

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**GENÉTICA MOLECULAR DE *Genlisea violacea* A.St.-Hil. E
Genlisea aurea A.St.-Hil. (LENTIBULARIACEAE)**

Yani Cristina Aranguren Díaz

Bióloga

2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**GENÉTICA MOLECULAR DE *Genlisea violacea* A.St.-Hil. E
Genlisea aurea A.St.-Hil. (LENTIBULARIACEAE)**

Yani Cristina Aranguren Díaz

Orientador: Prof. Dr. Vítor Fernandes Oliveira de Miranda

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

2016

A622g Aranguren Díaz, Yani Cristina
Genética molecular de *Genlisea violacea* A.St.-Hil. E *Genlisea aurea* A.St.-Hil. (Lentibulariaceae) / Yani Cristina Aranguren Díaz – – Jaboticabal, 2016
ix, 121 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016
Orientador: Vítor Fernandes Oliveira de Miranda
Banca examinadora: Mauricio Bacci Junior, Ana Paula de Moraes, Yoannis Domínguez Rodríguez, Eduardo Custodio Gasparino
Bibliografia

1. Biologia reprodutiva. 2. Conservação. 3. Estrutura populacional. 4. Microssatélites. 5. Polinização. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias

CDU 631.52:582.916.46

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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

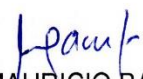
TÍTULO DA TESE: GENÉTICA MOLECULAR DE *Genlisea violacea* A.St.-Hil. E *Genlisea aurea* A.St.-Hil. (LENTIBULARIACEAE)

AUTORA: YANI CRISTINA ARANGUREN DÍAZ

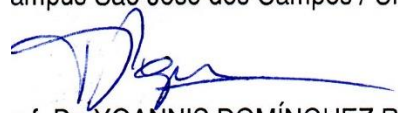
ORIENTADOR: VITOR FERNANDES OLIVEIRA DE MIRANDA

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


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


rof. Dr. MAURICIO BACCI JUNIOR
Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) / Instituto de Biociências de Rio Claro - SP


rofa. Dra. ANA PAULA DE MORAES
Campus São José dos Campos / Universidade Federal de São Paulo


rof. Dr. YOANNIS DOMÍNGUEZ RODRÍGUEZ
UNESP Campus do Litoral Paulista / São Vicente/SP


rof. Dr. EDUARDO CUSTODIO GASPARINO
Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 17 de junho de 2016

DOS CURRICULARES DO AUTOR

YANI CRISTINA ARANGUREN DÍAZ é natural de Mérida, Estado de Mérida, Venezuela. Nascida o 23 de junho de 1981. Fez faculdade de biologia na Universidad de Los Andes (ULA), onde fez iniciação científica nos laboratórios de Simbioses e Cultivo de Tecidos Vegetais *in vitro*, de Ecologia Tropical e de Vectores de Parasitas, e fez estágio de docência em fisiologia vegetal. Também fez TCC em fisiologia e biologia molecular de *Brassica nigra* (L.) Kock, e se formou no ano 2006. Depois fez o mestrado em Biologia Celular na ULA e fez sua dissertação em Variabilidade genética de goiabas nativas da Venezuela, sob orientação do Prof. Dr. Gustavo Fermin. No 2012 ingressou no doutorado em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) pela UNESP, câmpus Jaboticabal, com bolsa PEC-PG do CAPES sob orientação do Prof. Dr. Vítor Fernandes Oliveira de Miranda. Durante o doutorado tem participado em vários projetos de pesquisa do Laboratório de Sistemática Vegetal e fez parte da equipe de atualização e revisão da Lista de Espécies da Flora do Brasil (Família Lentibulariaceae). Tem interesse pela biologia da polinização, genética molecular e genética de populações e biologia da conservação.

...no es posible la humanidad si no tenemos una nueva relación con la Madre Naturaleza

Rigoberta Menchú

Podrán cortar todas las flores, pero no podrán detener la primavera

Pablo Neruda

A minha mãe e minha irmã, meu exemplo, inspiração e motivação.

Ao Elwi, meu companheiro de vida.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço o meu orientador Dr. Vitor F. O. Miranda, pela oportunidade que me deu de fazer parte de sua equipe, por todos os aprendizados profissionais e pessoais, pela amizade e por iniciar-me na paixão pelas plantas carnívoras.

Ao programa CAPES pela bolsa de Doutorado (processo PEC-PG 5916-11-9).

À equipe do Laboratório de Sistemática Vegetal: Cristine Menezes, Saura Silva, Yoannis Domínguez, Dasmiliá Cruz, Michelle Pena, Néstor Franco, Guilherme Seber, Fernanda Rodrigues, Marcelo Moretto e Lucas Antoszczeszen, pela colaboração nas coletas e observações de campo, as discussões científicas, as risadas, o companheirismo, a comida, a bebida e muito importante a amizade.

Aos professores Dr. Manoel Victor Lemos e Dra. Janete Desidério, à técnica Eliane Alves, pela imensa colaboração e apoio ao permitir o uso de materiais e equipamento do Laboratório de Genética de Bacterias.

Ao Dr. Todd Michael pela disponibilização dos dados genômicos.

Ao Dr. Alessandro de Mello Varani Mello pela orientação e ajuda na busca *in silico* de microssatélites.

Aos professores Dr. Eduardo Custódio Gasparino, Dr. André Rodrigo Rech (UFVJM) e Dr. Felipe Amorin (UNESP-Botucatu), pela assessoria relacionada a alguns aspectos da biologia reprodutiva e polinização.

Ao professor Dr. Ben-hur Mattiuz e à Dra. Tereza Castellane pela colaboração nos protocolos de determinação de teor de néctar em flores.

Ao professor Dr. Fernando Zara, e às técnicas Marcia Mataqueiro e Claudia Rodrigues pela ajuda em protocolos de microscopia óptica e MEV.

Ao professor Dr. Gabriel Melo (UFPR) pela ajuda na identificação de alguns polinizadores.

Ao Carlos Rohrbacher pela doação de material vegetal.

À Carla Aranguren pela sua colaboração nas análises e discussões sobre biologia reprodutiva e polinização.

Ao Centro de Recursos Biológicos (CREBIO), especialmente ao Prof. Dr. Jesus Ferro, à Dr. Renata Tezza e à Dr. Agda Facincani pela colaboração na electroforese capilar e genotipagem.

Ao Elwi Machado pelo companheirismo, paciência, motivação, apoio e carinho neste processo tão importante.

À minha família, especialmente minha mãe, minha irmã Carla e minhas tias Julia, Mary, Reina e Ana, que sempre com muito amor me apoiam e inspiram.

À Cristine Menezes, pelas longas conversas relacionadas sobre a vida e sobre nosso trabalho. Foram muitos aprendizados, muitas alegrias e ganho de uma amiga e uma irmã.

À Michele Pena e Maria Lucia Correal, por toda a amizade, o carinho e fazer-me sentir em família.

Aos meus amigos do Brasil: Sonia Reis, Augusto Amaro, Juliana Brombim, Márcia Rodrigues, Marli Valeri, Blanca Dugarte, Donicer Montes, Carolina Casares, Jesús Aular, Fernando Rodas, Wilmar Botello, Cruz Enriquez, Natalia Franco, Natali Franco, Efigenia Camela, Lumey Perez, Gustavo Sanchez, Bruno Val, Victor Viera, Ricardo Ramirez, Yury Granja, Ana María Ramirez e Javier Cadena, por fazerem meus dias no Brasil mais alegres e acompanhados.

Ao Gustavo Fermin, por estar sempre comigo, apoiando com sua amizade, a confiança e motivação.

A meus amigos de sempre, Carmen, Iulay, Luis, Ximena, Anelvi, Elizabeth, Yakary, Natasha y Alzoray, que na distância estão sempre perto de mim, me animando com sua amizade.

Às famílias Machado Sierra e Gobbo Menezes pelo carinho e confiança.

Aos meus filhos e sobrinhos peludos: Filó, Lunita, Teo, Apolo, Dafne, Mateo y Luna que fazem minha vida mais alegre.

À Venezuela.

Ao Brasil, pela imensa oportunidade e aprendizado durante estes quatro anos inesquecíveis.

SUMÁRIO

	Página
1. CAPÍTULO I - Considerações gerais	1
Introdução.....	1
Objetivos.....	3
Objetivo Geral.....	3
Objetivos Específicos	3
Revisão da literatura	4
Carnivoria em plantas.....	4
Família Lentibulariaceae.....	6
Microssatélites.....	16
Referências	20
2. CAPÍTULO II - Biologia reprodutiva de <i>Genlisea violacea</i> A.St.-Hil.	29
Introdução.....	30
Local e material vegetal de estudo	33
Biologia floral	35
Sistema de reprodução.....	36
Morfometria floral.....	36
Visitas florais	38
Resultados.....	38
Biologia reprodutiva.....	38
Sistema de reprodução.....	40
Morfometria das flores	41
Visitantes florais	47
Discussão	54
Padrões ecológicos das populações de <i>Genlisea violacea</i> estudadas.....	54
Biologia floral e reprodutiva	56
Visitantes florais e polinizadores.....	58
Conclusões	62
Referências	63

3. CAPÍTULO III - Desenvolvimento de marcadores microssatélites na planta carnívora <i>Genlisea aurea</i> (Lentibulariaceae) usando sequências genômicas NGS..	69
Introdução.....	70
Material e Métodos	72
Busca <i>in silico</i>	72
Extração de DNA.....	73
Teste dos <i>primers</i>	74
Desenho de <i>primers</i> por sistema de cauda M13.....	74
Genotipagem.....	75
Transferibilidade	75
Análise de dados	76
Conclusões	80
Referências	81
4. CAPÍTULO IV – Genética populacional de <i>Genlisea violacea</i> A.St.-Hil. e <i>Genlisea aurea</i> A.St.-Hil. (LENTIBULARIACEAE).....	84
Introdução.....	85
Material e Métodos	87
Populações amostradas	87
Extração de DNA.....	89
Amplificação de microssatélites	89
Genotipagem.....	89
Análise de diversidade genética	90
Estrutura genética de populações	90
Resultados.....	91
Diversidade genética de <i>Genlisea violacea</i>	91
Estrutura genética de <i>Genlisea violacea</i>	95
Diversidade genética de <i>Genlisea aurea</i>	98
Estrutura genética de <i>Genlisea aurea</i>	102
Discussão	106
Diversidade genética de <i>Genlisea violacea</i>	106
Estrutura genética de <i>Genlisea violacea</i>	108
Diversidade genética de <i>Genlisea aurea</i>	110
Estrutura genética de <i>Genlisea aurea</i>	111

Conclusões	113
Referências	114
5. CONCLUSÕES FINAIS	119
6. APÊNDICES.....	120

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Medidas florais de <i>Genlisea violacea</i> das duas populações estudadas da Serra da Canastra e Furnas. Significância estatística de teste t-student e permanova ($P < 0,0001$).	42
Tabela 2.2. Medidas médias dos insetos visitantes coletados.	46
Tabela 2.3. Visitantes florais de flores de <i>G. violacea</i> em populações naturais da Serra da Canastra e Furnas, Minas Gerais. No de visitas, se refere ao número de vezes que pousaram sobre uma flor aberta.	48
Tabela 3.1. Número de sequências com SSR encontrados em cada etapa.....	72
Tabela 3.2. Populações estudadas.	73
Tabela 3.3. Características dos 12 <i>loci</i> de microsatélites polimórficos para <i>Genlisea aurea</i> calculados com o Primer3. <i>Primers forward</i> (F) e <i>reverse</i> (R). O tamanho dos fragmentos estão apresentados em pares de bases.	76
Tabela 3.4. Sequência de <i>primer forward</i> com cauda M13 no extremo 5'.	77
Tabela 3.5. Características dos microsatélites polimórficos para <i>Genlisea aurea</i> . N, número de amostras; k, número de alelos; H_o e H_e , heterozigosidade observada e esperada; F null, frequência de alelos nulos ($P < 0.05$).	78
Tabela 3.6. Transferibilidade de amplificação em <i>Genlisea filiformis</i> , <i>G. tuberosa</i> e <i>G. violacea</i> usando marcadores microsatélites desenvolvidos para <i>G. aurea</i> . Os valores indicam o tamanho dos fragmentos em pares de base (pb). Três indivíduos foram testados em cada espécie. Os <i>primers</i> que não amplificaram estão indicados com na.	79
Tabela 4.1. Populações de <i>Genlisea violacea</i> e <i>G. aurea</i> estudadas.	88
Tabela 4.2. Diversidade genética para cada <i>locus</i> SSR nas populações estudadas de <i>Genlisea violacea</i> . N_a , número de alelos. N_e , número de alelos efetivos. I, índice de Shannon. H_o e H_e , heterozigosidade observada e esperada. F_{is} , F_{it} e F_{st} , endogamia entre as populações, total e dentro das populações, respectivamente. N_m , fluxo genético. Null, alelos nulos.....	92
Tabela 4.3. Diversidade genética para cada <i>locus</i> SSR nas populações de <i>Genlisea violacea</i> estudadas. N_a , número de alelos. N_e , número de alelos efetivos. I, índice de Shannon. H_o e H_e , heterozigosidade observada e esperada. F, coeficiente de endogamia.	93
Tabela 4.4. Matriz de fluxo genético entre as populações estudadas de <i>Genlisea violacea</i>	93
Tabela 4.5. Matriz de distância genética das populações estudadas de <i>Genlisea violacea</i> . Identidade genética (sobre a diagonal) distância genética (abaixo da diagonal).	94
Tabela 4.6. Análise de variância molecular hierárquica (AMOVA) para o conjunto de todas as populações estudadas de <i>Genlisea violacea</i>	97

Tabela 4.7. Análise de variância molecular hierárquica (AMOVA) para três grupos geográficos ($k = 3$) determinados por análise bayesiana das populações estudadas de <i>Genlisea violacea</i> .	98
Tabela 4.8. Diversidade genética para cada <i>locus</i> SSR nas populações de <i>Genlisea aurea</i> estudadas. Na, número de alelos. Ne, número de alelos efetivos. I, índice de Shannon. Ho e He, heterozigosidade observada e esperada. Fis, Fit e Fst, endogamia entre as populações, total e dentro das populações. Nm, fluxo genético. Null, alelos nulos.	99
Tabela 4.9. Diversidade genética para cada <i>locus</i> SSR nas populações de <i>Genlisea aurea</i> estudadas. Na, número de alelos. Ne, número de alelos efetivos. I, índice de Shannon. Ho e He, heterozigosidade observada e esperada. F, coeficiente de endogamia.	100
Tabela 4.10. Matriz de fluxo genético entre as populações estudadas de <i>Genlisea aurea</i> .	100
Tabela 4.11. Matriz de distância genética das populações estudadas de <i>Genlisea aurea</i> Identidade genética (sobre a diagonal) distância genética (abaixo da diagonal).	101
Tabela 4.12. Análise de variância molecular hierárquica (AMOVA) para o conjunto de todas as populações estudadas de <i>G. aurea</i> .	104
Tabela 4.13. Análise de variância molecular hierárquica (AMOVA) para três grupos geográficos ($k = 3$) determinados por análise bayesiana das populações estudadas de <i>Genlisea aurea</i> .	105

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Representantes de Lentibulariaceae. (a). <i>Pinguicula jackii</i> Barnh. (b). <i>Genlisea aurea</i> A.St.-Hil. (c). <i>Utricularia reniformis</i> A.St.-Hil. (Créditos: a. C.M.P.Valdés ; b-c. LSV).	6
Figura 1.2. Representação do gênero <i>Pinguicula</i> . <i>Pinguicula moranensis</i> Kunth (a) Hábito; (b) tricomas secretores da superfície das folhas; (c) Presa aprisionada por movimento epiascidiado. (Créditos: a. Noah Elhardt; b. honda-e.com; c. bestcarnivorousplant.com)	8
Figura 1.3. Gênero <i>Utricularia</i> . (a) Flor de <i>U. laciniata</i> A.St.-Hil & Girard; (b) Utrículo de <i>U. gibba</i> L. (Créditos: LSV-UNESP).	10
Figura 1.4. <i>Genlisea aurea</i> A.St.-Hil. (a) Folhas fotossintéticas (FF) e folhas utriculíferas (FU); (b) Inflorescência; (c) Folhas cobertas por mucilagem. (Créditos: LSV-UNESP).	12
Figura 1.5. <i>Genlisea violacea</i> A.St.-Hil. (a) Plantas de duas localidades em Furnas, MG; (b) Flor de uma população da Serra da Canastra, MG; (c) Roseta com folhas fotossintéticas e folhas utriculíferas (Créditos: LSV-UNESP).	15
Figura 1.6. Microssatélites. (a) Representação hipotética de um mesmo <i>locus</i> SSR para 4 indivíduos diploides diferentes e algumas variações alélicas. As setas verdes representam os elementos repetitivos. (b) Genotipagem em gel dos quatro indivíduos representados. As bandas verdes representam os alelos A, B e C, que possuem comprimentos diferentes por terem números de repetições diferentes.	18
Figura 2.1. Parque Nacional da Serra da Canastra. ♦ Localidades das populações estudadas.	34
Figura 2.2. Medições da flor de <i>Genlisea violacea</i> . (CL) comprimento e (LL) largura do lábio inferior da corola, (A) largura da abertura entre lábios da corola, (CC) comprimento do cálcio e comprimento da flor completa (CF).	37
Figura 2.3. Viabilidade polínica avaliada por testes de TTC e Alexander. No eixo x tempo em horas desde o início da antese, no eixo y, porcentagem de viabilidade...	39
Figura 2.4. Concentrações de açúcares em flores de <i>Genlisea violacea</i> determinadas por HPLC. B0, flores brancas inteiros; B1, corola sem cálcio de flores brancas; B2, cálcio de flores brancas; R0, flores roxas inteiros; R1, corola sem cálcio de flores roxas; R2, cálcio de flores roxas.	40
Figura 2.5. Flores de <i>Genlisea violacea</i> das populações estudadas. (a) Morfotipo da população 1; (b-d) Morfotipos da população 2, (b) morfotipo roxo, (c) morfotipo branco e roxo, (d) morfotipo branco. (Créditos: LSV-UNESP).	43
Figura 2.6. Análise de coordenadas principais entre as populações 1 e 2, em função das variáveis morfométricas das flores. Comparação entre a população 1 (▲) com todos os morfotipos da população 2 (▼).	44

Figura 2.7. Análise de coordenadas principais entre as populações 1 e 2, em função das variáveis morfométricas das flores. Comparação entre a população 1 (♦) com o da população 2, morfotipos de flores roxas (▲), flores roxo com branco (■) e flores brancas (▼).	45
Figura 2.8. Análise de coordenadas principais entre as subpopulações de Furnas em função das variáveis morfométricas das flores. Morfotipos de flores roxas (▲), flores roxas com branco (■) e flores brancas (▼).	45
Figura 2.9. Flores injuriadas de <i>Genlisea violacea</i> da população de Furnas (MG) com sinais de florivoria. (Créditos: LSV-UNESP).	47
Figura 2.10. Visitantes polinizadores de <i>G. violacea</i> : (a) <i>Lasioglossum</i> sp., (b) <i>Ceratina</i> sp., (c) <i>Toxomerus</i> cf. <i>virgulatus</i> . (Créditos: LSV-UNESP).	49
Figura 2.11. Visitas florais de <i>Genlisea violacea</i> . (a-b) <i>Lasioglossum</i> sp. em flores da nascente do Rio São Francisco; (c-d) Diptera <i>Toxomerus</i> sp. em flores de Furnas, MG. (Créditos: LSV-UNESP).	51
Figura 2.12. Comportamento de visita floral de pequenas abelhas <i>Lasioglossum</i> sp. (Créditos: LSV-UNESP).	52
Figura 2.13. Fotomicrografias de varredura de insetos visitantes de <i>Genlisea violacea</i> . (a-b) Pólen na parte posterior do tórax de abelha <i>Lasioglossum</i> sp. (c) Pólen na cabeça da abelha <i>Ceratina</i> sp. (d) Pólen no tórax de um Syrphidae. PV, pólen de <i>Genlisea violacea</i> ; PA, pólen de Asteraceae.	53
Figura 3.1. Sistema de <i>primer</i> com cauda M13.	74
Figura 4.1. Localidade das populações estudadas. (●) Populações de <i>Genlisea violacea</i> ; (♦) Populações de <i>Genlisea aurea</i> . Os números representam as populações conforme descritas na tabela 4.1.	87
Figura 4.2. Análise de coordenadas principais das distâncias genéticas das populações de <i>Genlisea violacea</i>	94
Figura 4.3. Agrupamento por distância genética de populações de <i>Genlisea violacea</i>	95
Figura 4.4. Valor ΔK ótimo de <i>K clusters</i> para <i>Genlisea violacea</i> ($\Delta K = 5,87$ em <i>K</i> = 3).	96
Figura 4.5. Estrutura genética de <i>Genlisea violacea</i> inferida por análise bayesiana. <i>K</i> = 3. <i>Fst1</i> = 0,184; <i>Fst2</i> = 0,101; <i>Fst3</i> = 0,129. Verde, população genética 1; azul, população genética 2; vermelho, população genética 3.	97
Figura 4.6. Análise de coordenadas principais das distâncias genéticas das populações de <i>Genlisea aurea</i>	101
Figura 4.7. Agrupamento por distância genética de populações de <i>Genlisea aurea</i>	102
Figura 4.8. Valor ΔK ótimo de <i>K clusters</i> para <i>Genlisea aurea</i> ($\Delta K = 48,333$ em <i>K</i> = 3).	103
Figura 4.9. Estrutura genética de <i>Genlisea aurea</i> inferida por análise bayesiana, <i>K</i> = 3. <i>Fst1</i> = 0,166; <i>Fst2</i> = 0,087; <i>Fst3</i> = 0,164. Vermelho, população genética 1; azul, população genética 2; verde, população genética 3.	104

RESUMO

O gênero *Genlisea* forma parte da maior família de plantas carnívoras, as Lentibulariaceae. Das aproximadamente 30 espécies conhecidas do gênero, 17 encontram-se no Brasil e delas 10 são endêmicas. O gênero tem sido pouco estudado, sendo ainda escassos os estudos sobre aspectos genéticos e praticamente se desconhecem seu estado de conservação ou a fragilidade das populações naturais. *Genlisea violacea* A.St.-Hil. e *G. aurea* A.St.-Hil. são endêmicas e estão distribuídas nas formações de Cerrado e de Mata Atlântica, que são biomas muito frágeis. Neste trabalho foram estudadas a biologia reprodutiva e a polinização de *G. violacea* em duas populações naturais. Além disso, foram analisadas a estrutura genética e a dinâmica de populações de *G. violacea* e *G. aurea*. Para isso se desenvolveram microssatélites a partir de dados genômicos de *G. aurea*, transferíveis nas espécies congêneras, incluindo *G. violacea*. Adicionalmente foi estudada a estrutura genética de algumas populações de *G. violacea* e *G. aurea*. Segundo as observações e análises realizadas, *G. violacea* é espécie alógama e autocompatível que oferece néctar aos visitantes, facilitando a autopolinização durante a antese e polinização cruzada durante todo o tempo de vida da flor, por meio de pelo menos duas espécies de abelhas. Mesmo assim, existem diferenças fenotípicas entre populações e incluso apresenta vario morfotipos dentro da mesma população. Ademais, foram desenvolvidos 12 marcadores microssatélites em *G. aurea*, que são transferíveis a espécies congêneras. Nas populações das espécies estudadas observou-se variabilidade baixa e média, respectivamente para *G. violacea* e *G. aurea*, com maior variação dentro que entre populações, que refletem o sistema reprodutivo misto e uma polinização entomofílica. No caso de *G. aurea*, na estruturação genética se observou uma separação entre as populações da Bahia e do sul e centro oeste do país. As diversidades genéticas baixas destas duas espécies sugerem que devem ser vigiadas e protegidas para sua conservação.

