, BARRETT; ECKERT; HUSBAND, 1993, KAMEYAMA; OHARA, 2006b) e, a segunda, envolvida à biologia reprodutiva da planta. Segundo Taylor (1989), as flores de *Utricularia* são visitadas por insetos das ordens Hymenoptera, Diptera e Lepidoptera. Apesar de que em nossas observações de campo foram constatados visitantes florais para *U. foliosa*, tais como vespas, moscas e libélulas, é conhecido que em espécies como *U. amethystina* (MENEZES, 2015) e *U. reniformis* (CLIVATI et al., 2012) as flores são pouco visitadas pelos polinizadores assim como o comportamento generalista destes (MENEZES, 2015; CLIVATI et al., 2012). Este comportamento poderia trazer como consequência baixo sucesso reprodutivo da polinização em condições naturais além de baixas taxas de diversidade genética.

## 4.2 Estrutura demográfica

Os resultados obtidos na análise *mismatch* para o espaçador cloroplastidial e a região nuclear junto com os altos níveis de diversidade genética mostraram distribuição multimodal para *Utricularia foliosa*, o que sugere populações que estão em equilíbrio, que ocorrem em *habitat* estáveis e, portanto, não têm ocorrido flutuações demográficas recentes (SLATKIN; HUDSON, 1991).

Tais resultados ao serem analisados conjuntamente com o teste *D* de Tajima se mostraram incongruentes tanto para *trnS-trnG* quanto para ITS. Os valores

negativos obtidos neste teste se correspondem com populações que se encontram em expansão. Mesmos assim, ambas análises mostraram valores positivos e negativos quando analisados os valores do teste  $F_s$  de  $F_u$ . Comparações entre a análise *mismatch* e os testes de neutralidade podem mostrar diferentes níveis de redundância e complementaridade entre eles (MOUSSET; DEROME; VEUILLE, 2004). Tais resultados poderiam ser indicativos que *Utricularia foliosa* tem sofrido contração populacional, reduzindo o tamanho da população e, conseqüentemente, sofrido expansão demográfica rápida e recente. Apesar de todas as populações analisadas serem da mesma espécie, elas podem se comportar com dinâmicas diferentes. Isso pode estar relacionado às diversas áreas de distribuição geográfica onde ocorrem, as quais poderiam ter sido afetadas por vários fatores climáticos de variada magnitude; portanto, comportamentos ecológicos diferentes podem ser a resposta adaptativa para tais eventos (WEN et al., 2016).

### 4.3 Estrutura genética

Estimativa de compartilhamento entre genótipos dos indivíduos amostrados para *Utricularia foliosa* por meio da análise BAPS identificou a presença de 5 *clusters* para *trnS-trnG* e 6 *clusters* para ITS, porém estes grupos não representam uma clara estruturação geográfica. Em ambas análises foi observado compartilhamento de genótipos entre as populações (Figura 3). Por outro lado, quando analisados os resultados da AMOVA, *trnS-trnG* e ITS mostraram maior variação dentro das populações dos grupos (Tabela 6 e 7). Os altos valores de variação genética distribuída dentro das populações são de grande interesse para obter informações sobre o efeito gargalo e os processos que originaram tais variações (PARISOD; TRIPPI; GALLAND, 2005). Apesar que em plantas aquáticas como *Ranunculus bungei* Steud. e *Podostemum ceratophyllum* Michx. terem sido observadas moderadas variações dentro das populações, estudos baseados em marcadores nucleares sugerem que o efeito fundador desempenha um papel importante no estabelecimento das populações de plantas aquáticas (ZHU; YU; XU, 2015). Em *Sarracenia purpurea* L. foram observadas variações genéticas dentro das populações como consequência das mudanças produzidas pelo efeito gargalo nas

sequências de alelos, além do efeito fundador afetando a composição genômica das populações (PARISOD; TRIPPI; GALLAND, 2005).

A partir da análise do cpDNA foi obtido que as populações da *Isla de la Juventud* apresentam frequências geralmente diferentes das populações restantes. O fato da proximidade geográfica, compartilhar *habitat* similares e haplótipos sugerem intercâmbio de alelos entre elas. Quando analisado o nrDNA foi observado na população F7IJ da *Isla de la Juventud* um genótipo predominante e de baixa frequência de compartilhamento com outras populações. De acordo com estes resultados, pode-se inferir duas hipóteses: primeira, a população esteja compartilhando alelos com outra população que ocorre perto da área onde se localiza que não foi coletada e, segunda e mais provável, a população tem sido formada a partir de eventos demográficos recentes a partir de poucos indivíduos. A existência de um genótipo dominante sugere populações que têm sido formadas a partir de poucos indivíduos (efeito fundador) (TAGGART, 1990). Os altos índices de diversidade genética e a presença de haplótipos compartilhados com outras populações nesta população apontam que F7IJ está se recuperando e que o efeito fundador não aconteceu recentemente. Vários padrões e processos microevolutivos atuam nas ilhas conjuntamente aos processos fundadores, tais como processos de especiação e o efeito gargalo, trazendo como consequência mudanças tanto genóticas quanto fenotípicas nas diversas linhagens (WHITTAKER; FERNÁNDEZ-PALACIOS, 2007).

Apesar das populações amostradas se encontrarem distantes geograficamente (Brasil e Cuba) e separadas por barreiras, em cada área geográfica amostrada as populações são próximas de acordo as localidades onde ocorrem (Figura 1 e Tabela 1) compartilhando haplótipos e *habitat* similares, o que sugere possível intercâmbio de alelos (fluxo genético) entre elas. Além disso, é conhecido que os frutos de *U. foliosa* são liberados quando maduros e os diásporos flutuam (RODRIGUES et al., in prep.; TAYLOR, 1989), e a espécie tem a capacidade de se propagar por meio da reprodução clonal. Esta adaptação tem sido observada em angiospermas aquáticas e particularmente em carnívoras aquáticas como um sistema para facilitar a dispersão (KAMEYAMA; OHARA, 2006b).

#### 4.4 Reconstruções filogeográficas

A partir de sequências cloroplastidiais e nucleares, foi possível observar a relação de ancestralidade entre os haplótipos identificados. Os resultados da inferência bayesiana (Figuras 4 e 5) são congruentes com os obtidos nas redes de haplótipos (Figuras 6 e 7).

As politomias observadas a partir da inferência bayesiana para o cpDNA e o nrDNA mostraram clados não resolvidos nos quais não foram esclarecidas as relações entre os haplótipos. Provavelmente tem sido o resultado de insuficientes sítios informativos devido que a espécie pode ter tido uma origem recente. Para *Utricularia foliosa* ambos marcadores mostraram haplótipos compartilhados entre populações de Brasil e Cuba e a presença de haplótipos exclusivos locais. Contudo inferi-se que a capacidade *Utricularia foliosa* se dispersar pela água pode ser um mecanismo a ter influenciado no compartilhamento de haplótipos.

As análises realizadas a partir de sequências de nrDNA determinaram a presença de haplótipos exclusivos de baixa frequência de compartilhamento para população da *Isla de la Juventud* (F7IJ) o que se corresponde com a análise BAPS, sendo observada maior estruturação desta população em relação às restantes. Isso sugere que F7IJ pode ser uma população de origem recente. Pode-se supor que haplótipos com uma única conexão e que encontram-se ligados a outros da mesma população tenham evoluído recentemente e não tiveram tempo suficiente para se dispersar (VÁZQUEZ-DOMÍNGUEZ et al., 2009).

Nas redes de haplótipos para ambos marcadores analisados, observa-se que a maioria dos haplótipos menos frequentes diferem do haplótipo ancestral por poucos passos mutacionais (Figura 5 e 6), sugerindo que existe pouca recombinação genética. Baixos números de passos mutacionais em filogenias de haplótipos a nível intraespecífico mostram geralmente pouca recombinação, portanto isso implica que entre eles o tempo evolutivo têm sido menor (TEMPLETON; CRANDALL; SING, 1992).

O conhecimento de mecanismos de dispersão para o gênero *Utricularia* são limitados mas poderiam ajudar na compreensão da história evolutiva da espécie (TAYLOR, 1989). A partir de estimativas de tempo de divergência baseados em

dados moleculares logrou-se inferir que processos de dispersão a longas distâncias em muitas espécies aquáticas são considerados eventos relativamente recentes (LES et al., 2003). As duas grandes massas de terra (Laurasia e Gondwana) e o conjunto derivado delas estiveram separadas e isoladas durante 200 milhões de anos (TOMECEK, 2009; LÓPEZ, 2015). Portanto, a deriva continental influenciou pouco na distribuição de muitas plantas aquáticas (LES et al., 2003).

Reconstruções ancestrais das áreas de distribuição a partir de *trnS-trnG* e ITS indicam que Cuba apresenta a linhagem mais ancestral das populações de *Utricularia foliosa* amostradas. Diante desse resultado, é possível supor a dispersão e colonização da espécie no sentido Cuba a América do Sul (norte a sul).

Apesar da origem de *Utricularia* ser duvidosa, reconstruções filogenéticas têm inferido que o gênero tem origem neotropical (GUISANDE et al., 2007; MÜLLER; BORSCH, 2005). No entanto, a seção *Utricularia* tem uma ampla distribuição em todo o mundo (TAYLOR, 1989), portanto é muito provável que o ancestral da seção tenha se dispersado amplamente dando origem a espécies em outras regiões. No Hemisfério Norte ocorrem grande número de espécies aquáticas de *Utricularia* o que provavelmente esteja relacionado com uma condição evolutiva derivada do gênero (GUISANDE et al., 2007). Segundo Müller et al. (2002) tem sido difícil determinar a origem da família pelo fato de serem encontrados poucos registros fósseis, no entanto, durante a evolução da família, os membros de carnívoras aquáticas do gênero *Utricularia* poderem ter tido uma rápida expansão em todo o Hemisfério Norte.

## 5 CONCLUSÕES

*Utricularia foliosa* apresenta alta diversidade genética com grande diferenciação dentro das populações quando analisadas em conjunto para o espaçador cloroplastidial e a região nuclear.

As populações de *Utricularia foliosa* têm sido influenciadas por vários processos demográficos o que sugere que as populações sofreram contração populacional e recente expansão demográfica.

As populações de *Utricularia foliosa* não estão, no geral, estruturadas geneticamente e o padrão filogeográfico intraespecífico sugere uma dispersão recente entre as áreas geográficas estudadas.

Os níveis de diversidade genética sugerem que a espécie se encontra em moderado estado de conservação e a manutenção dessa diversidade está sujeita às condições ambientais, reprodutivas e ecológicas.

## 6 REFERÊNCIAS

ABRAHASOM, W. G. Demography and vegetative reproduction. In: Solbrig, O.T. (Ed.) **Demographic and evolution in plant populations**. Oxford: Blackwell scientific, 1980. p. 89-106.

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

BARRETT, S. C. Influences of clonality on plant sexual reproduction. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 29, p. 8859-8866, 2015.

BARRETT, S. C. H.; ECKERT, C.; HUSBAND, B. C. Evolutionary processes in aquatic plant populations. **Aquatic Botany**, v. 44, n. 2-3, p. 105–145, 1993.

BORHIDI, A. **Phytogeography and vegetation ecology of Cuba**. Budapest: Akadémiai Kiadó, 1996. p. 29-32.

CHASE, M. W.; HILLS, H. H. Silica gel: An ideal material for field preservation of leaf samples for DNA studies. **Taxon**, v. 40, p. 215–220. 1991.

CLIVATI, D.; GITZENDANNER, M. A.; HILSDORF, A. W. S.; ARAÚJO, W. L.; MIRANDA, V. F. O. Microsatellite markers developed for *Utricularia reniformis* (Lentibulariaceae). **American Journal of Botany**, v. 99, n. 9, p. 375–378, 2012.

CBOL PLANT WORKING GROUP. A DNA barcode for land plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.106, n. 31, p. 12794-12797. 2009.

CORANDER, J.; MARTTINEN, P.; SIRÉN, J.; TANG, J. Enhanced Bayesian modelling in BAPS software for learning genetic structures of populations. **BMC Bioinformatics**, v. 9, n. 1, p. 539, 2008.

CORANDER, J.; TANG, J. Bayesian analysis of population structure based on linked molecular information. **Mathematical Biosciences**, v. 205, n. 1, p. 19–31, 2007.

CORANDER, J.; MARTTINEN, P. Bayesian identification of admixture events using multilocus molecular markers. **Molecular Ecology**, v. 15, n. 10, p. 2833–2843, 2006.

CULLINGS, K. W. Design and testing of a plant-specific PCR primer for ecological and evolutionary studies. **Molecular Ecology**, v. 1, n. 4, p. 233–240. 1992.

DOMÍNGUEZ, Y. **Taxonomia e filogeografia de *Pinguicula* L. ser. *Albidae* Casper (Lentibulariaceae)**. 2014. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade de Mogi das Cruzes, 2014.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemistry Bulletin**, v. 19, n. 1, p. 11–15. 1987.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, n. 3, p. 564–567, 2010.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, v. 131, n. 2, p. 479–491, 1992.

FU, Y. X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. **Genetics**, v. 147, n. 2, p. 915–925, 1997.

GRACE, J. B. The adaptive significance of clonal reproduction in angiosperms: an aquatic perspective. **Aquatic Botany**, v. 44, n. 2-3, p. 159–180, 1993.

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

HALL, T. **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT** *Nucleic Acids Symposium Series*, 1999. Disponível em: <<http://jwbrown.mbio.ncsu.edu/JWB/papers/1999Hall1.pdf>>  
HAMILTON, M. B. Four primer pair for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraespecific variation. **Molecular Ecology**, v. 8, n. 3, p. 521–523, 1999.

HARRISON, S.; HASTINGS, A. Genetic and evolutionary consequences of metapopulation structure. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 11, n. 4, p. 180–183, 1996.

HILLIS, D. M.; DIXON, M. T. Ribosomal DNA: Molecular Evolution and Phylogenetic Inference. **The quarterly review of biology**, v. 66, n. 4, p. 411–453, 1991.

IZQUIERDO, L. Y.; PIÑERO, D. High genetic diversity in the only known population of *Aechmea tuitensis* (Bromeliaceae). **Australian Journal of Botanic**, v. 48, n. 5, p. 645–650, 2000.

KAMEYAMA, Y.; OHARA, M. Predominance of clonal reproduction, but recombinant origins of new genotypes in the free-floating aquatic bladderwort *Utricularia australis* f. *tenuicaulis* (Lentibulariaceae). **Journal of Plant Research**, v. 119, n. 4, p. 357–362, 2006a.

KAMEYAMA, Y.; OHARA, M. Genetic Structure in Aquatic Bladderworts: Clonal Propagation and Hybrid Perpetuation. **Annals of Botany**, v. 98, n. 5, p. 1017–1024, 2006b.

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

KATOH, K.; STANDLEY, D. M. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. **Molecular Biology and evolution**, v. 30, n. 4, p. 772–780, 2013.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. Conservation of the Brazilian Cerrado. **Conservation Biology**, v. 19, n. 3, p. 707–713, 2005.

KOCH, M. A.; KIEFER, C.; EHRICH, D.; VOGEL, J.; BROCHMANN, C.; MUMMENHOFF, K. Three times out of Asia Minor: the phylogeography of *Arabis alpina* L. (Brassicaceae). **Molecular Ecology**, v. 15, n. 3, p. 825–839, 2006.

LES, D. H.; CRAWFORD, D. J.; KIMBALL, R. T.; MOODY, M. L.; LANDOLT, E. Biogeography of Discontinuously Distributed Hydrophytes: A Molecular Appraisal of Intercontinental Disjunctions. **International Journal of Plant Sciences**, v. 164, n. 6, p. 917–932, 2003.

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

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

LÓPEZ, A. Particularidades de la flora neotropical relacionadas con su origen, La Habana, 11 dez. 2015. **Disponível em:** <<https://www.researchgate.net/publication/286456292>> Acesso em: 02 nov. 2016.

MENEZES, C. G. Sistemática, evolução e biologia reprodutiva de *Utricularia* com ênfase para *Utricularia amethystina* Salzm. ex A.St.-Hil. & Girard (Lentibulariaceae). **2015. Tese (Doutorado em Agronomia Genética e Melhoramento de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2015.**

MENEZES, C. G. Dinâmica e estrutura de populações de *Utricularia* (Lentibulariaceae): comparação entre espécies ameaçadas e não ameaçadas. **2010. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia, subárea Taxonomia Molecular) – Universidade de Mogi das Cruzes, 2010.**

MIRANDA, V. F. O.; MENEZES, C. G.; SILVA, S. R.; DÍAZ, Y. C. A.; RIVADAVIA, F. 2015. Lentibulariaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB146>>. Acesso em: 11 Ago. 2016.

MIRANDA, V. F. O.; BORGES, R. A.; HERING, R. L.; MONTEIRO, N.; DOS SANTOS FILHO, L. A. Lentibulariaceae. In: Martinelli, G; Avila Moraes M. **Livro Vermelho da Flora do Brasil**. 1. ed. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013. p. 1100.

MIRANDA, V. F. O.; MARTINS, V. G.; FURLAN, A.; BACCI JR, M. Plant or fungal sequences? An alternative optimized PCR protocol to avoid ITS (nrDNA) misamplification. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 1, p. 141–152, 2010.

MOUSSET, S.; DEROME, N.; VEUILLE, M. A Test of Neutrality and Constant Population Size Based on the Mismatch Distribution. **Molecular Biology and Evolution**, v. 21, n. 4, p. 724–731, 2004.

MÜLLER, K.; BORSCH, T. Phylogenetics of *Utricularia* (Lentibulariaceae) and molecular evolution of the trnK intron in a lineage with high substitutional rates. **Plant Systematics and Evolution**, v. 250, n. 1-2, p. 39–67, 2005.

MÜLLER, K. F.; BORSCH, T.; LEGENDRE, L.; THEISEN, I.; BARTHLOTT, W. **Evolution of carnivory in the Lentibulariaceae: considerations based on molecular, morphological, and physiological evidence**. The 4th International Carnivorous Plant Conference. Tokyo, 2002. p. 33.

OVIEDO, R. **Diversidad vegetal del humedal Ciénaga de Zapata, Matanzas, Cuba**. 2013. Tesis doctoral – Universidad de Alicante, 2013.

PANFET, C. M. El género *Utricularia* (Lentibulariaceae) en las Antillas Mayores. **Revista del Jardín Botánico Nacional**, v. 29, p. 11–19, 2008.

PARISOD, C.; TRIPPI, C.; GALLAND, N. Genetic Variability and Founder Effect in the Pitcher Plant *Sarracenia purpurea* (Sarraceniaceae) in Populations Introduced into Switzerland: from Inbreeding to Invasion. **Annals of Botany**, v. 95, n. 2, p. 277–286, 2005.

PINTO, L. P.; BEDÊ, L.; PAESE, A.; FONSECA, M.; PAGLIA, A.; LAMAS, I. **Mata Atlântica Brasileira: Os desafios para conservação da biodiversidade de um hotspot mundial**. 1. ed. [s.l.] Rima Editora, 2006.

POSADA, D. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. **Molecular Biology and Evolution**, v. 25, n. 7, p. 1253–1256, 2008.

ROGERS, A. R.; HARPENDING, H. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. **Molecular Biology and Evolution**, v. 9, n. 3, p. 552–569, 1992.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, v. 19, n. 12, p. 1572–1574, 2003.

SATTLER, R.; RUTISHAUSER, R. Structural and dynamic descriptions of the development of *Utricularia foliosa* and *U. australis*. **Canadian journal of botany**, v. 68, n. 9, p. 1989–2003, 1990.

SILVA, S.; PINHEIRO, D. G.; MEER, E. J.; MICHAEL, T. P.; VARANI, A. M.; MIRANDA, V. F. O. The complete chloroplast genome sequence of the leafy bladderwort, *Utricularia foliosa* L. (Lentibulariaceae). **Conservation Genetics Resources**, p. 1-4, 2016.

SLATKIN, M.; HUDSON, R. R. Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. **Genetics**, v. 129, n. 2, p. 555–62, 1991.

STÖVER, B. C.; MÜLLER, K. F. TreeGraph 2: Combining and visualizing evidence from different phylogenetic analyses. **BMC bioinformatics**, v. 11, n. 7 p. 1–9, 2010.

TAGGART, J. B. Genetic variability and differentiation among founder populations of the pitcher plant (*Sarracenia purpurea* L.) in Ireland. **Heredity**, v. 64, n. 1989, p. 177–183, 1990.

TAJIMA, F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics**, v. 123, n. 3, p. 585–595, 1989.

TAYLOR, P. **The genus *Utricularia* - a taxonomic monograph**. London: Office of Public Sector Information, 1989. p. 40, 46, 565, 678, 679.

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

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

TOMECEK, S. **Plate Tectonics**. Chelsea House, 2009. p. 102.

VÁZQUEZ-DOMÍNGUEZ, E.; CASTAÑEDA-RICO, S.; GARRIDO-GARDUÑO, T.; GUTIÉRREZ-GARCÍA, T. A. Avances metodológicos para el estudio conjunto de la información genética, genealógica y geográfica en análisis evolutivos y de distribución. **Revista Chilena de Historia Natural**, v. 82, n. 2, p. 277–297, 2009.

WEN, Z.; XU, Z.; ZHANG, H.; FENG, Y. Chloroplast phylogeographic patterns of *Calligonum* sect. *Pterococcus* (Polygonaceae) in arid Northwest China. **Nordic Journal of Botany**, v. 34, n. 3, p. 335–342, 2016.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S. J. W. T.; TAYLOR, J. W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.; GELFAND, D.; SNINSKY, J.; WHITE, T. (Ed.). **PCR Protocols: A guide to methods and applications**. San Diego: Academic Press, 1990. p. 315–322.

WHITTAKER, R. J.; FERNÁNDEZ-PALACIOS, J. M. **Island biogeography ecology, evolution, and conservation**. Oxford: University press, 2007. p. 167-168.

YU, Y. et al. RASP (Reconstruct Ancestral State in Phylogenies) : A tool for historical biogeography. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 87, p. 46–49, 2015.

YU, Y.; HARRIS, A. J.; HE, X. S-DIVA (Statistical Dispersal-Vicariance Analysis): A tool for inferring biogeographic histories. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 56, n. 2, p. 848–850, 2010.

ZHU, J.; YU, D.; XU, X. The phylogeographic structure of *Hydrilla verticillata* (Hydrocharitaceae) in China and its implications for the biogeographic history of this worldwide-distributed submerged macrophyte. **BMC Evolutionary Biology**, v. 15, n. 95, p. 1–11, 2015.