Palavras-chave: Biologia reprodutiva, conservação, estrutura populacional, microssatélites, polinização.

SUMMARY

The *Genlisea* genus is part of the larger family of carnivorous plants, Lentibulariaceae. They are approximately 30 known species of the genus, 17 in Brazil and 10 of them are endemic. The genus has been understudied, yet there are few studies on genetic aspects and practically its conservation status and the fragility of the natural populations are unknown. *Genlisea violacea* A.St.Hil. and *G. aurea* A.St.Hil. are endemic and are distributed in the formations of the *Cerrado* and Atlantic Forest, which are very fragile biomes. In this study we analyzed the reproductive biology and pollination of *G. violacea* in two natural populations. In addition, we also analyzed the genetic structure and dynamics of *G. violacea* and *G. aurea* populations. For this we developed microsatellite from genomic data of *G. aurea*, and did cross-amplification in congeneric species including *G. violacea*. According to the observations and analyses, *G. violacea* is self-compatible and allogamous that offers nectar to visitors, facilitating self-pollination during anthesis and cross-pollination throughout the flower lifetime through at least two species of bees. Also, there are differences between populations and phenotypic features included morphotypes within the same population. In addition, 12 microsatellite markers were developed in *G. aurea*, which are transferable to congeneric species. The populations of both species have low variability and average, respectively for *G. violacea* and *G. aurea*, with high variation within than among populations, reflecting the mixed reproductive system and pollination by insects. In *G. aurea* was observed in genetic structure a separation between the populations from Bahia and the South and Center-West of the country. The low diversity of these two species is indicative of the importance of monitoring and protecting the natural populations.

Keywords: Conservation, genetics structure, microsatellites, pollination, reproductive biology.

CAPÍTULO I - Considerações gerais

Introdução

O Brasil é um dos países com maior biodiversidade do planeta, possuindo uma ampla variedade de espécies vegetais, muitas delas endêmicas (BFG et al., 2015); porém, pouco conhecidas. A família Lentibulariaceae é um grupo de plantas carnívoras muito bem representada no Brasil sendo este país um centro de diversidade da família (TAYLOR, 1991; MCPHERSON, 2010). As Lentibulariaceae fazem parte da ordem das Lamiales, no clado das Asterídeas (APG IV, 2016), uma ordem relativamente jovem (originada nos últimos 95 milhões de anos) que possui o maior número de espécies carnívoras conhecidas, cujas linhagens evoluíram a partir de antecessores com folhas grudentas (MCPHERSON, 2010; SCHÄFERHOFF et al., 2010; REFULIO-RODRIGUEZ; OLMSTEAD, 2014). As Lentibulariaceae são compostas por aproximadamente 370 espécies agrupadas em três gêneros *Pinguicula*, *Genlisea* e *Utricularia* (TAYLOR, 1989; FLEISCHMANN, 2012; FLEISCHMANN; STAATSSAMMLUNG; MENZINGER, 2015). No Brasil ocorrem 82 espécies, nos gêneros *Genlisea* e *Utricularia*, dos quais 26 são endêmicas (MIRANDA et al., 2015), e até o momento, o gênero *Pinguicula* não foi registrado para o Brasil.

O gênero *Genlisea* é formado por pequenas ervas que não desenvolvem raízes. São plantas heteroblásticas, ou seja, produzem dois tipos de folhas diferentes determinadas ontogeneticamente por seus programas genéticos de desenvolvimento (GROB; PFEIFER; RUTISHAUSER, 2007; RUTISHAUSER, 2015). Apresentam folhas aéreas fotossintéticas, e folhas modificadas subterrâneas, não-fotossintéticas e com aparência de raiz que são chamadas *folhas utriculíferas* (FLEISCHMANN, 2012). As folhas fotossintéticas são rosuladas, as inflorescências racemosas podem ser pilosas, às vezes com flores solitárias e escapo e pedicelos que possuem brácteas; as flores são andróginas, zigomorfas, amarelas, brancas ou violáceas com androceu formado por dois estames aderidos à corola (FROMM-TRINTA, 1979; FISCHER; POREMBSKI; BARTHLOTT, 2000; DOMÍNGUEZ, 2012; FLEISCHMANN, 2012).

Em 1970 Fromm-Trinta dividiu o gênero *Genlisea* em dois subgêneros: *Genlisea*, caracterizada por deiscência circuncisa do fruto; *Tayloria* Fromm-Trinta, caracterizado por uma deiscência longitudinal do fruto (Fromm-Trinta, 1979). O subgênero *Genlisea* se distribui nas Américas do Sul e Central, África e Madagascar (FLEISCHMANN, 2012).

O gênero *Genlisea* é o menos conhecido; ainda assim, se sabe que apresentam características fisiológicas, genéticas, genômicas, evolutivas e ecológicas interessantes que têm chamado a atenção de cientistas nos últimos anos. Elas possuem adaptações fisiológicas e modificações de seu desenvolvimento morfogênico a supressão de raízes e a heterofilia, que facilitam a obtenção de nutrientes em ambientes limitantes. Além disso, os tamanhos dos genomas pequenos (com cromossomos comparáveis aos de algumas bactérias), a variação genômica intraespecífica, altas taxas de substituição (JOBSON et al., 2004; MÜLLER et al., 2004, 2006; GREILHUBER et al., 2006; ALBERT et al., 2010; LEUSHKIN et al., 2013b; VELEBA et al., 2014; VU et al., 2015), são características que indicam que as espécies de *Genlisea* podem ser um excelente modelo de estudo da biologia vegetal desde muitos aspectos; assim, ao se conhecer esse grupo, poderia revelar informações sobre a biologia das plantas em geral.

Conhecer aspectos como a biologia reprodutiva, a variação genética e dinâmica populacional e a história evolutiva de *Genlisea violacea* e *Genlisea aurea* poderia contribuir não só a compreender estas duas espécies, assim como poderia trazer luz sobre a biologia e a história natural do gênero, de outras espécies relacionadas e dos ecossistemas aos que pertencem. Mesmo assim, uma aplicação importante derivada deste trabalho de investigação é conhecer a vulnerabilidade das populações naturais, para assim servir de subsídio para estratégias de conservação de espécies do gênero *Genlisea* e espécies relacionadas, assim como as áreas naturais onde se encontram.

Objetivos

Objetivo Geral

Conhecer aspectos de ecologia molecular de *Genlisea violacea* A.St.-Hil. e *Genlisea aurea* A.St.-Hil.

Objetivos Específicos

- Estudar a biologia reprodutiva de *Genlisea violacea*;
- Testar a transferibilidade de *primers* SSR de *Utricularia reniformis* em *Genlisea violacea* e *Genlisea aurea*;
- Desenvolver marcadores microssatélites em *G. aurea* a partir de dados genômicos;
- Avaliar a transferibilidade dos marcadores microssatélites de *G. aurea* em outras espécies congêneras;
- Analisar a variabilidade genética e dinâmica em populações de *G. violacea* e de *G. aurea* com o emprego de marcadores microssatélites.

Revisão da literatura

Carnivoria em plantas

O síndrome de carnivoria se caracteriza por um conjunto de adaptações que permitem atrair, capturar, matar, digerir e absorver nutrientes a partir das presas degradadas (DARWIN, 1875; JUNIPER; ROBINS; JOEL, 1989) que, dependendo do tipo de planta, podem ser organismos como bactérias, protozoários, algas, crustáceos, insetos e pequenos vertebrados (LLOYD, 1976; MCPHERSON, 2010). Existem aproximadamente 800 espécies de plantas nas quais pela carnivoria obtêm vantagens no seu crescimento e desenvolvimento (KRÓL et al., 2012; GIVNISH, 2015). A carnivoria é pouco comum em plantas, sendo que as espécies carnívoras representam menos de 0,3% das 290.000 plantas conhecidas (MCPHERSON, 2010).

Na história evolutiva das plantas, a síndrome da carnivoria surgiu em processos homoplásticos distintas vezes em linhagens diferentes de angiospermas (20 gêneros, 12 famílias e 5 ordens), nas quais as folhas e tricomas foram modificados para formar as armadilhas (JUNIPER; ROBINS; JOEL, 1989; ALBERT; WILLIAMS; CHASE, 1992; MÜLLER et al., 2004; MCPHERSON, 2010).

Os principais centros de diversidade de plantas carnívoras encontram-se na Austrália, sudeste Asiático, sul da África, América do Norte, Planalto das Guianas e Brasil (MCPHERSON, 2010). No Brasil existem numerosas plantas carnívoras nativas e endêmicas, principalmente espécies das famílias Droseraceae e Lentibulariaceae (BFG et al., 2015; MIRANDA et al., 2015).

Segundo o mecanismo de captura da presa, as armadilhas podem ser ativas ou passivas (se realizam ou não movimento para capturar a presa); e segundo a morfologia podem ser do tipo adesiva, tipo ratoeira, tipo jarra ou num nível mais complexo, como em *Utricularia* e *Genlisea* (JUNIPER; ROBINS; JOEL, 1989; MCPHERSON, 2010).

No grupo de plantas carnívoras tipo adesivas, estas possuem lâminas foliares cobertas emergências em tricomas secretores de mucilagem e enzimas digestivas (LLOYD, 1976; JUNIPER; ROBINS; JOEL, 1989; MIRANDA; SAJO, 2000). Dentre os

gêneros com este tipo de armadilha encontram-se: *Drosera*, *Drosophyllum*, *Triphyophyllum* (Caryophyllales), *Roridula* (Ericales), *Byblis*, *Ibicella*, *Philcoxia*, *Pinguicula* e *Proboscidea* (Lamiales).

As armadilhas tipo ratoeira são folhas lobuladas com apêndices e tricomas que são sensíveis à presença de presas, estimulando o fechamento dos lóbulos e a secreção de enzimas digestivas (BEMM et al., 2016; BÖHM et al., 2016). Este grupo está composto apenas por dois gêneros monotípicos: *Dionaea* e *Aldrovanda* (ordem Caryophyllales, família Droseraceae).

As carnívoras com armadilhas tipo jarras possuem folhas individuais modificadas em forma tubular com tricomas glandulares e retentores no interior, como nos gêneros *Cephalotus* (ordem Oxalidales: família Cephalotaceae), *Darlingtonia*, *Heliamphora* e *Sarracenia* (ordem Ericales: família Sarraceniaceae), *Nepenthes* (ordem Caryophyllales: família Nepenthaceae); ou são rosetas com folhas mais ou menos fechadas que podem coletar e armazenar água da atmosfera e que permitem a captura. Este último grupo está constituído por dois gêneros de bromélias: *Brocchinia* e *Catopsis* (ordem Poales: família Bromeliaceae). Estas armadilhas são as maiores que existem e conseqüentemente são as que podem capturar presas maiores (JUNIPER; ROBINS; JOEL, 1989; MCPHERSON, 2010).

As armadilhas de *Genlisea* (família Lentibulariaceae: ordem Lamiales) são uma das mais complexas. São folhas subterrâneas que formam um tubo fistulado, com uma cavidade digestiva (ampola) e bifurcada na parte distal em forma de Y invertido (JUNIPER; ROBINS; JOEL, 1989). No interior da armadilha existem numerosos tricomas retentores e glandulares que permitem a captura e a digestão das presas (GUISANDE et al., 2007; PŁACHNO; KOZIERADZKA-KISZKURNO; SWIATEK, 2007; VINCENT; MARMOTTANT, 2011).

O último e mais complexo tipo de armadilhas está presente no gênero *Utricularia*, (ordem Lamiales: família Lentibulariaceae; MCPHERSON, 2010). Estas são pequenas vesículas sugadoras com geotropismo negativo, com tricomas secretores de enzimas no interior (LLOYD, 1976; JUNIPER; ROBINS; JOEL, 1989; MCPHERSON, 2010).

Família Lentibulariaceae

A maior família de plantas carnívoras é Lentibulariaceae, que está constituída por 366 espécies em três gêneros *Pinguicula*, *Genlisea* e *Utricularia* (Figura 1.1; (FLEISCHMANN, 2012; FLEISCHMANN; STAATSSAMMLUNG; MENZINGER, 2015). O Brasil é um centro de diversidade de plantas carnívoras, especialmente de *Genlisea* e *Utricularia* (MCPHERSON, 2010), com 82 espécies destes gêneros dos quais 26 são endêmicas (MIRANDA et al., 2015).

As espécies de Lentibulariaceae são ervas distribuídas em algumas regiões boreais e tropicais do mundo, em ambientes aquáticos ou terrestres e úmidos, com poucos nutrientes; assim, têm a capacidade de obter fósforo, nitrogênio e outros nutrientes vitais capturando e digerindo presas por meio de estruturas foliares que variam com o gênero e também com a espécie (BARTHLOTT et al., 1998; MULLER et al., 2002; MCPHERSON, 2010; FLEISCHMANN, 2012). Também é a família mais amplamente distribuída entre as carnívoras, encontrando-se em todo o planeta exceto na Antártica, regiões muito áridas, latitudes polares e algumas ilhas oceânicas (TAYLOR, 1989; MCPHERSON, 2010).



Figura 1.1. Representantes de Lentibulariaceae. **(a).** *Pinguicula jackii* Barnh. **(b).** *Genlisea aurea* A.St.-Hil. **(c).** *Utricularia reniformis* A.St.-Hil. (Créditos: a. C.M.P.Valdés ; b-c. LSV).

A família é monofilética, sendo *Pinguicula* o grupo irmão do clado formado pelos gêneros *Genlisea* e *Utricularia* (MÜLLER et al., 2004, 2006; ALBERT et al., 2010). *Pinguicula* retém características plesiomórficas como a conservação das raízes e o mecanismo de carnivoría tipo folhas adesivas, comparado com a ausência de raízes e o padrão de armadilhas complexas em *Genlisea* e *Utricularia* (JUNIPER; ROBINS; JOEL, 1989; GREILHUBER et al., 2006; MÜLLER et al., 2006; ALBERT et al., 2010). Além disso, *Genlisea* e *Utricularia* apresentam características moleculares atípicas como uma variação no tamanho genômico (até entre populações da mesma espécie), os menores genomas conhecidos em plantas e altas taxas de substituição nucleotídica, das maiores conhecidas em plantas (JOBSON et al., 2004; MÜLLER et al., 2004, 2006; GREILHUBER et al., 2006).

Pinguicula

Pinguicula é um gênero formado por 101 espécies que se caracterizam por serem pequenas ervas perenes ou em poucos casos anuais, com folhas rosetadas (CASPER, 1966; LEGENDRE, 2000; CIESLAK et al., 2005). Ocorrem na Europa, norte da África, algumas regiões de Ásia, e nas Américas do Norte e do Sul (MCPHERSON, 2010; YILDIRIM; ENOL; RHAN, 2012); contudo, até agora no Brasil não se conhece nenhuma espécie desse gênero.

As rosetas de *Pinguicula* ficam posicionadas diretamente na superfície do solo e as folhas possuem tricomas glandulares sésseis secretores de enzimas digestivas e tricomas glandulares secretores de mucilagem, que na maioria das espécies encontram-se distribuídos na parte adaxial (Figura 1.2; JUNIPER; ROBINS; JOEL, 1989; LLOYD, 1976; MCPHERSON, 2010). Assim, quando pequenos insetos pousam sobre as folhas, ficam presos pela mucilagem e o contato com as glândulas sésseis estimulam a secreção de enzimas digestivas (HESLOP-HARRISON, 2004; MCPHERSON, 2010). Em algumas espécies, outra resposta induzida pela presa aprisionada é o dobramento epiascidiado das margens das folhas que contribui com a retenção da presa e com processo de digestão (Figura 1.2; MCPHERSON, 2010).



Figura 1.2.. Representação do gênero *Pinguicula*. *Pinguicula moranensis* Kunth **(a)** Hábito; **(b)** tricomas secretores da superfície das folhas; **(c)** Presa aprisionada por movimento epiascidiado. (Créditos: a. Noah Elhardt; b. honda-e.com; c. bestcarnivorousplant.com)

Utricularia

Utricularia é o segundo gênero com mais espécies de plantas carnívoras conhecidas, com cerca de 235 (FLEISCHMANN; STAATSSAMMLUNG; MENZINGER, 2015). Existem espécies anuais ou perenes e diferentes formas de vida: terrestres, litófitas, epífitas facultativas, reófitas, aquáticas livres e afixadas (TAYLOR, 1989). A diversidade de ambientes que habita está relacionada também à variedade de modificações na morfologia vegetativa.

O gênero é heteroblástico, ou seja, tem dois tipos de folhas, umas fotossintéticas aéreas e umas não fotossintéticas modificadas em forma de vesículas. Os utrículos (Figura 1.3) são as modificações foliares mais complexas conhecidas no reino vegetal (MÜLLER et al., 2006). Ademais, não possuem raiz nem radícula no estado embrionário (TAYLOR, 1989).

Possui estruturas tão diversas que representa um bom modelo de homeose e heteroblastia, e difere do modelo caule-folha bem definido da maioria das plantas (SATTLER, 1984; RUTISHAUSER, 1993, 1999, 2015; RUTISHAUSER; MOLINE, 2005). Há controvérsia se as estruturas fotossintéticas são folhas ou caules modificados, assim como há folhas modificadas em forma de vesícula que funcionam como armadilha, os utrículos (MCPHERSON, 2010). Assim, as *Utricularia* não apresentam o clássico modelo de organografia vegetal diferenciado em raiz, caule e folha, sendo ainda um desafio estabelecer as relações de homologia entre os órgãos vegetativos (SATTLER, 1984; RUTISHAUSER, 1993, 2015; RUTISHAUSER; MOLINE, 2005). Por outro lado, elas correspondem mais com o modelo de desenvolvimento confuso *Fuzzy Arberian Morpholgy* (FAM) proposto por Agnes Arber entre 1920 e 1957 (RUTISHAUSER, 2001). Esse padrão morfológico atípico parece ter um *continuum* de formação de estruturas onde não se consegue distinguir os padrões hierárquicos estruturais de desenvolvimento comuns de plantas (RUTISHAUSER, 2001, 2015; RUTISHAUSER; ISLER, 2001). O modelo de desenvolvimento confuso aparentemente é pouco comum em plantas, mas é encontrado também em plantas aquáticas da família Podostemaceae (RUTISHAUSER, 2001, 2015, 2016).



Figura 1.3. Gênero *Utricularia*. **(a)** Flor de *U. laciniata* A.St.-Hil & Girard; **(b)** Utrículo de *U. gibba* L. (Créditos: LSV-UNESP).

As armadilhas em *Utricularia* são produzidas em filoclados, caules, estolões ou rizoides (REIFENRATH et al., 2006), e sua estrutura básica é similar em todas as espécies (MCPHERSON, 2010). Elas são cápsulas esféricas ou ovais, de 0,2 mm até 12 mm, com paredes finas que podem ser pigmentadas ou semitranslúcidas (REIFENRATH et al., 2006; MCPHERSON, 2010; SHIRAKAWA; NAGANO; HOSHI, 2012). No lado interno da abertura pode se encontrar uma válvula ou porta que apenas se abre quando o utrículo está vazio (REIFENRATH et al., 2006; MCPHERSON, 2010). Além na maioria das espécies, do lado externo da abertura há papilas, glândulas, tricomas e apêndices (antenas, cerdas gatilho) muitas vezes localizados na parte dorsal cuja forma e nível de ramificação variam com a espécie (FINERAN, 1985; JUNIPER; ROBINS; JOEL, 1989; REIFENRATH et al., 2006; MCPHERSON, 2010). Os apêndices externos supostamente têm função de atração da presa que, ao tocar os apêndices gatilho, estes sinalizam o início da captura (REIFENRATH et al., 2006; MCPHERSON, 2010). No interior do utrículo há diferentes glândulas

especializadas com funções de bombeio, secreção de enzimas digestivas e absorção (JUNIPER; ROBINS; JOEL, 1989; TAYLOR, 1989; MCPHERSON, 2010).

O mecanismo de captura das presas é ativo. O utrículo fechado lentamente se esvazia por bombeio de glândulas internas, gerando uma pressão negativa no interior, depois quando uma presa toca um dos apêndices antena estimula a abertura do utrículo que permite sugar água e presa, pelas diferenças de pressão dentro e fora da estrutura (JOYEUX; VINCENT; MARMOTTANT, 2011; POPPINGA et al., 2015). Depois as pressões no interior e exterior do utrículo se igualam, este se fecha, as paredes se relaxam e voltam ao seu estado de equilíbrio (ADAMEC, 2011; JOYEUX; VINCENT; MARMOTTANT, 2011; SIROVÁ et al., 2011; POPPINGA et al., 2015).

Genlisea

O gênero *Genlisea* se caracteriza por serem pequenas ervas rosetadas heteroblásticas, que não desenvolvem raízes (Figura 1.4). As folhas utriculíferas são subterrâneas, não fotossintéticas, têm ontogenia epiascida (JUNIPER; ROBINS; JOEL, 1989), com forma de um Y invertido com braços fistulosos helicoidais, que se conectam ao tubo sobrepujante que chega à ampola (Figura 1.4a; BARTHLOTT et al., 1998; FROMM-TRINTA, 1979; PŁACHNO; KOZIERADZKA-KISZKURNO; SWIATEK, 2007).