### **CAPÍTULO 3 - Genética e dinâmica populacional de *Utricularia gibba* L. (Lentibulariaceae) baseadas em análises do espaçador *trnS-trnG* do DNA cloroplastidial e da região ITS do DNA nuclear ribossomal**

**RESUMO** – *Utricularia gibba* é uma espécie cosmopolita com populações que ocupam amplas áreas. Tanto no Brasil quanto em Cuba encontra-se associada a ambientes antropizados e espécies de vegetação aquática, podendo estes fatores influenciar diretamente na dinâmica das suas populações. Este estudo teve como objetivo determinar a diversidade genética e estrutura populacional de *U. gibba* mediante o emprego do espaçador cloroplastial *trnS-trnG* e a região nuclear ribossomal ITS e assim poder inferir processos filogeográficos que podem ter agido nas populações. Foram amostradas 10 populações pertencentes aos Estados brasileiros da Bahia, Minas Gerais, Rio Grande do Norte e São Paulo, além da região ocidental de Cuba (*Pinar del Río e Isla de la Juventud*). Foram encontradas altas e baixas taxas de diversidade genética e, além disso, observadas populações não estruturadas, sendo a maior diferenciação encontrada dentro das populações. As populações de *Utricularia gibba* mostraram compartilhamento entre Brasil e Cuba o que poderia estar condicionado com processos de dispersão a longas distâncias. Contudo é possível pressupor que a linhagem mais ancestral de *U. gibba* pode ter se originado na região de América do Sul.

**Palavras-chave:** filogenia intraespecífica, cpDNA, nrDNA, grupos geográficos.

## **1 INTRODUÇÃO**

Os estudos filogeográficos têm sido muito utilizados em plantas envolvendo pesquisas sobre a diversidade genética de populações. Eles lidam com princípios e processos que regem as distribuições geográficas das linhagens genealógicas entre e dentro das espécies (AVISE, 2000). Os processos históricos deixam grandes evidências sobre a estrutura genética das populações existentes, principalmente naquelas que têm sofrido longos processos para sua diferenciação. Portanto, a

estrutura genética das populações na atualidade tem sido utilizada para realizar estimativas sobre a história de longos eventos de dispersão (PETIT et al., 1997), relações entre a variância histórica e processos geológicos (AVISE, 2000), além de eventos de contração e expansão relacionados com mudanças globais (HEWITT, 2000).

*Utricularia gibba* L. é uma carnívora aquática com uma ampla distribuição geográfica; apresenta uma alta densidade e grande concentração de indivíduos nas suas populações (BORTOLINI; DILL; BUENO, 2007). Tanto no Brasil quanto em Cuba, a espécie encontra-se em espaços antropizados e associada com espécies de vegetação aquática (MIRANDA et al., 2015; PANFET, 2008). Fundamentalmente nas Antilhas, nas Américas Central e do Sul é uma espécie muito variável quanto à forma das flores e número de inflorescências (TAYLOR, 1989).

*Utricularia gibba* possui uns dos menores genomas haploides dentre as angiospermas, reportado com 82 megabases (IBARRA-LACLETTE et al., 2011, 2013), sendo esse repertório genético suficiente para integrar e regular processos de desenvolvimento e reprodução (IBARRA-LACLETTE et al., 2013). Recentes estudos genômicos demonstraram que *Utricularia gibba* é a candidata ideal que poderia ser utilizada para compreender as relações entre as mutações genômicas e tendências fisiológicas, fazendo ênfase em estudos anatômicos e morfológicos (CHORMANSKI; RICHARDS, 2012; IBARRA-LACLETTE et al., 2011). Sendo assim, vários trabalhos têm sido focados em aspectos morfológicos (CHORMANSKI; RICHARDS, 2012), ecológicos e fisiológicos (BORTOLINI; DILL; BUENO, 2007; GORDON; PACHECO, 2007; JUANG; JUANG; LIU, 2011) a respeito da espécie. Nenhum dos trabalhos evidenciam até o momento, a história evolutiva intraespecífica com relação à sua distribuição geográfica.

Por este motivo o objetivo deste trabalho foi analisar a diversidade e estrutura genéticas de várias populações *Utricularia gibba* L. baseadas em sequências de DNA cloroplastidial *trnS-trnG* e nuclear ITS e assim inferir processos filogeográficos e demográficos visando compreender a história evolutiva da espécie.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram amostradas 10 populações de *Utricularia gibba* L. que ocorrem no Brasil e a região ocidental de Cuba (Figura 1).

A coleta de espécimes foi realizada em populações naturais entre os anos 2013 e 2015. Uma vez que a espécie estudada é aquática, foram considerados como pertencentes à mesma população todos aqueles indivíduos amostrados dentro do mesmo corpo de água num raio de 1 km, sendo variável o número de espécimes coletados por população com base do número de indivíduos encontrados. Foi determinado o número máximo de indivíduos por população o que variou dependendo da quantidade de indivíduos encontrados. As amostras coletadas foram preservadas em sílica gel (CHASE; HILLS, 1991) e para cada uma das populações amostradas foi depositado *voucher* nos herbários do *Instituto de Ecología y Sistemática* (HAC) e da Universidade Estadual Paulista - UNESP, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (JABU).

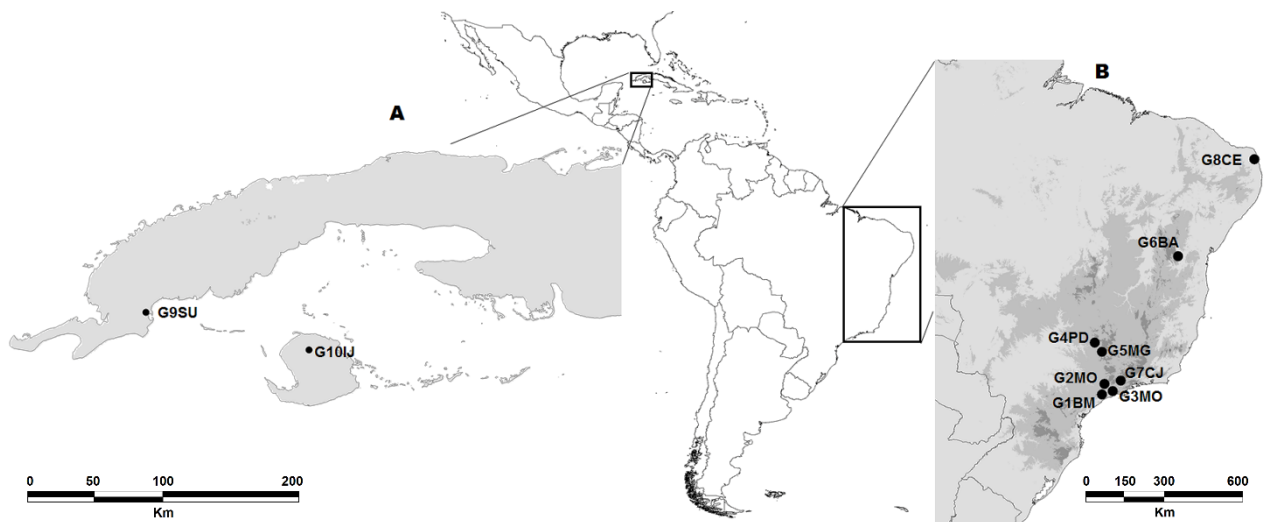


Figura 1. Localização geográfica das populações amostradas de *Utricularia gibba* L. Região ocidental de Cuba (A) e Brasil (B). Os pontos representam as localidades das populações. Populações: Biritiba-Mirim, (G1BM), Mogi das Cruzes (G2MO, G3MO), Pedregulhos (G4PD), Ibiraci (G5MG), Ibicoara (G6BA), Campos de Jordão (G7CJ), Jacumã, Ceará Mirim (G8CE), *San Ubaldo* (G9SU) e *Isla de la Juventud* (G10IJ).

Tabela 1. Populações de *Utricularia gibba* incluídas neste estudo.

Populações	Localidades	Coordenadas e altitude (m)	Herbários
G1BM	Brasil, São Pulo. Biritiba-Mirim	23°34'13.62"S; 46°2'27.56"W / 780m	JABU
G2MO	Brasil, São Paulo. Mogi das Cruzes. Avenida Presidente Castelo Branco	23°32'21.98"S; 46°8'35.77"W / 743m	JABU
G3MO	Brasil, São Paulo. Mogi das Cruzes. Rodovia Professor Alfredo Rolim de Moura	23°33'27.10"S; 46°8'14.82" W / 746 m	JABU
G4PD	Brasil, São Paulo. Pedregulho. Poço do Burro	20°10'54.19"S;47°17'52.76" W / 673m	JABU
G5MG	Brasil, Minas Gerais. Ibiraci	20°17'59.64"S; 47°11'14.06" W / 723m	JABU
G6BA	Brasil, Bahia. Ibicoara. Rio Mucugezinho	13°19'35.04"S; 41°10'53.29" W / 673m	JABU
G7CJ	Brasil, São Paulo. Campos de Jordão. Estrada Pará	22°46'11.56"N; 45°31'50.66" W / 1813m	
G8CE	Brasil, Rio Grande do Norte. Ceará Mirim. Jacumã	5°34'59.99" N; 35°13' 59.99" W / 10m	JABU
G9SU	Cuba, <i>Pinar del Río. San Ubaldo, Cortés</i>	22°04'59.98" N; 84°01'00.12" W / 8m	HAC
G10IJ	Cuba, <i>Isla de la Juventud. Gerona. Rio de la presa Viet-Nam</i>	21°48'0" N; 82°53'32.12" W / 9m	HAC

## 2.1 Análises moleculares

### 2.1.1 Extração do DNA

O DNA genômico total dos indivíduos foi extraído segundo o protocolo CTAB (CULLINGS, 1992; DOYLE; DOYLE, 1987) com modificações de (LODHI et al., 1994). Foram utilizados 25-30 mg de tecido desidratado em sílica gel previamente higienizado para retirar micro-organismos presentes na superfície vegetal e as

amostras foram expostas em nitrogênio líquido e posteriormente maceradas. A qualidade do DNA foi analisada no (NanoDrop®) e as amostras armazenadas a -20 °C.

### 2.1.2 Amplificação

As reações de amplificação foram realizadas no termociclador PTC-100 (*MJ Research*) e com volumem total de 25 µL.

A região *trnS-trnG* do DNA cloroplastidial foi amplificada para cada amostra utilizando os iniciadores *trnS* (GCU) 5'-GCCGCTTTAGTCCACTCAGC-3' e *trnG* (UCC) 5'-GAACGAATCACACTTTTACCAC-3' segundo (HAMILTON, 1999). Foram utilizados separadamente os reagentes: 2U Taq DNA polimerase (Dream Taq™ Sinapse), 0,1 vol. de tampão 10 x com MgCl<sub>2</sub> mM, 0,08 mM de nucleotídeos (dNTPs, 10 mM), 0,2 µM de cada iniciador, 30 ng de DNA *template*, (BSA) segundo Miranda et al. (2010). O programa de PCR incluiu desnaturação inicial a 94 °C por 1 min seguido por 30 ciclos a 94 °C / 30 s, 55 °C / 30 s de anelamento, 72 °C / 5 min e extensão final a 72 °C / 5 min.

Para a amplificação da região ITS do DNA nuclear ribossomal foram usados inicialmente os iniciadores ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') e ITS4 (5'-TCCTTCCGCTTATTGATATGC-3'). Existindo dificuldades na amplificação de muitas das amostras, foi também utilizado o iniciador 18d (5'-CACACCGCCCGTCGCTCCTACCGA-3') no lugar do ITS5 (HILLIS; DIXON, 1991; WHITE et al., 1990). Foram utilizados: 2U Taq DNA polimerase (Dream Taq™ Sinapse), 0,1 vol. de tampão 10 x com MgCl<sub>2</sub> mM, 0,08 mM de nucleotídeos (dNTPs, 10 mM), 0,1 µM de cada iniciador, 30 ng de DNA *template*, DMSO segundo Miranda et al. (2010). A PCR incluiu desnaturação inicial a 95 °C por 3 min seguido por 30 ciclos a 95 °C / 30 s, 55 °C / 30 s de anelamento, 72 °C / 1min e extensão final a 72 °C / 10 min. Foram visualizados em gel de agarose a 1% os produtos da amplificação sendo evidenciados com brometo de etídio e revelados e fotografados.

### 2.1.3 Purificação e sequenciamento dos produtos amplificados

A purificação dos produtos foi feita mediante a lavagem com acetato de sódio e etanol. Foram adicionados ao volume da reação 100  $\mu\text{L}$  de água Milli-Q lavando as paredes do tubo e transferidos para tubos de 1,5 mL. Adicionaram-se 12  $\mu\text{L}$  de acetato de sódio e 330  $\mu\text{L}$  de etanol (100%) com inversão dos tubos e se deixaram repousar  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 3 horas. Os tubos foram centrifugados a 14.000 rpm durante 30min a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  e descartado o conteúdo. Após de se acrescentar 1mL de etanol (70%) os tubos foram invertidos e centrifugados a 14.000 rpm durante 10 min a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  e feitas duas lavagens. O etanol foi descartado quando o *pellet* estava seco e foi diluído em 22  $\mu\text{L}$  de água. Os produtos purificados foram quantificados em espectrofotômetro NanoDrop™ 1000.

Foi utilizado para as reações de sequenciamento 1 $\mu\text{L}$  (10 ng /  $\mu\text{L}$ ) do produto de PCR purificado, 4  $\mu\text{L}$  de água Milli-Q, 1  $\mu\text{L}$  (10mM) de cada iniciador (*trnS* (GCU) e *trnG* (UCC), 3  $\mu\text{L}$  de tampão de sequenciamento (*Save Money 2,5 x*), 1  $\mu\text{L}$  de *Big Dye v 3.1* para um volume total na reação de 10  $\mu\text{L}$ . O programa de PCR de sequenciamento foi de  $96\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 1 min, seguidamente de 39 ciclos de  $96\text{ }^{\circ}\text{C}$  / 15 s,  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  / 15 s,  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  / 4min. Após realizada a PCR foram adicionados 80  $\mu\text{L}$  de isopropanol 75% em cada amostra e encubadas 15 min à temperatura ambiente para posteriormente serem centrifugadas a 4.000 rpm em centrífuga por 30 min a  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Depois de descartado o isopropanol, adicionaram-se 200  $\mu\text{L}$  de etanol (70%) e as placas centrifugadas a 4.000 rpm por 10 min a  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Foram feitas duas lavagens e o sobrenadante foi descartado. As placas foram secas na centrífuga na bancada por 30 min, ressuspendidas em 10  $\mu\text{L}$  de formamida, desnaturadas por 5 min a  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  e sequenciadas no sequenciador automático ABI 3730 XL DNA Analyzer (*Applied Biosystems*).

### 2.1.4 Alinhamento e análise de seqüências

As fitas senso e antissenso para *trnS-trnG* e ITS foram alinhadas e obtidas as fitas consenso com o auxílio dos aplicativos Bioedit v. 7.0.9.0 (HALL, 1999) e ClustalW (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994). As matrizes foram alinhadas pelo aplicativo

Mafft v. 7 (KATO; STANDLEY, 2013). Foram excluídos os falsos *indels* nas extremidades das sequências.

## 2.2 Análises de diversidade, estrutura genética e história demográfica

As sequências alinhadas foram analisadas com ajuda do aplicativo DnaSP v. 5.10 (LIBRADO; ROZAS, 2009) e foi determinado o número de haplótipos ( $h$ ), mutações ( $\eta$ ), índices de diversidade haplotípica ( $Hd$ ) e nucleotídica ( $\pi$ ). Por meio da análise de variância molecular hierárquica AMOVA (EXCOFFIER; SMOUSE; QUATTRO, 1992) com ajuda do aplicativo Arlequin v.3.5 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010) estimou-se a estrutura genética das populações. A análise dividiu-se em dois níveis tanto para *trnS-trnG* quanto para ITS: nível de populações e grupos geográfico (Brasil-Cuba). Foram calculados os índices  $F_{CT}$ ,  $F_{SC}$ ,  $F_{ST}$  significativos quando  $P < 0,05$ , segundo a estatística  $F$ . A significância da análise foi obtida com 1.023 permutações. Além disso foi realizada a análise BAPS (CORANDER; TANG, 2007; CORANDER et al., 2008). O programa estimou o número máximo de *clusters* baseado no menor valor do  $\log(I_m)$ . Inicialmente foi feita a análise de agrupamento *mixture analysis* empregando múltiplos números máximos de agrupamento (1-20) para posteriormente obter o modelo evolutivo *admixture* (CORANDER; MARTTINEN, 2006) sendo aplicadas 5.000 interações.

Visando inferir eventos demográficos nas populações. Foram feitos os testes de neutralidade  $D$  de Tajima (TAJIMA, 1989) e  $F_s$  (FU, 1997) utilizando o número total de sítios segregantes de cada grupo por meio do aplicativo DnaSP v.5.10 (LIBRADO; ROZAS, 2009). Para determinar populações em expansão e equilíbrio foi calculada a distribuição *mismatch* (par a par) (ROGERS; HARPENDING, 1992; SLATKIN; HUDSON, 1991).

## 2.3 Análises filogeográficas e filogenéticas

Foi elaborada uma matriz para o espaçador cloroplastidial *trnS-trnG* e outra para a região nuclear ITS e para o enraizamento dos cladogramas foram empregadas como grupo-externo sequências de espécies de *Utricularia* (Ver Apêndice 1). Com

ajuda da plataforma CIPRES (MILLER et al., 2015) foram obtidos os modelos evolutivos com o aplicativo aplicativo jModelTest (POSADA, 2008) para posteriormente ser inferidas as relações filogenéticas entre os haplótipos mediante a inferência bayesiana por meio do aplicativo MrBayes v. 3.1.2 (RONQUIST; HUELSENBECK, 2003). As filogenias intraespecífica foram representadas com redes de haplótipos utilizando o aplicativo NETWORK v 5.0.0.0 (<http://www.fluxus-engineering.com>) mediante o método *median-joining* (BANDELT; FORSTER; RÖHL, 1999). Com ajuda do programa TreeGraph 2 v. 2.0 (STÖVER; MÜLLER, 2010) foram desenhados os cladogramas.

Para a reconstrução da história ancestral foi implementado o aplicativo RAPS (YU et al., 2015) tanto para as árvores do cpDNA quanto para as do nrDNA, sendo utilizando o aplicativo S-DIVA (YU; HARRIS; HE, 2010). Foram elaboradas as árvores sendo consideradas duas áreas de distribuição, Brasil e Cuba. Espécies da África (*U. bisquamata* Schrank, *U. sandersonii* Oliv.), Austrália (*U. dichotoma* Labill., *U. monanthos* Hook.f., *U. volubilis* R.Br) e do Brasil *U. flaccida* A.DC., *U. neottioides* A.St.-Hil. & Girard, *U. longifolia* Gardner) foram consideradas como grupo externo.

### **3 RESULTADOS**

#### **3.1 Sequências do cpDNA e o nrDNA**

Foram obtidas variações quanto à qualidade das sequências nos dois marcadores, sendo mais eficiente a região nuclear. Por essa razão, foram obtidas amostragens desiguais para ambos marcadores entre as populações de *Utricularia gibba*. A quantidade de sequências obtidas em cada análise assim como a quantidade de haplótipos determinados encontram-se descritos nas Tabelas 3 e 4.

#### **3.2 Diversidade genética e distribuição de haplótipos**

Foram obtidas 245 sequências para *Utricularia gibba* pertencentes a localidades do Brasil e Cuba, as quais variaram quanto ao número, tamanho e quantidade de sítios variáveis (*trnS-trnG*: 66 sequências, 611 pb / 1 sítio, ITS: 179

sequências, 669 pb / 60 sítios). Quando analisada a diversidade genética proporcionada pelos índices de diversidade haplotípica e nucleotídica, foi observado para *trnS-trnG* baixa taxa de diversidade genética quando analisadas todas as populações, ao contrário do ITS que apresenta alta taxa. Quando analisadas separadamente as populações para cpDNA foram observados altos e baixos índices de diversidade entre as populações (Tabela 3) e para o nrDNA, exceto as populações G1BM e G10IJ com menores valores de diversidade, as restantes mostraram altas taxas de diversidade genética (Tabela 4).

Tabela 3. Diversidade genética das populações de *Utricularia gibba* e testes de neutralidade do espaçador intergênico *trnS-trnG* do cpDNA. Populações: Mogi das Cruzes (G3MO), Pedregulho (G4PD), Ibiraci (G5MG), Ibicoara (G6BA), Campos de Jordão (G7CJ), Ceará Mirim (G8CE), *San Ubaldo* (G9SU) e *Isla de la Juventud* (G10IJ).

Populações	N	$\eta$	h	Hd	$\pi$	Testes de neutralidade	
						D	Fs
<b>BRASIL</b>							
G3MO	9	20	4	0,583±0,183	0,01821±0,01213	-1,94756**	2,286
G4PD	5	25	5	1,000±0,126	0,03701±0,00939	-0,99237	-0,286
G5MG	10	24	5	0,667±0,163	0,01070±0,00371	-1,80138*	1,706
G6BA	8	2	3	0,464±0,200	0,00100±0,00048	-1,31009	-0,999
G7CJ	14	6	3	0,275±0,148	0,00317±0,00221	-1,95891*	0,535
G8CE	4	3	3	0,833±0,222	0,00829±0,00302	-0,75445	-0,288
<b>CUBA</b>							
G9SU	7	28	4	0,714±0,181	0,03641±0,01103	-0,74593	3,405
G10IJ	9	1	2	0,222±0,166	0,02778±0,02078	-1,08823	-0,263
Total	66	1	2	0,261±0,062	0,26107±0,06177	0,30428	0,832

Número de indivíduos (N), número de mutações ( $\eta$ ), número de haplótipos (h), diversidade haplotípica (Hd), diversidade nucleotídica ( $\pi$ ). Testes de neutralidade: D de Tajima, Fs de Fu. Significância: \*P < 0,05; \*\*P < 0,01.

Ao todo dois haplótipos foram obtidos quando analisado o cpDNA, sendo H1 compartilhado na maioria das populações (Tabela 5). Para a região ITS do nrDNA obtiveram-se 42 haplótipos, H1 e H36 com alta frequência, sendo H1 compartilhado com várias das populações. Os haplótipos restantes foram de baixa frequência e exclusivos de cada população.

Tabela 4. Diversidade genética das populações de *Utricularia gibba* e testes de neutralidade na região ITS do nrDNA. Populações: Biritiba-Mirim, (G1BM), Mogi das Cruzes (G2MO, G3MO), Pedregulho (G4PD), Ibiraci (G5MG), Ibicoara (G6BA), Campos de Jordão (G7CJ), Jacumã, Ceará Mirim (G8CE), *San Ubaldo* (G9SU) e *Isla de la Juventud* (G10IJ).

Populações	N	$\eta$	h	Hd	$\pi$	Testes de neutralidade	
						D	Fs
<b>BRASIL</b>							
G1BM	20	10	3	0,195±0,115	0,00181±0,00143	-2,25631**	1,223
G2MO	19	97	13	0,877±0,074	0,09418±0,01578	-0,00195	1,513
G3MO	24	117	18	0,924±0,049	0,02913±0,01397	-2,19350**	-3,072
G4PD	14	60	10	0,890±0,081	0,02821±0,00979	-2,03687*	-0,358
G5MG	23	109	15	0,921±0,041	0,03229±0,01177	-1,77922	0,084
G6BA	13	34	11	0,974±0,039	0,04661±0,00601	0,01756	-1,750
G7CJ	20	48	10	0,711±0,113	0,01223±0,00472	-2,13900*	-0,387
G8CE	6	10	5	0,933±0,122	0,01615±0,00403	-0,24625	-0,658
<b>CUBA</b>							
G9SU	15	22	6	0,571±0,149	0,00646±0,00313	-2,12805**	0,501
G10IJ	25	28	8	0,490±0,123	0,00639±0,00254	-2,41642**	-0,783
Total	179	60	42	0,568±0,043	0,02900±0,00331	-1,88094*	-23,983

Número de indivíduos (N), número de mutações ( $\eta$ ), número de haplótipos (h), diversidade haplotípica (Hd), diversidade nucleotídica ( $\pi$ ). Testes de neutralidade: D de Tajima, Fs de Fu. Significância: \*P < 0,05; \*\*P < 0,01.

Tabela 5. Distribuição de haplótipos do espaçador intergênico *trnS-trnG* do cpDNA em *U. gibba*. Populações: Biritiba-Mirim (G1BM), Mogi das Cruzes (G2MO, G3MO), Pedregulho (G4PD), Ibiraci (G5MG), Ibicoara (G6BA), Campos de Jordão (G7CJ), Ceará Mirim (G8CE), *San Ubaldo* (G9SU) e *Isla de la Juventud* (G10IJ).

h	Populações										Freq
	G1BM	G2MO	G3MO	G4PD	G5MG	G6BA	G7CJ	G8CE	G9SU	G10IJ	
<i>trnS-trnG</i>											
H1	-	-	9	4	10	8	14	4	7		56
H2	-	-		1						9	10
ITS											
H1	19	9	22	12	14	10	18		12		116
H2	1										1
H3		1									1
H4		1									1
H5		1									1
H6		1			1						2
H7		1									1
H8		1									1
H9		1									1
H10		1									1
H11		1									1
H12		1	1								1
H13			1								1
H14				1							1
H15				1							1
H16					1						1
H17					1						1
H18					1						1
H19					1						1
H20					1						1
H21					1						1
H22					1						1
H23					1						1
H24					1						1
H25											1
H26						1					1
H27						1					1
H28							1				1
H29							1				1
H30								1			1
H31								2			2
H32								1			1
H33								1			1
H34								1			1
H35									1		1
H36									1	20	21
H37									1		1
H38										1	1
H39										1	1
H40										1	1
H41										1	1
H42										1	1

Freq = Frequência

- = Populações não amostradas

### 3.3 Análises demográficas

A Figura 2 mostra os resultados da análise *mismatch* em populações que apresentaram valores significativos quando realizado o teste *D* de Tajima.

O espaçador *trnS-trnG* mostrou distribuição *mismatch* unimodal para as populações G3MO, G7CJ de São Paulo o que corrobora os resultados negativos e significativos obtidos pelo teste *D* de Tajima de expansão populacional, no entanto a população (G5MG) de Minas Gerais foi multimodal o que falsifica a hipótese sobre recente expansão demográfica (Tabela 3 e Figura 2A-C).

Para a região ITS do nrDNA, quando analisadas todas as populações de *Utricularia gibba* e a população G1BM foi obtida distribuição *mismatch* unimodal corroborando os resultados negativos e significativos do teste *D* de Tajima, indicando recente expansão demográfica. Entretanto, as populações G3MO, G4PD e G7CJ do Estado de São Paulo e G9SU, G10IJ de Cuba se mostraram multimodais, indicando que se encontram em equilíbrio (Tabela 4 e Figura 2D-J).

### 3.4 Estrutura genética

A AMOVA foi aplicada com o fim de testar o grau de variação genética das populações amostradas de *Utricularia gibba*. Na análise baseada no espaçador *trnS-trnG* os valores significativos revelam diferenciação genética entre os indivíduos amostrados e alta porcentagem de variação entre as populações. Resultados similares foram obtidos quando analisado o espaçador ITS. No segundo nível hierárquico, considerando os grupos geográficos (Brasil e Cuba), tanto para cpDNA quanto para nrDNA os valores significativos dos índices  $F_{SC}$  e  $F_{ST}$  evidenciaram a variabilidade das populações amostradas, sendo mais alta dentro das populações dos grupos geográficos (Tabelas 6 e 7).

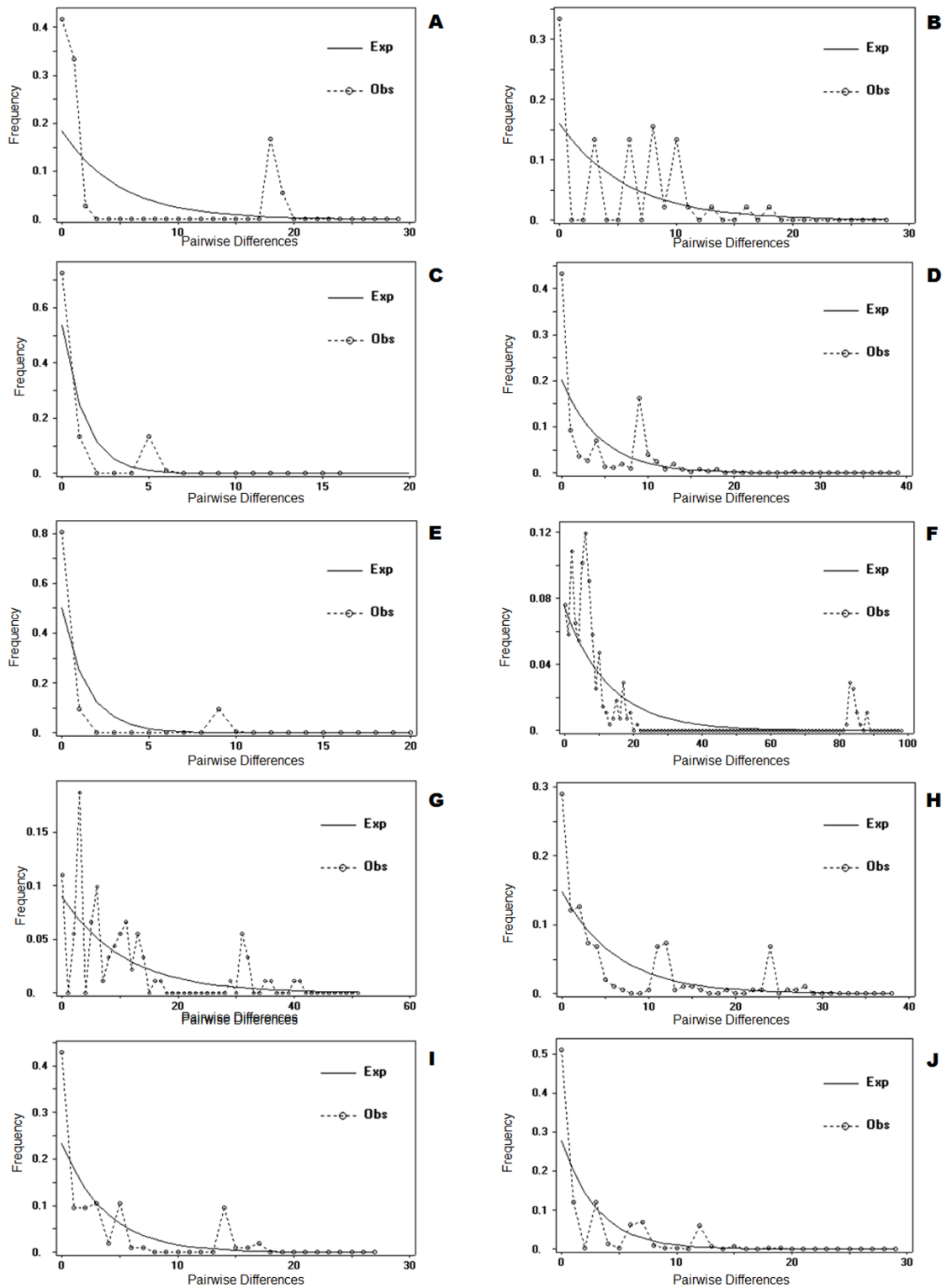


Figura 2. Distribuição *mismatch* para *Utricularia gibba* baseada em seqüências do espaçador *trnS-trnG*: G3MO (A), G5MG (B), G7CJ (C). Baseada na região ITS: para todas as populações (D), G1BM (E), G3MO (F), G4PD (G), G7CJ (H), G9SU (I), G10IJ (J).

Tabela 6. Análise de variância molecular (AMOVA) para populações de *Utricularia gibba* baseadas no espaçador *trnS-trnG*.

Fonte de variação	GL	SM	Componentes de variância	%	Índice de fixação	P
Entre populações	7	7,685	0,13377	90,65	$F_{ST}=0,90653$	0,00000
Dentro das populações	58	0,800	0,01379	9,35		
Entre grupos geográficos	1	3,567	0,11728	54,62	$F_{CT}=0,54620$	0,10948
Entre populações de grupos geográficos	6	4,118	0,08365	38,96	$F_{SC}=0,85845$	0,00000
Dentro das populações de grupos geográficos	58	0,800	0,01379	6,42	$F_{ST}=0,93576$	0,00000

GL: graus de liberdade, SQ: soma dos quadrados, %: porcentagem de variação, P: probabilidades ( $P < 0,05$ ).

Tabela 7. Análise de variância molecular (AMOVA) para populações de *Utricularia gibba* baseadas no espaçador ITS.

Fonte de variação	GL	SM	Componentes de variância	%	Índice de fixação	P
Entre populações	9	200,62	1,20783	57,16	$F_{ST}=0,57162$	0,00000
Dentro das populações	169	152,97	0,90515	42,84		
Entre grupos geográficos	1	106,77	1,49498	49,42	$F_{CT}=0,49418$	0,07918
Entre populações de grupos geográficos	8	93,845	0,62502	20,66	$F_{SC}=0,40846$	0,00000
Dentro das populações de grupos geográficos	169	152,97	0,90515	29,92	$F_{ST}=0,70079$	0,00000

GL: graus de liberdade, SQ: soma dos quadrados, %: porcentagem de variação, P: probabilidades ( $P < 0,05$ ).

Na análise BAPS foram identificados 4 *clusters* segundo o marcador de cpDNA e 6 segundo o nrDNA (Figura 3). Estes *clusters* evidenciam ausência de estrutura populacional. A análise da região ITS (Figura 3B) mostrou a presença de um genótipo exclusivo e pouco compartilhado na população G8CE do Rio Grande do Norte, Brasil.

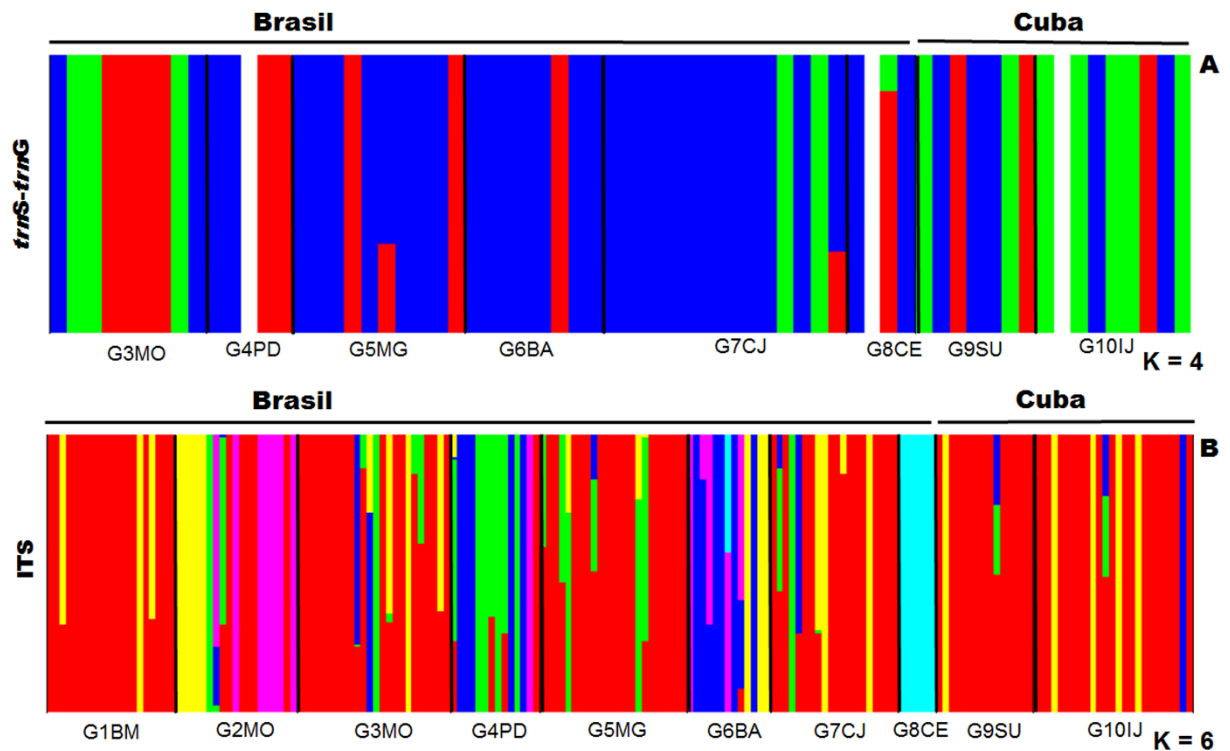


Figura 3. Análise bayesiana (BAPS) de populações de *Utricularia gibba* baseadas em 66 sequências do espaçador *trnS-trnG* (A) e 179 da região nuclear ITS (B). As cores indicam o número de *clusters* para cada marcador analisado. Populações: Biritiba-Mirim (G1BM), Mogi das Cruzes (G2MO, G3MO), Pedregulho (G4PD), Ibiraci (G5MG), Ibicoara (G6BA), Campos de Jordão (G7CJ), Ceará Mirim (G8CE), *San Ubaldo* (G9SU) e *Isla de la Juventud* (G10IJ).

### 3.5 Filogenia e filogeografia

A inferência bayesiana mostrou ramos consistentes e árvores não resolvidas, sendo observadas politomias para ambos marcadores (Figura 4 e 5). As reconstruções da distribuição geográfica para *Utricularia gibba* tentando recuperar a história filogeográfica da espécie apontam o nó do Brasil como possível área ancestral para os dois marcadores (Figuras 4 e 5).

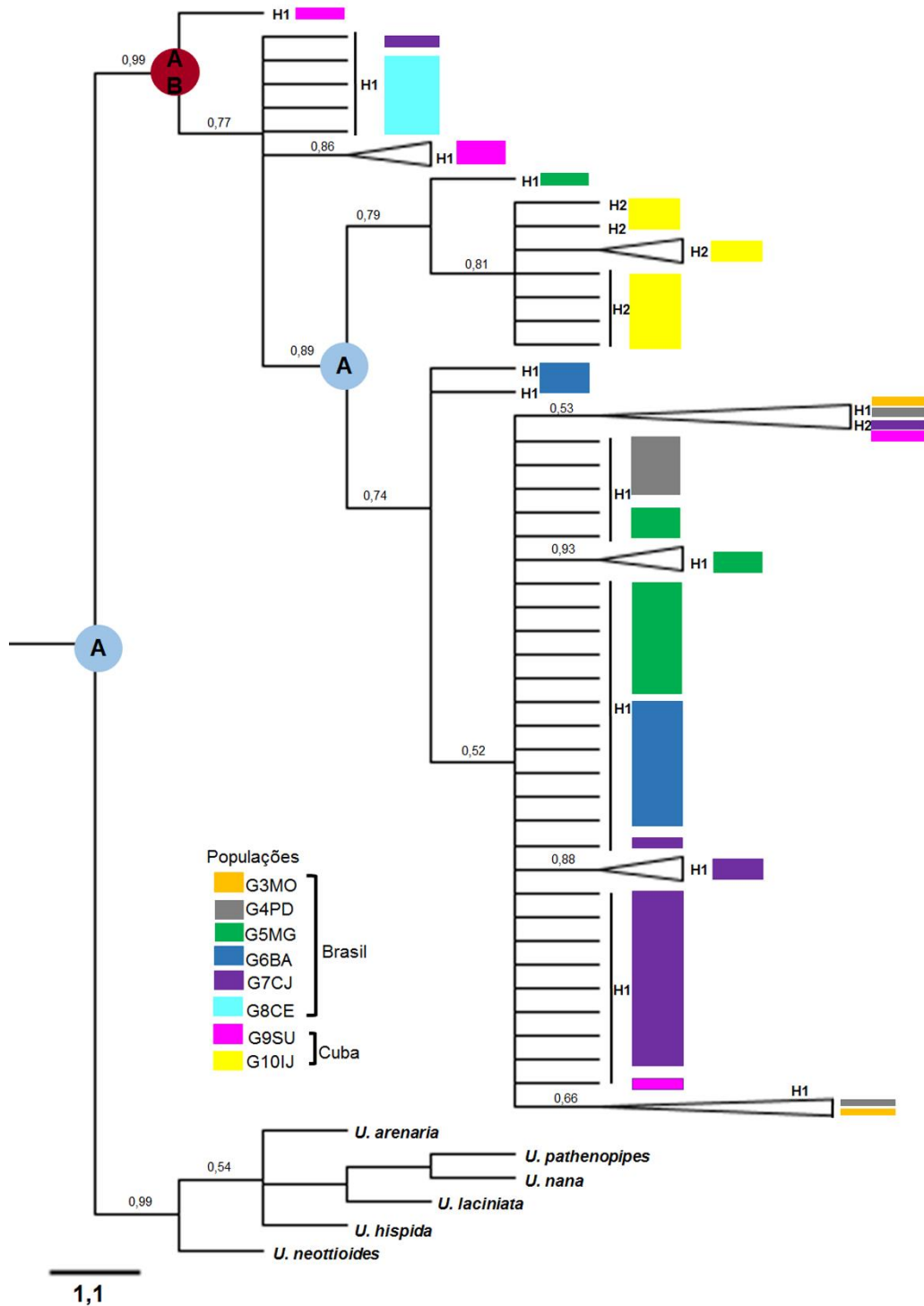


Figura 4. Árvore consenso de hipóteses obtidas mediante Inferência bayesiana (IB) de seqüências *trnS-trnG*. As cores indicam as populações amostradas de *Utricularia gibba* e os valores indicam as probabilidades posteriores. Os círculos mostram as reconstruções filogenéticas da distribuição ancestral: Brasil (A), Brasil ou Cuba (AB). Populações: Mogi das Cruzes (G3MO), Pedregulho (G4PD), Ibiraci (G5MG), Ibicoara (G6BA), Campos de Jordão (G7CJ), Ceará Mirim (G8CE), *San Ubaldo* (G9SU) e *Isla de la Juventud* (G10IJ).



A relações filogenéticas intraespecíficas de *Utricularia gibba* são mostradas pela rede de haplótipos (Figura 6). O espaçador *trnS-trnG* mostrou dois haplótipos para a espécie, portanto não foi possível representar na forma de rede. Ambos haplótipos apresentaram alta frequência, sendo maior em H1 que foi compartilhado entre todas as populações amostradas exceto por G10IJ, da *Isla de la Juventud* (Tabela 5). Na região ITS, os haplótipos H1 e H36 apresentaram a maior frequência entre as populações, sendo H1 encontrado em todas as populações, exceto na população G10IJ da *Isla de la Juventud* (Figura 6). Os haplótipos restantes apresentaram baixa frequência.

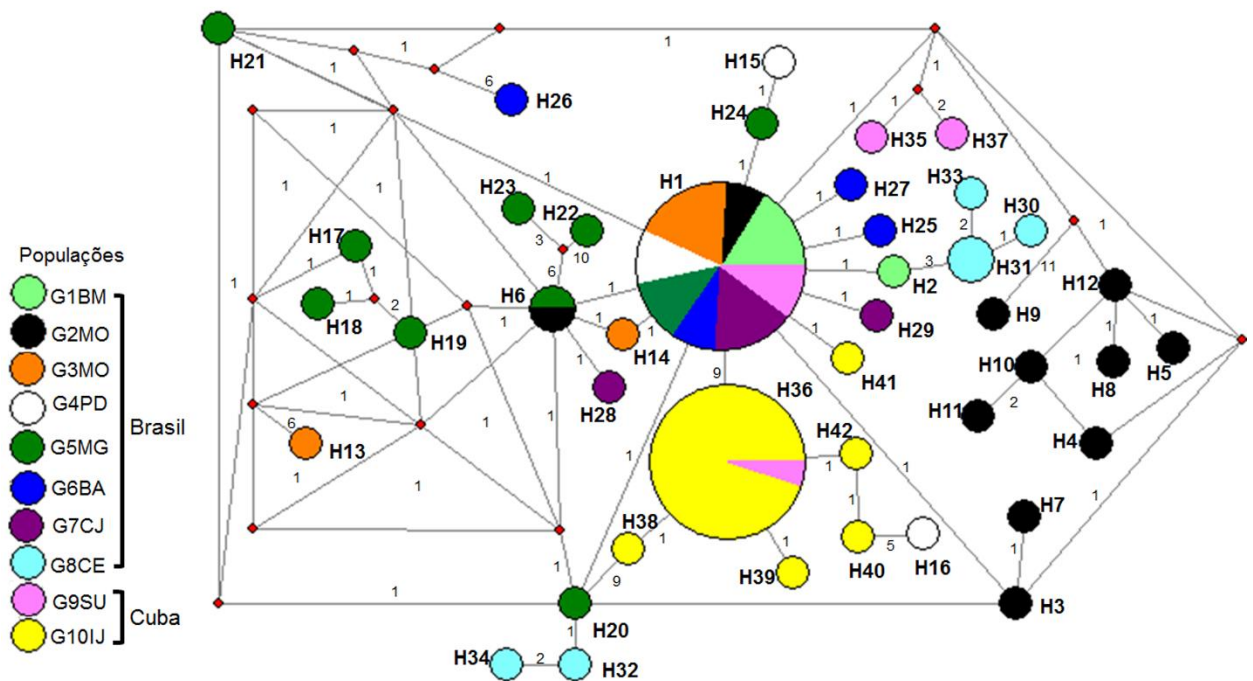


Figura 6. Rede de haplótipos em *Utricularia foliosa* baseados na região ITS. O tamanho dos nós é proporcional à frequência de cada haplótipo (H). Os vetores médios (nós vermelhos) indicam haplótipos não detectados separados por mutações. Os valores nos ramos indicam a quantidade de mutações entre os haplótipos. Populações: Brasil (G1BM, G2MO, G3MO, G4PD, G5MG, G6BA, G7CJ, G8CE); Cuba (G9SU, G10IJ).