Nas folhas utriculíferas, as presas entram através das aberturas dos braços ao interior da armadilha onde tricomas retentores evitam que escapem (PŁACHNO; KOZIERADZKA-KISZKURNO; SWIATEK, 2007; FLEISCHMANN et al., 2010). Uma vez na ampola, os tricomas glandulares começam a produzir enzimas digestivas que transformam as presas em substâncias simples que são absorvidas e aproveitadas pela planta (PŁACHNO; KOZIERADZKA-KISZKURNO; SWIATEK, 2007; PŁACHNO et al., 2008). Os tricomas glandulares cobrem as paredes internas da ampola; são curtos, pedunculados e glandulosos capitados, constituídos basicamente por três tipos de células (FROMM-TRINTA, 1979; PŁACHNO; KOZIERADZKA-KISZKURNO; SWIATEK, 2007). A cabeça do tricoma secretor está formado por 2-4 células que possuem grandes vacúolos, numerosas mitocôndrias e um sistema de retículo endoplasmático rugoso bem desenvolvido, que permitem uma considerável e constante síntese e modificação de proteínas; além disso, possuem cutículas com

poros que permitem a absorção das substâncias digeridas (STUDNICKA, 2003a; PŁACHNO; KOZIERADZKA-KISZKURNO; SWIATEK, 2007; PŁACHNO et al., 2008). Adicionalmente, a morte da presa provavelmente deve ocorrer por anóxia no interior da ampola, já que neste espaço as concentrações de oxigênio são de zero ou próximo de zero (ADAMEC, 2003).

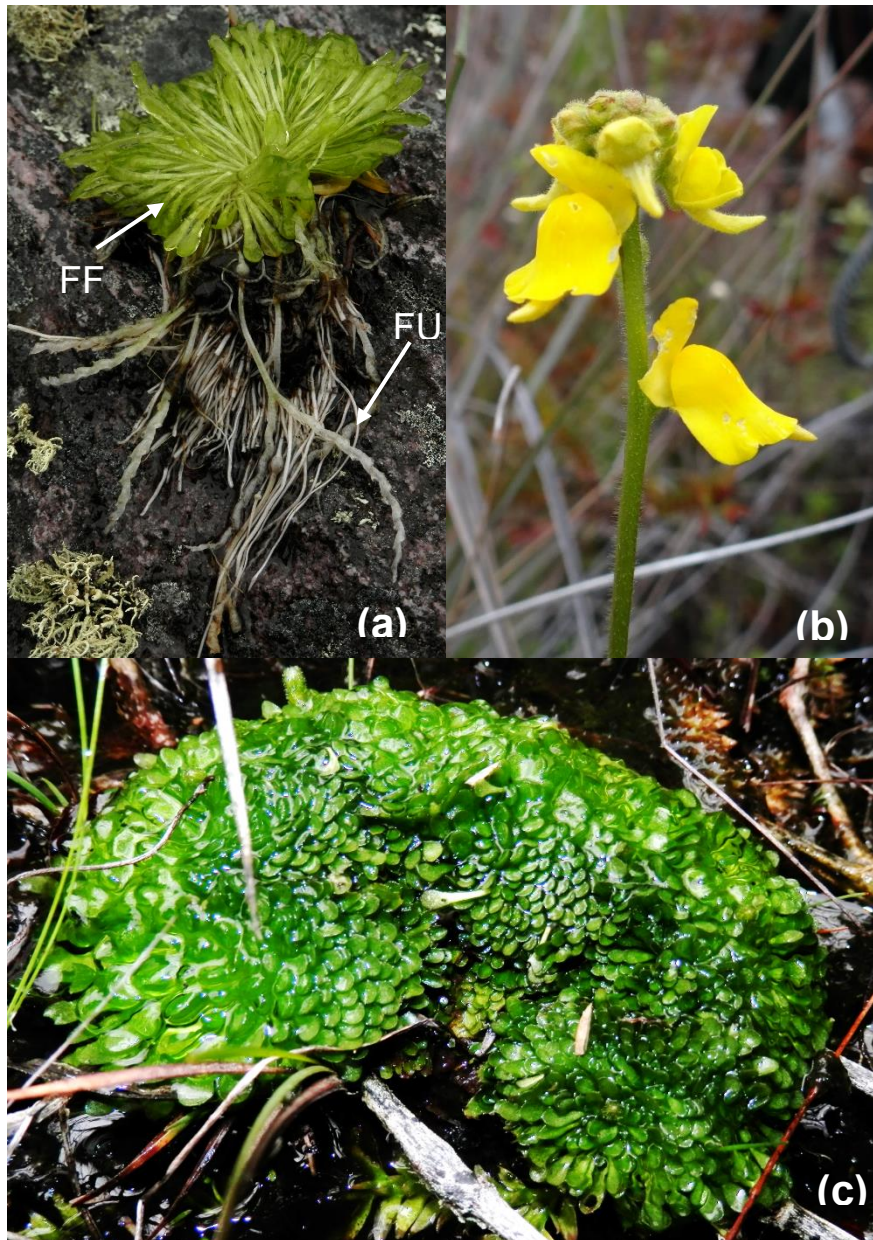


Figura 1.4. *Genlisea aurea* A.St.-Hil. **(a)** Folhas fotossintéticas (FF) e folhas utriculíferas (FU); **(b)** Inflorescência; **(c)** Folhas cobertas por mucilagem. (Créditos: LSV-UNESP).

O tipo de presa deve estar condicionado pela espécie de *Genlisea* e pelo ambiente que habita. Porém, observações em campo e em condições de laboratório sugerem que existe uma variedade de presas incluindo bactérias, protozoários, algas e microfauna, como nemátodos, rotíferos, anelídeos e pequenos artrópodes (BARTHLOTT et al., 1998; STUDNICKA, 2003b; PŁACHNO et al., 2005, 2008; CARAVIERI et al., 2014). O mecanismo de atração e captura ainda não é bem conhecido; existem hipóteses que sugerem que as armadilhas teriam mecanismos de atração quimiotática e de transporte ativo semelhante aos utrículos de suas espécies irmãs do gênero *Utricularia* (DARWIN, 1875; BARTHLOTT et al., 1998; STUDNICKA, 2003a). Entretanto, alguns estudos indicam que o processo de captura de presas é passivo, as presas são atraídas pelas características da superfície interna dos braços e a presença de oxigênio no interior das folhas utriculíferas (PŁACHNO et al., 2008). Assim, num ambiente aquático ou semiaquático, onde há pouca disponibilidade de oxigênio para organismos aeróbios ou anaeróbios facultativos, a acumulação deste gás dentro de espaços da armadilha simula os espaços aeríferos do solo, assim as presas seriam atraídas em busca da vital molécula (ADAMEC, 2003, 2007; STUDNICKA, 2003a; PŁACHNO et al., 2008). Além disso, têm sido observadas comunidades de comensais como protozoários, algas e artrópodes associados às armadilhas, que poderiam ter alguma função de atração das presas de *Genlisea* (JUNIPER; ROBINS; JOEL, 1989; ADAMEC, 2007; PŁACHNO et al., 2008; PŁACHNO; WOŁOWSKI, 2008).

As flores são andróginas, zigomorfas, amarelas, brancas ou violáceas com androceu formado por dois estames aderidos à corola (Figura 1.4; FROMM-TRINTA, 1979). O pólen é pouco conhecido, Erdtman em 1952 descreve que podem ser isopolares, tricolpados ou tetracolpados dependendo da espécie (FROMM-TRINTA, 1979).

Dentro do gênero *Genlisea* podem se classificar dois subgêneros: *Tayloria* e *Genlisea* (FROMM-TRINTA, 1979). Além da deiscência longitudinal do fruto descrita por Fromm-Trinta (1979), as espécies do subgênero *Tayloria* são diferenciadas do subgênero *Genlisea* pelas flores lilases, lavandas ou brancas, com um cálcio geralmente menor e divergente a partir do lábio inferior e paralelo ao pedicelo (FLEISCHMANN et al., 2010, 2011).

Genlisea subgênero *Genlisea* está dividido em três seções: a seção neotropical *Genlisea* e as seções africanas *Recurvatae* A.Fleischm., Kai Müell., Barthlott & Eb.Fisch e *Africanae* A.Fleischm., Kai Muell., Barthlott & Eb.Fisch (FLEISCHMANN, 2012). A seção *Genlisea* está formada por 12 espécies das quais nove ocorrem no Brasil e delas duas são endêmicas (FLEISCHMANN, 2012; MIRANDA et al., 2015), as outras três são endêmicas da Venezuela (FLEISCHMANN, 2012). As espécies do gênero presentes no Brasil são *G. aurea* A.St.-Hil., *G. filiformis* A.St.-Hil., *G. guianensis* N.E.Br., *G. nigrocaulis* J.A.Steyerm., *G. oxycentron* P.Taylor, *G. pygmaea* A.St.-Hil., *G. repens* Benj., *G. roraimensis* N.E.Br. e *G. tuberosa* Rivadavia, Gonella & A.Fleischm. (MIRANDA et al., 2015). *Genlisea aurea* A.St.-Hil. (Figura 1.4) é a espécie tipo do subgênero *Genlisea*, é endêmica do Brasil e encontra-se distribuída na região centro e sul do país (FROMM-TRINTA, 1979; FLEISCHMANN, 2012; MIRANDA et al., 2015).

O subgênero *Tayloria* é endêmico ao Brasil e atualmente se reconhecem oito espécies: *G. violacea* A.St.-Hil., *G. uncinata* P.Taylor & Fromm, *G. lobata* Fromm, *G. metallica* Rivadavia & A.Fleischm., *G. oligophylla* Rivadavia & A.Fleischm., *G. flexuosa* Rivadavia, A. Fleischm. & Gonella, *G. nebulicula* Rivadavia, Gonella & A. Fleischm. e *G. exhibitionista* Rivadavia & A.Fleischm (MIRANDA et al., 2015). *G. violacea* (Figura 1.5) é a espécie tipo do subgênero *Tayloria* (FROMM-TRINTA, 1979) e está distribuída na região sudeste do Brasil (MIRANDA et al., 2015).

Genlisea violacea

Genlisea violacea A.St.-Hil. (Figura 1.5) é a espécie tipo do subgênero *Tayloria*, com porte de 25-30 cm de altura, pequenas folhas espatuladas, inflorescência em racemo 1-17 flores, escapo ereto, brácteas ovadas e pedicelos de 7-20 mm de comprimento. Têm cinco sépalas, oblongas, ovado-lanceoladas ou elípticas, corola bilabiada, violeta ou lilás, com marca amarela na giba do lábio inferior; lábio superior profundamente bilobado, e lábio inferior trilobado e calcarado (Figura 1.5). O cálcio é cilíndrico com ápice dilatado e menor que o lábio inferior. Têm estames com filetes curvados, ovário piloso e sementes prismáticas (FROMM-TRINTA, 1979). Esta espécie, endêmica ao Brasil, distribui-se no Cerrado e na Mata Atlântica, dos estados

de Espírito Santo, Minas Gerais e São Paulo (MIRANDA et al., 2015). *G. violacea* é diploide e tem um dos maiores genomas da família (133 Mpb, $2n \sim 16$; (GREILHUBER et al., 2006; LEUSHKIN et al., 2013b; FLEISCHMANN et al., 2014).

Ocorre em solos arenosos quartzíticos ou rochosos e em paredões, em locais sazonalmente úmidos com água corrente e uma fina camada de matéria orgânica (FLEISCHMANN, 2012).



Figura 1.5. *Genlisea violacea* A.St.-Hil. **(a)** Plantas de duas localidades em Furnas, MG; **(b)** Flor de uma população da Serra da Canastra, MG; **(c)** Roseta com folhas fotossintéticas e folhas utriculíferas (Créditos: LSV-UNESP).

Genlisea aurea

Genlisea aurea A.St.-Hil. (Figura 1.4) é a espécie tipo do subgênero *Genlisea*, caracterizada por ter atraentes flores amarelas ouro. São plantas entre 9-41cm de altura, folhas espatuladas e densamente rosuladas. As inflorescências têm entre 1-14 flores amarelas, com brácteas basifixas no escapo e pedicelos eretos de 2-25mm. A corola é pilosa com lábio superior inteiro, lábio inferior trilobado e com cálcio cilíndrico e cônico. Os estames possuem filetes encurvados, ovário hirsuto e sementes piramidais (FROMM-TRINTA, 1979; FLEISCHMANN, 2012).

Esta espécie endêmica do Brasil distribui-se no Cerrado e na Mata Atlântica, dos estados de Bahia, Espírito Santo, Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais, Paraná Rio de Janeiro, Santa Catarina, São Paulo e Tocantins (MIRANDA et al., 2015).

Genlisea aurea é diploide ($2n = \sim 52$) e tem o segundo menor genoma conhecido em plantas, de 64 Mpb, e este tamanho apresenta variação entre populações (GREILHUBER et al., 2006; LEUSHKIN et al., 2013a; FLEISCHMANN et al., 2014).

Microssatélites

A variabilidade genética pode ser determinada através de marcadores moleculares. Os marcadores de DNA são os mais empregados atualmente, e consistem em sequências específicas que se encontram distribuídas no genoma, que podem ser codificantes ou não, e que podem ser diferentes entre indivíduos, espécies ou outros táxons (AVISE, 2004).

Os DNAs satélite são sequências repetidas em tandem geralmente associadas com a heterocromatina (SKINER; BONNEWELL; FOWLER, 1983) e que variam em tamanho. Segundo o tamanho os mais conhecidos são os minissatélites que podem ser de uns 1,5 Kb, e os microssatélites que podem chegar a ser umas 50 repetições de sequências curtas (LI et al., 2002).

Os STRs (*Short Tandem Repeat*), SSR (*Simple Sequence Repeat*) ou microssatélites, são segmentos de DNA formados por pequenas sequências

nucleotídicas, repetidas em tandem, que encontram-se distribuídas em genomas e apresentam alto nível de polimorfismo (Figura 1.6; CHISTIakov; HELLEMANS; VOLCKAERT, 2006; GUICHoux et al., 2011). A maioria dos microssatélites são neutros, ou seja, não são afetados pela seleção, se localizam em regiões não codificantes e não têm efeitos epistáticos (ELLEGREN, 2004). Eles são uns dos marcadores mais empregados (GUICHoux et al., 2011), são muito práticos e informativos porque são pequenos, codominantes (pode-se distinguir os homozigotos dos heterozigotos) e a detecção está baseada em PCR e eletroforese (AZOFEIFA-DELGADO, 2006; CHISTIakov; HELLEMANS; VOLCKAERT, 2006; GUICHoux et al., 2011).

Os microssatélites foram descobertos nos anos 80 do século passado, ao identificar sequências repetidas, polimórficas e de herança mendeliana no genoma humano (NAKAMURA et al., 1987; LITT; LUTY, 1989) e depois foram identificados em várias pesquisas em plantas, fungos e animais (DROR et al., 1995; ELLEGREN, 2004).

As sequências SSR encontram-se em todos os organismos vivos (com padrões característicos em cada grupo taxonômico), e no caso dos eucariontes se distribuem no genoma nuclear, mitocondrial ou cloroplastidial (ELLEGREN, 2004). Portanto, são bons para analisar diversidade e ancestralidades em espécies silvestres e de importância econômica. O alto polimorfismo deve-se às altas taxas de mutação destas regiões, principalmente pelos erros de replicação por deslizamento da DNA polimerase (AVISE, 2004).

Ainda quando os microssatélites são uma excelente ferramenta para analisar a biodiversidade, a identificação e desenvolvimento, precisa de extensos e custosos protocolos de prospecção *in vitro* no genoma ou em sequências expressas (GUICHoux et al., 2011; ABDUL-MUNEER, 2014). Tradicionalmente consiste na construção de bibliotecas de enriquecimento de sequências em tandem (BILLOTTE et al., 1999) ou bibliotecas de EST (PASHLEY, 2006); seguido do *screening* de clones procurando sequências repetidas, o sequenciamento e desenho de *primers* sobre sequências flanqueantes (AVISE, 2004). Se são conhecidos SSR em espécies relacionada e se essas regiões são conservadas, é possível que sejam transferíveis.

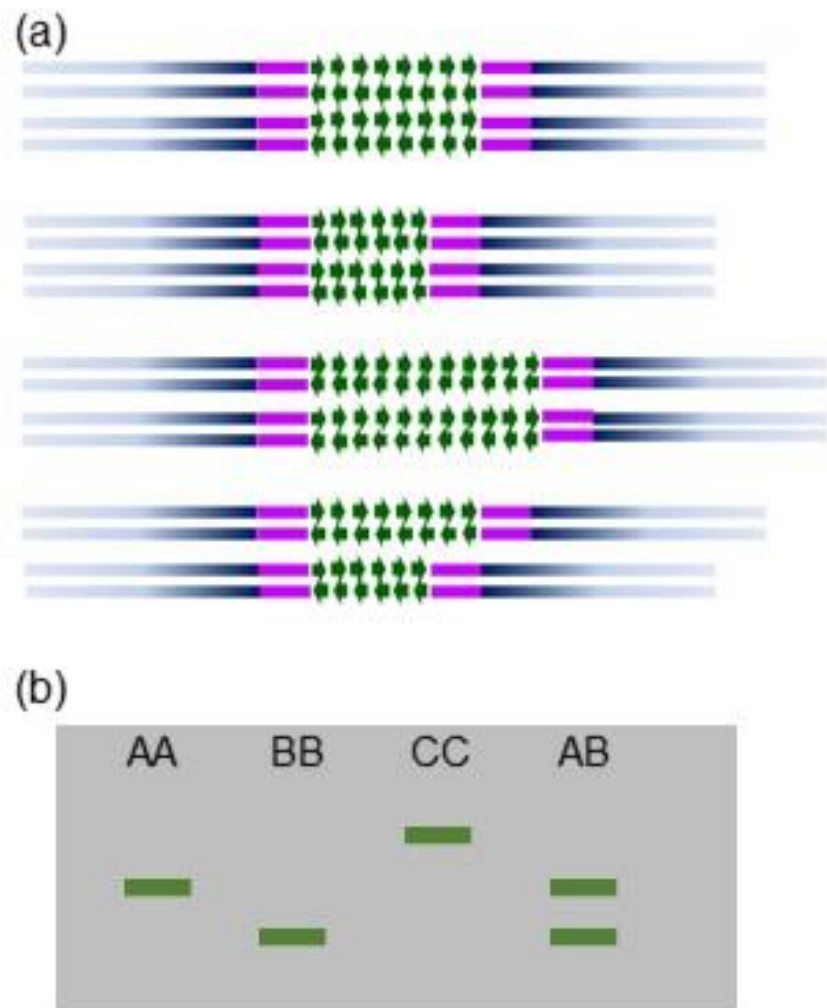


Figura 1.1. Microssatélites. **(a)** Representação hipotética de um mesmo *locus* SSR para 4 indivíduos diploides diferentes e algumas variações alélicas. As setas verdes representam os elementos repetitivos. **(b)** Genotipagem em gel dos quatro indivíduos representados. As bandas verdes representam os alelos A, B e C, que possuem comprimentos diferentes por terem números de repetições diferentes.

Adicionalmente, com o sucesso da genômica e o sequenciamento de última geração (*Next Generation Sequencing*, NGS), os dados dos genomas disponibilizam informação para o desenvolvimento de estudos populacionais (MILLER et al., 2013). Existem diferentes tipos de sequenciamento por NGS; o *pair-end* é muito empregado (GUICHOUX et al., 2011; MILLER et al., 2013). Com a busca *in silico* de marcadores nos dados genômicos, é possível diminuir o tempo e os custos no desenvolvimento de microssatélites.

Referências

- ABDUL-MUNEER, P. M. Application of Microsatellite Markers in Conservation Genetics and Fisheries Management: Recent Advances in Population Structure Analysis and Conservation Strategies. **Genetics Research International**, v. 2014, n. 6, p. 1–11, 2014.
- ADAMEC, L. Zero water flows in *Genlisea*. **Carnivorous Plant Newsletter**, p. 46–48, 2003.
- ADAMEC, L. Oxygen concentrations inside the traps of the carnivorous plants *Utricularia* and *Genlisea* (Lentibulariaceae). **Annals of botany**, v. 100, n. 4, p. 849–56, out. 2007.
- ADAMEC, L. By which mechanism does prey capture enhance plant growth in aquatic carnivorous plants: Stimulation of shoot apex? **Fundamental and Applied Limnology / Archiv für Hydrobiologie**, v. 178, n. 2, p. 171–176, 1 jan. 2011.
- ALBERT, V.; JOBSON, R. W.; MICHAEL, T. P.; TAYLOR, D. J. The carnivorous bladderwort (*Utricularia*, Lentibulariaceae): a system inflates. **Journal of experimental botany**, v. 61, n. 1, p. 5–9, jan. 2010.
- ALBERT, V.; WILLIAMS, S.; CHASE, M. Carnivorous plants: phylogeny and structural evolution. **Science**, v. 257, n. 5076, p. 1491–1495, 1992.
- 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**, v. 181, n. 1, p. 1–20, maio 2016.
- AVISE, J. C. **Molecular markers, natural history and evolution**. 2. ed. Sunderland-Massachusetts.: Sinauer Associates, 2004.
- AZOFEIFA-DELGADO, Á. Uso de marcadores moleculares en plantas ; aplicaciones en frutales el trópico. **Agronomía Mesoamericana**, v. 17, n. 2, p. 221–241, 2006.
- BARTHLOTT, W.; POREMBSKI, S.; FISCHER, E.; GEMMEL, B. First protozoa-trapping plant found. **Nature**, v. 392, n. 6675, p. 447–447, abr. 1998.

BEMM, F.; BECKER, D.; LARISCH, C.; KREUZER, I.; ESCALANTE-PEREZ, M.; SCHULZE, W. X.; ANKENBRAND, M.; WEYER, A. Van De; KROL, E.; AL-RASHEID, K. A.; MITHÖFER, A.; WEBER, A. P.; SCHULTZ, J.; HEDRICH, R. Venus flytrap carnivorous lifestyle builds on herbivore defense strategies. **Genome Research**, p. 1–14, 2016.

BFG; FORZZA, R. C.; GRACINEIDE, S. S.; RAFAEL, F.; FLÁVIO, M.; MARIA, C. E.; ANDRÉ, M.; IVANILZA, M.; REGINA, H. P.; ELISETE, A.; LIDYANNE, Y. S.; FILHO, A.; JOÃO, L. M.; ANDREA, O.; ARICLENES, A. M.; MARÍA, M.; MARTA, C.; VIVIAN, A.; LUCAS, A. V.; MICHEL, J. F.; JOSÉ, F. A.; LUIS, C.; PAUL, E.; RAFAEL, A. X.; ROSELI, L. C.; CLÁUDIA, P.; JAMES, L.; MARIA, R. C.; RICARDO, S.; DOUGLAS, C.; STEFANO, D.; RODRIGO, D.; JULIE, H. A.; VALQUÍRIA, F. Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. v. 66, n. 4, 2015.

BILLOTTE, N.; LAGODA, P. J. L.; RISTERUCCI, A. M.; BAURENS, F. C. Microsatellite-Enriched Libraries : Applied Methodology for the Development of SSR Markers in Tropical Crops. **Fruits**, v. 54, n. 4, p. 277–288, 1999.

BÖHM, J.; SCHERZER, S.; KROL, E.; KREUZER, I.; VON MEYER, K.; LOREY, C.; MUELLER, T. D.; SHABALA, L.; MONTE, I.; SOLANO, R.; AL-RASHEID, K. A. S.; RENNENBERG, H.; SHABALA, S.; NEHER, E.; HEDRICH, R. The Venus Flytrap *Dionaea muscipula* Counts Prey-Induced Action Potentials to Induce Sodium Uptake. **Current Biology**, v. 26, n. 3, p. 286–295, fev. 2016.