## 4 DISCUSSÃO

### 4.1 Diversidade genética

As variações genéticas produzidas nas espécies são resultado de vários processos evolutivos ao longo do tempo. A diminuição da diversidade genética em *Utricularia gibba* associado à baixa quantidade de haplótipos obtidos inferem populações nas quais fatores ecológicos têm agido ao longo do tempo. Os baixos valores de diversidade genética podem estar associados a populações que têm sofrido fragmentação do *habitat*, deriva genética ou efeito gargalo (AMOS; HARWOOD, 1998). Além disso, a redução da conectividade entre as populações pode estar condicionada à perda do *habitat*, trazendo como consequência redução no fluxo genético e da variabilidade genética (MARTÍNEZ-CRUZ; GODOY; NEGRO, 2007). Baixos valores de diversidade genética também têm sido observado em populações de *U. longifolia* quando analisadas com os espaçadores IT1 e ITS2 (MENEZES, 2010) e em espécies de *Elodea* a partir de fragmentos de AFLPs (LAMBERTINI et al., 2010). Para as populações analisadas a partir do nrDNA, que mostraram altos índices de diversidade genética além de 42 haplótipos, sendo alguns deles compartilhados, pressupõe populações nas quais o fluxo genético está se incrementando, contribuindo assim ao aumento da heterozigozidade.

*Utricularia gibba* possui inflorescências com flores cleistógamas (TAYLOR 1989). Portanto, apresenta reprodução sexuada por autogamia, sendo as flores capazes de se autopolinizar e autofecundar. Além disso apresenta flores zigomorfas e bilabiadas, o que pode estar relacionado com a polinização entomófila (ALCALÁ; DOMÍNGUEZ, 2011; CLIVATI et al., 2014; PLACHNO et al., 2016). Isso pode favorecer o cruzamento entre indivíduos da mesma população ou populações diferentes.

É importante destacar que os valores de diversidade genética observados nas populações cubanas, apesar de serem menores do que a maioria da populações do Brasil quando analisada ITS, não são considerados baixos, levando em conta as condições de restrição geográfica das ilhas com baixo número total de indivíduos por espécie e baixa quantidade de populações (MELONI et al., 2013). No entanto,

*Utricularia gibba* foi recentemente adicionada na “*Lista roja de la flora de Cuba*”, como uma espécie “Em perigo crítico” (GONZÁLEZ TORRES et al., 2016).

## 4.2 Demografia

O resultado *mismatch* unimodal suportado pelos valores significativos do teste *D* de Tajima indicaram claramente expansão demográfica em duas populações analisadas com o cpDNA (Figura 2A e 2C e Tabela 3) e uma com nrDNA (Figura 2E e Tabela 4). Os valores restantes negativos e significativos obtidos no teste *D* de Tajima para *trnS-trnG* e ITS pressupõem populações em expansão, porém não foram congruentes com a análise *mismatch* as quais representam populações em equilíbrio.

Os baixos níveis de diversidade genética observados em G7CJ (Tabela 3) e G1BM (Tabela 4) caracterizaram estas populações. Sabe-se que durante o processo da expansão demográfica o efeito fundador pode diminuir os níveis de variação genética (CUN; WANG, 2010).

Os eventos demográficos de expansão e equilíbrio observados nas populações estudadas podem estar estreitamente relacionados com o processo de dispersão da espécie. Apesar da maioria das sementes de *Utricularia* não apresentarem modificações para a dispersão pelo vento, sendo a água e os pássaros os principais agentes, em *Utricularia gibba* as sementes apresentam alas (TAYLOR, 1989). Portanto, a dispersão pelo vento poderia ser fator que influenciaria os processos de expansão demográfica. Além disso, *U. gibba* apresenta reprodução vegetativa por meio de estolões que se ramificam dicotomicamente (CHORMANSKI; RICHARDS, 2012). Fragmentos de estolões são viáveis e já foram reportados em plumagem de aves (TAYOR, 1989).

Os pássaros são considerados os maiores agentes de dispersão nas plantas aquáticas. Tem sido relatado que as sementes de algumas macrófitas submersas como *Najas* e *Potamogeton* são dispersadas por meio de aves aquáticas (ZHU; YU; XU, 2015). Dessa forma, os processos de dispersão por pássaros em espécies de *Utricularia* podem ocorrer normalmente de norte a sul (ou o contrário) e podem acontecer entre as duas Américas e outras áreas de distribuição (TAYLOR, 1989). Portanto, eventos de migração com o auxílio das aves podem explicar eventos

demográficos observados nesta espécie.

Tem sido observado amplamente a redução do potencial da dispersão nas ilhas com relação aos continentes, tanto em plantas quanto em animais (CODY; OVERTON, 1996). Portanto, no arquipélago de Cuba é muito provável que as populações G9US e G10IJ tenham sofrido o efeito da ação de várias forças evolutivas e eventos demográficos. Da mesma forma que observado em *Utricularia foliosa* (Capítulo 2), na área onde coletada a população G10IJ está sendo afetada pela presença de plantas aquáticas invasoras entre as quais se encontram *Ludwigia sedioides* (Humb. & Bonpl.) H.Hara e *Cyperus* sp. Este fator poderia influenciar na diversidade genética da espécie e poderia agir afetando o crescimento das populações. Em *Pinar del Río*, espécies ameaçadas que ocorrem em comunidades aquáticas especialmente lagoas sob solo quartzítico estão sendo afetadas pela saturação e ressecamento e impacto antrópico (URQUIOLA et al., 2010). Por outro lado, à *Isla de la Juventud* historicamente tem sido afetada principalmente pelos fenômenos naturais, além da ação antrópica pela exploração florestal (VILAMAJÓ; CHANG, 2002).

### 4.3 Estrutura genética

Apesar da primeira análise AMOVA ter mostrado altos valores de  $F_{ST}$ , indicando populações estruturadas quando comparados com os resultados das análises BAPS foram observados para ambos marcadores que os grupos genéticos identificados apresentam aproximadamente a mesma frequência em todas as populações (Figura 3), o que evidencia a falta de estrutura genética entre as populações amostradas. A segunda análise hierárquica AMOVA foi congruente com estes resultados, indicando pouca estrutura populacional uma vez que os valores  $F_{ST}$  mostraram para o cpDNA e para o nrDNA que a maior diferenciação se encontra dentro das populações. Resultados semelhantes foram encontrados para *Utricularia foliosa* (Capítulo 2), quando analisados os grupos geográficos. Para muitas plantas carnívoras são reconhecidos processos microevolutivos atuando na variação genética entre e dentro das populações (ALCALÁ; DOMÍNGUEZ, 2011). Mudanças nas sequências de alelos como produto do efeito gargalo foram observadas em *Sarracenia purpurea*, trazendo

como consequência diferenciação dentro das populações (PARISOD; TRIPPI; GALLAND, 2005). Além disso, outros estudos encontraram diferenciação dentro das populações naturais de *Pinguicula albida* C.Wright ex Griseb (DOMÍNGUEZ, 2014) e *Pinguicula moranensis* Kunth (ALCALÁ; DOMÍNGUEZ, 2011).

A presença de um genótipo exclusivo e pouco compartilhado na população G8CE do Rio Grande do Norte, quando analisada a região ITS, pode estar condicionada à falta de amostragem na área intermediária entre esta população e as demais populações no Sudeste do Brasil. De acordo com a distribuição cosmopolita de *Utricularia gibba* e ampla distribuição no Brasil, particularmente no Rio Grande do Norte (MIRANDA et al., 2015), é pouco provável que a população permaneça isolada e, portanto, não exista fluxo genético com as populações restantes, porém uma amostragem mais ampla cobrindo estas áreas intermediárias poderia mostrar resultados mais completos. Altos índices de diversidade genética observados nesta população corroboram esta hipótese. A presença de genótipos dominantes também têm sido observada frequentemente em populações de angiospermas aquáticas que apresentam reprodução clonal (BARRETT; ECKERT; HUSBAND, 1993), o que pode ser influenciado por esta forma de reprodução assexuada devido à falta de recombinação genética.

#### **4.4 Reconstruções filogeográficas**

Por meio da análise de sequências nucleares e cloroplastidiais foi possível observar a relação entre os haplótipos. Os resultados obtidos para *Utricularia gibba* a partir da inferência bayesiana mostrou para os dois marcadores cladogramas com politomias (Figuras 4 e 5). O espaçador cloroplastidial mostrou o haplótipo H1 compartilhado entre todas as populações, exceto com a população da *Isla da Juventud*. Para a região ITS, H1 também foi compartilhado entre todas as populações exceto para a população de G8CE de Rio Grande do Norte e G10IJ da *Isla de la Juventud* (Tabela 5).

A particularidade da população G10IJ de se manter separada das demais populações, além de apresentar haplótipos exclusivos e de escassa frequência de compartilhamento, sugere que pode ter evoluído recentemente e não ter tido tempo para se dispersar (VÁZQUEZ-DOMÍNGUEZ et al., 2009). Características semelhantes

foram observadas na população F71J de *Utricularia foliosa* na *Isla de la Juventud* (Capítulo 2). Sabe-se que as barreiras geográficas e isolamento geográfico das ilhas podem trazer alterações na frequência de alelos de uma geração a outra (deriva genética) e conseqüentemente a nova coadaptação de combinação de alelos, contribuindo para isolamento reprodutivo da população parental original (WHITTAKER; FERNÁNDEZ-PALACIOS, 2007).

É importante destacar que o escasso compartilhamento de haplótipos observado na população da *Isla de la Juventud* foi particularmente dado com a população G9SU de *Pinar del Río*. Segundo a história geológica da região ocidental de Cuba, estas áreas emergiram durante a era Cenozoica e estiveram conectadas temporalmente entre os períodos Neogeno e Quaternário formando uma massa de terra contínua (ITURRALDE-VINENT, 2005, 1998). Portanto, é possível que estas populações estiveram conectadas e que teria ocorrido fluxo genético.

A ausência de estrutura genética indicada pelo compartilhamento de haplótipos nas populações de *Utricularia gibba* poderia estar condicionada pela dispersão a longas distâncias. Tal condição tem sido observada em plantas aquáticas de *Alisma plantago-aquatica* L., *Eleocharis acicularis* (L.) Roem. & Schult., *Lemna minor* L., *Phalaris arundinacea* L. e *Phragmites communis* Trin. (MOREIRA-MUÑOZ et al., 2014). Os *habitat* de água doce e pântanos se caracterizaram pela baixa continuidade ecológica durante o Pleistoceno tardio e o Holoceno. Desta forma, as mudanças físico-químicas acontecidas nesta etapa poderiam ter afetado os corpos de água. Talvez como uma adaptação ao meio, as plantas aquáticas antes mencionadas apresentam a capacidade de dispersão a longas distâncias (por meio do vento e aves migratórias) e a ocorrência em grandes áreas de distribuição (MOREIRA-MUÑOZ et al., 2014).

É conhecido que as plantas aquáticas devem ter percorrido distâncias transoceânicas significativas por meio da dispersão, no entanto tem sido inferido que as plantas cosmopolitas aquáticas tiveram uma dispersão recente (ZHU; YU; XU, 2015; LES et al., 2003). Estimativas de tempos de divergência a partir de dados moleculares de diversos grupos taxonômicos de plantas aquáticas indicam que a dispersão a longas distâncias têm sido um fator importante para o estabelecimento das espécies. Além disso, são eventos relativamente recentes, sendo que muitas das espécies aquáticas alcançaram uma ampla distribuição há relativamente pouco

tempo, sem grande influência da deriva continental (LES et al., 2003). Eventos de dispersão a longas distâncias e recolonização têm sido inferidos para o gênero *Genlisea* (FLEISCHMANN et al., 2010). Apesar de eventos de dispersão a longas distâncias apresentarem maior probabilidade de êxito nos continentes do que nas ilhas é fato que a dispersão explica também a origem da diversidade da flora insular (LES et al., 2003; ELIASSON, 1995.). Embora os mecanismos de dispersão promovam o conhecimento da história evolutiva do gênero, é importante sinalizar o papel que desempenham os pássaros neste importante processo (TAYLOR, 1989).

Baseado na reconstrução de áreas ancestrais, a análise a partir de *trnS-trnG* e ITS sugerem o Brasil como a área mais ancestral. O fato de ser *Utricularia gibba* uma espécie cosmopolita e aquática, torna-se difícil inferir uma história evolutiva. Tem sido complicado realizar estimativas para determinar a idade do surgimento de Lentibulariaceae devido à ausência de pontos de calibração fóssil e a filogenia ainda não resolvida para a família dentro da ordem Lamiales (SHÄEFORT et al., 2010). Os resultados obtidos nesta análise refletem uma história diferente do observado para *Utricularia foliosa* (Capítulo 2), sendo congruente com as hipóteses morfológicas e filogenéticas inferidas para o gênero sobre a origem Neotropical particularmente na América do Sul (GUISANDE et al., 2007; MÜLLER; BORSCH, 2005; TAYLOR, 1989). Além disso, como citado no capítulo 2, a ampla distribuição cosmopolita que apresenta a seção *Utricularia* poderia implicar que o ancestral da seção pode ter se dispersado amplamente originando espécies com ampla distribuição. Inferências sobre a dispersão do gênero apontam inicialmente as regiões de África tropical e Austrália e posteriormente as regiões restantes (GUISANDE et al., 2007).

## 5 CONCLUSÕES

*Utricularia gibba* mostrou variação nos índices de diversidade genética quando analisado o marcador cloroplastidial e a região nuclear, mas não existem diferenças quanto às populações quando analisadas cada região geográfica.

Processos de expansão e equilíbrio demográfico poderiam estar relacionados com eventos de dispersão e a ação de forças evolutivas, sendo evidenciada maior incidência nas populações cubanas.

As populações de *Utricularia gibba* não estão geneticamente estruturadas e as maiores diferenciações foram encontradas dentro das populações dos grupos geográficos.

O compartilhamento de haplótipos entre as populações permitiu pressupor possíveis processos recentes de dispersão entre as regiões geográficas, sendo inferido que a área ancestral de *Utricularia gibba* poderia ter origem na América do Sul.

## 6 REFERÊNCIAS

ALCALÁ, R.; DOMÍNGUEZ, C. Genetic Structure of the Carnivorous Plant *Pinguicula moranensis* (Lentibulariaceae) on the Transvolcanic Mexican Bel. **Biochemical Genetic**, v. 50, n. 5-6, p. 416–427, 2011.

AMOS, W.; HARWOOD, J. Factors affecting levels of genetic diversity in natural populations. **Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences**, v. 353, p. 177–186, 1998.

AVISE, J.C. **Phylogeography: the history and formation of species**. Cambridge: Harvard University Press, 2000. p. 3-6.

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

BARRETT, S. C. H.; ECKERT, C.; HUSBAND, B. C. Evolutionary processes in aquatic plant populations. **Aquatic Botany**, v. 44, n. 2-3, p. 105–145, 1993.

BORTOLINI, J. C.; DILL, M. A.; BUENO, N. C. Variação da Biomassa de *Utricularia gibba* L. em Ambiente Lêntico no Município de Entre Rios do Oeste/PR. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 1, p. 786–788, 2007.

CHASE, M. W.; HILLS, H. H. Silica gel: An ideal material for field preservation of leaf samples for DNA studies. **Taxon**, v. 40, p. 215–220, 1991.

CHORMANSKI, T. A.; RICHARDS, J. H. An architectural model for the bladderwort *Utricularia gibba* (Lentibulariaceae) 1. **The Journal of the Torrey Botanical Society**, v. 139, n. 2, p. 137–148, 2012.

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

CODY, M.L.; OVERTON, J. McC. Short-term evolution of reduced dispersal in island plant populations. **Journal of Ecology**, v. 84, n. 1, p. 53-61, 1996.

CORANDER, J. et al. Enhanced Bayesian modelling in BAPS software for learning genetic structures of populations. **BMC Bioinformatics**, v. 9, n. 1, p. 539, 2008.

CORANDER, J.; TANG, J. Bayesian analysis of population structure based on linked molecular information. **Mathematical Biosciences**, v. 205, n. 1, p. 19–31, 2007.

CORANDER, J.; MARTTINEN, P. Bayesian identification of admixture events using multilocus molecular markers. **Molecular Ecology**, v. 15, n. 10, p. 2833–2843, 2006.

CULLINGS, K. W. Design and testing of a plant-specific PCR primer for ecological and evolutionary studies. **Molecular Ecology**, v. 1, n. 4, p. 233–240, 1992.

CUN, Y. Z.; WANG, X. Q. Plant recolonization in the Himalaya from the southeastern Qinghai-Tibetan Plateau: Geographical isolation contributed to high population differentiation. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 56, n. 3, p. 972–982, 2010.

DOMÍNGUEZ, Y. **Taxonomia e filogeografia de *Pinguicula* L. ser. *Albidae* Casper (Lentibulariaceae)**. 2014. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade de Mogi das Cruzes, 2014.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemistry Bulletin**, v. 19, n. 1, p. 11–15. 1987.

ELIASSON, U. Patterns of Diversity in Island Plants. In: VITOUSEK, P. M; LOOPE, L. L; ADSERSEN, H. **Islands Biological Diversity and Ecosystem Function**. Germany: Verlag Berlin Heidelberg. 1995. p. 35-50.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, n. 3, p. 564-567, 2010.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, v. 131, n. 2, p. 479–491, 1992.

FLEISCHMANN, A. et al. Molecular Phylogenetics and Evolution Phylogenetics and character evolution in the carnivorous plant genus *Genlisea* A.St.-Hill.(Lentibulariaceae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 56, n. 2, p. 768–783, 2010.

FU, Y. X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. **Genetics**, v. 147, n. 2, p. 915–925, 1997.

GONZÁLEZ TORRES, L. R. et al. Lista roja de la flora de Cuba. Jardín Botánico Nacional/Sello Editorial AMA: **Bissea**, v. 10, n. 1, 2016. 352 p. Edição Especial.

GORDON, E.; PACHECO, S. Prey composition in the carnivorous plants *Utricularia inflata* and *Utricularia gibba* (Lentibulariaceae) from Paria Peninsula, Venezuela. **Revista Biología Tropical**, v. 55, n. 3-4, p. 795–803, 2007.

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

HALL, T. **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT** Nucleic Acids Symposium Series, 1999. Disponível em: <<http://jwbrown.mbio.ncsu.edu/JWB/papers/1999Hall1.pdf>>

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

HEWITT, G. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. **Nature**, v. 405, n. 6789, p. 907–913, 2000.

HILLIS, D. M.; DIXON, M. T. Ribosomal DNA: Molecular Evolution and Phylogenetic Inference. **The quarterly review of biology**, v. 66, n. 4, p. 411–453, 1991.

IBARRA-LACLETTE, E. et al. Architecture and evolution of a minute plant genome. **Nature**, v. 498, n. 7452, p. 94–98, 2013.

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

ITURRALDE-VINENT, M. A. Sinopsis de la Constitución Geológica de Cuba. **Acta Geologica Hispanica**, v. 33, n. 1-4, p. 9–56, 1998.

ITURRALDE-VINENT, M. A. La Paleogeografía del Caribe y sus implicaciones para la biogeografía histórica. **Revista del Jardín Botánico Nacional**, v. 25-26, p. 49–78, 2005.

JUANG, T. C. C.; JUANG, S. D. C.; LIU, Z. H. Direct evidence of the symplastic pathway in the trap of the bladderwort *Utricularia gibba* L. **Botanical Studies**, v. 52, n. 1, p. 47–54, 2011.

KATOH, K.; STANDLEY, D. M. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7 : Improvements in Performance and Usability. **Molecular Biology and evolution**, v. 30, n. 4, p. 772–780, 2013.

LAMBERTINI, C. et al. Genetic diversity in three invasive clonal aquatic species in New Zealand. **BCM Genetic**, v. 11, n. 52, p. 2–18, 2010.

LES, D. H. et al. Biogeography of Discontinuously Distributed Hydrophytes: A Molecular Appraisal of Intercontinental Disjunctions. **International Journal of Plant Sciences**, v. 164, n. 6, p. 917–932, 2003.

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

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

MARTÍNEZ-CRUZ, J.; GODOY, J. A.; NEGRO, J. J. Population fragmentation leads to spatial and temporal genetic structure in the endangered Spanish imperial eagle. **Molecular Ecology**, v. 16, n. 3, p. 477–486, 2007.

MELONI, M. et al. Effects of clonality on the genetic variability of rare , insular species : the case of *Ruta microcarpa* from the Canary Islands. **Ecology and Evolution**, v. 6, n. 3, p. 1569–1579, 2013.

MENEZES, C. G. **Dinâmica e estrutura de populações de *Utricularia* (Lentibulariaceae): comparação entre espécies ameaçadas e não ameaçadas**. 2010. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia, subárea Taxonomia Molecular) – Universidade de Mogi das Cruzes, 2010.

MILLER, M. A et al. A RESTful API for Access to Phylogenetic Tools via the CIPRES Science Gateway. **Evolutionary Bioinformatics** 11, 43-48, 2015. DOI: 10.4137/EBO.S21501

MIRANDA, V. F. O., MENEZES, C. G., SILVA, S. R., DÍAZ, Y. C. A., RIVADAVIA, F. 2015. Lentibulariaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB146>>. Acesso em: 17 Sep. 2016.

MIRANDA, V. F. O. DE et al. Plant or fungal sequences? An alternative optimized PCR protocol to avoid ITS (nrDNA) misamplification. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 1, p. 141–152, 2010.

MOREIRA-MUÑOZ, A et al. Endemism on Islands – Case Studies. In: HOBOM, C. (Ed.). **Endemism in Vascular Plants, Plant and vegetation 9**. Springer Dordrecht Heidelberg:New York London, 2014. Chapter 6, p. 150.

MÜLLER, K.; BORSCH, T. Phylogenetics of *Utricularia* (Lentibulariaceae) and molecular evolution of the trnK intron in a lineage with high substitutional rates. **Plant Systematics and Evolution**, v. 250, n. 1-2, p. 39–67, 2005.

PANFET, C. M. El género *Utricularia* (Lentibulariaceae) en las Antillas Mayores. **Revista del Jardín Botánico Nacional**, v. 29, p. 11–19, 2008.

PARISOD, C.; TRIPPI, C.; GALLAND, N. Genetic Variability and Founder Effect in the Pitcher Plant *Sarracenia purpurea* (Sarraceniaceae) in Populations Introduced into Switzerland: from Inbreeding to Invasion. **Annals of Botany**, v. 95, n. 2, p. 277–286, 2005.

- PETIT, R. J. et al. Comparative organization of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant populations. **Molecular Ecology**, v.14, n. 3, p.689-701, 2005.
- PETIT, R. J. et al. Chloroplast DNA footprints of postglacial recolonization by oaks. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 18, p. 9996–10001, 1997.
- PLACHNO, BARTOSZ J. et al. Floral ultrastructure of two Brazilian aquatic-epiphytic bladderworts: *Utricularia cornigera* Studnička and *U. nelumbifolia* Gardner (Lentibulariaceae). **Protoplasma**, p. 1-14, 2016.
- POSADA, D. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. **Molecular Biology and Evolution**, v. 25, n. 7, p. 1253–1256, 2008.
- ROGERS, A. R.; HARPENDING, H. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. **Molecular Biology and Evolution**, v. 9, n. 3, p. 552–569, 1992.
- RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, v. 19, n. 12, p. 1572–1574, 2003.
- SCHÄFERHOFF, B.; FLEISCHMANN, A.; FISCHER, E.; ALBACH, D. C.; BORSCH, T.; HEUBL, G.; MÜLLER, K. F. Towards resolving Lamiales relationships: insights from rapidly evolving chloroplast sequences. **BMC Evolutionary Biology**, v. 10, n. 1, p. 352–374, 2010.
- SLATKIN, M.; HUDSON, R. R. Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. **Genetics**, v. 129, n. 2, p. 555–62, 1991.
- STÖVER, B. C.; MÜLLER, K. F. TreeGraph 2 : Combining and visualizing evidence from different phylogenetic analyses. **BMC bioinformatics**, v. 11, n. 7 p. 1–9, 2010.
- TAJIMA, F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics**, v. 123, n. 3, p. 585–595, 1989.
- TAYLOR, P. **The genus *Utricularia* - a taxonomic monograph**. London: Office of Public Sector Information, 1989. p. 45-46, 577-579, 582.
- THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, n. 22, p. 4673–4680, 1994.
- URQUIOLA, A. J. et al. **Libro rojo de la flora vascular de la provincia Pinar del Río**. Alicante, 2010. p. 24.

VÁZQUEZ-DOMÍNGUEZ, E. et al. Avances metodológicos para el estudio conjunto de la información genética, genealógica y geográfica en análisis evolutivos y de distribución. **Revista Chilena de Historia Natural**, v. 82, n. 2, p. 277–297, 2009.

VILAMAJÓ, D; CHANG, S. Zonificación ecológica en el noroeste de la Isla de Juventud, Cuba. **Revista del Jardín Botánico Nacional de Cuba**, v. 23, n. 2, p. 285-301. 2002.

WHITE, T. J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.; GELFAND, D.; SNINSKY, J.; WHITE, T. (Ed.). **PCR Protocols: A guide to methods and applications**. San Diego: Academic Press, 1990. p. 315–322.

WHITTAKER, R. J; FERNÁNDEZ-PALACIOS, J. M. **Island biogeography ecology, evolution, and conservation**. Oxford: University press, 2007. p. 167–168.

YU, Y. et al. RASP (Reconstruct Ancestral State in Phylogenies ): A tool for historical biogeography. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 87, p. 46–49, 2015.

YU, Y.; HARRIS, A. J.; HE, X. S-DIVA (Statistical Dispersal-Vicariance Analysis): A tool for inferring biogeographic histories. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 56, n. 2, p. 848–850, 2010.

ZHU, J.; YU, D.; XU, X. The phylogeographic structure of *Hydrilla verticillata* (Hydrocharitaceae) in China and its implications for the biogeographic history of this worldwide-distributed submerged macrophyte. **BMC Evolutionary Biology**, v. 15, n. 95, p. 1–11, 2015.

## **CAPÍTULO 4 - Palinomorfologia de Lentibulariaceae Rich. da região ocidental de Cuba**

**RESUMO** – É apresentado o estudo polínico de 12 táxons da família Lentibulariaceae que ocorrem na região ocidental de Cuba visando caracterizar a morfologia polínica utilizando caracteres dos grãos de pólen, que possam auxiliar na identificação das espécie e taxonomia do grupo. Os grãos de pólen foram analisados por meio de microscopia óptica de luz e microscopia eletrônica de varredura visando novos caracteres que contribuíssem à taxonomia de espécies de Lentibulariaceae nessa região. Os grãos de pólen foram acetolisados, mensurados, fotografados e descritos com base nos caracteres qualitativos. Neste estudo apresentamos análises estatísticas multivariadas por meio dos dados quantitativos. Os grãos de pólen são de tamanho pequeno a médio, isopolares, subprolatos a prolatos, de âmbito circular, subcircular a quadrangular, zonoaperturados, 3-colporados, 4- (5) -colporados, 6- (7-18) -colporados ou porados, endoabertura lalongada ou lolongada e endocingulados em algumas espécies, exina com ornamentação psilada, psilado-perfurada, microrreticulada a rugulada. Sexina mais espessa que a nexina. Em *Pinguicula* ser. *Albidae* foram observadas endoabertura com fastígios, característica descrita pela primeira vez para o gênero e para a família Lentibulariaceae. As espécies de *Utricularia* estudadas foram agrupadas em três tipos polínicos com base nas aberturas, características da endoabertura e forma. Variações morfológicas observadas nos grãos de pólen evidenciaram a diversidade intergenérica do pólen em Lentibulariaceae, corroborando a importância taxonômica destas características a nível de família.

**Palavras chaves:** euripolínica, morfologia polínica, *Genlisea*, *Pinguicula*, *Utricularia*

### **1 INTRODUÇÃO**

Lentibulariaceae apresenta a maior diversidade de espécies entre as plantas carnívoras. É uma família cosmopolita que agrupa aproximadamente 350 espécies (KRÓL et al., 2012), distribuídas em três gêneros: *Genlisea* A. St.-Hil., *Pinguicula* L. e *Utricularia* L. (KRÓL et al., 2012; TAYLOR, 1989). A família apresenta diversos

hábitos de vida, tanto plantas aquáticas, palustres, quanto terrestres ou epífitas, o que geralmente está relacionado aos ambientes em que ocorrem as espécies (TAYLOR, 1989). As armadilhas diferem em cada gênero, apresentando-se como folhas subterrâneas e tubulares (*Genlisea*), folhas adesivas (*Pinguicula*) ou folhas modificadas em utrículos de sucção (*Utricularia*). O caráter plesiomórfico das armadilhas ocorre em *Pinguicula* dando origem às formas mais derivadas presentes nos outros dois gêneros (JUNIPER; ROBINS; JOEL, 1989; MÜLLER et al., 2004). As flores são solitárias ou agrupadas em inflorescências racemosas, zigomorfas, com brácteas (exceto em *Pinguicula*, e às vezes estão ausentes em *Genlisea*), bilabiadas, com cálcio. Apresenta frutos em cápsula, com uma grande diversidade de padrões de deiscência irregular (CASPER, 1966; FROMM-TRINTA, 1979; TAYLOR, 1989).

Em Cuba ocorrem os três gêneros de Lentibulariaceae, apresentando-se *Genlisea* somente com uma espécie, *Genlisea filiformis* A. St.-Hil. (ALAIN, 1957), *Pinguicula* com 13 espécies (DOMÍNGUEZ; PANFET; MIRANDA, 2014; DOMÍNGUEZ, 2012) e *Utricularia* com 14 espécies (CASPER, 1966; DOMÍNGUEZ, 2012) sendo o gênero com maior quantidade de espécies na família. Todos os táxons possuem sistema radicular pouco desenvolvido ou ausente e são ervas anuais ou perenes (LLOYD, 1942; TAYLOR, 1989).

Cuba é a maior ilha das Antilhas e encontra-se dividida em três regiões geográficas, ocidente, centro e oriente. A região ocidental, quanto à diversidade é uma das áreas mais ricas do arquipélago (BORHIDI, 1996). *Genlisea filiformis* e espécies de *Pinguicula* ser. *Albidae* ocorrem nesta região (ALAIN, 1957). O gênero *Utricularia* além de compartilhar diversas áreas de distribuição em todo o país, apresenta a maior quantidade de espécies no ocidente de Cuba (PANFET, 2008).

Embora em Cuba os três gêneros ocorram em lugares úmidos, os hábitos de vida entre eles são diversos, sendo a maioria das espécies terrestres, porém, existem várias espécies aquáticas de *Utricularia* e duas espécies litófitas e uma epífita de *Pinguicula* (SHIMAI et al., 2007).

Alguns estudos indicam o monofiletismo de Lentibulariaceae, incluída na ordem Lamiales, juntamente com outras 23 famílias (APG IV, 2016). O gênero *Pinguicula* forma um grupo irmão com o clado *Genlisea-Utricularia* (JOBSON et al.,

2003; MÜLLER et al., 2004, 2002). *Utricularia* é um grupo morfológicamente heterogêneo com grande número de espécies (aproximadamente 235 – FLEISCHMANN, 2015) e foi dividido por Taylor (1989) em dois subgêneros (*Utricularia* e *Polypompholyx* (Lehm.) P.Taylor) e 33 seções principalmente com base na morfologia dos órgãos vegetativos.

Müller e Borsch (2005), baseados em caracteres moleculares corroboram a classificação infragenérica de *Utricularia* proposta por Kamiéski (1895); deste estudo deriva-se o subgênero *Bivalvaria*, incluindo espécies anteriormente abordadas no subgênero *Utricularia*.

*Pinguicula*, com aproximadamente 100 espécies, está dividido em três subgêneros: *P.* subg. *Pinguicula*, *P.* subg. *Isoloba* e *P.* subg. *Temnoceras* (Barnhart, 1916; Casper, 1966); *Genlisea* tem sido estudado taxonomicamente por Fromm-Trinta (1981) e Taylor (1989) os quais propõem dois subgêneros: *G.* subg. *Genlisea* e *G.* subg. *Tayloria* sendo incluídas as 31 espécies já descritas (FLEISCHMANN, 2012).

Existem alguns estudos sobre a palinologia de Lentibulariaceae (BERETTA et al., 2014; CASPER; MANITZ, 1975; FROMM-TRINTA, 1981, 1979; HUYNH, 1968; LOBREAU-CALLEN; JÉRÉMIE; SUAREZ-CERVERA, 1999; RODONDI; BERETTA; ANDREIS, 2010; SOHMA, 1975A, 1975B; TAYLOR, 1989), a maioria deles são baseados na descrição da morfologia polínica e apontam algumas diferenças entre os grãos de pólen da família. Segundo Sohma (1975a), os grãos de pólen de *Pinguicula* apresentam similaridade com os grãos de *Utricularia*. Além disso, Fromm-Trinta (1981, 1979) encontrou semelhanças entre os grãos de pólen de *Utricularia* e *Genlisea* (seções *Genlisea* e *Tayloria*).

Considerando que os trabalhos sobre a morfologia polínica da família Lentibulariaceae não envolvem estudos das características do pólen desta família em Cuba, os objetivos deste trabalho foram caracterizar a morfologia polínica de 12 táxons de Lentibulariaceae que ocorrem na região ocidental de Cuba, identificando caracteres morfológicos dos grãos de pólen, tanto qualitativamente quanto quantitativamente, que possam auxiliar na identificação das espécie e taxonomia do grupo.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Material Vegetal

Foram analisados os grãos de pólen de 12 táxons de Lentibulariaceae da região ocidental de Cuba: *Genlisea filiformis* A. St.-Hil., *Pinguicula* L. ser. *Albidae* (*P. albida* C.Wright ex Griseb., *P. cubensis* Urquiola & Casper, *P. filifolia* C.Wright ex Griseb. subsp. *filifolia*, *P. filifolia* subsp. *alba* Y.Domínguez, Panfet & V.Miranda), *Utricularia foliosa* L., *U. gibba* L., *U. juncea* Vahl, *U. pusilla* Vahl, *U. resupinata* B.D.Greene ex Bigelow, *U. simulans* Pilg. e *U. subulata* L. (Tabela 1). O material polínico foi obtido a partir de botões florais em pré-antese coletados em populações naturais disponíveis em exsicatas depositadas nos herbários do *Jardín Botánico Nacional de Cuba* (HAJB) e da Universidade de Mogi das Cruzes (HUMC). As outras sete espécies de Lentibulariaceae (gênero *Utricularia*) que ocorrem na região ocidental de Cuba (PANFET, 2008), não foram incluídas nas análises devido à falta de material reprodutivo nos espécimes disponíveis.

Tabela 1. Espécies de Lentibulariaceae de Cuba ocidental incluídas na análise.

No	Táxons	Localização	Habitat	Voucher*
1	<i>Genlisea filiformis</i> A.St.-Hil.	Isla de la Juventud	Terrestre	HUMC5006
2	<i>Pinguicula albida</i> C.Wright ex Griseb.	Pinar del Río	Terrestre	HUMC5007
3	<i>Pinguicula cubensis</i> Urquiola & Casper	Pinar del Río	Terrestre	HUMC5314
4	<i>Pinguicula filifolia</i> C.Wright ex Griseb subsp. <i>filifolia</i>	Isla de la Juventud	Terrestre	HUMC5010
5	<i>Pinguicula filifolia</i> subsp. <i>alba</i> Y.Domínguez, Panfet & V.Miranda	Pinar del Río	Terrestre	HUMC5321
6	<i>Utricularia foliosa</i> L.	Pinar del Río	Aquática	HAJB48849
7	<i>Utricularia gibba</i> L.	Isla de la Juventud	Aquática	HAJB41944
8	<i>Utricularia juncea</i> Vahl	Pinar del Río	Terrestre	HAJB83213
9	<i>Utricularia pusilla</i> Vahl	Pinar del Río	Terrestre	HAJB41243
10	<i>Utricularia resupinata</i> B.D.Greene ex Bigelow	Isla de la Juventud	Aquática	HAJB45866
11	<i>Utricularia simulans</i> Pilg.	Isla de la Juventud	Terrestre	HAJB48401
12	<i>Utricularia subulata</i> L.	Pinar del Río	Terrestre	HAJB41356

\*Acrônimos dos herbários de acordo ao Index Herbariorum (Thiers, atualizados continuamente)

## 2.2 Microscopia óptica de luz (MO) e microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Os grãos de pólen foram acetolisados segundo o método descrito por Erdtman (1960) com modificações de Melhem et al. (2003). O tempo de contato do material polínico com a mistura de acetólise variou segundo as características próprias de cada táxon: *Genlisea* (1 min 30 s), *Pinguicula* (1 min 40 s) e *Utricularia* (de 1 min 30 s até 2 min 30 s). Para as análises de microscopia óptica (MO) foram montadas quatro lâminas permanentes de cada amostra e posteriormente analisadas e fotografadas sob microscópio óptico de luz (Motic, Mod. BA400) com câmera acoplada (Moticam 5.0 Mpixel) utilizando o aplicativo Motic Image Plus 2.0ML (Motic China Group Co., Ltd.). As lâminas foram depositadas na coleção de pólen do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária, Universidade Estadual Paulista, Unesp, Jaboticabal, Brasil. Além disso, para a observação detalhada da ornamentação da exina, os grãos de pólen de algumas espécies foram analisados por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) seguindo as etapas citadas por Melhem et al. (2003) para grãos de pólen acetolisados e não acetolisados. As amostras foram colocadas sobre fita de carbono em suportes e cobertos com uma fina camada de ouro em metalizador DDESK II (Deton Vacuum). Os grãos de pólen foram observados e fotografados a 15 kV utilizando microscópio eletrônico de varredura JEOL (Mod. JSM 5410).

## 2.3 Medidas analisadas

Foram mensurados os diâmetros polar e equatorial ( $n = 25$ ) dos grãos de pólen, dentro do prazo máximo de sete dias após a montagem das lâminas de acordo com as recomendações de Melhem e Matos (1972) e Salgado-Labouriau (1973). Os valores das aberturas, apocolpo e espessura das camadas da exina, sempre que possível, foram analisados em 10 grãos de pólen de cada amostra. O número de aberturas típico de cada táxon foi verificado mediante contagem das mesmas em grãos de pólen em vista polar ( $n = 100$ ). Assim, as variáveis quantitativas analisadas foram: diâmetro equatorial em vista equatorial (DEVE),

diâmetro equatorial em vista polar (DEVP), diâmetro polar em vista equatorial (DPVE), apocolpia (AP), comprimento do colpo (CCOM), largura do colpo (CLAR), comprimento da endoabertura (ECOM), largura da endoabertura (ELAR), diâmetro do poro (PDIA) e espessura da exina (EX).

A partir dos dados quantitativos dos diâmetros obtidos nas análises foram calculados a média aritmética ( $\bar{X}$ ), o desvio padrão ( $s$ ), o coeficiente de variação (CV) e o intervalo de confiança (IC a 95%) para cada variável analisada utilizando o aplicativo SYSTAT 12 ver. 12.02.00 (SYSTAT Software, Inc, 2007). Além disso, foi calculada a razão P/E (diâmetro polar / diâmetro equatorial), o índice de área polar (IAP) e o índice do colpo, seguindo respectivamente Barth e Melhem (1988); Faegri e Iversen, (1966) e Gasparino, Cruz-Barros e Chautems (2013). Para identificar a relação entre as espécies estudadas com base nas medidas dos grãos de pólen foi feita uma análise de componentes principais (PCA), utilizando o programa FITOPAC (SHEPHERD, 1996) e o programa PC-ORD (McCune e Mefford, 1999).

De acordo com os dados quantitativos mensurados nos grãos de pólen de *Utricularia* foi realizada uma análise de agrupamento (*Cluster*) para agrupar as espécies de acordo com as similaridades morfológicas e determinar tipos polínicos. A análise foi baseada no método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) e utilizando a distância euclidiana como medida de dissimilaridade mediante o aplicativo SYSTAT 12 ver. 12.02.00 (SYSTAT Software, Inc, 2007).

A descrição das características polínicas de cada táxon foi feita de acordo com os caracteres quantitativos e qualitativos observados e seguindo a sequência proposta por Barth e Melhem (1988) e a terminologia seguiu os critérios de Barth e Melhem (1988) e Punt et al. (2007).

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Descrições morfológicas e tipos polínicos

##### 3.1.1 Lentibulariaceae Rich.

Os grãos de pólen das espécies estudadas de Lentibulariaceae são mônades, de tamanho pequeno a médio, área polar pequena, isopolares. Variam de suboblato a prolato em vista equatorial, de âmbito circular, subcircular a quadrangular; zonoaperturados; porados ou colporados, (2)3-porados, 3-colporados, 4(5)-colporados, (6)7-18-colporados, endocingulados ou não. Colpos longos, largos ou estreitos, de extremidades arredondadas ou afiladas; endoabertura com fastígios (*Pinguicula* ser. *Albidae*); algumas vezes sincolporados ou anastomosados nos polos. Exina com ornamentação psilada, psilado-perfurada, microrreticulada a rugulada. Sexina mais espessa que a nexina, sendo esta de difícil visualização.

##### 3.1.2 *Genlisea* A. St.-Hil. (Figura 1A e Tabelas 2, 3 ,4)

Grãos de pólen de tamanho médio (Tabela 2 e 3), prolatos (Tabela 2); âmbito circular; 3-colporados (Figura 1A); algumas vezes sincolporado; área polar grande, colpos longos e estreitos; aberturas de difícil visualização. Ornamentação rugulada, apresentando grânulos em MEV (Figura 4A e Tabela 2).

Espécie estudada: *Genlisea filiformis* A. St.-Hil.

##### 3.1.3 *Pinguicula* L. ser. *Albidae* (Figura 1 B-I e Tabelas 2,3 e 4)

Grãos de pólen de tamanho médio (Tabela 2 e 3), prolato esferoidal (*Pinguicula albida*, *P. filifolia* subsp. *filifolia*), oblato esferoidal (*P. filifolia* subsp. *alba*) e suboblato (*P. cubensis*) (Tabela 2); âmbito circular (*P. albida*) (Figura 1B), quadrangular (*P. cubensis*) (Figura 1D), subcircular (*P. filifolia* subsp. *alba* e *P. filifolia* subsp. *filifolia*) (Figura 1F e 1H); 4(5)-colporados (Figura 1B-I e Tabelas 2, 3 e 4); área polar pequena, colpo longos e estreito de extremidades arredondadas;

endoabertura lalongada (Figura 1G), com fastígios (Figura 1B e 1H). Ornamentação microrreticulada (Figura 4B e Tabela 2).

Espécies e subespécies estudadas: *Pinguicula albida* C.Wright ex Griseb., *Pinguicula cubensis* Urquiola & Casper, *Pinguicula filifolia* C.Wright ex Griseb. subsp. *filifolia*, *Pinguicula filifolia* subsp. *alba* Y.Domínguez, Panfet & V.Miranda.

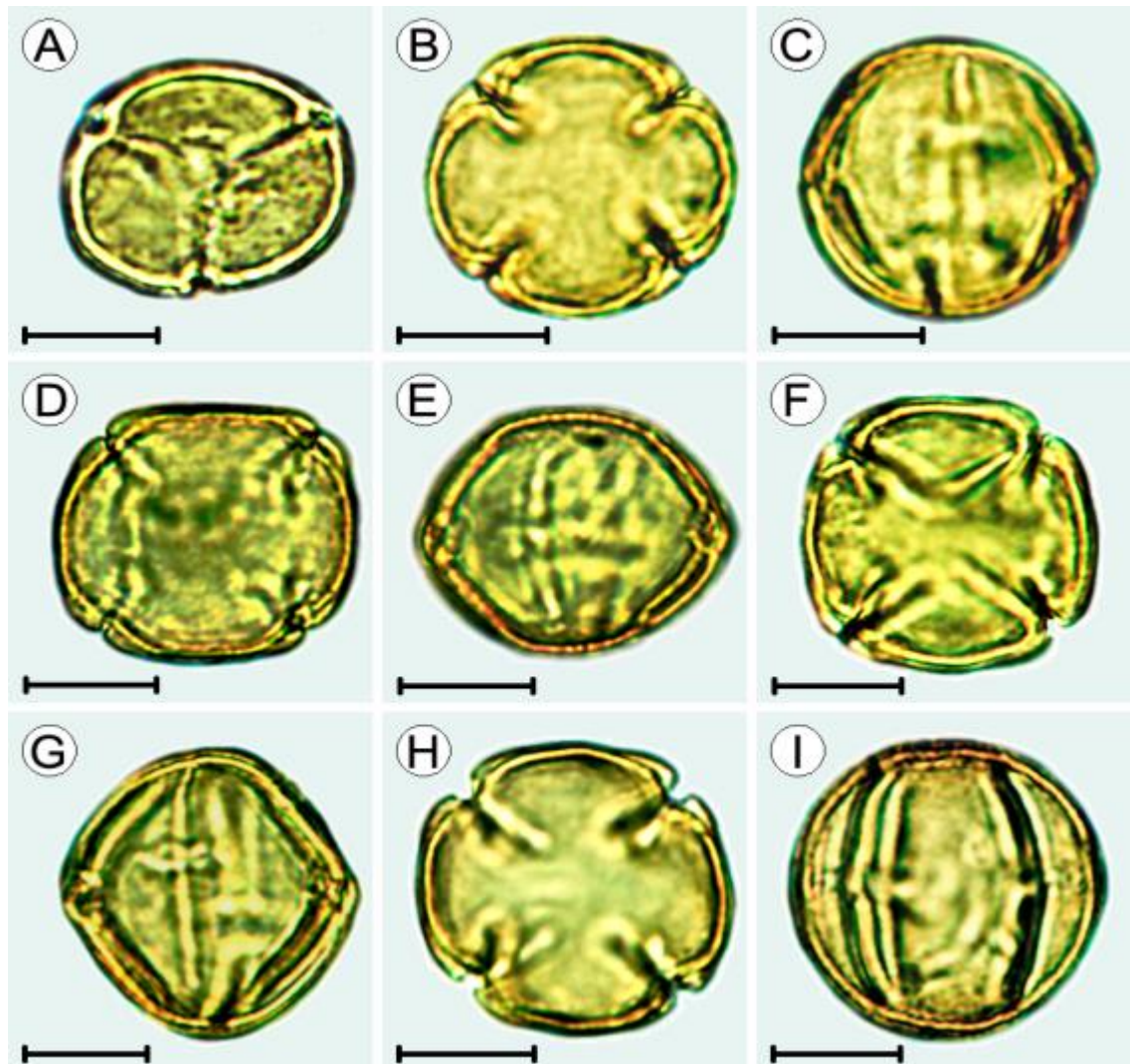


Figura 1. Fotomicrografias dos grãos de pólen de *Genlisea* A. St.-Hil. e *Pinguicula* L. *Genlisea filiformis* (A, vista polar). *Pinguicula albida* (B, vista polar; C, vista equatorial). *P. cubensis* (D, vista polar; E, vista equatorial). *P. filifolia* subsp. *alba* (F, vista polar; G, vista equatorial). *P. filifolia* subsp. *filifolia* (H, vista polar; I, vista equatorial). Escalas = 10  $\mu$ m.