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

CASPER, S. J. Monographie der Gattung *Pinguicula* L. **Bibliotheca Botanica**, v. 127/128, p. 1–209., 1966.

CHISTIYAKOV, D. A.; HELLEMANS, B.; VOLCKAERT, F. A. M. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. **Aquaculture**, v. 255, n. 1-4, p. 1–29, 2006.

CIESLAK, T.; POLEPALLI, J. S.; WHITE, A.; MULLER, K.; BORSCH, T.; BARTHLOTT, W.; STEIGER, J.; MARCHANT, A.; LEGENDRE, L. Phylogenetic analysis of *Pinguicula* (Lentibulariaceae): chloroplast DNA sequences and morphology support several geographically distinct radiations. **American Journal of Botany**, v. 92, n. 10, p. 1723–1736, 1 out. 2005.

DARWIN, C. R. **Insectivorous plants**. [s.l.: s.n.]

DOMÍNGUEZ, Y. Relocalización de *Genlisea filiformis* en la Isla de la Juventud. v. 6, n. 4, 2012.

DROR, S.; AVITAL, A.; MHAMEED, S.; LAVI, U. DNA fingerprints in plants using simple-sequence repeat and minisatellite probes. **Hortscience**, v. 30, n. 1, p. 109–112, 1995.

ELLEGREN, H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. **Nature Reviews Genetics**, v. 5, n. 6, p. 435–445, jun. 2004.

FINERAN, B. A. **Glandular trichomes in *Utricularia*: A review of their structure and function** Israel Journal of Botany, 1985. .

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

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

FLEISCHMANN, A.; MICHAEL, T. P.; RIVADAVIA, F.; SOUSA, A.; WANG, W.; TEMSCH, E. M.; GREILHUBER, J.; MULLER, K. F.; HEUBL, G. Evolution of genome size and chromosome number in the carnivorous plant genus *Genlisea* (Lentibulariaceae), with a new estimate of the minimum genome size in angiosperms. **Annals of Botany**, v. 114, n. 8, p. 1651–1663, 1 dez. 2014.

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

FLEISCHMANN, A.; SCHÄFERHOFF, B.; HEUBL, G.; RIVADAVIA, F.; BARTHLOTT, W.; MÜLLER, K. F. Phylogenetics and character evolution in the carnivorous plant genus *Genlisea* A. St.-Hil. (Lentibulariaceae). **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 56, n. 2, p. 768–83, ago. 2010.

FLEISCHMANN, A.; STAATSSAMMLUNG, B.; MENZINGER, M. Taxonomic *Utricularia* news. **Carnivorous Plant Newsletter**, v. 44, n. March, p. 2013–2016, 2015.

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

GIVNISH, T. J. New evidence on the origin of carnivorous plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 1, p. 10–11, 2015.

GREILHUBER, J.; BORSCH, T.; MÜLLER, K.; WORBERG, A.; POREMBSKI, S.; BARTHLOTT, W. Smallest Angiosperm Genomes Found in Lentibulariaceae, with Chromosomes of Bacterial Size. **Plant Biology**, v. 8, n. 6, p. 770–777, nov. 2006.

GROB, V.; PFEIFER, E.; RUTISHAUSER, R. Sympodial construction of Fibonacci-type leaf rosettes in *Pinguicula moranensis* (Lentibulariaceae). **Annals of botany**, v. 100, n. 4, p. 857–63, out. 2007.

GUICHOUX, E.; LAGACHE, L.; WAGNER, S.; CHAUMEIL, P.; LÉGER, P.; LEPAIS, O.; LEPOITTEVIN, C.; MALAUSA, T.; REVARDEL, E.; SALIN, F.; PETIT, R. J. Current trends in microsatellite genotyping. **Molecular Ecology Resources**, v. 11, n. 4, p. 591–611, 2011.

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

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

JOBSON, R. W.; NIELSEN, R.; LAAKKONEN, L.; WIKSTRÖM, M.; ALBERT, V. a. Adaptive evolution of cytochrome c oxidase: Infrastructure for a carnivorous plant

radiation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 52, p. 18064–8, 28 dez. 2004.

JOYEUX, M.; VINCENT, O.; MARMOTTANT, P. Mechanical model of the ultrafast underwater trap of *Utricularia*. **Physical Review E - Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics**, v. 83, n. 2, p. 1–12, 2011.

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

KRÓL, E.; PŁACHNO, B. J.; ADAMEC, L.; STOLARZ, M.; DZIUBIŃSKA, 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, jan. 2012.

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

LEUSHKIN, E. V; SUTORMIN, R. a; NABIEVA, E. R.; PENIN, A. a; KONDRASHOV, A. S.; LOGACHEVA, M. D. The miniature genome of a carnivorous plant *Genlisea aurea* contains a low number of genes and short non-coding sequences. **BMC genomics**, v. 14, n. 1, p. 476, jan. 2013a.

LEUSHKIN, E. V; SUTORMIN, R. A.; NABIEVA, E. R.; PENIN, A. A.; KONDRASHOV, A. S.; LOGACHEVA, M. D. The miniature genome of a carnivorous plant *Genlisea aurea* contains a low number of genes and short non-coding sequences. **BMC Genomics**, v. 14, n. 1, p. 476, 2013b.

LI, Y. C.; KOROL, A. B.; FAHIMA, T.; BEILES, A.; NEVO, E. Microsatellites: Genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: A review. **Molecular Ecology**, v. 11, n. 12, p. 2453–2465, 2002.

LITT, M.; LUTY, J. A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal Human Genetics**, v. 44, n. 3, p. 397–401, 1989.

LLOYD, F. E. **The carnivorous plants**. New York: Dover Publications, Inc., 1976.

MCPHERSON, S. **Carnivorous plants and their habitats**. Poole, Dorset, England: Redfern Historia Natural Productions Ltd., 2010.

MILLER, M. P.; KNAUS, B. J.; MULLINS, T. D.; HAIG, S. M. SSR_pipeline: A Bioinformatic Infrastructure for Identifying Microsatellites From Paired-End Illumina High-Throughput DNA Sequencing Data. **Journal of Heredity**, v. 104, n. 6, p. 881–885, 2013.

MIRANDA, V. F. O.; MENEZES, C. G.; SILVA, S. R.; DÍAZ, Y. C. A.; RIVADAVIA. **Lentibulariaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/FichaPublicaTaxonUC/FichaPublicaTaxonUC.do?id=FB146>>. Acesso em: 1 jan. 2016.

MIRANDA, V. F. O.; SAJO, M. das G. Aspectos morfo-anatômicos de três espécies de *Drosera*, durante o desenvolvimento pós-seminal. **Acta Botanica Brasilica**, v. 14, n. 2, p. 185–195, 2000.

MULLER, K.; BORSCH, T.; LEGENDRE, L.; POREMBSKI, S.; THEISEN, I.; BARTHLOTT, W. Evolution of carnivory in the Lentibulariaceae: considerations based on molecular, morphological, and physiological evidence. In: Proceedings 4th International Carnivorous Plant Conference, Tokyo. **Anais...** Tokyo: 2002.

MÜLLER, K.; BORSCH, T.; LEGENDRE, L.; POREMBSKI, S.; THEISEN, I.; BARTHLOTT, W. Evolution of carnivory in Lentibulariaceae and the Lamiales. **Plant biology (Stuttgart, Germany)**, v. 6, n. 4, p. 477–90, jul. 2004.

MÜLLER, K. F.; BORSCH, T.; LEGENDRE, L.; POREMBSKI, S.; BARTHLOTT, W. Recent progress in understanding the evolution of carnivorous Lentibulariaceae (Lamiales). **Plant biology (Stuttgart, Germany)**, v. 8, n. 6, p. 748–57, nov. 2006.

NAKAMURA, Y.; LEPPERT, M.; O'CONNELL, P.; WOLFF, R.; HOLM, T.; CULVER, M.; MARTIN, C.; FUJIMOTO, E.; HOFF, M.; KUMLIN, E.; ET, A. Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. **Science**, v. 235, n. 4796, p. 1616–1622, 27 mar. 1987.

PASHLEY, C. H. EST Databases as a Source for Molecular Markers: Lessons from

Helianthus. **Journal of Heredity**, v. 97, n. 4, p. 381–388, 22 jun. 2006.

PŁACHNO, B. A. J. P.; ISZKURNO, M. A. K. O.-K.; WIĄTEK, P. I. Ś.; ARNOWSKI, D. O. W. D. Prey Attraction In Carnivorous *Genlisea* (Lentibulariaceae). v. 50, n. 2, p. 87–94, 2008.

PŁACHNO, B. J.; ADAMUS, K.; FABER, J.; KOZŁOWSKI, J. Feeding behaviour of carnivorous *Genlisea* plants in the laboratory. **Acta Botanica Gallica**, v. 152, p. 159–164, 2005.

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

PŁACHNO, B.; WOŁOWSKI, K. Algae commensal community in *Genlisea* traps. **Acta Societatis Botanicorum Poloniae**, v. 77, n. 1, p. 77–86, 2008.

POPPINGA, S.; WEISSKOPF, C.; WESTERMEIER, A. S.; MASSELTHER, T.; SPECK, T. Fastest predators in plant kingdom: Functional morphology and biomechanics of suction traps found in the largest genus of carnivorous plants. **AoB Plants**, p. plv140, 2015.

REFULIO-RODRIGUEZ, N. F.; OLMSTEAD, R. G. Phylogeny of Lamiidae. **American Journal of Botany**, v. 101, n. 2, p. 287–299, 2014.

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

RUTISHAUSER, R. The developmental plasticity of *Utricularia aurea* (Lentibulariaceae) and its floats. **Aquatic Botany**, v. 45, n. 2-3, p. 119–143, 1993.

RUTISHAUSER, R. Polymerous Leaf Whorls in Vascular Plants: Developmental Morphology and Fuzziness of Organ Identities. **International Journal of Plant Sciences**, v. 160, n. S6, p. S81–S103, 1999.

RUTISHAUSER, R. Developmental Genetics and Morphological Evolution of

Flowering Plants, Especially Bladderworts (*Utricularia*): Fuzzy Arberian Morphology Complements Classical Morphology. **Annals of Botany**, v. 88, n. 6, p. 1173–1202, 2001.

RUTISHAUSER, R. Evolution of unusual morphologies in Lentibulariaceae (bladderworts and allies) and Podostemaceae (river-weeds): a pictorial report at the interface of developmental biology and morphological diversification. **Annals of Botany**, v. 117, n. 5, p. 811–832, 2015.

RUTISHAUSER, R. Evolution of unusual morphologies in Lentibulariaceae (bladderworts and allies) and Podostemaceae (river-weeds): a pictorial report at the interface of developmental biology and morphological diversification. **Annals of Botany**, v. 117, n. 5, p. 811–832, abr. 2016.

RUTISHAUSER, R.; ISLER, B. Developmental Genetics and Morphological Evolution of Flowering Plants, Especially Bladderworts (*Utricularia*): Fuzzy Arberian Morphology Complements Classical Morphology. **Annals of Botany**, v. 88, n. 6, p. 1173–1202, dez. 2001.

RUTISHAUSER, R.; MOLINE, P. Evo-devo and the search for homology (“sameness”) in biological systems. **Theory in Biosciences**, v. 124, n. 2, p. 213–241, 2005.

SATTLER, R. Homology—A Continuing Challenge. **Systematic Botany**, v. 9, n. 4, p. 382–394, 1984.

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, 2010.

SHIRAKAWA, J.; NAGANO, K.; HOSHI, Y. Polyploid Genome Structure of *Drosera spatulata* Complex (Droseraceae). **The Japan Mendel Society**, v. 77, n. 1, p. 97–106, 2012.

SIROVÁ, D.; BOROVEC, J.; PICEK, T.; ADAMEC, L.; NEDBALOVÁ, L.; VRBA, J. Ecological implications of organic carbon dynamics in the traps of aquatic carnivorous

Utricularia plants. **Functional Plant Biology**, v. 38, n. 7, p. 583, 2011.

SKINER, D. M.; BONNEWELL, V.; FOWLER, R. F. Sites of Divergence in the Sequence of a Complex Satellite DNA and Several Cloned Variants. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 47, p. 1151–1157, 1 jan. 1983.

STUDNICKA, M. Observations on life strategies of *Genlisea*, *Heliamphora*.pdf. **Carnivorous Plant Newsletter**, v. 32, p. 57–61, 2003a.

STUDNICKA, M. *Genlisea* traps: a new piece of knowledge. **Carnivorous Plant Newsletter**, v. 32, p. 36–39, 2003b.

TAYLOR, P. **The genus *Utricularia* – a taxonomic monograph**. Kew Bulletin ed. Key, London: Royal Botanic Gardens, 1989.

TAYLOR, P. The genus *Genlisea*. **Carnivorous Plant Newsletter**, v. 20, p. 20–26, 1991.

VELEBA, A.; BURE, P.; ADAMEC, L.; MARDÁ, P.; LIPNEROV, I.; HOROV, L. Genome size and genomic GC content evolution in the miniature genome-sized family Lentibulariaceae. **New Phytologist**, v. 203, n. 1, p. 22–28, 2014.

VINCENT, O.; MARMOTTANT, P. Carnivorous *Utricularia*: the buckling scenario. **Plant signaling & behavior**, v. 6, n. 11, p. 1752–4, nov. 2011.

VU, G. T. H.; SCHMUTZER, T.; BULL, F.; CAO, H. X.; FUCHS, J.; TRAN, T. D.; JOVTCHEV, G.; PISTRICK, K.; STEIN, N.; PECINKA, A.; NEUMANN, P.; NOVAK, P.; MACAS, J.; DEAR, P. H.; BLATTNER, F. R.; SCHOLZ, U.; SCHUBERT, I. Comparative Genome Analysis Reveals Divergent Genome Size Evolution in a Carnivorous Plant Genus. **The Plant Genome**, v. 0, n. 0, p. 0, 2015.

YILDIRIM, H.; ENOL, S. G.; RHAN, A. F. P. *Pinguicula habilli* (Lentibulariaceae), a new carnivorous species from South-West Anatolia, Turkey. **Phytotaxa**, v. 58, p. 46–58, 2012.

CAPÍTULO II - Biologia reprodutiva de *Genlisea violacea* A.St.-Hil.

Resumo

A biologia reprodutiva das espécies da família Lentibulariaceae tem sido pouco estudada, e dentre os três gêneros, *Genlisea* é o menos conhecido. *Genlisea violacea* é uma planta carnívora endêmica do Brasil, que habita algumas regiões serranas do cerrado dos estados de Minas Gerais e São Paulo. Neste trabalho se estudaram alguns aspectos da biologia reprodutiva de duas populações de *G. violacea* no PARNA Serra da Canastra e na região de Furnas. Nas populações estudadas as flores têm receptividade estigmática durante todo o tempo de vida que garante o sucesso reprodutivo, porém a viabilidade polínica diminui limitando temporalmente a autopolinização. Também se observou uma variabilidade fenotípica que poderia estar relacionada aos polinizadores e por fatores abióticos como a radiação. Determinou-se que as flores são visitadas por algumas espécies de Diptera, Lepidoptera e Hymenoptera. Além disso, o comportamento no forrageio das flores, a relação morfométrica e a presença de pólen de *G. violacea* no corpo de abelhas dos gêneros *Lasioglossum* (Halictidae) e *Ceratina* (Apidae), evidenciam que sejam possíveis polinizadores de *G. violacea*. Também se observou muita atividade de visitação e pólen no corpo de moscas do gênero *Toxomerus* (Syrphidae). A distribuição restrita desta espécie e o estado de fragmentação de seus ecossistemas e o decaimento global de himenópteros indicam uma alta vulnerabilidade da espécie e a necessidade de medidas para sua conservação.

Palavras-chave: Cerrado, Lentibulariaceae, entomofilia, polinização, variabilidade fenotípica.

Introdução

Muitas espécies de plantas dependem de interações planta-animal na polinização e dispersão de frutos e sementes que garantem seu sucesso reprodutivo. Estima-se que 87,5% das angiospermas podem ser polinizadas por animais (OLLERTON; WINFREE; TARRANT, 2011), assim os polinizadores são fundamentais nas cadeias tróficas dos biomas (IMPERATRIZ-FONSECA et al., 2012), sendo papel importante no funcionamento dos ecossistemas. Além da sua importância em ecossistemas naturais, uma terceira parte dos cultivos do mundo depende da polinização por insetos (FAO, 2016), os quais são muito importantes em pelo menos 91 culturas diferentes (KLEIN et al., 2007). No Brasil 85 culturas se beneficiam de polinizadores (GIANNINI et al., 2015).

As abelhas nativas são polinizadores importantes em ecossistemas naturais e agrossistemas, porém mudanças no clima, o desmatamento, a poluição, o crescimento das zonas urbanas, o aumento das atividades agrícolas e o avanço de espécies invasoras e parasitas têm levado ao declínio as populações de himenópteros (POTTS et al., 2010; GIANNINI et al., 2012; MARTINS; GONÇALVES; MELO, 2013). Porém, ainda é pouco o que se conhece dos polinizadores, suas interações com as plantas e os ecossistemas, e sua vulnerabilidade, por isso são necessários mais esforços em pesquisas nesta área (KLEIN et al., 2007; IMPERATRIZ-FONSECA et al., 2012; GIANNINI et al., 2015).

O Brasil é um dos países megadiversos do planeta, onde convivem seis grandes biomas em terra firme, amazônia, caatinga, cerrado, mata atlântica, pantanal e pampa (KLINK; MACHADO, 2005; RYLANDS; BRANDON, 2000). Devido à grande diversidade e extensão territorial, ainda são muitas as espécies desconhecidas e os aspectos biológicos das espécies que ali convivem. Desses biomas o que tem chamado mais a atenção em termos de estudo e conservação é a Amazônia, assim outros biomas são menos conhecidos e mais afetados pelas atividades antrópicas. O cerrado é o segundo bioma mais extenso depois da Amazônia, e se caracteriza por serem savanas tropicais (KLINK; MACHADO, 2005) com uma ocorrência de 12.097 espécies de angiospermas das quais 31,5% são endêmicas (BFG et al., 2015). Contudo, o cerrado é um dos biomas mais frágeis devido à transformação do território

pelo desenvolvimento de atividades agrícolas, pecuárias e outras atividades humanas (KLINK; MACHADO, 2005) sendo reconhecido como um *hotspot* de conservação (MYERS et al., 2000). Num relatório feito pelo Ministério do Meio Ambiente no Brasil sobre o desmatamento do cerrado, estimou-se para o 2010 uma diminuição do 50,84% da mata nativa (MMA/IBAMA, 2011) e não existem dados oficiais e atuais. Porém, no ano 2000 foi estimado que só permanecem aproximadamente 20% da vegetação primária e que só 6,2% da área é protegida (MYERS et al., 2000).

Calcula-se que existe informação relacionada com a reprodução de só 3% das espécies de plantas do cerrado (MOTTA MAUÉS et al., 2012). Num bioma com tantos endemismos, a polinização por animais é muito importante (MOTTA MAUÉS et al., 2012) e, segundo os dados existentes, no cerrado predomina a polinização mediada por abelhas ou melitofilia (ISHARA; MAIMONI-RODELLA, 2011). Na melitofilia, o inseto estabelece uma relação com a flor, pela busca de recursos como pólen, néctar, óleos, resinas e perfumes (PINHEIRO et al., 2014). A síndrome da melitofilia está relacionada com antese diurna, cores amarelas, roxas e azuis, simetria floral bilateral com facilitação para o aterrisagem e sustentação, guias de néctar ou pólen, presença de néctar e órgãos sexuais ocultos, pequenas quantidades de néctar e muito concentrado, com poucos estames e muitos óvulos por ovário (FAEGRI; PIJL, 1979; RECH; DE ÁVILA; SCHLINDWEIN, 2014). Porém, as interações entre abelhas e flores melitofílicas é tão variada, que abelhas podem visitar e polinizar flores com outras síndromes, e flores melitofílicas podem ser polinizadas por outros tipos de insetos (PINHEIRO et al., 2014). Por outro lado, o sistema de polinização não-especializado de Diptera é semelhante à síndrome de pequenas abelhas e se caracteriza por serem flores pequenas, zigomorfas, abertas e com tubo floral (FAEGRI; PIJL, 1979; DE LIMA NADIA; MACHADO, 2014). Outra síndrome relacionada é a miofília de Diptera de probóscide longa, no qual as flores geralmente são zigomorfas de cores chamativas e tubo floral alongado (DE LIMA NADIA; MACHADO, 2014).

O gênero *Genlisea* junto a *Pinguicula* e *Utricularia* agrupam aproximadamente 360 espécies de plantas carnívoras, com muitas espécies terrestres, aquáticas e semiaquáticas, que constituem a família Lentibulariaceae (MÜLLER et al., 2004). Das aproximadamente 30 espécies de *Genlisea* conhecidas, 17 ocorrem no Brasil e 10 são

endêmicas (FLEISCHMANN, 2012; MIRANDA et al., 2015). O gênero está dividido em dois subgêneros *Genlisea* e *Tayloria* Fromm-Trinta. *Genlisea* subgênero *Tayloria* é endêmico do Brasil e atualmente se reconhecem oito espécies, entre elas *G. violacea* A.St.-Hil (FROMM-TRINTA, 1979; FLEISCHMANN et al., 2011). Esta espécie está distribuída no cerrado, nos estados de Minas Gerais e São Paulo, em ambientes úmidos, arenosos, com poucos nutrientes, ou sobre rochas úmidas. (FROMM-TRINTA, 1979; FLEISCHMANN et al., 2010; MIRANDA et al., 2015). *G. violacea* como outras espécies do gênero caracteriza-se por ser uma erva pequena, semiaquática, anual, que não possui raízes, com folhas modificadas não- fotossintéticas subterrâneas que lembram raízes, as quais funcionam como armadilhas (FROMM-TRINTA, 1979). Possuem inflorescências racemosas, flores zigomorfas, casmógamas, com a corolas roxas, bilabiadas calcaradas formada por cinco pétalas fusionadas (FROMM-TRINTA, 1979; FLEISCHMANN, 2012). O lábio superior resulta da fusão de duas pétalas e o lábio inferior de três pétalas, que pode ser evidenciado nos dois e três lóbulos respectivos; o lábio inferior é plano e estendido e na base forma um palato que oculta os órgãos sexuais e que abre acesso ao calcar que produz néctar através de tricomas secretores (FLEISCHMANN et al., 2011; FLEISCHMANN, 2012). O androceu é formado por dois estames aderidos à corola e o ovário está fusionado na parte basal à região centro-ventral do cálice é unilocular, têm numerosos óvulos e a placentação é central. O estigma é bilabiado e o lóbulo inferior é longo e cobre as anteras frente às abertura do cálice, o que poderia evitar a autopolinização (FLEISCHMANN, 2012). Na natureza as flores são alógamas mas tem se observado autopolinização em cultivo, indicando que o pólen não é autoincompatível (FLEISCHMANN et al., 2011; FLEISCHMANN, 2012). Este tipo de flores, bilabiadas, com calcar e oferta de néctar são polinizadas por abelhas (FAEGRI; PIJL, 1979; PINHEIRO et al., 2014).

Pouco se conhece sobre aspectos da biologia reprodutiva na família. Em espécies de *Utricularia* só existem alguns trabalhos sobre polinização das espécies brasileiras *U. reniformis* (CLIVATI et al., 2014) e *U. ametysthina* (MENEZES, 2015), e indianas *U. albocaerulea*, *U. purpurascens* e *U. reticulata* (HOBBHAHN; KÜCHMEISTER; POREMBSKI, 2006); e estes registraram como visitantes florais abelhas, borboletas, mariposas e dípteros, e algumas espécies de Hymenoptera são

os polinizadores efetivos. Além disso, as características fenológicas e reprodutivas do gênero *Genlisea* têm sido pouco estudadas. Até agora só foram registradas observações ao acaso de visitas de abelhas em algumas espécies de *Genlisea* (FLEISCHMANN, 2012); porém, desconsiderando o presente trabalho, não havia qualquer estudo sistemático da biologia reprodutiva, nem estudos em campo para descrever o forrageio de insetos visitantes e determinar quais são os polinizadores efetivos em *Genlisea*.

O sucesso reprodutivo é fundamental para o estabelecimento das populações, manter fluxo genético e a diversidade genética necessária para a conservação das espécies (FRANKHAM, 2005). As mudanças no clima e as atividades antrópicas podem comprometer a capacidade de adaptação das espécies (ALSOS et al., 2012) e o equilíbrio das comunidades de plantas e polinizadores que ocorrem nos ecossistemas (POTTS et al., 2010; GIANNINI et al., 2012; MARTINS; GONÇALVES; MELO, 2013). Portanto, as populações naturais no cerrado das Lentibulariaceae podem ser vulneráveis. Assim, entender a biologia reprodutiva das espécies é muito importante para seu manejo e conservação, assim como suas relações dentro do ecossistema. Neste sentido, o desconhecimento sobre a biologia reprodutiva da família Lentibulariaceae e mais especificamente sobre *Genlisea violacea* levou a que no presente trabalho fossem avaliadas e analisadas algumas das características reprodutivas e os padrões ecológicos de populações naturais de *G. violacea*.

Material e métodos

Local e material vegetal de estudo

O estudo de polinização foi realizado em duas populações de *G. violacea* localizadas na região sul de Minas Gerais no Parque Nacional da Serra da Canastra (sudeste do Brasil), em áreas do campo rupestre do Cerrado. A distância entre as populações é aproximadamente 49 Km (Figura 2.1). A primeira população (população 1) encontra-se na nascente do Rio São Francisco (20°14'31.81"S, 46°26'46.54"W) à

1367 m de altitude, no município São Roque de Minas (MG). A segunda população (população 2) encontra-se num afluente do lago de Furnas na Cachoeira Diquadinha ($20^{\circ}38'32.6''\text{S}$, $46^{\circ}15'49.0''\text{W}$) a 861 m de altitude, no município Capitólio (MG).

Nos locais foram realizadas as observações de visitas florais e tomadas algumas medições florais. Também foi coletado material vegetal em sílica gel e material testemunho que foi depositado no Herbário JABU da FCAV-UNESP. As coletas foram realizadas com autorizações do Sisbio N° 26938 e N° 43985, do Instituto Chico Mendes/MMA.

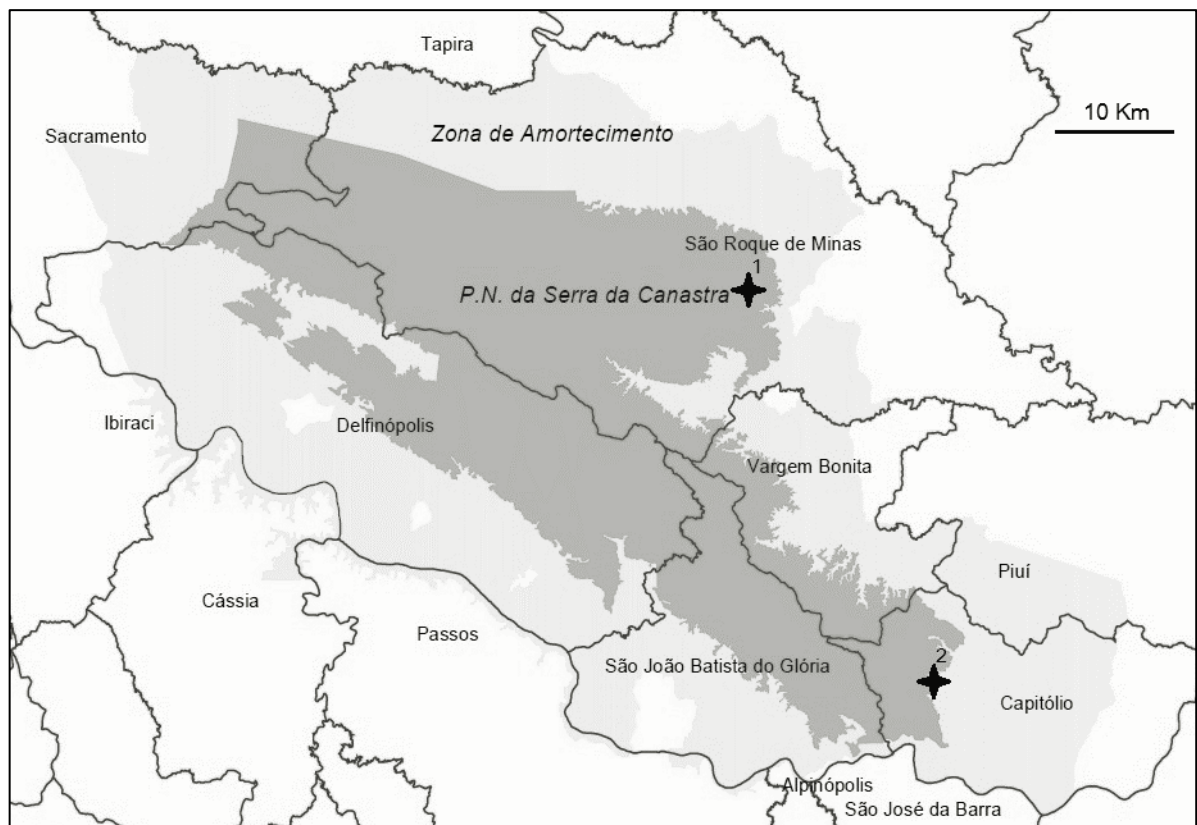


Figura 2.1. Parque Nacional da Serra da Canastra. ♦ Localidades das populações estudadas.

A população 1 se encontra no interior do PARNA Serra da Canastra num local com pouca atividade antrópica (existe apenas uma trilha pouco transitada a 140 m), num espaço aberto com solo úmido e rochoso, com vegetação tipicamente herbácea e arbustos. Nesse local foram observadas entre 201 e 260 flores abertas de *G. violacea*, segundo o período de observação (uma densidade de ~ 7 flores/m²).

A população 2 se localiza nos limites do mesmo PARNA, num local onde ocorrem atividades de lazer, a 200 m de uma estrada muito movimentada e a 500 m da Represa de Furnas. O espaço não recebe sol direto durante o dia todo, e está na beira do rio sobre as rochas úmidas, junto com musgos, ervas e gramíneas. O número de flores abertas variou entre 108 e 191 flores abertas de acordo com o período de observação (uma densidade de ~ 52 flores/m²).

Biologia floral

Os testes foram feitos com flores diferentes em condições naturais em campo, nas populações estudadas. Foi avaliada qualitativamente a receptividade estigmática em botões florais, flores recém-abertas e flores senescentes, empregando H₂O₂ a 3% (DAFNI, 1992) e com 10 réplicas de cada fase.

Foi também determinada a viabilidade polínica em micrósporos empregando dois protocolos baseados em coloração (DAFNI, 1992). A determinação da porcentagem de grãos abortados foi feita pelo método de coloração e Alexander (ALEXANDER, 1980) e a mensuração de atividade metabólica foi feita com 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio (TTC), que detecta atividade de desidrogenases respiratórias (ALEXANDER, 1980; DAFNI, 1992). Os testes foram realizados no início da antese, empregando as duas anteras de três flores diferentes às 0h, 3h, 12h, 24h e 48h. Posteriormente foram contados os grãos corados e não-corados por microscópio óptico.

O teor de néctar foi mesurado por determinação espectrométrica de carboidratos (HONDA et al., 1982). Para isso foram coletados os cálcares em microtubos de 200 µL de 10 flores isoladas de possíveis visitantes com tecido de filó, em três períodos (08h00, 12h00 e 20h00) no início da antese. No laboratório, foram abertos os cálcares para expor as glândulas nectaríferas e o néctar depositado, sendo

diluído numa solução aquosa com 2-cyanoacetamida e foram incubados em banho-maria por 10 minutos. Seguidamente, foi medida a absorbância a 276 nm e calculadas as concentrações de açúcares reduzidos. Além disso, foi realizada outra estimativa do conteúdo de néctar. Por tanto, no campo foram coletados e lavados com água mili-Q 25 cálcares excisados da corola, e no laboratório foram determinados os conteúdos de néctar por HPLC (MORRANT; SCHUMANN; PETIT, 2008). Foi empregado como controle solução de lavagem do restante da corola (sem cálcar). A separação por HPLC foi feita numa coluna de carboidrato e a amostra foi eluída em acetonitrilo:água:reactivo modificador de açúcar amina (127:23:0,1 v/v).

Sistema de reprodução

Foi feito teste no laboratório com indivíduos isolados com papel de envelopes de chá e foram mantidos em cultivo no laboratório durante três meses. Durante o tempo se observou o tempo de antese, o tempo de duração das flores abertas e a formação de frutos em flores isoladas. Também se fizeram testes por cruzamento manual, separando cinco grupos: (1) autopolinização manual; (2) autopolinização espontânea; (3) apomixia (agamospermia); (4) polinização cruzada manual; (5) polinização natural em campo (controle); (6) polinização cruzada manual entre morfotipos. Para isso, as polinizações foram feitas em flores no começo da antese, as polinizações manuais foram feitas com uma agulha, nos tratamentos 1, 3, 4 e 6, as plantas foram emasculadas tirando a corola e em todos os casos exceto o controle, as flores foram isoladas com saquinhos de chá.

Morfometria floral

No campo, foram selecionados 30 indivíduos com flores abertas em cada população, e com um paquímetro digital foram mesurados o comprimento e largura do lábio inferior da corola, a largura da abertura entre lábios da corola, comprimento do cálcar e comprimento da flor completa. Também, foram contados o número de indivíduos e frutos em cada planta. Os valores obtidos em cada população foram analisados por estatística descritiva e foi feito um teste de hipóteses para amostras com distribuição desconhecida (*t-Student*) entre as duas populações para cada

variável. Para analisar possíveis diferenças populacionais, foram realizadas comparações entre as 5 variáveis medidas: comprimento e largura do lábio inferior da corola, a largura da abertura entre lábios da corola, comprimento do cálcio e comprimento da flor completa (Figura 2.2). Devido à diferença observada entre os morfotipos da população 2, seguiu-se a seguinte abordagem: a) comparação das duas populações considerando na população 2 todos os morfotipos juntos como uma única população; b) comparação das populações de flores roxas das duas populações 1 e 2; c) comparação da morfologia dos três morfotipos da população 2. Nas análises realizaram-se dois tipos de teste: Análise de Coordenadas Principais (PCO) para avaliar o ordenamento e variação das amostras de cada população; e Análise Multivariada por Permutações (PERMANOVA) para detectar se existem diferenças significativas entre as amostras de flores avaliadas. Os PCO e PERMANOVA basearam-se numa matriz de similaridade com distâncias euclidianas, sendo que os PERMANOVA foram realizados com 9999 permutações e $\alpha=0,05$. Ambas análises foram conduzidas com o programa PRIMER 6 (ANDERSON, M.J.; GORLEY; CLARKE, 2008).



Figura 2.1. Medições da flor de *Genlisea violacea*. (CL) comprimento e (LL) largura do lábio inferior da corola, (A) largura da abertura entre lábios da corola, (CC) comprimento do cálcio e comprimento da flor completa (CF).

Visitas florais

Foram realizadas observações das visitas florais em períodos diurnos desde as 08h00 às 18h00, totalizando na primeira população (população 1) 173h de observação em três períodos no mês de fevereiro de 2012 e na segunda (população 2) 106h de observação em três períodos, junho e julho de 2015 e abril de 2016. Foram identificados os morfotipos visitantes florais e seu comportamento, frequência e duração de cada visita. Ademais, os visitantes foram fotografados e capturados para posteriormente serem encaminhados para a identificação.

Os insetos nos quais se observou pólen foram secados numa câmara de dessecação com sílica gel e metalizados com ouro para registro em microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM 5410), operado em 15 kV. Assim, usando como controle pólen retirado de anteras de *G. violacea*, foi determinada a identidade dos grãos de pólen presentes em cada inseto.

Dos insetos coletados foram mensurados os comprimentos e as larguras da cabeça e do corpo inteiro e em alguns casos a o comprimento da língua. Depois se compararam com as medidas das flores e dos insetos, porém o número baixo de insetos coletados não permitiu testar a correlação estatística.

Resultados

Biologia reprodutiva

As flores avaliadas apresentaram uma receptividade estigmática de 100% em botões e flores abertas, que reduziu à 80% em flores senescentes (queda de 20% de receptividade). Por outro lado, a viabilidade polínica não é completa ao início da antese devido ao aborto de grãos de pólen; e nos grãos viáveis a viabilidade diminui gradualmente ao decorrer o tempo, desde 80% até 39,76% (Figura 2.3).

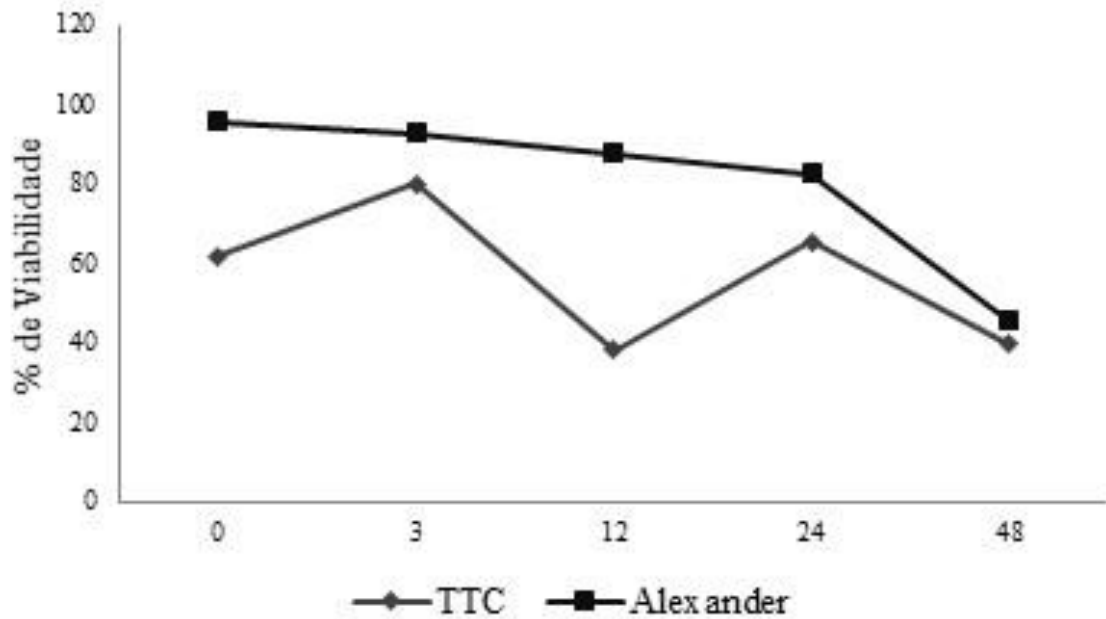


Figura 2.3. Viabilidade polínica avaliada por testes de TTC e Alexander. No eixo x tempo em horas desde o início da antese, no eixo y, porcentagem de viabilidade.

No caso da oferta de néctar não teve diferenças durante o dia durante o dia todo, a concentração de açúcares é $x = 24 \mu\text{g/mL} \pm 0,00009$ ($0,00072 \mu\text{g}$ de açúcares por flor de um total de 10 flores analisadas). Na determinação de néctar por HPLC, a concentração medida em só uma flor, foi muito baixa para a sensibilidade do equipamento (que detecta apenas $>30\text{mg/mL}$). Portanto, foi preciso juntar o conteúdo de 24 flores diferentes para a detecção. Assim determinou-se que nos controles (a flor inteira ou a corola sem cálcar), não possuem ou possuem pouco conteúdo de açúcares, e o cálcar contém néctar em forma de glicose (Figura 2.4). Ademais, o cálcar das flores roxas continham mais glicose que as flores brancas, $\sim 104 \mu\text{g/flor}$ e $\sim 25 \mu\text{g/flor}$ respetivamente (Figura 2.4)

Nas observações iniciais realizadas no laboratório, as anteses completas desde o início dos botões, pode durar ~ 20 dias e as flores abertas podem se manter por ~ 30 dias. Quando as flores se mantêm isoladas, $\sim 38\%$ das flores desenvolvem frutos sem a presença de polinizador.

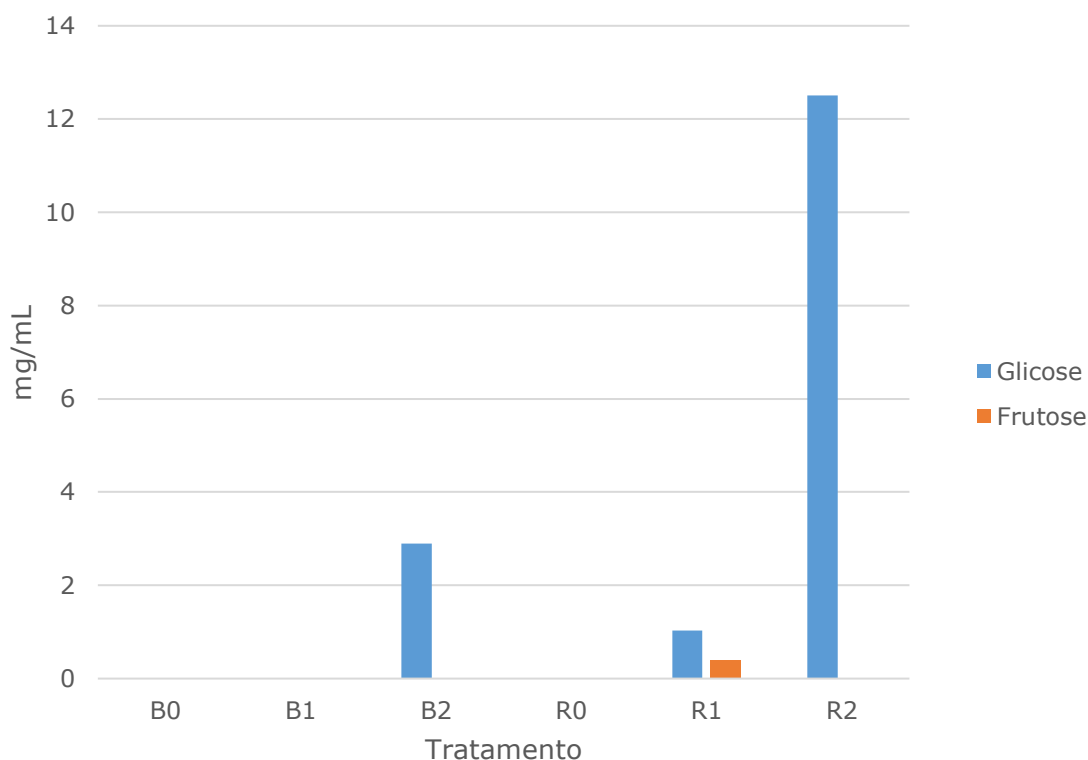


Figura 2.4. Concentrações de açúcares em flores de *Genlisea violacea* determinadas por HPLC. B0, flores brancas interas; B1, corola sem cálcar de flores brancas; B2, cálcar de flores brancas; R0, flores roxas interas; R1, corola sem cálcar de flores roxas; R2, cálcar de flores roxas.

Sistema de reprodução

Após 45 dias dos cruzamentos, tinham se desenvolvidos os ovários em frutos com sementes. Das flores autopolinizadas manualmente 29,41% formaram frutos, e das autopolizadas espontaneamente 5,20%. Nas flores emasculadas não polinizadas se observou que 5,80% das flores produziram frutos. No caso da polinização cruzada manual se observou que o 41,18% das flores formaram frutos, e esta mesma porcentagem se observou em cruzamentos entre o morfotipo de flores roxas azuladas e de flores brancas com roxo. O controle teve maior taxa de fertilização, com 87,45%

das flores com frutos desenvolvidos, dos quais pelo menos o 45% das sementes são viáveis.

Morfometria das flores

Ao observar as flores das duas populações 1 e 2 foram evidentes algumas diferenças na morfologia, tamanho e coloração da corola (Figura 2.5; Tabela 2.1). Segundo o teste de hipóteses das medições das flores encontrou-se que existem diferenças significativas ($p < 0,010$) em todas as 5 variáveis entre as flores das duas populações. Ademais, na população 2 foram observados três morfotipos diferentes, encontrando diferenças significativas ($p < 0,010$) entre o morfotipo de flores brancas e os outros dois morfotipos.

As flores da população 1 são de cor violeta com linhas violeta escuras no lábio superior, mais ou menos perpendiculares à abertura da flor; também possuem uma mancha amarela em forma triangular na base do lábio inferior na entrada à abertura que mimetiza anteras, e pequenas linhas roxas escuras que parecem guias de néctar dirigidas à abertura (Figura 2.5a). As anteras e o estigma ficam escondidos, e para o polinizador ter acesso é preciso abrir a flor empurrando as peças da corola.

Na população 2 foram encontrados três morfotipos com cores de corola diferentes: flores roxas-azuladas, brancas com roxo e brancas. O padrão morfológico das roxas é o mais similar ao da população 1; porém, com linhas roxas escuras mais intensas em direção à abertura, as manchas amarelas que mimetizam anteras são mais lobuladas e possuem uma mácula distal branca. O estigma é roxo escuro e fica exposto na abertura, enquanto as anteras ficam escondidas (Figura 2.5b). As flores brancas com roxo são maiores e têm uma forma um pouco diferente com o comprimento do lábio inferior maior (Figura 2.5c). As linhas roxas são mais espessas e intensas, e a mancha que mimetiza anteras é menor; além, o estigma e as anteras ficam expostos porque a flor é aberta. No caso das flores brancas, são menores que todas as outras, não possuem as linhas roxas, a mancha amarela é leve e o estigma e as anteras também são expostos (Figura 2.5d). Além disso, a variabilidade morfométrica da população 1 é maior que da população 2 (Figura 2.6 e 2.7).