Tabela 2. Caracterização morfológica dos grãos de pólen de Lentibulariaceae de Cuba ocidental. Relação diâmetro polar/ equatorial (P/E), índice da área polar (PAI), número de endoaberturas (NE), forma das endoaberturas (ES) e ornamentação da exina (EO).

Táxons	Tamanho <sup>1</sup>	P/E	Forma <sup>2</sup>	IAP	NE	ES <sup>3</sup>	EO <sup>4</sup>
<i>Genlisea filiformis</i>	M	1.37	P	0.64	3	-	R
<i>Pinguicula albida</i>	M	1.00	PS	0.30	4(5)	LA	MR
<i>Pinguicula cubensis</i>	M	0.86	SO	0.27	4(5)	LA	MR
<i>Pinguicula filifolia</i> subsp. <i>filifolia</i>	M	1.08	PS	0.35	4(5)	LA	MR
<i>Pinguicula filifolia</i> subsp. <i>alba</i>	M	0.90	OS	0.31	4(5)	LA	MR
<i>Utricularia foliosa</i>	M	0.99	OS	0.26	(15)16-18	LO	R
<i>Utricularia gibba</i>	M	0.91	OS	0.32	13-14(15)	LA	PP
<i>Utricularia juncea</i>	M	1.20	SP	-	(2)3	-	PP
<i>Utricularia pusilla</i>	P	0.82	SO	0.35	(8)9-10	LA	PP
<i>Utricularia resupinata</i>	M	0.77	SO	0.45	(11)12-13(14)	LO	R
<i>Utricularia simulans</i>	M	0.91	OS	0.48	4(5)	-	P
<i>Utricularia subulata</i>	M	0,96	OS	0.54	(6)7(8)	-	PP

<sup>1</sup> M = médio, P = pequeno

<sup>2</sup> OS = oblato esperoidal, P = prolato, PS = prolato esferoidal, SO = suboblato, SP = subprolato.

<sup>3</sup> LA = lalongada, LO = lolongada

<sup>4</sup> MR = microrreticulada, P = psilada, PP = psilado-perforada, R=rugulada

Tabela 3. Dados quantitativos dos grãos de pólen de Lentibulariaceae de Cuba ocidental. Diâmetro polar em vista equatorial (PDEV), diâmetro equatorial em vista equatorial (EDEV) e diâmetro equatorial em vista polar (EDPV). PDEV, DEV e EDPV:  $n = 25$ .

Táxons	DPVE					DEVE					DEVP				
	Int.	$\bar{x} \pm s_x$	s	CI	CV	Int.	$\bar{x} \pm s_x$	s	CI	CV	Int.	$\bar{x} \pm s_x$	s	CI	CV
<i>Genlisea</i>	25.0-	30.7	3.02	29.45-	10	12.5-	22.25	3.54	20.79-	16	20.0-	25.54	3.00	24.30-	12
<i>filiformis</i>	35.0	$\pm 0.6$		31.95		30	$\pm 0.71$		23,71		35.0	$\pm 0.60$		26.78	
<i>Pinguicula</i>	26.9-	28.20	0.79	27.88-	3	26.6-	28.17	0.82	27.83-	3	26.3-	27.98	0.66	27.71-	2
<i>albida</i>	29.6	$\pm 0.16$		28.53		29.7	$\pm 0.16$		28.51		28.8	$\pm 0.13$		28.25	
<i>Pinguicula</i>	25.8-	27.86	0.98	27.46-	4	29.1-	32.16	0.38	31.59-	4	28.5-	31.56	0.05	31.09-	4
<i>cubensis</i>	29.2	$\pm 0.20$		28.27		34.7	$\pm 0.28$		32.73		33.6	$\pm 0.23$		32.04	
<i>Pinguicula</i>	30.1-	34.22	1.80	33.48-	5	27.6-	31.43	1.53	30.80-	5	30.6-	32.34	1.14	31.87-	4
<i>filifolia</i>	37.9	$\pm 0.36$		34.97		35.0	$\pm 0.31$		32.06		35.1	$\pm 0.23$		32.81	
subsp.															
<i>filifolia</i>															
<i>Pinguicula</i>	29.0-	33.11	1.55	32.47-	5	30.7-	33.80	1.45	33.19-	4	31.6-	33.37	0.98	32.97-	5
<i>filifolia</i>	36.1	$\pm 0.31$		33.75		37.6	$\pm 0.30$		34.42		35.0	$\pm 0.20$		34.42	
subsp. <i>alba</i>															
<i>Utricularia</i>	27.5-	38.80	6.33	36.19-	16	25.0-	42.65	5.55	40.36-	13	35.0-	42.35	4.51	40.49-	11
<i>foliosa</i>	50.0	$\pm 1.27$		41.41		50.0	$\pm 1.11$		44.94		55.0	$\pm 0.90$		44.21	
<i>Utricularia</i>	27.5-	32.50	2.26	31.57-	7	30.0-	35.44	2.97	34.22-	8	27.5-	34.76	3.46	33.33-	10
<i>gibba</i>	37.5	$\pm 0.45$		33.43		45.0	$\pm 0.59$		36.67		41.5	$\pm 0.69$		36.19	
<i>Utricularia</i>	23.1-	32.42	4.80	30.43-	15	17.9-	26.86	3.97	25.22-	15	28.2-	30.45	1.41	29.86-	5
<i>juncea</i>	46.2	$\pm 0.96$		34.40		33.4	$\pm 0.80$		28.50		33.4	$\pm 0.28$		31.03	

Continua

Tabela 3. Continuação

Táxons	DPVE					DEVE					DEVP				
	Int.	$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$	s	CI	CV	Int.	$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$	s	CI	CV	Int.	$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$	s	CI	CV
<i>Utricularia</i>	15.4-	18.88	3.60	17.40-	19	15.4-	22.98	2.67	21.88-	12	20.1-	24.02	1.75	23.30-	7
<i>pusilla</i>	30.8	$\pm 0.72$		20.37		26.4	$\pm 0.53$		24.09		28.2	$\pm 0.35$		24.75	
<i>Utricularia</i>	20.5-	24.56	1.96	23.86-	7	25.7-	31.83	3.31	30.46-	10	28.2-	33.56	3.22	32.23-	10
<i>resupinata</i>	25.7	$\pm 0.34$		25.25		38.5	$\pm 0.66$		33.20		38.5	$\pm 0.64$		34.89	
<i>Utricularia</i>	19.2-	24.18	2.54	23.13-	11	23.1-	26.49	1.45	25.89-	6	23.1-	25.18	1.23	24.67-	5
<i>simulans</i>	28.2	$\pm 0.51$		25.23		28.2	$\pm 0.29$		27.09		28.2	$\pm 0.25$		25.69	
<i>Utricularia</i>	17.9-	22.09	1.62	21.42-	7	20.5-	22.99	1.77	22.26-	8	20.5-	23.98	1.80	23.24-	8
<i>subulata</i>	25.1	$\pm 0.32$		22.76		27.5	$\pm 0.35$		23.72		26.2	$\pm 0.36$		24.73	

Int. = intervalo,  $\bar{x}$  = média aritmética,  $s_{\bar{x}}$  = desvio padrão da média aritmética, s = desvio padrão, CI = intervalo de confiança ( $p = 0.05$ ), CV = coeficiente de variação (valor em porcentagem).

Tabela 4. Medidas do colpo, endoabertura, poro, apocolpo (AP) e exina em grãos de pólen de Lentibulariaceae de Cuba ocidental ( $n = 10$ ). Os valores são apresentados como média. Todas as medidas em  $\mu\text{m}$ .

Táxons	Colpo			Endoabertura		PDIA	AP	Exina
	Comp. (CC)	Lar. (LC)	Índice do colpo	Comp. (CE)	Lar. (LE)	-	$\bar{x}$	Espessura (EX)
<i>Genlisea filiformis</i>	16.47	1,17	19,01	2,94	2,35	-	16.36	0.81
<i>Pinguicula albida</i>	23.35	1.79	15.73	4.53	13.75	-	8.26	1.80
<i>Pinguicula cubensis</i>	15.88	1.70	18.91	4.34	10.35	-	8.61	1.29
<i>Pinguicula filifolia</i> subsp. <i>filifolia</i>	20.65	1.81	17.36	3.10	9.76	-	11.37	1.11
<i>Pinguicula filifolia</i> subsp. <i>alba</i>	21.02	1.52	22.23	3.75	10.92	-	10.21	1.24
<i>Utricularia foliosa</i>	33.20	2.05	20.80	11.8		-	11.00	1.98
<i>Utricularia gibba</i>	28.40	2.30	15.40	6.20	$\pm 1.36$	-	11.25	1.74
				$\pm 0.63$				
<i>Utricularia juncea</i>	-	-	-	-	-	4,38	8.45	1.94
<i>Utricularia pusilla</i>	11.07	5.06	4.50	4.74		-	15.11	1.52
<i>Utricularia resupinata</i>	15.49	5.66	5.60	5.63		-	12.13	1.80
<i>Utricularia simulans</i>	21.77	2.08	12.70	4,61	3,07	-	12.91	0.94
<i>Utricularia subulata</i>	11.45	4.41	5.20	2,14		-	8.45	1.56

Comp.= Comprimento, Lar.= largura, PDIA.= Diâmetro do poro.

### 3.1.4 *Utricularia* L. (Figura 2 A-I e 3 A-I)

Tipo I - Grãos de pólen de tamanho médio (Tabela 2 e 3), subprolato (Tabela 2); âmbito circular (Figura 2G); (2)3-porados (Figura 2G e Tabela 2); área polar muito grande. Ornamentação psilado-perfurada (Figura 4C e Tabela 2).

Espécie estudada: *Utricularia juncea* Vahl.



Figura 2. Fotomicrografias dos grãos de pólen de *Utricularia* L. *Utricularia foliosa* (A, vista polar; B, vista equatorial; C, ornamentação). *U. gibba* (D, vista polar; E, vista equatorial; F, ornamentação). *U. juncea* (G, vista polar; H, vista equatorial; I, ornamentação). Escalas = 10  $\mu$ m.

Tipo II - Grãos de pólen de tamanho médio (Tabela 2, 3), oblato esferoidal (Tabela 2); âmbito subcircular; 4(5)-colporados (Figura 1, Tabela 2, 3, 4); área polar pequena, colpo longo e estreito de extremidades afiladas; endoabertura de difícil visualização. Ornamentação psilada (Figura 4D, Tabela 2).

Espécie estudada: *Utricularia simulans* Pilg.

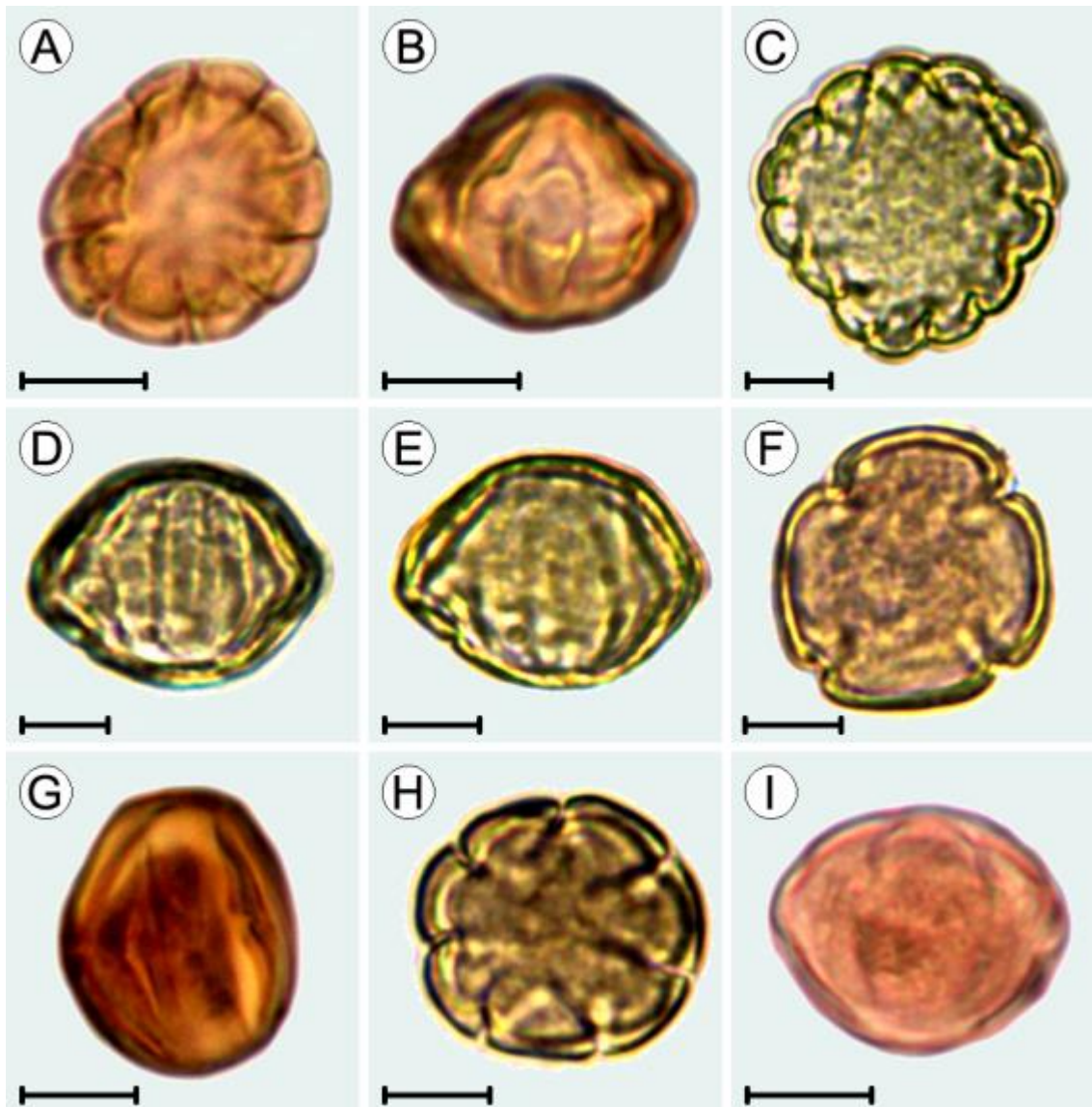


Figura 3. Fotomicrografias dos grãos de pólen de *Utricularia* L. *Utricularia pusilla* (A, vista polar; B, vista equatorial). *U. resupinata* (C, vista polar; D, vista equatorial; E, ornamentação). *U. simulans* (F, vista polar; G, vista equatorial). *U. subulata* (H, vista polar; I, vista equatorial). Escalas = 10  $\mu$ m.

Tipo III - Grãos de pólen de tamanho médio (Tabela 2 e 3); oblato esferoidal (*Utricularia foliosa*, *U. gibba*, *U. subulata*), suboblato (*U. pusilla*, *U. resupinata*) (Tabela 2); âmbito circular; (6)7-18-colporados (Figura 1 e Tabela 2, 3 e 4); endocingulados; área polar pequena (exceto em *U. subulata*, grande), colpi longos e estreitos em *U. foliosa*, *U. gibba*, longos e largos em *U. resupinata*, longos e muito largos em *U. pusilla*, e colpi curtos e largos em *U. subulata*. As extremidades dos colpi são anastomosadas em *U. foliosa* e *U. gibba*; endoabertura alongada

(*U. gibba*, *U. pusilla*) e alongada (*U. foliosa*, *U. resupinata*), em *U. subulata* endoabertura de difícil visualização. Ornamentação rugulada (*U. foliosa* e *U. resupinata*) e psilado-perfurada (demais espécies) (Figura 4E e Tabela 2).

Espécies estudadas: *Utricularia foliosa* L., *Utricularia gibba* L., *Utricularia pusilla* Vahl, *Utricularia resupinata* B.D.Greene ex Bigelow, *Utricularia subulata* L.

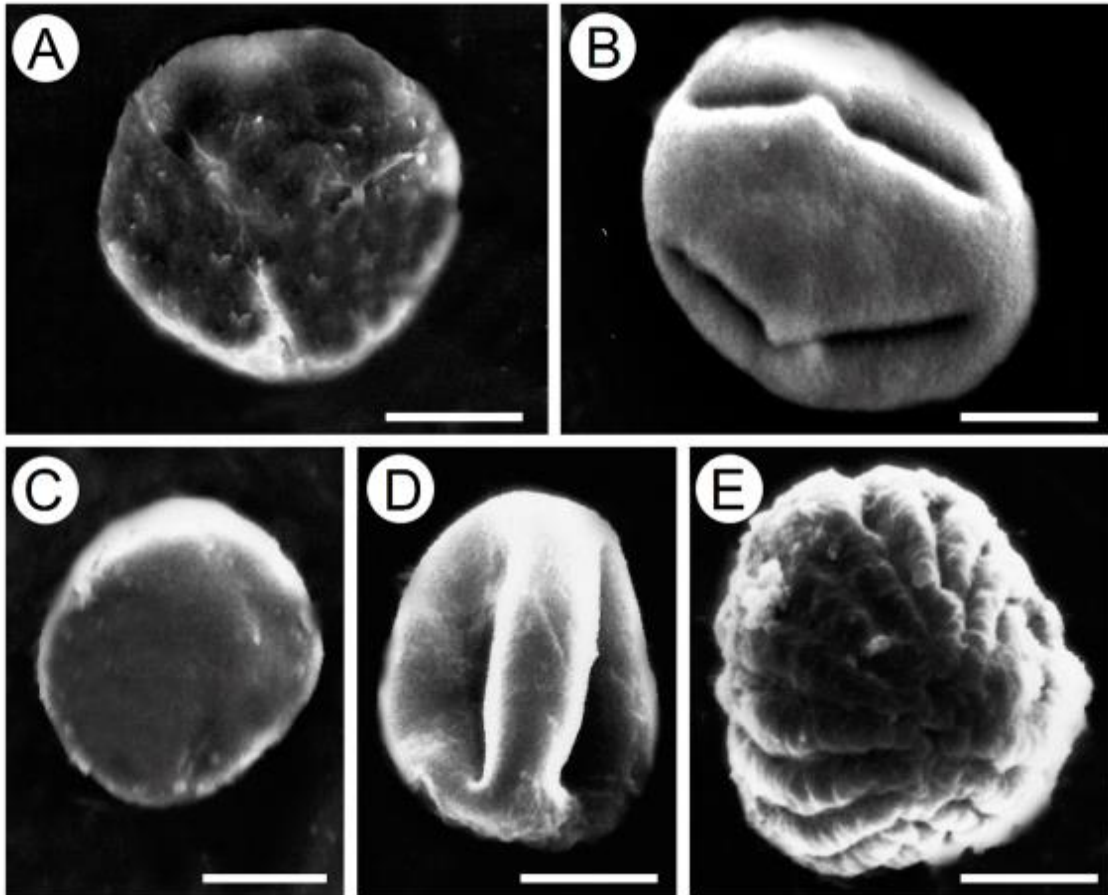


Figura 4. Ornamentação em grãos de pólen de Lentibulariaceae e tipos polínicos de *Utricularia*. *Genlisea* A. St.-Hil. *G. filiformis* (A); *Pinguicula* L. *P. filifolia* subsp. *alba* (B); *Utricularia* L.: Tipo I *U. juncea* (C); Tipo II *U. simulans* (D); Tipo III *U. foliosa* (E). Escalas = 10  $\mu$ m.

### 3.2 Chave dos tipos de pólen dos táxons estudados

1 Grãos de pólen porados.....	<i>Utricularia</i> Tipo I ( <i>Utricularia juncea</i> )
1' Grãos de pólen colporados.....	2
2 Grãos 3-colporados.....	<i>Genlisea filiformis</i>
2' Grãos com mais de 3 aberturas.....	3
3 Pólen com 4-(5) aberturas, sem endocíngulo.....	4
3' Pólen com mais de 5 aberturas, com endocíngulo.....	Tipo III ( <i>Utricularia foliosa</i> , <i>U. gibba</i> , <i>U. pusilla</i> , <i>U. resupinata</i> , <i>U. subulata</i> )
4 Ornamentação psilada e aberturas sem fastígios.....	Tipo II ( <i>Utricularia simulans</i> )
4' Ornamentação microreticulada e aberturas com fastígios....	<i>Pinguicula</i> ser. <i>Albidae</i>

### 3.3 Análise dos dados quantitativos

Por meio da análise de componentes principais (Figura 5) foram obtidos os seguintes resultados: os dois eixos resumiram 90,27% da variância total dos dados. O primeiro componente explica 55,80% da variância total, sendo a variável mais relacionada ao primeiro eixo o comprimento do colpo (CCOM) (Tabela 5), a qual contribuiu no posicionamento da maioria das espécies no lado positivo exceto *U. juncea*, sendo separada totalmente dos restantes táxons posicionada no lado negativo em função da variável diâmetro do poro (PDIA).

O segundo componente explica 34,47% da variância. O valor largura da endoabertura (ELAR) foi o que mais contribuiu ao agrupamento dos taxones de *Pinguicula* ser. *Albidae* do lado positivo deste eixo. As demais espécies (*U. foliosa*, *U. gibba*, *U. pusilla*, *U. resupinata* e *U. subulata*) foram posicionadas do lado negativo do eixo, devido principalmente aos valores de largura do colpo (CLAR). *Genlisea filiformis* e *Utricularia simulans* possuem valores intermediários produto das variáveis que influenciaram o eixo 2, ficando desta forma em uma posição mediana quando comparados com as demais espécies.