Tabela 2.1. Medidas florais de *Genlisea violacea* das duas populações estudadas da Serra da Canastra e Furnas. Significância estatística de teste t-student e permanova ($P < 0,0001$).

	Serra da Canastra Roxas	Furnas Roxa	Furnas Brancas	Furnas Brancas- roxas
Comprimento do lábio inferior	5,62 ± 0,15 ^(a)	5,92 ± 0,15 ^(b)	4,67±0,22 ^(c)	6,36±0,22 ^(b)
Largura do lábio inferior	7,42 ± 0,18 ^(a)	6,92 ± 0,20 ^(b)	5,29±0,24 ^(c)	6,64±0,12 ^(b)
Abertura	2,11 ± 0,05 ^(a)	1,78 ± 0,04 ^(b)	0,89±0,36 ^(c)	1,548±0,02 ^(b)
Comprimento do cálcar	3,30 ± 0,09 ^(a)	5,26 ± 0,14 ^(b)	4,00±1,6 ^(c)	4,98±1,62 ^(b)
Comprimento do escapo	110,24 ± 4,42 ^(a)	63,51 ± 3,18 ^(b)	95,01±1,67 ^(c)	73,2±4,15 ^(b)
No de flores	2,30 ± 0,17 ^(a)	2,17 ± 0,08 ^(b)	1,80±0,14 ^(c)	1,6±0,10 ^(b)
No de frutos	0,87 ± 0,15 ^(a)	0,67 ± 0,16 ^(b)	2,43±0,69 ^(c)	1,3±0,40 ^(b)



Figura 2.5. Flores de *Genlisea violacea* das populações estudadas. **(a)** Morfotipo da população 1; **(b-d)** Morfotipos da população 2, **(b)** morfotipo roxo, **(c)** morfotipo branco e roxo, **(d)** morfotipo branco. (Créditos: LSV-UNESP).

Ao analisar as populações por PCO encontra-se variabilidade fenotípica e a mesma disposição para todas as variáveis, que se evidencia com uma distribuição achatada ou orientada apenas em um eixo (Figura 2.6, 2.7 e 2.8). Nesta distribuição se observa um gradiente de tamanhos no qual cada população tende a se distribuir num dos extremos; assim as flores da população 1 são as menores e as roxas da população 2 são maiores, com tamanhos intermediários nas subpopulações. Ao se compararem a populações 1 e a população 2 (roxas) num PERMANOVA se encontraram diferenças significativas ($p=0,0001$) para todas as variáveis morfométricas. Por outro lado, ao se compararem as subpopulações ou morfotipos de Furnas, foi observado que entre o morfotipo roxo e roxo com branco não há diferenças significativas ($p=0,0001$). Entretanto, foram encontradas diferenças significativas entre estas duas e o morfotipo de flores brancas.

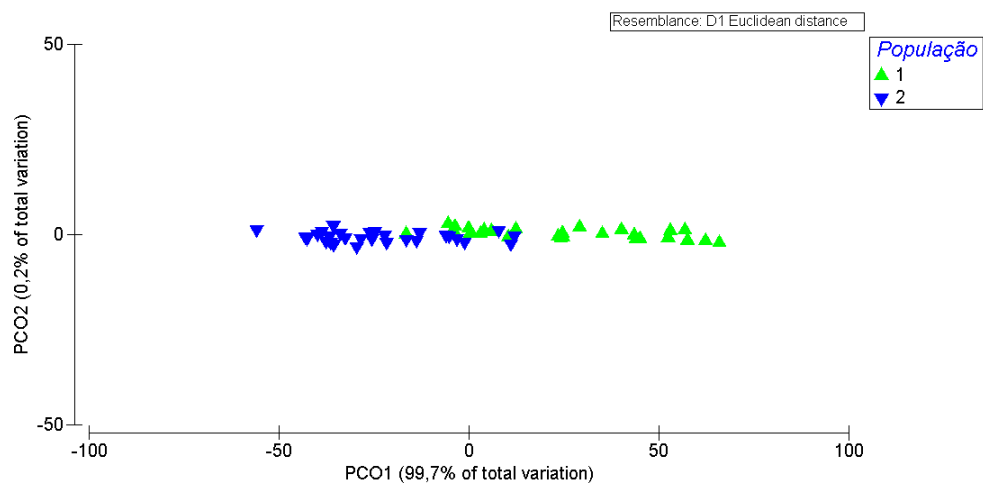


Figura 2.6. Análise de coordenadas principais entre as populações 1 e 2, em função das variáveis morfométricas das flores. Comparação entre a população 1 (▲) com todos os morfotipos da população 2 (▼).

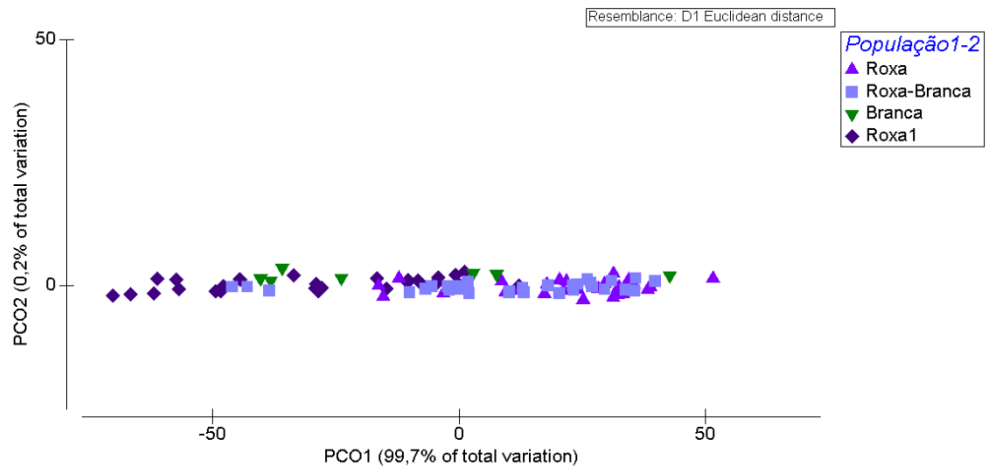


Figura 6.7. Análise de coordenadas principais entre as populações 1 e 2, em função das variáveis morfométricas das flores. Comparação entre a população 1 (◆) com o da população 2, morfotipos de flores roxas (▲), flores roxo com branco (■) e flores brancas (▼).

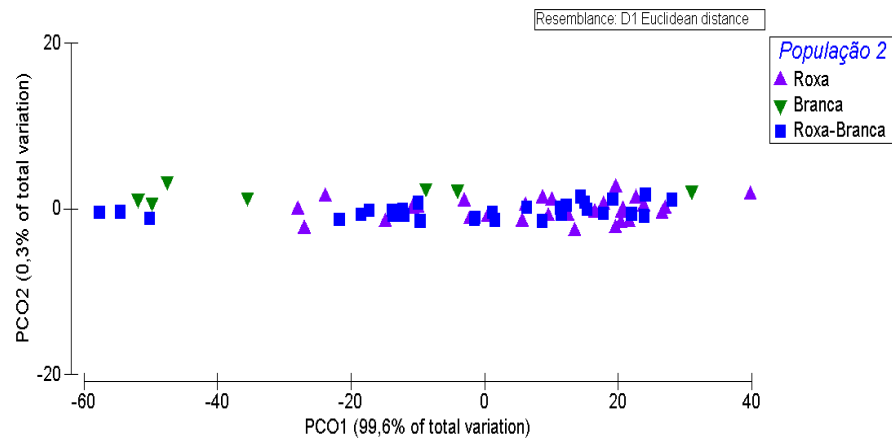


Figura 2.8. Análise de coordenadas principais entre as subpopulações de Furnas em função das variáveis morfométricas das flores. Morfotipos de flores roxas (▲), flores roxas com branco (■) e flores brancas (▼).

Outra observação importante na população de Furnas foram os sinais de florivoría em flores roxas, onde as marcas amarelas que mimetizam pólen foram comidas (Figura 2.9).

Foram realizadas medições das abelhas, moscas e boboleta capturados, do comprimento e largura da cabeça e do corpo inteiro e em alguns casos o comprimento da língua (Tabela 2.2). Ao comparar as medidas da cabeça das abelhas *Lasioglossum* e *Ceratina*, com a abertura da flor, observa-se que a maioria das abelhas poderiam inserir a cabeça para acessar ao néctar no cálcar; e a língua poderia entrar apenas até aproximadamente a primeira terceira parte do cálcar (Tabelas 2.1 e 2.2). No caso dos Syrphidae só o morfotipo de flores brancas com roxo têm uma abertura que permitiria a entrada da cabeça do inseto. E as abelhas do gênero *Trigona* são grandes em relação à abertura das flores; portanto, elas poderiam ser mais atraídas pelo pólen dos morfotipos com anteras expostas assim como poderiam sorver o néctar com a língua.

Tabela 2.2. Medidas médias dos insetos visitantes coletados.

Medida	<i>Lasioglossum</i> sp. (n=4)	<i>Ceratina</i> sp. (n=4)	<i>Trigona</i> sp. (n=1)	Syrphidae 1 (n=4)	Syrphidae 2 (n=1)	Hesperiinae (n=4)
Comprimento da cabeça (mm)	1,73±0,11	1,41±0,08	2,77	1,68±0,06	1,20	2,74
Largo cabeça (mm)	1,62±0,17	1,35±0,08	2,70	2,10±0,07	1,59	2,75
Língua (mm)	-	0,76±0,01	-	-	-	~4,08
Comprimento do corpo (mm)	4,56±0,34	4,63±0,20	6,25	7,85 ±0,48	5,54	15,13



Figura 2.9. Flores injuriadas de *Genlisea violacea* da população de Furnas (MG) com sinais de florivoria. (Créditos: LSV-UNESP).

Visitantes florais

Os visitantes florais das duas populações praticamente não foram os mesmos, se observaram 5 visitantes na população 1 e 8 na população 2; ou seja, no total se observaram 13 morfotipos diferentes. Na primeira população se observou mais atividade e visitas e na segunda população a atividade foi menor (Tabela 2.3).

Dos 13 morfotipos diferentes de visitantes florais que foram registrados encontraram-se: um Lepidoptera, seis Hymenoptera e cinco Diptera. Na população 1 se encontraram mais Hymenoptera (três), além de um Lepidoptera e um Diptera (Syrphidae); e na segunda se encontraram mais Diptera (quatro), e quatro Hymenoptera (Tabela 2.3; Figura 2.10).

Os padrões de visita de cada tipo de visitante foram diferentes, de manhã entre as 8 e 10h as visitas eram feitas mais pelas moscas, no período mais quente do dia, entre as 10h e 16h, foram mais frequentes as abelhas e no final do dia pela borboleta.

Não se conseguiu capturar todos os visitantes florais observados. Depois de consultar especialistas se conseguiu identificar os insetos capturados (Tabela 2.3). Os dípteros 1 e 3, da população 1 e 2 respectivamente, têm aparência de abelhas e foram identificados como duas espécies *Toxomerus* c.f. *virgulatus* e *Toxomerus* Sp, da

família Syrphidae (Figura 2.10 e 2.11). Os dípteros 2, 4 e 5, da população 2 são espécies diferentes de mosca da subordem Nematocera.

Tabela 2.3. Visitantes florais de flores de *G. violacea* em populações naturais da Serra da Canastra e Furnas, Minas Gerais. No de visitas, se refere ao número de vezes que pousaram sobre uma flor aberta.

Morfo	Nº de visitas	Tempo (s)/visita
POPULAÇÃO 1		
Diptera	36	1-15
<i>Toxomerus cf. virgulatus</i>		
Hymenoptera	80	2-240
sp. 1		
<i>Lasioglossum sp.</i>	15	3-45
<i>Ceratina sp.</i>	30	4-39
Lepidoptera		
Hesperiidae	8	1-8
POPULAÇÃO 2		
Diptera		
sp.1 (Nematocera)	10	1-104
<i>Toxomerus sp.2</i>	8	1-120
sp.2 (Nematocera)	5	1-34
sp.3 (Nematocera)	1	40
Hymenoptera		
sp. 2	3	1-2
sp. 3	7	1-15
<i>Lasioglossum sp.</i>	1	2
<i>Trigona sp.</i>	1	2

Pelo comportamento observado, as moscas da família Syrphidae visitaram e pousaram em flores de *G. violacea*, e também flores de outras espécies como de *Utricularia triloba* e *U. lanciniata* e de *Xyris* sp. Ao observar na lupa os Syrphidae capturados, foram encontrados grãos de pólen na cabeça e na parte posterior do tórax, e por microscopia eletrônica de varredura se verificou que tinham pólen de *G. violacea* (Figura 2.12). Os Nematocera pousavam em geral por pouco tempo (Tabela 1) e ficavam forrageando também em flores de outras espécies.

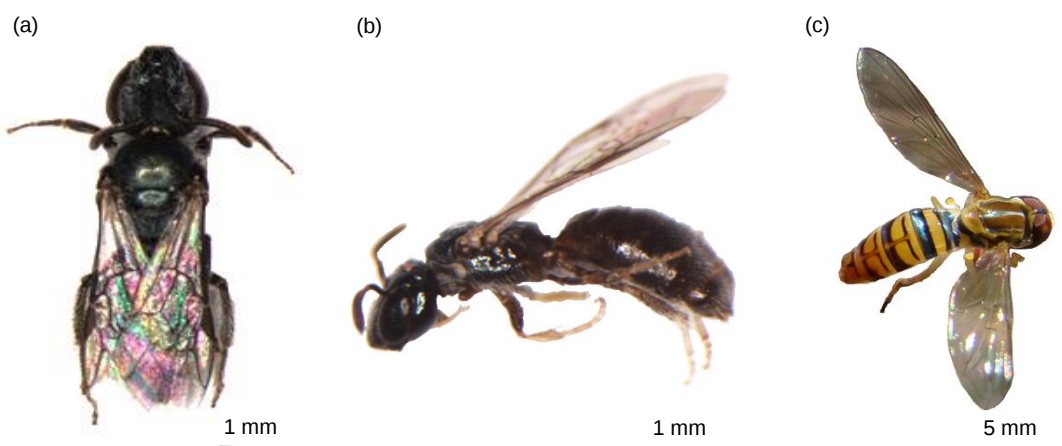


Figura 2.10. Visitantes polinizadores de *G. violacea*: (a) *Lasioglossum* sp., (b) *Ceratina* sp., (c) *Toxomerus* cf. *virgulatus*. (Créditos: LSV-UNESP).

As borboletas são da família Hesperíidae, subfamília Hesperíinae; e se observaram oito visitas onde pousavam sobre a flor por vários segundos (máx. 8 s) provavelmente sorvendo néctar do cálcar e não visitava flores de outras espécies; mas, na borboleta coletada não foram encontrados grãos de pólen.

Dos Hymenoptera observados na Serra da Canastra, um foi identificado como uma abelha da família Halictidae, subfamília Halictinae, gênero *Lasioglossum* subgênero *Dialictus*. Outro foi identificado como uma abelha da família Apidae,

subfamília Xylocopinae, gênero *Ceratina*, subgênero *Ceratinula*. E um terceiro não conseguiu ser coletado e identificado. Na população de Furnas, se observaram quatro Hymenoptera, dos quais um é o mesmo *Lasioglossum* sp. observado na Serra da Canastra, outro é da família Apidae, gênero *Trigona*, e os outros não foram identificados.

Os Hymenoptera aparentemente só visitavam plantas de *G. violacea* e ficavam forrageando de flor em flor (Figura 2.11). No momento em que eles pousavam na flor, ficavam sobre o lábio inferior. Depois, o inseto empurrava o lábio inferior para baixo com o abdômen abrindo a corola e enfiando a cabeça dentro da flor ficando próximo do cálcio onde a abelha liba o néctar presente nas paredes do cálcio (Figura 2.12). Nesse processo, a cabeça e a parte posterior do tórax ficam em contato com as anteras, impregnando-se de pólen (Figura 2.12). No microscópio eletrônico de varredura foram constatados grãos de pólen de *G. violacea* em espécimes de *Lasioglossum* sp. e *Ceratina* sp. tanto na cabeça como na parte posterior do tórax (Figura 2.13). A identidade do pólen foi verificada comparando com micrografias de esta espécie. Mesmo assim, foram observados grãos de pólen de Asteraceae, indicando que estas abelhas podem estar visitando outras espécies.

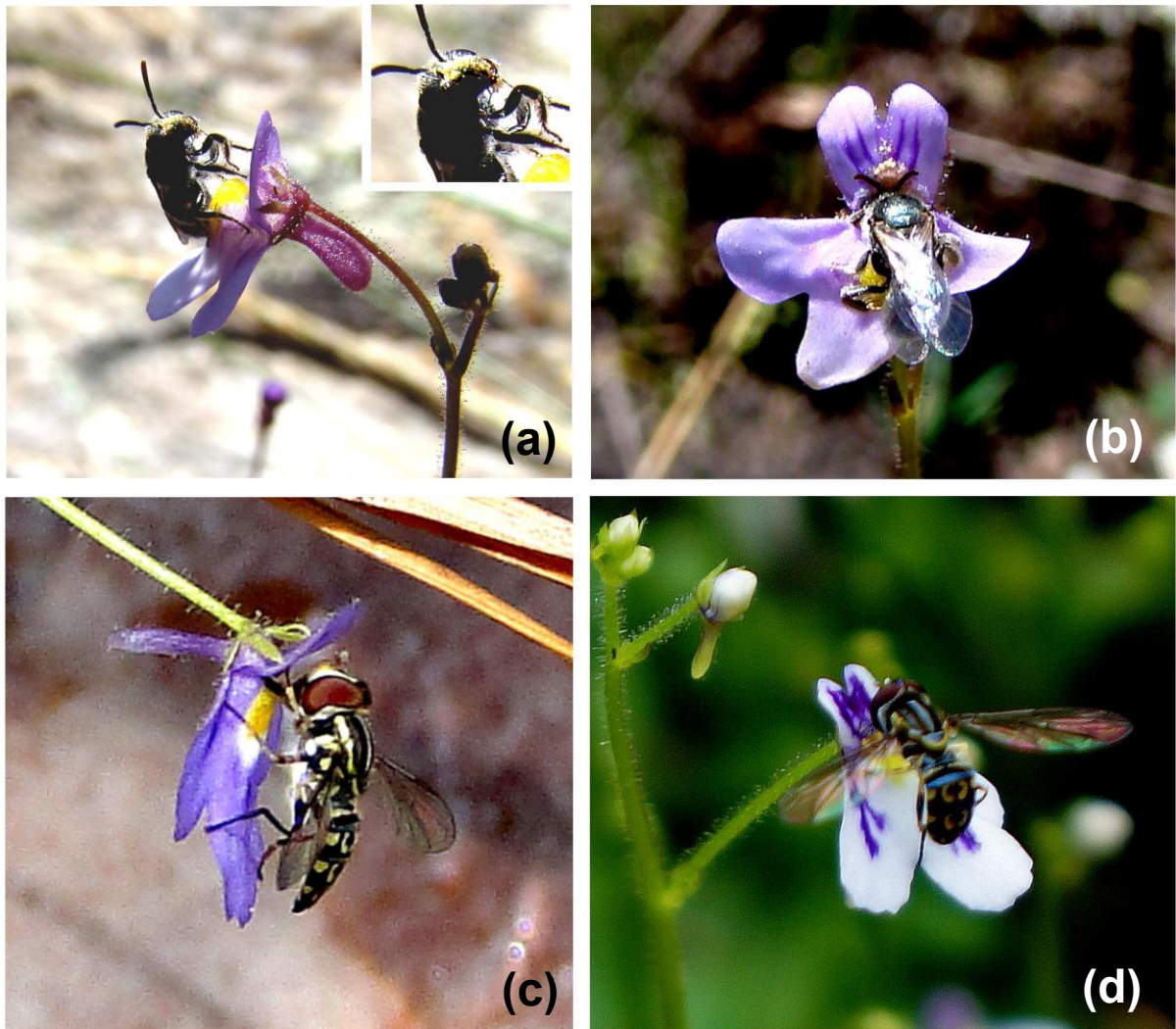


Figura 2.11. Visitas florais de *Genlisea violacea*. **(a-b)** *Lasioglossum* sp. em flores da nascente do Rio São Francisco; **(c-d)** Diptera *Toxomerus* sp. em flores de Furnas, MG. (Créditos: LSV-UNESP).



Figura 2.12. Comportamento de visita floral de pequenas abelhas *Lasioglossum* sp. (Créditos: LSV-UNESP).

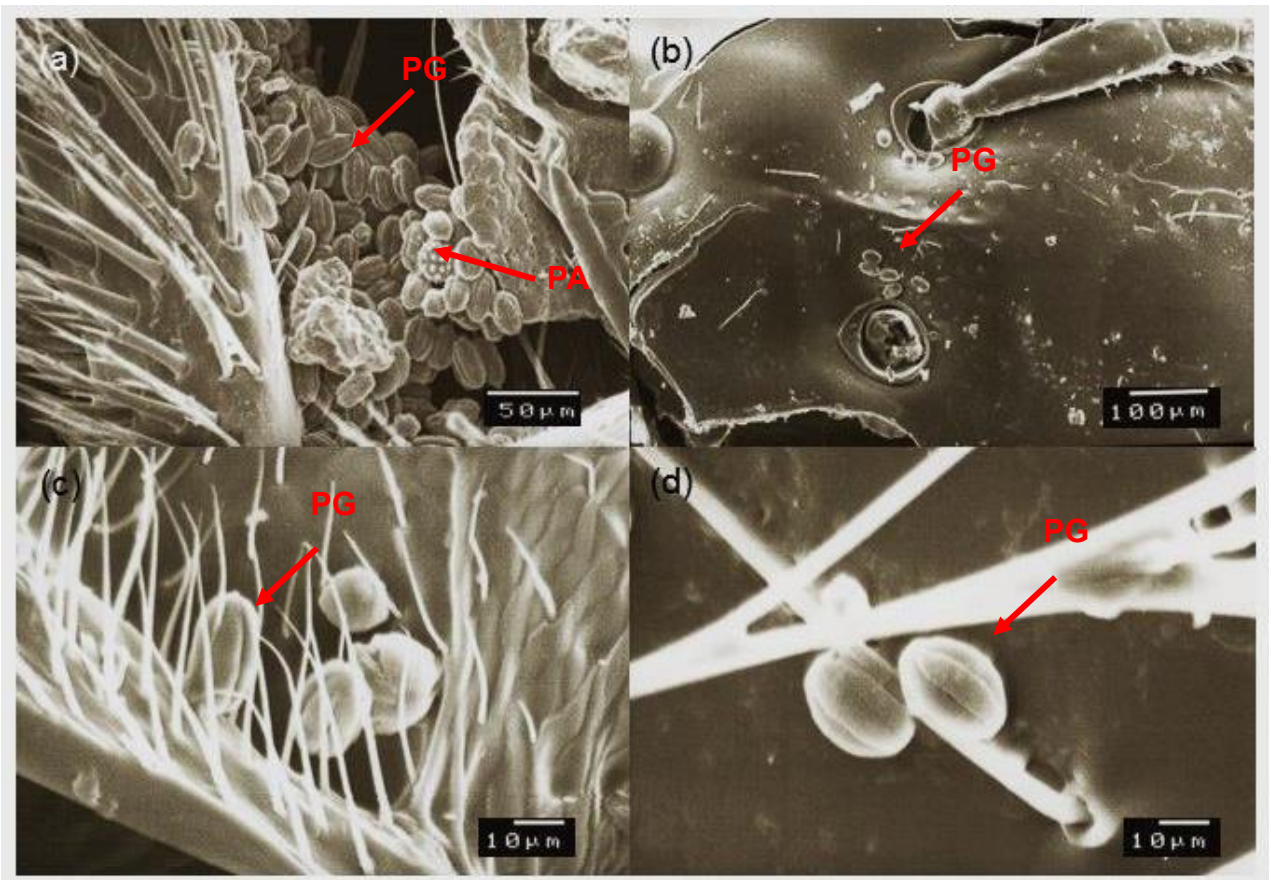


Figura 2.13. Fotomicrografias de varredura de insetos visitantes de *Genlisea violacea*. **(a-b)** Pólen na parte posterior do tórax de abelha *Lasioglossum* sp. **(c)** Pólen na cabeça da abelha *Ceratina* sp. **(d)** Pólen no tórax de um Syrphidae. PV, pólen de *Genlisea violacea*; PA, pólen de Asteraceae.