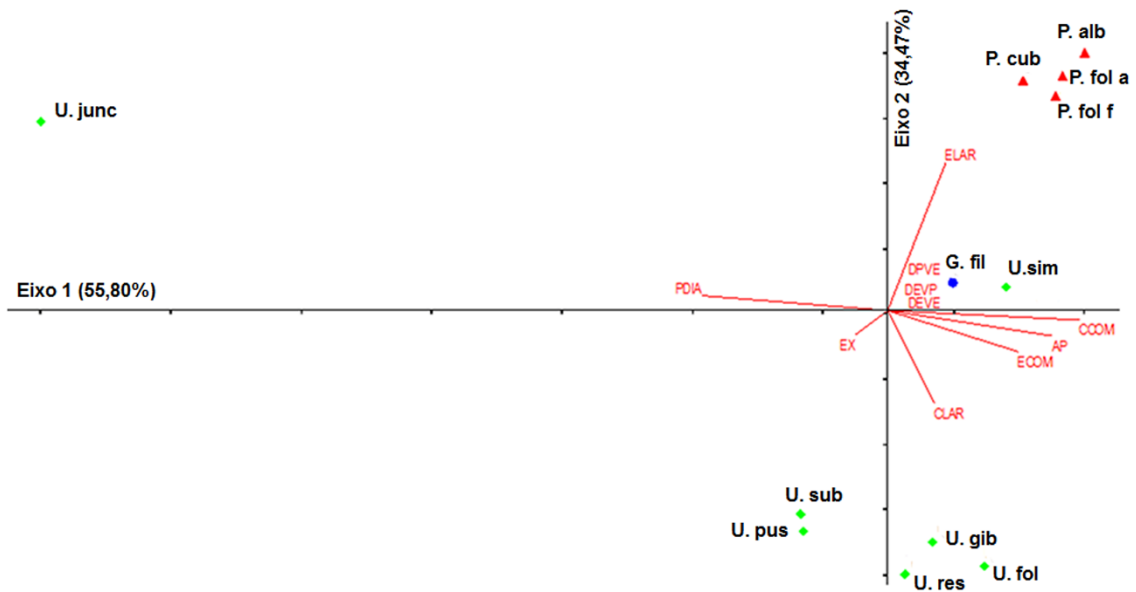


Figura 5. Análise de componentes principais realizada com variáveis métricas de pólen de *Genlisea*, *Pinguicula* e *Utricularia*. G.fil = *Genlisea filiformis*, P.alb = *Pinguicula albida*, P.cub = *P. cubensis*, P.fil.a = *P. filifolia* subsp. *alba*, P.fil.f = *Pinguicula filifolia* subsp. *filifolia*, U.fol = *Utricularia foliosa*, U.gib = *U. gibba*, U.jun = *U. juncea*, U.pus = *U. pusilla*, U.res = *U. resupinata*, U.sim = *U. simulans*, U.sub = *U. subulata*.

Tabela 5. Coeficiente de correlação de Pearson e Kendall de variáveis métricas de grãos de pólen do primeiro e segundo eixo de ordenação PCA em espécies de Lentibulariaceae de Cuba ocidental.

Variáveis	Componentes principais	
	Eixo 1	Eixos 2
DPVE	0.0039	0.5060
DEVE	0.0451	0.0089
DEVP	0.0199	0.0100
CCOM	0.6063	-0.1736
CLAR	0.1663	-0.2977
ECOM	0.3295	-0.2364
ELAR	0.4284	0.8675
AP	0.4569	-0.2320
EX	-0.0454	-0.0504
PDIA	-0.3153	0.1144

Na análise de agrupamento realizada para as espécies de *Utricularia* foi obtido um dendrograma (Figura 6) onde as espécies foram separadas em três grupos segundo as características morfométricas dos grãos de pólen. O primeiro grupo contém *U. juncea*, o segundo grupo *U. simulans* e o terceiro as demais espécies estudadas. Os grupos obtidos com base na análise de caracteres quantitativos são congruentes com os caracteres qualitativos observados nas espécies de cada grupo (Figura 4 C-E); e os tipos polínicos estabelecidos o que concorda com a PCA.

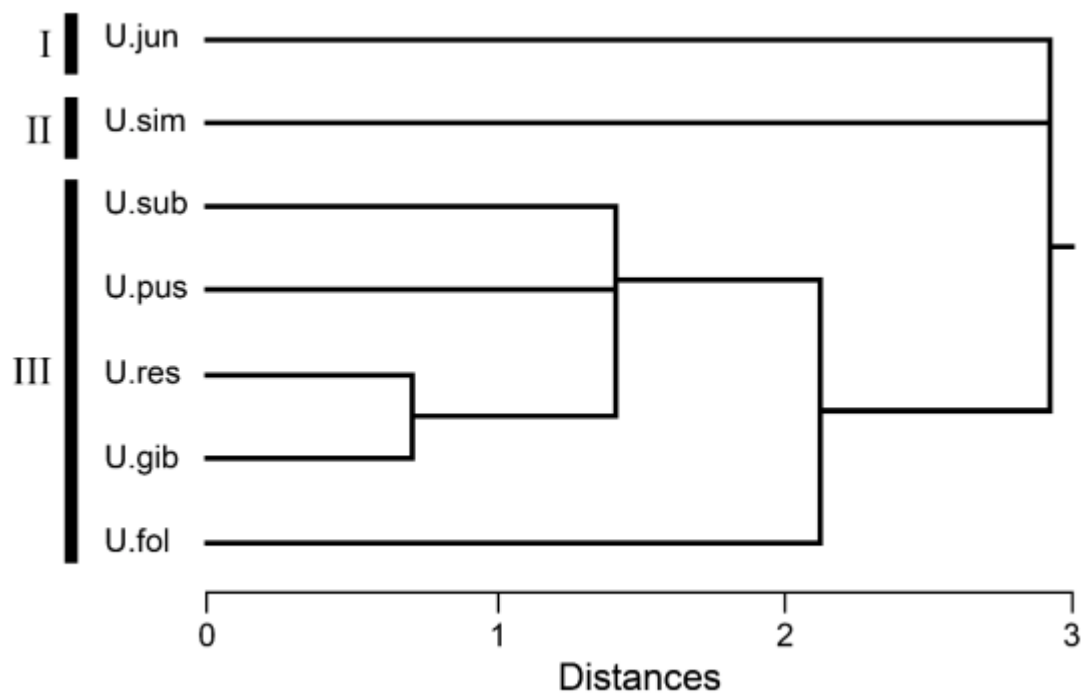


Figura 6. Tipos de pólen (I, II e III) identificados em espécies de *Utricularia* de acordo com a análise de cluster com base em caracteres morfométricos. U.fol = *U. foliosa*, U.gib = *U. gibba*, U.jun = *U. juncea*, U.pus = *U. pusilla*, U.res = *U. resupinata*, U.sim = *U. simulans*, U.sub = *U. subulata*.

#### 4 DISCUSSÃO

Com base nos dados aqui analisados, Lentibulariaceae se caracteriza por ser uma família euripolínica sendo que as principais variações polínicas encontradas são referentes ao tipo, número e estrutura das aberturas, ornamentação da exina e

forma dos grãos de pólen. Embora verificamos similaridades morfológicas nos grãos de pólen entre os três gêneros que ocorrem na região ocidental de Cuba, algumas características permitiram discriminar os gêneros e as espécies estudadas. Trabalhos morfológicos anteriormente realizados com espécies da família também apontaram algumas diferenças entre os grãos de pólen analisados (BERETTA et al., 2014; CASPER; MANITZ, 1975; FROMM-TRINTA, 1981, 1979; HUYNH, 1968; LOBREAU-CALLEN; JÉRÉMIE; SUAREZ-CERVERA, 1999; BERETTA et al., 2014; CASPER; MANITZ, 1975; FROMM-TRINTA, 1981, 1979; HUYNH, 1968; LOBREAU-CALLEN; JÉRÉMIE; SUAREZ-CERVERA, 1999; RODONDI; BERETTA; ANDREIS, 2010; TAYLOR, 1989).

Os dados disponíveis sobre o tipo de abertura polínica em Lentibulariaceae retratam que o pólen em *Genlisea* e *Pinguicula* possui características morfológicas similares principalmente pela presença de grãos tricolporados (FROMM-TRINTA, 1981, 1979; SOHMA, 1975a, 1975b). Já em *Utricularia* são poucas as espécies com pólen tri e tetracolporado, estas geralmente apresentam mais de cinco aberturas (THANIKAIMONI, 1966; HUYNH, 1968; TAYLOR, 1989). Segundo Casper e Manitz (1975); Taylor (1989) e Thanikaimoni (1966), o tipo polínico mais derivado em *Utricularia* é encontrado fundamentalmente em espécies aquáticas e apresentam grande número de aberturas, sendo estas longas e prolongadas no apocolpo (às vezes sincolporadas), além da presença de uma endoabertura que se estende equatorialmente (endocingulo).

As espécies de *Genlisea* e *Pinguicula*, retratadas no presente estudo, podem ser diferenciadas por serem 3-colporadas em *G. filiformis* e 4(5)-colporadas nas espécies de *Pinguicula*, fato que contribui para a distinção das espécies destes gêneros. Já para as espécies de *Utricularia* nossos resultados apontam grãos de pólen com 4 ou mais aberturas (exceto para *U. juncea*), corroborando os trabalhos polínicos já desenvolvidos para o gênero (HUYNH, 1968; TAYLOR, 1989; THANIKAIMONI, 1966).

Para três das espécies do gênero *Genlisea*, seção *Genlisea* (*G. aurea*, *G. filiformis* e *G. repens*), na qual está inclusa uma das espécies estudadas, foi relatado similaridade com o pólen de *Utricularia*, pelo fato que em ambos gêneros ocorre o fenômeno do sincolpismo (FROMM-TRINTA, 1981, 1979). Segundo Sohma (1975a,

1975b) o pólen de *Pinguicula* apresenta similaridade ao de *Utricularia* com base na quantidade de aberturas e ornamentação da exina, embora em *Utricularia* essas características possam variar de espécie a espécie ou dentro de uma determinada espécie, como é o caso do número de aberturas nas espécies do gênero aqui estudadas (*Utricularia foliosa*, *U. gibba*, *U. pusilla*, *U. resupinata*, *U. subulata*) (Tabela 2).

Da análise palinológica de *Genlisea* foram obtidos resultados similares aos referidos na literatura para o gênero, onde os grãos de pólen de *G. filiformis* foram descritos de tamanho médio, subprolato, tricolporados, sincolporados e rugosos (FROMM-TRINTA, 1979, 1981). Segundo os nossos resultados a espécie apresenta pólen com características similares quanto ao tamanho, número e tipo de aberturas e ornamentação. No entanto, diferem quanto a forma, sendo prolatos com diâmetros maiores (Tabela 3) dos indicados por Fromm-Trinta (1979).

Tsymbalyuk, Mosyakin e Bezusko (2008) destacaram a importância dos tipos de aberturas e da ornamentação da superfície do mesocolpo na morfologia polínica de *Pinguicula* e *Utricularia*, contribuindo na diferenciação dos gêneros. Os resultados obtidos na análise palinológica das espécies de *Pinguicula* são congruentes com as características polínicas descritas para o gênero (CASPER, 1966; ESPINOSA-MATÍAS; ZAMUDIO; MÁRQUEZ-GUZMÁN, 2005; HESLOP-HARRISON, 2004; RODONDI; BERETTA; ANDREIS, 2010; SOHMA, 1975a, 1975b; TSYMBALYUK; MOSYAKIN; BEZUSKO 2008). Todos os táxons analisados apresentam similaridades quanto ao padrão morfológico geral, as maiores diferenças observadas estão no número de aberturas, que varia entre 3 e 8 (ESPINOSA-MATÍAS; ZAMUDIO; MÁRQUEZ-GUZMÁN, 2005) e ornamentação da exina (CASPER, 1966; SOHMA, 1975b). Anteriormente foi descrito que o gênero apresenta pólen subsferoidal e a ornamentação da exina varia, sendo reticulada, microrreticulada e ocasionalmente psilada (CASPER, 1966; SOHMA, 1975b). Nas espécies estudadas, *Pinguicula ser. Albidae* exibe diferenças na forma dos grãos; o pólen pode ser prolato esferoidal, oblato esferoidal e suboblato confirmando as características referidas na literatura anteriormente citada. Nas três espécies foi observada exina com ornamentação microrreticulada.

Nos espécimes aqui estudados pertencentes a *Pinguicula* ser. *Albidae* da região ocidental de Cuba foram observadas endoaberturas com fastígios, característica descrita pela primeira vez para o gênero e para a família Lentibulariaceae. Os fastígios correspondem a cavidades limitadas pela sexina e nexina na região da endoabertura de grãos de pólen colporados (REITSMA, 1966; PUNT et al., 2007). Estas estruturas ocorrem para gêneros da família Solanaceae como *Cestrum* L. (SILVA; CARVALHO; SANTOS, 2003) e *Acnistus* Schott, *Brunfelsia* L., *Capsicum* L., *Cyphomandra* Mart. ex Sendtn e *Dyssochroma* Miers e *Solanum* L. (CRUZ-BARROS et al., 2011) e para o gênero *Sebastiania* Spreng. da família Euphorbiaceae (SALES; BARRETO; BARTH, 2011), entre outros, grupos que filogeneticamente não encontram-se relacionados a Lentibulariaceae (APG IV, 2016).

Para as espécies de *Utricularia*, Thanikaimoni (1966) faz referência sobre a relação entre sementes, hábitat e a morfologia polínica e agrupa as espécies do gênero em três grupos pelos tipos de sementes (com abas, escrobiculata ou reticulada ou estriato-reticulada, gloquidiata ou comosas), pelas características do *habitat* (aquático, terrestre e epífita) sendo a quantidade de aberturas e o comprimento do colpo os padrões polínicos que caracterizaram cada grupo. Posteriormente Huynh (1968) não encontrou tais relações e menciona que em *Utricularia*, a analogia entre o *hábitat* e a morfologia polínica não é estrita no gênero como um todo, sendo mostrado que as variações nas aberturas e comprimento do colpo que tinham sido descritas para um *habitat* específico poderiam ser compartilhadas por espécies que ocorrem em outros *habitat*. Isso corrobora os resultados obtidos nas espécies aqui estudadas as quais ocorrem em ambientes tanto aquáticos quanto terrestre portanto as diferenças no hábitat não constituem um padrão para estabelecer diferenças palinológicas entre as espécies, pois espécies de hábito aquático e terrestre não apresentaram diferenças polínicas que possam ser utilizadas nesta distinção. Lobreau-Callen, Jérémie e Suarez-Cervera (1999) sugeriram que as variações do pólen em Lentibulariaceae (e famílias relacionadas como Scrophulariaceae Juss.) estão mais relacionadas a história evolutiva de cada espécie do que a especialização pelo *habitat*.

Taylor (1989) observou que os grãos de pólen das espécies de *Utricularia* pertencentes às seções *Setiscapella*, *Lectricula* e *Utricularia* são muito similares,

apresentando pólen sincolporado, sendo que as principais diferenças entre elas estão dadas pelo número de aberturas. Já Lobreau-Callen, Jérémie e Suarez-Cervera (1999), segundo análises baseadas principalmente em microscopia eletrônica de varredura, encontraram semelhanças nestas seções quanto ao número de aberturas (de 8 a 12) e características da exina, mas observaram para a seção *Utricularia* ectoaberturas com extremidades soldadas (sincolpismo) descrevendo esta em um tipo polínico distinto das seções *Setiscapella* e *Lecticula*, as quais não apresentam grãos de pólen sincolporados. Segundo as análises morfológicas de Taylor (1989), as seções antes mencionadas representam as linhagens mais derivadas dentro do gênero *Utricularia*; por outro lado as seções *Aranella* e *Stomoisia* representam linhagens ancestrais, o autor descreve para *Aranella* também pólen sincolporado e para *Stomoisia* pólen porado.

Os principais estudos morfopolínicos envolvendo espécies de Lentibulariaceae relatam descrições ou tipos polínicos baseados no aumento do número de aberturas nos grãos de pólen e na presença de endocíngulo e sincolpismo nas aberturas (BERETTA et al., 2014; CASPER; MANITZ, 1975; FROMM-TRINTA, 1979; HUYNH, 1968; LOBREAU-CALLEN ET AL., 1999; TAYLOR, 1989; THANIKAIMONI, 1966). Essas características normalmente são relacionadas com grupos ou linhagens derivadas.

Seguindo este raciocínio, Lobreau-Callen, Jérémie e Suarez-Cervera (1999) e Taylor (1989) observaram que a seção *Utricularia* apresenta caracteres mais derivados, pela presença de ectoaberturas soldadas no apocolpo (sincolpismo) e endocíngulo, além das características da ultraestrutura da exina e do infratectum. Lobreau-Callen, Jérémie e Suarez-Cervera (1999) consideraram as outras seções em um nível evolutivo intermediário, pelo fato da presença de características consideradas ancestrais, como um número relativamente pequeno de aberturas (menos de 10) ou uma mistura de caracteres como observados em algumas seções (*Aranella*, *Psyllosperma*, *Foliosa*, *Orchidioides*, *Iperua*, *Stylotheca*, *Sprucea*, *Avesicaria*, *Avesicarioides*, *Setiscapella*).

Os tipos polínicos aqui definidos para *Utricularia* foram estabelecidos principalmente com base nas diferenças morfológicas das aberturas dos grãos de pólen (número e estrutura das aberturas, presença de endocíngulo). *Utricularia*

*foliosa* e *U. gibba* são espécies pertencentes à seção *Utricularia* que foram nesse trabalho agrupadas junto com *U. subulata* e *U. pusilla* da seção *Setiscapella* e *U. resupinata* da seção *Lecticula* pelas características dos seus grãos de pólen que mostram o tipo polínico III aqui descrito. As três seções às quais pertencem estas espécies estão incluídas no subgênero *Utricularia* e sustentado por dados moleculares (JOBSON et al., 2003; MÜLLER et al., 2006; MÜLLER; BORSCH, 2005; REUT; JOBSON, 2010).

As outras duas espécies pertencem a seções diferentes: *Utricularia* sect. *Aranella* (*U. simulans*) e sect. *Stomoisa* (*U. juncea*), tendo sido as duas agrupadas no subgênero *Bivalvaria* como proposto por Müller e Borsch (2005), porém, ainda estão em clados separados como suportados por nossos dados polínicos. Estas duas espécies apresentam características polínicas diversas tanto quantitativas, quanto qualitativas como grãos de pólen porados (*U. juncea*) e ausência de endocíngulo e fastígios nas aberturas (*U. simulans*), o que permitiu a separação delas dois tipos polínicos diferentes (I e II).

## 5 CONCLUSÃO

A análise realizada nas espécies aqui estudadas permite definir Lentibulariaceae como uma família euripolínica, sendo que as diferenças morfológicas observadas nos grãos de pólen auxiliam na distinção dos gêneros e em alguns casos das espécies. *Genlisea filiformis* apresentou grãos de pólen prolatos, 3-colporados, características que permitem separá-la das demais espécies estudadas; em *Pinguicula* ser. *Albidae* foi observada a presença de fastígios nas aberturas e ornamentação microrreticulada, tais características também permitem diferenciar o gênero das demais espécies analisadas. Em *Utricularia* foram identificados três tipos polínicos, o que mostra uma variação nos grãos de pólen para o gênero. Portanto, *Utricularia* pode ser considerado um gênero euripolínico, onde foram identificados caracteres morfológicos considerados derivados (como grande número de aberturas, presença de endocíngulo e sincolpismo), o que confirmam as hipóteses anteriormente propostas sobre a diversificação polínica na

família, sendo que um trabalho envolvendo mais espécies de todas as seções poderá caracterizar melhor os grupos.

### **Agradecimentos**

Aos curadores dos herbários do *Jardín Botánico Nacional de Cuba* (HAJB) e da Universidade de Mogi das Cruzes (HUMC) por disponibilizarem o material. Apoio financeiro foi recebido da Coordenação Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

### **6 REFÊRENCIAS**

ALAIN, HNO. **Flora de Cuba 4. Dicotiledóneas: Melastomataceae a Plantaginaceae**. Cont. Ocas. Mus. Hist. Nat. Colegio “De La Salle”. 16. La Habana. 1957.

APG IV. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. **Botanical Journal of the Linnean Society**, p. 1–20, 2016.

BARTH, O .M.; MELHEM, T. S. **Glossário ilustrado de palinologia**. Editora UNICAMP, Campinas. 1988.

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

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

BORHIDI, A. **Phytogeography and vegetation ecology of Cuba**. Budapest: Akadémiai Kiadó, 1996. p. 29-32.

CASPER, S. J. Monographie der gattung *Pinguicula* L. **Bibliotheca Botanica**, v. 127, n. 128, p. 1-209. 1966.

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

CRUZ-BARROS, M.A.V., SILVA, E.L., GASPARINO, E.C., SOUZA, L.N., ANEDI, C.O. Flora Polínica da reserva do parque estadual das fontes do Ipiranga (São Paulo, Brasil). **Hoehnea**, v. 38, p. 661–685. 2005.

DOMÍNGUEZ, Y. Searching for West Cuban *Pinguicula*. **AIPC Magazine**. v. 27, p. 11–35 . 2012.

DOMÍNGUEZ, Y., PANFET, C. M., MIRANDA, V.F.O. *Pinguicula filifolia* subsp. *alba* (Lentibulariaceae), a new subspecies with an extremely restricted distribution in Pinar del Río, Cuba. **Phytotaxa**, v. 158, n.1, p. 85–92. 2014.

ERDTMAN, G. The acetolysis method, a revised description. **Svensk Botanisk Tidskrift Utgifven af Svenska Botaniska Foreningen**, v. 54, p. 561–564. 1960.

ESPINOSA-MATÍAS, S.; ZAMUDIO, S.; MÁRQUEZ-GUZMÁN, J. Embriología de las estructuras reproductoras masculinas del género *Pinguicula* L. (Lentibulariaceae). **Boletín de la Sociedad Botánica de México**, v. 76, p. 43–52. 2005.

FAEGRI, G.; IVERSEN, J. **Textbook of modern pollen analysis**. Copenhagen: Scandinavian University Books, 1966. p. 237.

FLEISCHMANN, A. **A monograph of the genus *Genlisea***. Poole: Redfern Historia Natural Productions Ltd., 2012. p. 727.

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

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

FROMM-TRINTA, E. Revião do gênero *Genlisea* A.St.-Hil (Lentibulariaceae) no Brasil. **Boletim do museo Nacional**, n. 61, p. 1–20. 1981.

GASPARINO, E. C.; CRUZ-BARROS, M. A. V.; CHAUTEMS, A. Pollen morphology in Brazilian species of *Codonanthe* (Mart.) Hanst. and *Nematanthus* Schrader (Gesneriaceae). **Grana**, v. 52, n. 4, p. 258-274, 2013.

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

HUYNH, K. L. Étude de la morphologie du pollen du genre *Utricularia* L. **Pollen et Spore**, v. 10, n. 1, p. 11–55, 1968.

JOBSON, R. W.; PLAYFORD, J.; CAMERON, K. M.; ALBERT, V. A. Molecular Phylogenetics of Lentibulariaceae Inferred from Plastid rps16 Intron and trnL-F DNA Sequences: Implications for Character Evolution and Biogeography. **Systematic Botany**, v. 28, n. 1, p. 157–171, 2003.