Discussão

Padrões ecológicos das populações de *Genlisea violacea* estudadas

A variações fenotípicas em *Genlisea violacea* foram descritas anteriormente por Fleischman (2012), porém é interessante a variabilidade morfométrica com diferenças significativas entre e dentro de populações, especialmente na população 2 (Figura 2.5, 2.6 e 2.7). Esta divergência nas características florais pode ser devido à adaptação às variações ambientais locais, e poderiam ser selecionadas principalmente pelos polinizadores. A seleção pelo polinizador tem sido observada em muitas espécies por competição e preferência pelo polinizador (JOHNSON; STEINER, 1997; SCHEMSKE; BRADSHAW, 1999; CARUSO, 2000; RAUSHER, 2008; THAIRU; BRUNET, 2015). Além disso, a evolução da morfologia, cor e tamanho da flor podem resultar não apenas da interação com polinizadores, mas também de outros agentes bióticos como herbívoros e agentes abióticos como o estresse hídrico e térmico (GALEN, 1999; STRAUSS; WHITTALL, 2006; THAIRU; BRUNET, 2015).

Genlisea violacea é uma espécie de planta carnívora que é endêmica do cerrado brasileiro com uma distribuição em ilhas localizadas em algumas serras dos estados de Minas Gerais e São Paulo (FLEISCHMANN et al., 2011). A espécie ocorre em solos arenosos quartzíticos ou rochosos e em paredões, em locais sazonalmente úmidos com água corrente e uma fina capa de matéria orgânica (FLEISCHMANN, 2012). Nesta distribuição acontecem vários microambientes, onde as populações estão adaptadas às condições específicas. O local da população 1 (Rio São Francisco) é aberto e muito ensolarado, o solo é úmido, rochoso e arenoso, e o ambiente em geral é uniforme; neste as flores são roxas e as características fenotípicas das flores desta população são pouco variáveis. No caso da população 2 (Furnas) na mesma área se observa um ambiente menos uniforme, que forma um gradiente desde espaços com pouca umidade e muito ensolarados (onde se encontram plantas de flores roxas), até espaços muito úmidos, com água corrente que recebe menos sol direto (onde ocorrem flores brancas com linhas roxas e só brancas). Além disso, na população 2 existe muita atividade antrópica (está nos limites do PARNA, próxima da rodovia, da represa e tem alta visitação para atividades recreativas).

Nas síndromes de polinização a cor é muito importante na atração (FAEGRI; PIJL, 1979; RECH; DE ÁVILA; SCHLINDWEIN, 2014) e as antocianinas são os pigmentos mais importantes nas cores das flores (RAUSHER, 2006, 2008; STRAUSS; WHITTALL, 2006). Nas Lentibulariaceae existem espécies com flores de cor roxa, amarela, branca e vermelha, sendo a roxa a mais comum; ademais, dentro de algumas poucas espécies como *U. amenthystina* e *G. violacea*, existem variações de coloração da corola interpopulacionais (TAYLOR, 1989; FLEISCHMANN, 2012; MENEZES, 2015). Nesta família as transições de cor roxa para branca são as mais frequentes (MENEZES, 2015). Adicionalmente, em plantas as antocianinas estão associadas com tolerância ao estresse abiótico (STRAUSS; WHITTALL, 2006) e a defesa de herbívoros e parasitas (LEV-YADUN; GOULD, 2008). Variações na pigmentação das flores podem ser ocasionadas por mutações deletérias ou mudanças num simples aminoácido de algum gene que forme parte da rota de síntese de antocianinas (JOHNSON et al., 2001; HOBALLAH et al., 2007; RAUSHER, 2008).

Então, as predominantes flores roxas, como as observadas na nascente do Rio São Francisco e uma das subpopulações de Furnas, parecem bem adaptadas aos espaços abertos onde a radiação e o estresse térmico estão presentes. Nas subpopulações brancas de Furnas, devem acontecer variações que permitiram se adaptar melhor nesses ambientes com menor radiação e maior disponibilidade hídrica. Mesmo assim, nas variações das cores os polinizadores podem atuar na seleção, e isso é mais evidente na localidade de Furnas, onde as características do ambiente favorecem a presença de maior diversidade de potenciais insetos polinizadores, especialmente de Diptera (que são mais atraídos por flores brancas, zigomorfas e pequenas).

Os florívoros podem influir na evolução dos sistemas reprodutivos (MCCALL; IRWIN, 2006). Curiosamente apenas nas flores roxas da população de Furnas se observou florivoria especificamente das machas amarelas (Figura 2.7). Isso pode comprometer a atração de polinizadores, portanto poderia gerar uma pressão que também favorece a variabilidade e o aumento na produção de flores (que se observa na densidade de flores desta população) para garantir a reprodução da população. Plachno et al. (2016), em estudo micromorfológico e histoquímico da corola de

Utricularia corigera e *U. nelumbifolia*, relatam a presença de osmóforos na região do palato da corola, onde geralmente ocorre a mácula amarela comum para muitas espécies de *Genlisea* e *Utricularia*, e também em *G. violacea*. Assim, a função de *unguentarius* dessa estrutura pode indicar não apenas uma atração visual para os florívoros, mas também olfativa.

Além da variação nas cores, as diferenças no nível de exposição do estigma e das anteras, assim como o tamanho devem ser características selecionadas pelos polinizadores. Na nascente do Rio São Francisco se observou menos diversidade de visitantes, mais frequência de visitação e um comportamento especializado para abrir as flores por parte das abelhas, frente a flores com órgãos sexuais escondidos. Contrariamente em Furnas, a diversidade foi maior (principalmente de dípteros), a frequência de visitação muito menor e o comportamento dos visitantes também foi diferente. Nesse caso, as flores tinham expostos os órgãos sexuais (estigma e estames) favorecendo a visitação e polinização a uma maior diversidade de insetos. De tal modo, as flores com anteras e estigmas escondidos (flores roxas) ou com só anteras escondidas, favorece a polinização por abelhas pequenas que podem inserir a cabeça na flor a procura de néctar (Figura 2.10 e 2.11). As flores maiores, abertas e com estigmas e anteras expostos (flores brancas com roxo), favorece a visitação de uma diversidade de insetos mais ampla, que inclui abelhas pequenas e grandes e dípteros. Adicionalmente as flores menores e/ou com órgãos sexuais expostos (flores brancas) favorece a visitação de pequenas abelhas e dípteros.

Biologia floral e reprodutiva

As espécies da família Lentibulariaceae têm despertado o interesse principalmente pela síndrome da carnívoria, porém a biologia reprodutiva e polinização é ainda pouco conhecida. No caso do gênero *Genlisea* existem descrições morfológicas e observações não experimentais que referem alguns elementos da biologia floral. Neste sentido, as características da flor, como os órgãos sexuais ocultos e a posição do estigma a respeito às anteras parecem evitar a autogamia (FLEISCHMANN, 2012). Em muitas espécies de *Utricularia* (HOBBAHN; KÜCHMEISTER; POREMBSKI, 2006; CLIVATI et al., 2014; PŁACHNO et al., 2016) e

Genlisea (FLEISCHMANN, 2012) existem glândulas produtoras de néctar associadas ao cálcio. Também, as corolas roxas bilabiadas, com mimetismo de pólen e a disponibilidade do recurso néctar oculto no cálcio, indicam que *G. violacea* é uma espécie alógama polinizada por insetos. Porém, nas flores isoladas inicialmente neste trabalho em condições de laboratório, observou-se formação de frutos em ausência do polinizador (por autopolinização ou apomixia), significando que podem ser autocompatíveis. As espécies do gênero *Utricularia* possuem polinização cruzada, algumas são autocompatíveis e podem ter autopolinização (JÉRÉMIE, 1989; TAYLOR, 1989; HOBBAHN; KÜCHMEISTER; POREMBSKI, 2006; CLIVATI et al., 2014). Entretanto, em *U. reniformis* se observou autocompatibilidade, porém necessitam do polinizador para serem polinizadas (CLIVATI et al., 2014). Em *Genlisea* também tem se observando autocompatibilidade ainda quando as espécies do subgênero *Tayloria* são alógamas (FLEISCHMANN et al., 2011) e em cultivo não se observou autopolinização (FLEISCHMANN, 2012). A posição e forma do estigma em relação às anteras indicam que a autopolinização espontânea seria pouco provável, e parecem requerer do inseto para a autopolinização, como ocorre em *U. reniformis* (CLIVATI et al., 2014). Entretanto é preciso fazer mais testes em campo, com flores isoladas, emasculadas e autopolinizadas para determinar com mais certeza como é a biologia reprodutiva da espécie (em andamento).

Em algumas espécies de *Utricularia*, a viabilidade estigmática prolongada favorece a polinização em ausência de polinizador (JÉRÉMIE, 1989). A separação espacial e temporal do pólen e do estigma reduz a autopolinização e aumenta a chance de polinização cruzada (WEBB; LLOYD, 1986). A receptividade estigmática durante todo o tempo de vida da flor, e a viabilidade polínica decrescente observada, são características que também foram observadas em *U. reniformis* e *U. ametisthyna* (CLIVATI et al., 2014; MENEZES, 2015). Assim, a receptividade estigmática durante todo o tempo de vida pode otimizar o sucesso reprodutivo. A autopolinização está limitada ao início da antese quando os grãos de pólen ainda são viáveis (sempre que exista a ação de um polinizador); e se as flores não são polinizadas no início, essa viabilidade prolongada permite aumentar as chances de acontecer a polinização cruzada. Além disso, a oferta de néctar constante durante o dia permite também a atração prolongada de insetos.

Visitantes florais e polinizadores

Na população localizada na nascente do Rio São Francisco se observaram cinco visitantes florais que pousaram várias vezes em diferentes flores da população (Tabela 2.3). Na população de Furnas, observaram-se oito polinizadores, porém quase todos diferentes da primeira população, com uma frequência de visitação menor e com baixa frequência de Hymenoptera (Tabela 2.3). Além disso, em Furnas o tipo de visitantes variou com a época de observação.

Essa diferença deve estar influenciada por vários fatores. Um componente importante são as variações no clima entre as duas populações; na primeira população as observações foram feitas em março e os dias foram mais ensolarados e quentes; e as observações da segunda população foram feitas em abril, junho e julho, estes dois últimos meses foram mais frios, com um pouco de nuvens em algumas horas do dia. Portanto, a temperatura deve ter influenciado a atividade principalmente de Hymenoptera que podem ter maior atividade de visitação e forrageio em dias ensolarados e com maior temperatura (ARROYO; ARMESTO; PRIMACK, 1985; MARTINS, 2014). Também, a ausência de Hymenoptera na segunda população, durante os meses de junho e julho, poderia indicar que as abelhas polinizadoras de *G. violacea* sejam estacionais, como costuma acontecer em abelhas que habitam regiões temperadas (ARROYO; ARMESTO; PRIMACK, 1985; MARTINS, 2014; MATOS; SILVA; TEODORO, 2016). Contudo Gonçalves e Melo (2005) encontraram muitos indivíduos de espécies de *Ceratina* em coletas no mês de maio no Parque Estadual de Vila Velha, Paraná. Adicionalmente, variações na qualidade da luz podem afetar os ritmos circadianos e por tanto a atividade em abelhas (CHITTKA; STELZER; STANEWSKY, 2013). A diversidade de Diptera na população de Furnas também deve estar relacionada com a cercania ao rio e as rochas úmidas, ambiente próprio dos Diptera que favorece o desenvolvimento de larvas. Além disso, a atividade antrópica presente na população 2 deve favorecer o estabelecimento dos Diptera.

A atividade antrópica também pode ter influenciado nas diferentes formas de polinizadores distintas entre as duas populações sendo que a de Furnas diminui a presença de Hymenoptera e aumenta a de Diptera. Diversos estudos indicam que

distúrbios ambientais produto de atividades humanas afetam as populações de abelhas levando ao decaimento destas espécies (POTTS et al., 2010; GIANNINI et al., 2012; MARTINS; GONÇALVES; MELO, 2013). Se estas atividades antrópicas têm alguma influência na composição de visitantes florais observados nas duas populações é possível supor que a população de Furnas seja mais vulnerável, principalmente pela contribuição na diminuição das populações de Hymenoptera.

Além disso, considera-se que em abelhas a distância de voo e forrageio é proporcional ao seu tamanho corporal (GREENLEAF et al., 2007) e as espécies de *Lasioglossum* e *Ceratina* são tão pequenas (~4,55 mm, Tabela 2.2), que talvez as populações de abelhas que polinizam a duas populações de *G. violacea* estão isoladas entre si. O tamanho também poderia limitar a capacidade de colonização (WILLIAMS et al., 2010), portanto estas populações merecem atenção e estudos que estimem a vulnerabilidade de estas abelhas e das comunidades que interagem com elas. Abelhas estacionais que habitam ambientes mais restritos podem ser mais vulneráveis.

Das espécies de abelhas conhecidas no Brasil, 913 são da família Apidae e 251 da família Halictidae (MOURE, JESUS SANTIAGO URBAN; MELO, 2007) e nestas duas famílias é frequente encontrar espécies generalistas, especialmente as de menor tamanho (DÍEZ, 2006; MICHENER, 2007). As espécies do gênero *Ceratina* (Xylocopinae) são de pequeno porte (GONÇALVES; MELO, 2005), podem ser generalistas poliléticas, sociais, parassociais e solitárias (GONÇALVES; MELO, 2005; MICHENER, 2007; DE PAULA; MELO, 2014), em alguns casos com constância floral (KOBAYASHI-KIDOKORO; HIGASHI, 2010) e constroem seus ninhos em caules e galhos quebrados (MICHENER, 2007; ROIG ALSINA, 2013). O gênero *Lasioglossum* (subgênero *Dialictus*), é um grupo muito grande e diverso de pequenas abelhas pretas ou verdes e azuis metálicos, possuem curtas e largas línguas que usam para pegar néctar, são generalistas poliléticas, com diferentes níveis sociais (MICHENER, 2007; DE PAULA; MELO, 2014; NOCELLI et al., 2014). Geralmente forrageiam pequenas ervas e podem ter constância floral (MICHENER, 2007). As características destes dois tipos de abelhas parecem estar correlacionadas com o tipo de flor. Ao observar as medidas florais e dos insetos, estes se correlacionam,

indicando que devem ter co-evoluído adaptando suas estruturas para melhor aproveitamento da polinização e evitar predação de outros visitantes. Entretanto, não parecem ser especialistas de *G. violacea* como indica a presença de alguns grãos de pólen de espécies de outras famílias de plantas (Figura 2.12a).

Os Diptera são visitantes florais frequentes em numerosas espécies de plantas (INOUE et al., 2015) e vetores de pólen de muitas delas (LARSON; KEVAN; INOUE, 2001; INOUE et al., 2015; ORFORD; VAUGHAN; MEMMOTT, 2015). Geralmente as moscas não precisam cuidado parental e utilizam diferentes fontes de alimento, por tanto muitas vezes têm sido consideradas polinizadores incertos (FAEGRI; PIJL, 1979; DE LIMA NADIA; MACHADO, 2014). A síndrome de miofilia não especializada, é parecida com a de melitofilia, e se caracteriza por flores pequenas, actinomorfas, com tubo floral curto, de cores claras, com guias e pequenas concentrações de néctar (FAEGRI; PIJL, 1979; DE LIMA NADIA; MACHADO, 2014). Alguns Diptera como os da família Syrphidae especializaram-se em se-alimentar de pólen e néctar (LARSON; KEVAN; INOUE, 2001; DE LIMA NADIA; MACHADO, 2014; IRSHAD, 2014). Contudo, as moscas têm causado pouco interesse em pesquisas de polinização e muitas vezes são consideradas predadores florais já que elas usam recursos florais de alimento. Várias famílias de dípteros podem ser polinizadores efetivos de plantas nativas e de cultivos (LARSON; KEVAN; INOUE, 2001; IRSHAD, 2014; INOUE et al., 2015). Os Diptera têm modelos temporais de visitas durante o dia determinados principalmente pela temperatura e a radiação solar, que variam entre espécies; mas, o frio e o sol podem ser estressantes (INOUE et al., 2015). Os Syrphidae têm um ritmo bimodal, com mais forrageio pela manhã e pelo final da tarde, quando as temperaturas são médias-altas (INOUE et al., 2015), têm probóscide curta que usam no consumo de néctar, e são polinizadores efetivos de várias espécies de plantas (LARSON; KEVAN; INOUE, 2001; DE LIMA NADIA; MACHADO, 2014; IRSHAD, 2014) O padrão de visitação observado corresponde com isso, maior frequência de Syrphidae de manhã quando as temperaturas e a radiação não são tão altas, maior frequência de abelhas no meio dia, e pequenos dípteros nos dias mais frios. Essa diferença temporal de visitação deve possivelmente diminuir a competição por recursos florais, aumentando a possibilidade de polinização cruzada.

Pelo comportamento de visita de muitas flores, incluso de outras espécies, e pelo tempo curto de visita, a mosca da família Syrphidae pode parecer um ladrão de pólen. Porém, a presença de pólen no corpo, observado por MEV, indica que estas moscas poderiam atuar como polinizadores efetivos de *G. violacea*; de fato os dípteros fazem parte importante da comunidade de polinizadores em ambientes temperados ou de altitude (INOUE et al., 2015).

A borboleta foi observada poucas vezes e ainda que elas pousavam sobre a flor durante oito segundos que pode ser tempo suficiente para pegar pólen no corpo, não foram obtidas evidências suficientes para afirmar que esta seja um polinizador. Em espécies de *Utricularia* tem se observado borboletas como polinizadores (HOBBAHN; KÜCHMEISTER; POREMBSKI, 2006; MENEZES, 2015).

É importante mencionar que das duas populações estudadas foram coletadas sementes e foram feitos testes de germinação e após terem sido feitas as observações de visita florais, e nos dois casos as sementes germinaram em 45%, indicando que nessas populações houve polinização efetiva. Também, se testaram sementes de coletas prévias há três anos antes, que mantiveram a viabilidade em 30%, característica que em campo deve ser importante para manter o banco de sementes no solo, que permite o estabelecimento das populações ano após ano.

Finalmente, *G. violacea* é uma espécie anual com uma distribuição restrita a ambientes semiaquáticos, em áreas serranas do cerrado (FLEISCHMANN, 2012). Assim, para garantir sua reprodução e sobrevivência, foram assim selecionadas características como uma receptividade estigmática prolongada, a autogamia facultativa, a oferta de néctar, o tamanho e a forma da corola e a disposição do gineceu e androceu que facilitam a visita de polinizadores específicos e evita a predação, e a produção de numerosas sementes que se mantêm viáveis por tempo prolongado, que se mantêm viáveis por tempos prolongados.

Conclusões

Genlisea violacea é uma espécie alógama e autocompatível. A receptividade estigmática e a oferta de néctar se mantêm, a viabilidade do pólen decai durante o tempo de vida da flor. Portanto podem ser autopolinizadas, mas a polinização cruzada mediada por um polinizador é mais efetiva.

O tamanho, a forma e a cor das flores variam, assim como morfometricamente têm diferenças significativas entre populações. Estas características podem ser influenciadas por fatores bióticos e abióticos. Os morfotipos estudados podem ter sido selecionados pelos polinizadores e pelo estresse abiótico, em virtude dos diferentes microambientes. Neste sentido, é importante fazer análises genéticas que permitam entender esta diversificação fenotípica.

Ao menos duas espécies de abelhas são polinizadores efetivos de *Genlisea violacea*. Estas abelhas são do gênero *Lasioglossum* (subgênero *Dialictus*: subfamília Halictinae: família Halictidae) e do gênero *Ceratina* (subgênero *Ceratinula*: subfamília Xylocopinae: família Apidae).

Além das abelhas, é possível que as moscas com aparência de abelha, da família Syrphidae, também participem na polinização.

No caso das moscas da subordem Nematocera, não há evidência de que sejam polinizadores. Por tanto, parecem ser simplesmente visitantes florais.

As diferenças nos padrões de visitas de insetos nas flores das duas populações podem ser atribuídas a vários fatores como o clima, o efeito antrópico, e/ou fatores sazonais dos insetos e das plantas, assim como pela variação morfológica das flores.

Os himenópteros são um importante recurso biológico para a manutenção de espécies da família Lentibulariaceae em ecossistemas naturais, sendo necessária atenção na sua conservação.