JUNIPER, B. E.; ROBINS R. J.; JOEL D. M. 1989. **The Carnivorous Plants**. London: Academic Press, 1989 p. 353.

KAMIÉNSKI, F. Lentibulariaceae, In: ENGLER, A., PRANTL, K. (Eds.). **Die natürlichen Pflanzenfamilien**: Leipzig, 1895. p. 108–122.

KRÓL, E.; PLACHNO, B. J.; ADAMEC, L.; STOLARZ, M.; DZIUBINSKA, H.; TREBACZ, K. Quite a few reasons for calling carnivores “the most wonderful plants in the world. **Annals of Botany**, v. 109, n. 1. p. 47–64, 2012.

LOBREAU-CALLEN, D.; JÉRÉMIE, J.; SUAREZ-CERVERA, M. Morphologie et ultrastructure du pollen dans le genre *Utricularia* L. (Lentibulariaceae). **Canadian Journal of Botany**, v. 77, n. 5, p. 744–767, 1999.

LLOYD, F. E. **The carnivorous plants**. New York: Chonica Botanica Company, 1942. p. 234.

MCCUNE, B.; MEFFORT, M. J. **Multivariate analysis of ecological data**. Version 4.25, MjM Software. Gleneden Beach, Oregon. 1999.

MELHEM, T. S.; MATOS, M. E. R. Variabilidade de forma dos grãos de pólen de *Eriope crassipes* Benth. Labiatae. **Hoehnea**, v. 2, p. 1–10, 1972.

MELHEM, T. S.; CRUZ-BARROS, M. A. V.; CORRÊA, M. A. S.; MAKINO-WATANABE, H.; SILVESTRE-CAPELATO, M. S. F.; GONÇALVES-ESTEVEZ, V. L. Variabilidade polínica em plantas de Campos do Jordão (São Paulo, Brasil). **Boletim de Botânica, Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo**, v. 16, p. 1–104. 2003.

MÜLLER, K.; BORSCH, T.; LEGENDRE, L.; POREMBSKI, S.; BARTHLOTT, W. 2006. Recent progress in understanding the evolution of carnivorous Lentibulariaceae (Lamiales). **Plant Biology**, v. 8, n. 06, p. 748–75. 2006.

MÜLLER, K.; BORSCH, T. Phylogenetics of *Utricularia* (Lentibulariaceae) and molecular evolution of the trnK intron in a lineage with high substitutional rates. **Plant Systematics and Evolution**, v. 250, n. 1-2, p. 39–67, 2005.

MÜLLER, K.; BORSCH, T.; LEGENDRE, L.; POREMBSKI, S.; THEISEN, I.; BARTHLOTT, W. Evolution of Carnivory in Lentibulariaceae and the Lamiales. **Plant Biology**, v. 6, n. 4, p. 477–490, 2004.

MÜLLER, K. F.; BORSCH, T.; LEGENDRE, L.; THEISEN, I.; BARTHLOTT, W. **Evolution of carnivory in the Lentibulariaceae: considerations based on molecular, morphological, and physiological evidence**. The 4th International Carnivorous Plant Conference. Tokyo, 2002. p. 33.

PANFET, C. M. El género *Utricularia* (Lentibulariaceae) en las Antillas Mayores. **Revista del Jardín Botánico Nacional**, v. 29, p. 11–19, 2008.

PUNT, W.; HOEN, P.P.; BLACKMORE, S.; NILSSON, S.; LE THOMAS, A. Glossary of pollen and spore terminology. **Review of Palaeobotany and Palynology**, v. 143, n. 1, p. 1–81, 2007.

ROCCIA, A.; GLUCH, O.; LAMPARD, S.; ROBINSON, A.; FLEISCHMANN, A.; MCPHERSON, S.; LEGENDRE, L.; PARTRAT, E.; TEMPLE, P. ***Pinguicula of the Temperate North***. Poole: Redfern Natural History Productions, 2016. p. 360.

REITSMA, T.J. Pollen morphology of some European Rosaceae. **Acta Botanica Neerlandica**, v. 15, n. 2, p. 290–307, 1966.

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

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

SALGADO-LABOURIAU, M. L. 1973. Contribuição à palinologia dos cerrados. **Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro**. 1973.

SALES, E. D. O; BARRETO, C. F.; BARTH, M. Morfologia polínica de espécies de Euphorbiaceae s.l. arbóreas ocorrentes no Estado de Santa Catarina, Brasil. **Hoehnea**, v. 38, n. 3, p. 493–498, 2011.

SHEPHERD, G. J. **FITOPAC 1**. Manual do usuário. Departamento de Botânica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 1996.

SHIMAI, H.; MASUDA, Y.; VALDÉS, C. M. P.; KONDO, K. Phylogenetic analysis of Cuban *Pinguicula* (Lentibulariaceae) based on internal transcribed spacer (ITS) region. **Chromosome Botany**, v. 2, n. 4, p. 151–158, 2007.

SILVA, S. N.; CARVALHO, A. M. V.; SANTOS, F. A. R. Morfologia polínica de doze espécies de *Cestrum* L. (Solanaceae) da mata higrófila na Bahia, Brasil. **Scientiarum, Biological Science**, v. 25, p. 439–443. 2003.

SOHMA, K. Polen morphology of the Japanese species of *Utricularia* L. and *Pinguicula* L. with notes on fossil pollen of *Utricularia* from Japan (1)\*\*. **The Journal Japanese Botany**, v. 50, n. 6, p. 164–179, 1975a.

SOHMA, K. Polen morphology of the Japanese species of *Utricularia* L. and *Pinguicula* L. with notes on fossil pollen of *Utricularia* from Japan (2)\*\*. **The Journal Japanese Botany**, v. 50, n. 7, p. 193–208, 1975b.

SYSTAT. **Mystat: A student version of Systat 32-bit UNICODE English**. Version 12.02.00. SYSTAT Software, Inc. 2007.

TAYLOR, P. **The genus *Utricularia* - a taxonomic monograph**. London: Office of Public Sector Information, 1989. p. 3-5, 24, 46, 52, 565-566, 679.

THANIKAIMONI, G. Pollen morphology of the genus *Utricularia*. **Pollen et Spore**, v. 8, n. 2, p. 265–284, 1966.

THIERS, B. [continuously updated]. Index Herbariorum: A global directory of public herbaria and associated staff. New York Botanical Garden's Virtual Herbarium. <http://sweetgum.nybg.org/science/ih/>.

TSYMBALYUK, Z. M.; MOSYAKIN, S. L.; BEZUSKO, L. G. Comparative morphological characterization of pollen grains of species of *Pinguicula* L. and *Utricularia* L. in the flora ukraine. **Ukrainian Botanical Journal**, v. 65, n. 4, p. 520–534, 2008.

## **CAPÍTULO 5 – Considerações finais**

As análises baseadas no espaçador cloroplastidial e a região nuclear mostraram dinâmicas populacionais diferentes para *Utricularia foliosa* e *U. gibba*.

Os índices de diversidade genética auxiliado pelas análises demográficas e de estrutura genética pressupõem tanto para *U. foliosa* quanto para *U. gibba* populações que têm sido influenciadas por fatores demográficos, ecológicos e evolutivos.

Os resultados obtidos nas populações naturais de *U. foliosa* e *U. gibba* sugerem sejam monitoradas e protegidas para sua conservação.

As espécies de Lentibulariaceae pertencentes a região ocidental de Cuba apresenta padrões polínicos que permitem estabelecer diferenças distintivas entre os gêneros e corroborar outras características polínicas que tinham sido descritas na família.

## APÊNDICES

Apêndice 1A. Sequências de Lentibulariaceae empregadas para o enraizamento das filogenias do espaçador *trnS-trnG* e a região ITS.

<i>trnS-trnG</i>	
<i>Utricularia arenaria</i> A. DC. (MENDOÇA; MIRANDA, em preparação)	AGGAATTTTTCTTTTAGACAAAAAGCGGCGCCAAGAACCGAACATAAATAAATAAG GATACCCCTTCCCTTGTGTTGATTTGTTTCGAAACTACCTCTTTTTTTTATTCTGATGG CCCGGCTGGGTGAGTACCCAGCTGGGGATTCCAGCGAATTACGAATTCTAGAGTAAT CATTATTTATATCTGATTTGAAAAACAAAATCCGTGTTTTTTCTTTATTATATTATATTC AATTGCATATCGAAACAACAAAAACAAAAAAGAGTACTTCTCTTTTTTTTTCTTTTTT GTTGTTGTTATATTGATTGATTATTTTGTCCGTTCAAANAAACTATCGATTGTTCAA AAATGCATTCTTCTAGTATGATTGGAGTGTTTTTCGACCTGTATCTATCTTCTTCAGC AACCGAGTATTTATTTTAAATTAATGAAGCATCTTTTACAAATTCATTAAGTT TATCCTATCTACTCGCAAAAAAGTGCAACACACAAAATTTGATGATTATTTGATAATCC ATCCNGTTCGACAAAAGGTACGTTTGCATAC
<i>Utricularia hispida</i> Lam. (MENDOÇA; MIRANDA, em preparação)	CGGACTTTTTGTGAACTCGAACAAGATGGATCATCAAAGAATCATAAAAAATGAGTGT ATTGCACTTTTTATGGGGAGATAGGATAAAATTTACTGATATTCGTAATAATATGTTTCA TTCACCTTCAAGTGAATACTAGGTTGCTGAATAAGATAGATACAGGTCTTAAAAAACT AAAATGATAACATAAGAATGCATTTTGGACCAATCTATAGTTTCTTTTGAACGTAAAAG AAAAAATAATAGTTAACAAACAAAAAAACAAAAAGAAGAACGACTATTTTCTTTTGT GACTATTCAATTGAGTATAATAAAAAAAGCAAGTATTTTTTTTTTCAAATCCGATATCG ATATAAATATAAAATAAATATATAAAATATAAATTGAAAAATATAAATAATGATTAGTCT ACAATTCGTAATTCGCGGGAATGCCCGGCTAGGTACTCACCCAGCCGGGCCATGATA ATAAATCAAATAAGGTCTTTTCAACAAAATCAACACAAAATAAAAGGGGTATCCCTT ATTTTTATTTAGTTGCGTTGTTGGCCCCGTTTTTGTCTAAAATAAATCCAGATTTGT CGATCTCTATCTATAATATAATAATAGAGAGAGAGGGAAAAAGAGAGAATCGTTAC ATTATGTGT
<i>Utricularia laciniata</i> St.-Hilaire & Girard (MENDOÇA; MIRANDA, em preparação)	ACCCGTTTTATTTGATTTAGTTTCGAAAGGCTCTTTTTTTTTTATTCTAATGGCCCGGCT GGGTATTACCTAGCCGGCGTTCCAGCGAATTACGAATTCTAGACTAATCATTATTT CTATCTGATTTGAAAATAAATCCTAGTTTTTTTTTATTATATTCAATTGAAGGTTCAA CAACAAAACGAGTCGTTCTCTTTTTTGTGTTGTTATATTGATTTTTTCCGTTCAA AAGAACTATCGAGAGTTAAAAATGCATTCTCTGTTATGATTTGAATTTTTTAAAT CTGTATCTATCTTCTCAGCAACCTAGTATTGACTTGAAATTGAATACTACGTTTACAAA TGTGATTCATTTTCCACTATTTCCCCCAAAAAGTGCAACACACTCATTTGATGAT TCTTTGATGATGCATCCTGGTCGACAAAAGATACGTTTGCATACAATAATCTTATTGTA GCGGGTATAGTTTAGTGGTAAAAGTG
<i>Utricularia nana</i> A.St.-Hil. & Girard (MENDOÇA; MIRANDA, em preparação)	TATTACACATAATGTAATACTTATATCTCTTTTTACCTCTTCTCTATATTATATTACAG AATAGATATAAAGATCGACAAATACGGAATATTATTTCAAAAAAGCAGCGTCAACAA TCGACCTAAAAACAAAGGGGGTATCCCTTTTTTTAGGATTTCTTTTTGTGCAAAAGG GCCTATTCTGATGCCCCGGATGGGTGAGTACCTAACCGGGCGTTCCAGCAAAATTAAG AATTTGAGACTAATTTGATATCTCTTTGAAAAAAAATTATTATTATATATATATATA TTTATTTATTCATATTCAATTTCAATTTCAATTTCAATTTCAATTTCAATTTCAATTTCA ACAAGAAGTATTTTTTGTGTTGTTATATTGATTATTATTATTATTATTACGTTCAAAG AACTATGGATTTTTGAAAAATCCATTTTTCTGGGATGATTTGATTGTTTTTTCGACTTG TATCGATCTTACTCAGAAACCTAATATTTACTTGAAATTAATGAAGCTTCTTTTACGTT TACAAATTCATTGCTTTTAGCCTATCTACCCCCAAAAAAAAGTGTAACACGCTCA

	TTTTAATGATTGTTAATGATCCGTCGCCGGTTCGACAAAAGGTCCGTTTGCATACAATAA TCTTATTGTAGCGGGTATAGTTTAGTGGTAAAAGTGTG
<i>Utricularia neottioides</i> A.St.-Hil. & Girard (MENDOÇA; MIRANDA, em preparação)	TATCCATTATACATAATGGACTTATTCTCTATTTTTCCCTCTTCTATCTCTATTCTATTA TCTATCTCTATTATAGATAGAGAAATCGACGCATCAGGAATTTATTTACATAAAAAAG CGTCGCCAACCAACCGAACTAAATAAGGGGTACCCCTTATTTAGTTTCGGTTGTACCGGC CGGTTTCAGTACCTAGCTGGGCGTTCCGATTAATTACGAATTTTAGAATAAATAAATAA TTTCGATTTATATCGTTAAAAATACTTGTGTTTTATTTATTATATCAATTAATTGAATAT AATAGTGAACAATAAAAAAAGAAGAACGACTCTTTTTCTGTTGTTATATTGTATTGTTT TTGACGTTCAAAGAACTATCTATTATCCAAAAGAAAATATTCTGCTGGTATTATTCCG AGTCTTTTTTAGACCTGTATATATTCTATCTTCTCAGTAACCAAGTATTCACCTTGAA ATTTTCATGAAGAATCTTTTACGAATATCATTAAATTTAATGATATACTACTCGCAACAA AAATGCAACCCACTAATTTTGTGATTCTTTGATGATCCATCTTGTGTTTCTAGTTCCG ACAAAAGGTACATTTGAATACAATAATTCTATTGTAGCGGGTATAGTTTAGTGGT
ITS	
<i>Utricularia amethystina</i> Salzm. ex A.St.-Hil. & Girard (SILVA; MIRANDA, em preparação)	ATCGTAACAAGTTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGATAAGATATGGAAT TGTGATTGACCGTGGAAAGTGTGCGCAAGTAATCGTCGATGTCGAAGCTGATGCACGG TTGCAATATCTGCTTCCGGTGACACGGTGCCGATTCTCGATGCGGCTTGGTTTTGGC GTCATCCCAAAGGTGTTTATACCCAGCGGGATAGCTGACCACCGAAAGTTTTTATAGG GCGTAGATTGCGCCAAGGAAATATATATAGGGCGGCATCGTTAATCTGGTATCGATT GTTGCCCTAGTGATGTACGTAAGTGCACCTTTAGAAACGACTCACGGCAACGGATATC TTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATATGTGATGTGAATTGCAGA ATCCCGTGAACCATCGAATCTTTGAACGCAAGTTGCGCCTGAGGTGTTTCTGCCGAT GGCACGCCTGTCTGGGTGTTGCAAATTACGTCGTTCCAATTCCTTGGTTTCGGATGGA ACGGAGATTGGCCTTCCGTTGGGATACCGGCGGATGGACTTAGTGTCTGTTGCCAA TGATGTGACATTATACGTGCGTTTTGATGTTGGTTTCTCCAACCTCTCACTGCGGGTTG TTGTGTAGCTTCTTGGGTTTTCTAAAGTATTGCGGCAATGGAGATGTTGTCCGTAT GCGTTGCCCCAGTTCAGGCGAGATCACCCGCCGAATTTAAGCATATCAA
<i>Utricularia arenaria</i> A. DC. (SILVA; MIRANDA, em preparação)	AACAAGTTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGACGAGCCCTGAGACCACC GCGAACGCGTTATTGAAAAACAAGCGTCGAGCGCTTGC GGGTGAGCCGTGCGCCT CCCGCGCGCTCGGCGGACACGGGCCACTGCGCCCGTCAACCCAAACCCACAA GGCGCGGATAGCGCAAGGATCACGAAATGGCGGAGCGCGGCGCCGTTGGCCGG TGGCGATGTACGCGTATGCAGCATCGCCCGGTACGCGGGCGCCCGTTCCGGATGG TGCGGACGAGCGCCCTAAGTCATAGAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTC TCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCG TGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCGATCTCGCCGAGGGCAC GCCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGAGCCCTCCCCTCGCACACGTCGCGTTG GGCGGGGGCGGACACTGGCCTCCCGTGCCTGCGGATCGCGCGGCCGCGGCAAT GAGGTCCCCGCTGCTGGGCGCCACGAGCATTGGTGGTTGGTAACGCAACTTCGCA TGCCGTGGCGTGCCAGGAGCTGGCACCATCAGCGAGAAGA
<i>Utricularia breviscapa</i> Wright ex Griseb. (SILVA; MIRANDA, em preparação)	GTAACAAGTTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGACGAGCCCCATAACGA CCGTGAACCTGTTTTGGTGTTTTTGGTGAAGGGTCGGCGTGCCTGCGTTGCCCT C-GACCGCGTCGATCCTTCCGCAATCAAACCCCAAGGCGCTCTTGGCCAAAGG- AAGAAATGATGGGGAGCGGGTGGATTGTAATCCTCCGCTCCCTTGGCGGTGCGCGA AGAGCGCAGCCAAAGCTTATTTACATTTACAAAGGATTGAAACAACCTCTCGGCAACG

GATATCTCGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTGGTGTGAAT  
 TGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCGGATCC  
 GCCAAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCACGTATCTTGTGCTCTCCAATTCGTCCCC  
 TCAGCCGGTCATGTTGGTTGCAGGGGGTGGGGTGGCGGATGTTGGCCTCCCGTGTG  
 CTCGGTTGGTTAAATGTGTCGCGTCCGTTGGAATTAGTCTCCATGGGCAATGGTGG  
 TTGCTTTGTCGACTTCTCATGCCGTGGTGTGATGCACCAACGTGTTGCGACAACCC  
 CCCTAGTGGTGACGTGCCTTCGCACGCCCTCGACC GCGACCCAGGTCAGGCGGG  
 ATTACCCGCTGAGTTTAAGCATA

*Utricularia cucullata*  
 A.St.-Hil. & Girard  
 (SILVA; MIRANDA, em  
 preparação)

GTCGTAACAAGGTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGACGAGCTAGCG-  
 AAACATTGTAACATGTTGAGATGTTGCCAAGTACGTGGGGTGCCTGTAGATGGTC  
 GCAAGGGCGTCGGCTCCACCCCACTCGCTCCCTCGTCCGTGAGGAGCGAAGATA  
 ACCATCCCATGGTGCACGCGGTGTCCAAGGAAACAAAGTGTGGGGTTGGCTTAGAC  
 CTCCCTCCGGGCGTGTTCAGCGTCCCTATTTTTACGACTCTCGGCAACGGATATCTC  
 GGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGATGTGAATTGCAGAAT  
 CCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCTGAGGCGATCTCGCTAAAGG  
 CACGCCTGCCTGGGTGTCACGCTATTGCGCGCGCCCCTCGTATCCACGTTCCGGGAT  
 GGGAGCGTTGTTGGCTTCCCGTTTTCGCTCCGCAATGACGGCTAGCCTAAATGAATC  
 GTGTCCGGCACTTACAACCTGACGCCTCGTGCCCTGGTGGTTCGCCGCTACGGCTG  
 CTAAGGTCGAGGCCCGTTGAACTGTTGGGGCATGCTAGACCAACCCCGGTGGCGT  
 TCCACGAGTTTTACGTGCGTGCCTGCTTTGCGGACCCAGGTCAGGCGGGATCAC  
 CCGCTGAGTTTAAGCATATCAATAA

*Utricularia minor* L.  
 (SILVA; MIRANDA, em  
 preparação)

AACAAGGTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGACGAGCCCCAAAATGACC  
 GTGAACCTGTTGTTTTCTAGCGAGAAGCAGCGATGCTTCCAAAACCCCAAGGCGC  
 CGGTCTTGCGCCAAGGAAAGAAATGATGGGGAGCGGAAATCCTCCGTTCTCTGGTGG  
 TGCGCGATGAGCGCATGTAAAATAAGAGTAAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTTG  
 GTTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATC  
 CCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCGAATCCGCCAAGGG  
 CAGTCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTGCCTCTCCCCCTCACTACTCGACCGG  
 TGATTGCGTGGGGGTGCGGAAGTTGGCCTCCCGTGCCTCGTTCGCTCGGCCGGC  
 CTAATGTGCCGCTTCTTTGCATCGGACGCCACGAGCAATGGTGGTTGCCTCTGT  
 CGACTTCGATGCTGTGGCGCCGAACGTCTTGGGAACGGGTGATGATCCCCTGTG  
 GCGAGGCGAGGCACTAGTGCCTTGGCAAGCCTCTCGACC GCGACCCAGGTCAGGC  
 -GGGACTACCCGCTGAGTTTAAGCATATCAAT

*Utricularia volubilis*  
 R.Br.  
 (SILVA; MIRANDA, em  
 preparação)

AGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTCGAGTCCCTCGGAATAGATGA  
 GCAACGCGAACATGTGATGGAACAAACGGGATGCACGGGCTCGCGCGGACGGGA  
 CATCCCGGACGATGCAGCCGTTGCCCCACGCTCGATGGGGCCGTCGCGTGGCT  
 TGAGCCCGCATGTTCCGTCGTTGCGAACGTAACCAAGGCGCGGCAAGCGCCAA  
 GGAACAAAGTAGCGTGGCAGCGCTCTTTGCGGCGCGCCCCGTAAGCGGGGTACG  
 CACCGGAGTGTGGTGAAGTGCAGCGTGTGTCGCGATGAGCGCCTCAATGAAAA  
 CGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGC  
 GATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGCAACCATCGAGTTTTTGAACGCAAGTTGC  
 GCCGAAGCGATCTCGCCGAGGGCACGTCCGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCCG  
 CCCCTCGCCCTACCCTACTTCGGGTGAGAGGCAAGGGGGCGGAGAATGGCCTCCCGT  
 GCGATCGATAGCGCGGCCGCCAAACGATATGGCTTACGCGCCGAGCGCTACTAG  
 CAATGGTGGTGCATTGCACGGCATCGCTTGTGTTGTTGCGAGTTGCGGTGATAT  
 ACGAGGACCCTTAGGGTGGCCGTTGGCCTAACCCACGACC GCGACCCAGGTCG  
 GGCGGGATTACCCGCTGAGTTTAAGCATATCA