Referências

- ALEXANDER, M. P. A versatile stain for pollen fungi, yeast and bacteria. **Stain technology**, v. 55, p. 13–18, 1980.
- ALSOS, I. G.; EHRICH, D.; THUILLER, W.; EIDSEN, P. B.; TRIBSCH, A.; SCHONSWETTER, P.; LAGAYE, C.; TABERLET, P.; BROCHMANN, C. Genetic consequences of climate change for northern plants. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 279, n. 1735, p. 2042–2051, 22 maio 2012.
- ANDERSON, M.J.; GORLEY, R. N.; CLARKE, K. R. **Permanova for Primer: guide to software and statistical methods**. Plymouth, UKPRIMER-E., , 2008. .
- ARROYO, M. T. K.; ARMESTO, J. J.; PRIMACK, R. B. Community studies in pollination ecology in the high temperate Andes of central Chile II. effect of temperature on visitation rates and pollination possibilities. **Plant Systematics and Evolution**, v. 149, n. 3-4, p. 187–203, 1985.
- BFG; FORZZA, R. C.; GRACINEIDE, S. S.; RAFAEL, F.; FLÁVIO, M.; MARIA, C. E.; ANDRÉ, M.; IVANILZA, M.; REGINA, H. P.; ELISETE, A.; LIDYANNE, Y. S.; FILHO, A.; JOÃO, L. M.; ANDREA, O.; ARICLENES, A. M.; MARÍA, M.; MARTA, C.; VIVIAN, A.; LUCAS, A. V.; MICHEL, J. F.; JOSÉ, F. A.; LUIS, C.; PAUL, E.; RAFAEL, A. X.; ROSELI, L. C.; CLÁUDIA, P.; JAMES, L.; MARIA, R. C.; RICARDO, S.; DOUGLAS, C.; STEFANO, D.; RODRIGO, D.; JULIE, H. A.; VALQUÍRIA, F. Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. v. 66, n. 4, 2015.
- CARUSO, C. Competition for pollination influences selection on floral traits of *Ipomopsis aggregata*. **Evolution**, v. 54, n. 5, p. 1546–1557, 2000.
- CHITTKA, L.; STELZER, R. J.; STANEWSKY, R. Daily changes in ultraviolet light levels can synchronize the circadian clock of bumblebees (*Bombus terrestris*). **Chronobiology International**, v. 30, n. 4, p. 434–442, 2 maio 2013.
- CLIVATI, D.; CORDEIRO, G. D.; PŁACHNO, B. J.; DE MIRANDA, V. F. O. Reproductive biology and pollination of *Utricularia reniformis* A.St.-Hil. (Lentibulariaceae). **Plant Biology**, v. 16, n. 3, p. 677–682, 29 maio 2014.
- DAFNI, A. **Pollination ecology: a practical approach**. Oxford: Oxford University Press, 1992.
- DE LIMA NADIA, T.; MACHADO, I. C. Polinização por dípteros. In: RECH, A. R.; AGOSTINI, K.; OLIVEIRA, P. E.; MACHADO, I. C. (Ed.). **Biologia a polinização**. Rio de Janeiro: Ceres Belchior, 2014. p. 527.
- DE PAULA, G. A. R.; MELO, G. A. R. **Assembleias de abelhas sob a perspectiva funcional**. 2014. Universidade Federal do Paraná, 2014.
- DÍEZ, M. C. **SISTEMAS DE POLINIZACION EN BOSQUES TROPICALES**. Disponível em: <<http://www.unalmed.edu.co/~poboyca/documentos/documentos1/polinizacion/POLINIZACION PALMAS/GENERALIDADES POLINIZACION.pdf>>. Acesso em: 4 ago.

2016.

FAEGRI, K.; PIJL, L. van der. **Principles of pollination ecology**. 3rd Editi ed. New York: Pergamon Press, 1979.

FAO. **Biodiversity**. Disponível em: <<http://www.fao.org/biodiversity/components/pollinators/en/>>. Acesso em: 1 jan. 2016.

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

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

FLEISCHMANN, A.; SCHÄFERHOFF, B.; HEUBL, G.; RIVADAVIA, F.; BARTHLOTT, W.; MÜLLER, K. F. Phylogenetics and character evolution in the carnivorous plant genus *Genlisea* A. St.-Hil. (Lentibulariaceae). **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 56, n. 2, p. 768–83, ago. 2010.

FRANKHAM, R. Genetics and extinction. **Biological Conservation**, v. 126, n. 2, p. 131–140, nov. 2005.

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

GALEN, C. Why do flowers vary? **BioScience**, v. 49, n. 8, p. 631, ago. 1999.

GIANNINI, T. C.; ACOSTA, A. L.; GARÓFALO, C. a.; SARAIVA, A. M.; ALVES-DOS-SANTOS, I.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. Pollination services at risk: Bee habitats will decrease owing to climate change in Brazil. **Ecological Modelling**, v. 244, p. 127–131, 2012.

GIANNINI, T. C.; CORDEIRO, G. D.; FREITAS, B. M.; SARAIVA, A. M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. The Dependence of Crops for Pollinators and the Economic Value of Pollination in Brazil. **Journal of Economic Entomology**, v. 108, n. 3, p. 849–857, 1 jun. 2015.

GONÇALVES, R. B.; MELO, G. a. R. A comunidade de abelhas (Hymenoptera, Apidae s. l.) em uma área restrita de campo natural no Parque Estadual de Vila Velha, Paraná: diversidade, fenologia e fontes florais de alimento. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 49, n. 1990, p. 557–571, 2005.

GREENLEAF, S. S.; WILLIAMS, N. M.; WINFREE, R.; KREMEN, C. Bee foraging ranges and their relationship to body size. **Oecologia**, v. 153, n. 3, p. 589–596, 8 ago. 2007.

HOBALLAH, M. E.; GUBITZ, T.; STUURMAN, J.; BROGER, L.; BARONE, M.; MANDEL, T.; DELL'OLIVO, A.; ARNOLD, M.; KUHLEMEIER, C. Single Gene-Mediated Shift in Pollinator Attraction in *Petunia*. **THE PLANT CELL ONLINE**, v. 19, n. 3, p. 779–790, 9 mar. 2007.

HOBBAHN, N.; KÜCHMEISTER, H.; POREMBSKI, S. Pollination biology of mass flowering terrestrial *Utricularia* species (Lentibulariaceae) in the Indian Western Ghats.

Plant biology (Stuttgart, Germany), v. 8, n. 6, p. 791–804, nov. 2006.

HONDA, S.; NISHIMURA, Y.; TAKAHASHI, M.; CHIBA, H.; KAKEHI, K. A manual method for the spectrophotometric determination of reducing carbohydrates with 2-cyanoacetamide. **Analytical Biochemistry**, v. 119, n. 1, p. 194–199, jan. 1982.

IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; LANGE CANHOS, D. A.; DE ARAUJO ALVES, D.; SARAIVA, A. M. Polinizadores e polinização - um tema global. In: IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; LANGE CANHOS, D. A.; DE ARAUJO ALVES, D.; SARAIVA, A. M. (Ed.). **Polinizadores no Brasil**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2012. p. 485.

INOUE, D. W.; LARSON, B. M. H.; SSYMANK, A.; KEVAN, P. G. Flies and Flowers lii: Ecology of Foraging and Pollination. **Journal of Pollination Ecology**, v. 16, n. January, p. 115–133, 2015.

IRSHAD, M. Review: Role of Syrphids (Diptera: Syrphidae) as Biotic Agents and Pollinators in Pakistan. **Journal of Bioresource Management**, v. 1, n. 2, p. 1–9, 2014.

ISHARA, K. L.; MAIMONI-RODELLA, R. de C. S. Pollination and dispersal systems in a Cerrado remnant (Brazilian Savanna) in Southeastern Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 54, n. 3, p. 629–642, jun. 2011.

JÉRÉMIE, J. Autogamie dans le genre *Utricularia* L. (Lentibulariaceae). **Bulletin du Museum National d'Histoire Naturelle, section B, Adansonia**, v. 11, p. 17–28, 1989.

JOHNSON, E. T.; RYU, S.; YI, H.; SHIN, B.; CHEONG, H.; CHOI, G. Alteration of a single amino acid changes the substrate specificity of dihydroflavonol 4-reductase. **The Plant Journal**, v. 25, n. 3, p. 325–333, 23 dez. 2001.

JOHNSON, S. D.; STEINER, K. E. Long-Tongued Fly Pollination and Evolution of Floral Spur Length in the *Disa draconis* Complex (Orchidaceae). **Evolution**, v. 51, n. 1, p. 45, fev. 1997.

KLEIN, A.-M.; VAISSIERE, B. E.; CANE, J. H.; STEFFAN-DEWENTER, I.; CUNNINGHAM, S. A.; KREMEN, C.; TSCHARNTKE, T. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 274, n. 1608, p. 303–313, 7 fev. 2007.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. A conservação do Cerrado brasileiro. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 147–155, 2005.

KOBAYASHI-KIDOKORO, M.; HIGASHI, S. Flower Constancy in the Generalist Pollinator *Ceratina flavipes* (Hymenoptera: Apidae): An Evaluation by Pollen Analysis. **Psyche**, v. 2010, p. 1–8, 2010.

LARSON, B. M. H.; KEVAN, P. G.; INOUE, D. W. Flies and flowers: taxonomic diversity of anthophiles and pollinators. **The Canadian Entomologist**, v. 133, n. 04, p. 439–465, 31 ago. 2001.

LEV-YADUN, S.; GOULD, K. S. Role of Anthocyanins in Plant Defence. In: **Anthocyanins**. New York, NY: Springer New York, 2008. p. 22–28.

MARTINS, A. C.; GONÇALVES, R. B.; MELO, G. A. Changes in wild bee fauna of a grassland in Brazil reveal negative effects associated with growing urbanization during the last 40 years. **Zoologia (Curitiba)**, v. 30, n. 2, p. 157–176, abr. 2013.

MARTINS, D. Sweat bees (Halictidae): natural history and pesticide exposure. In: **POLLINATOR SAFETY IN AGRICULTURE**. Rome: FAO, 2014.

MATOS, M. C. B.; SILVA, S. S.; TEODORO, A. V. Seasonal population abundance of the assembly of solitary wasps and bees (Hymenoptera) according to land-use in Maranhão state, Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia**, fev. 2016.

MCCALL, A. C.; IRWIN, R. E. Florivory: The intersection of pollination and herbivory. **Ecology Letters**, v. 9, n. 12, p. 1351–1365, 2006.

MENEZES, C. **Sistemática, evolução e biologia reprodutiva de utricularia com ênfase para utricularia amethystina salzm. ex a.st.-hil. & girard (lentibulariaceae)**. 2015. UNESP, 2015.

MICHENER, C. **The bees of the world**. 2th. ed. Baltimore: The Johns Hopkins University Press, 2007.

MIRANDA, V. F. O.; MENEZES, C. G.; SILVA, S. R.; DÍAZ, Y. C. A.; RIVADAVIA. **Lentibulariaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/FichaPublicaTaxonUC/FichaPublicaTaxonUC.do?id=FB146>>. Acesso em: 1 jan. 2016.

MMA/IBAMA. **Monitoramento do desmatamento nos biomas brasileiros por satélite. Acordo de cooperação técnica MMA/IBAMA: Monitoramento do bioma Cerrado 2009-2010**. [s.l: s.n.].

MORRANT, D. S.; SCHUMANN, R.; PETIT, S. Field methods for sampling and storing nectar from flowers with low nectar volumes. **Annals of Botany**, v. 103, n. 3, p. 533–542, 25 nov. 2008.

MOTTA MAUÉS, M.; GALARDA VARASSIN, I.; FREITAS, L.; SOBREIRA MACHADO, I. C.; ALVES MACEDO DE OLIVEIRA, E. A Importância dos Polinizadores nos Biomas Brasileiros, Conhecimento Atual e Perspectivas Futuras para Conservação. In: IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; LANGE CANHOS, D. A.; DE ARAUJO ALVES, D.; SARAIVA, A. M. (Ed.). **Polinizadores no Brasil**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2012.

MOURE, JESUS SANTIAGO URBAN, D.; MELO, G. A. R. **Catalogue of bees (hymenoptera, apoidea) in the neotropical region**. Curitiba: Sociedade Brasileira de Entomologia, 2007.

MÜLLER, K.; BORSCH, T.; LEGENDRE, L.; POREMBSKI, S.; THEISEN, I.; BARTHLOTT, W. Evolution of carnivory in Lentibulariaceae and the Lamiales. **Plant biology (Stuttgart, Germany)**, v. 6, n. 4, p. 477–90, jul. 2004.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; DA FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 853–858, 24 fev. 2000.

NOCELLI, R. C. F.; CINTRA-SOCELOWSKI, P.; ROAT, T. C.; FERREIRA, R. A. C.;

- PEREIRA, A. M.; CARVALHO, S. M.; MALASPINA, O. Pesticide exposure routes for Brazilian wild bees. In: **POLLINATOR SAFETY IN AGRICULTURE**. [s.l: s.n.]
- OLLERTON, J.; WINFREE, R.; TARRANT, S. How many flowering plants are pollinated by animals? *Oikos*, v. 120, n. 3, p. 321–326, mar. 2011.
- ORFORD, K. A.; VAUGHAN, I. P.; MEMMOTT, J. The forgotten flies: the importance of non-syrphid Diptera as pollinators. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 282, n. 1805, p. 20142934–20142934, 25 mar. 2015.
- PINHEIRO, M.; GAGLIANONE, M. C.; PEREIRA NUNES, C. E.; SIGRIST, M. R.; ALVES DOS SANTOS, I. Polinização por abelhas. In: RECH, A. R.; AGOSTINI, K.; OLIVEIRA, P. E.; MACHADO, I. C. (Ed.). **Biologia da polinização**. Rio de Janeiro: Projeto Cultura, 2014. p. 527.
- PŁACHNO, B. J.; STPICZYŃSKA, M.; DAVIES, K. L.; ŚWIĄTEK, P.; DE MIRANDA, V. F. O. Floral ultrastructure of two Brazilian aquatic-epiphytic bladderworts: *Utricularia cornigera* Studnička and *Utricularia nelumbifolia* Gardner (Lentibulariaceae). **Protoplasma**, p. 1–14, 2016.
- POTTS, S. G.; BIESMEIJER, J. C.; KREMEN, C.; NEUMANN, P.; SCHWEIGER, O.; KUNIN, W. E. Global pollinator declines: Trends, impacts and drivers. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 25, n. 6, p. 345–353, 2010.
- RAUSHER, M. D. The evolution of flavonoids and their genes. **The Science of Flavonoids**, p. 175–211, 2006.
- RAUSHER, M. D. Evolutionary Transitions in Floral Color. **International Journal of Plant Sciences**, v. 169, n. 1, p. 7–21, jan. 2008.
- RECH, A. R.; DE ÁVILA, R. S.; SCHLINDWEIN, C. Síndromes de polinização: especialização e generalização. In: RECH, A. R.; AGOSTINI, K.; OLIVEIRA, P. E.; MACHADO, I. C. (Ed.). **Biologia da polinização**. Rio de Janeiro: Projeto Cultura, 2014. p. 527.
- ROIG ALSINA, A. El género *Ceratina* en la Argentina: revisión del subgénero *Neoclavicera* subg. n. (Hymenoptera, Apidae, Xylocopinae). **Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales**, v. 15, n. 1, p. 121–143, 2013.
- RYLANDS, A. B.; BRANDON, K. Unidade de conservação brasileiras. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 27–31, 2000.
- SCHEMSKE, D. W.; BRADSHAW, H. D. Pollinator preference and the evolution of floral traits in monkeyflowers (*Mimulus*). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 21, p. 11910–11915, 12 out. 1999.
- STRAUSS, S. Y.; WHITTALL, J. B. Non-pollinator agents of selection on floral traits. In: HARDER, L. D.; BARRETT, S. C. H. (Ed.). **Ecology and Evolution of Flowers**. New York: Oxford University Press, 2006. p. 120–138.
- TAYLOR, P. **The genus *utricularia* – a taxonomic monograph**. Kew Bulletin ed. Key, London: Royal Botanic Gardens, 1989.
- THAIRU, M. W.; BRUNET, J. The role of pollinators in maintaining variation in flower

colour in the Rocky Mountain columbine, *Aquilegia coerulea*. **Annals of Botany**, v. 115, n. 6, p. 971–979, maio 2015.

WEBB, C. J.; LLOYD, D. G. The avoidance of interference between the presentation of pollen and stigmas in angiosperms II. Herkogamy. **New Zealand Journal of Botany**, v. 24, n. 1, p. 163–178, jan. 1986.

WILLIAMS, N. M.; CRONE, E. E.; ROULSTON, T. H.; MINCKLEY, R. L.; PACKER, L.; POTTS, S. G. Ecological and life-history traits predict bee species responses to environmental disturbances. **Biological Conservation**, v. 143, n. 10, p. 2280–2291, out. 2010.

CAPÍTULO III - Desenvolvimento de marcadores microssatélites na planta carnívora *Genlisea aurea* (Lentibulariaceae) usando sequências genômicas NGS

Resumo

Genlisea aurea A.St.-Hil. é uma espécie de planta carnívora da família Lentibulariaceae. É endêmica do Brasil e está distribuída nas regiões serranas do cerrado e da mata atlântica, os biomas brasileiros mais frágeis sobre grave ameaça de destruição devido a expansão das fronteiras agrícolas e urbanas. Esta espécie possui o segundo menor genoma conhecido em plantas, com variações de tamanho entre populações. São poucos os estudos da estrutura genética e estado de conservação na família Lentibulariaceae, e nenhum no gênero *Genlisea*. Nesse trabalho foram desenvolvidos marcadores microssatélites baseados na análise *in silico* de bibliotecas *paired-end* de sequenciamento NGS do genoma de *G. aurea*. Foi empregado o algoritmo *SSR_pipeline* para identificar as repetições di, tri e tetranucleotídeos e se escolheram as sequências que possuem entre 8 e 14 repetições, com suas regiões flanqueantes. Foi extraído DNA de 5 populações e foram testados os *primers* por PCR. De 21 *loci* SSR analisados, 12 amplificaram em todos os indivíduos e mostraram polimorfismo. A heterozigosidade variou entre 0,050 e 0,913. Também demonstramos que estes marcadores SSR são transferíveis em *Genlisea filiformis*, *G. repens*, *G. tuberosa* e *G. violacea*. Estes marcadores permitirão realizar futuras análises genéticas populacionais, filogeográficas e estudos de conservação desta espécie e potencialmente em espécies relacionadas.

Palavras-chave: Conservação; diversidade genética; espécies endêmicas; marcadores moleculares; SSR.

Introdução

As espécies dos gêneros *Genlisea*, *Utricularia* e *Pinguicula* (Lentibulariaceae) compreendem a maior família de plantas carnívoras com aproximadamente 370 espécies conhecidas. No Brasil foram descritas 82 espécies de *Utricularia* e *Genlisea*, das quais 26 são endêmicas. *Genlisea* está distribuída na América Central e do Sul, e África. Porém, a maior diversidade de espécies encontra-se no Brasil com 17 espécies conhecidas (FLEISCHMANN, 2012; MIRANDA et al., 2015).

Genlisea aurea A.St.Hil. é uma bela representante deste gênero, a qual cresce como uma densa roseta geralmente coberta com mucilagem. Produz inflorescências com corolas amarelo-douradas, pela qual vem seu nome (Latim *aurea*=ouro). *G. aurea* é endêmica do Brasil e está distribuída entre o centro e sul do país, no cerrado brasileiro (MIRANDA et al., 2015).

O cerrado é um dos ecossistemas mais diversos no Brasil e no mundo, com 31,5% de espécies de angiospermas endêmicas. Das espécies conhecidas, 61 das espécies nativas de Lentibulariaceae ocorrem no cerrado, dos quais 20 são endêmicas (MIRANDA et al., 2015). A mata atlântica é o bioma com maior diversidade de angiospermas do Brasil das quais 49,5% são endêmicas (BFG et al., 2015). Contudo, estes são os dois biomas mais frágeis e ameaçados devido à redução do tamanho como resultado do urbanismo, mineração, agricultura e criação de gado (MYERS et al., 2000; KLINK; MACHADO, 2005; BFG et al., 2015).

As espécies de *Genlisea* apresentam pequenas rosetas desprovidas de raízes e que possuem dois tipos de folhas: folhas aéreas fotossintéticas e subterrâneas não fotossintéticas. Estas últimas são estruturas especializadas chamadas rizófilos ou folhas utriculíferas, que apresentam geotropismo positivo (FLEISCHMANN, 2012). As folhas utriculíferas são tubulares em forma de Y invertido, que permitem a fixação no solo e capturar pequenos organismos (PŁACHNO et al., 2008), como microcrustáceos, ácaros e nemátodos (DARWIN, 1899; LLOYD, 1976; JUNIPER; ROBINS; JOEL, 1989) algas, cianobactérias e protozoários (BARTHLOTT et al., 1998; PŁACHNO; WOŁOWSKI, 2008), como fontes de nutrientes (BARTHLOTT et al., 1998; ADAMEC, 2008).

As características genômicas das espécies de *Genlisea* são muito interessantes, no caso *G. aurea* tem o segundo menor genoma conhecido em plantas, de 64 Mpb, e este tamanho apresenta variação entre populações (GREILHUBER et al., 2006; LEUSHKIN et al., 2013; FLEISCHMANN et al., 2014). Além do crescente interesse pelos estudos genômicos, atualmente não existem estudos sobre a estrutura genética de populações naturais de espécies de *Genlisea*.

Os microssatélites são uma excelente alternativa para se estimar a diversidade genética (ABDUL-MUNEER, 2014). Porém, o desenvolvimento destes marcadores pode ser muito trabalhoso e comumente, empregam-se protocolos de prospecção *in vitro* no genoma ou em sequências expressas (GUICHOUX et al., 2011), por meio de bibliotecas de enriquecimento de repetições em tandem (BILLOTTE et al., 1999) ou bibliotecas de EST (PASHLEY, 2006). O crescente sequenciamento de última geração NGS disponibiliza informação para o desenvolvimento de estudos populacionais (MILLER et al., 2013). Existem diferentes tipos de bibliotecas por NGS; o *pair-end* é um muito empregado e está baseado na construção de bibliotecas com fragmentos do genoma, que depois são sequenciados nos extremos para alinhar estas leituras *forward* e *reverse* que constituem pares de *reads* (ILLUMINA, 2016). O uso deste tipo de dados genômicos permite diminuir o tempo e os custos no desenvolvimento de microssatélites.

Marcadores microssatélites foram identificados na família Lentibulariaceae em *Utricularia reniformis* A.St.-Hil., e estes mostraram transferibilidade em outras espécies de *Utricularia* (CLIVATI et al., 2012). Porém, neste trabalho se determinou que estes marcadores não são transferíveis à *G. aurea* e *G. violacea*. Neste trabalho, se apresentam 12 marcadores microssatélites polimórficos desenvolvidos em *G. aurea* a partir de dados de sequenciamento NGS. Estes novos marcadores SSR permitirão realizar futuros estudos de diversidade genética em populações de *G. aurea* e espécies relacionadas.

Material e Métodos

Busca *in silico*

Foi realizada uma busca *in silico* de sequências repetidas em tandem presentes nas leituras obtidas de bibliotecas *pairen-end* do sequenciamento do genoma *high-throughput* Illumina de *G. aurea* feito por Michael et al. (www.genlisea.org - dados não publicados). Esta busca foi feita com o algoritmo *SSR_pipeline* (MILLER et al., 2013) empregando como critério de busca sequências com repetições di, tri e tetranucleotídeos com sequências flanqueantes de 50pb e sequências entre 5 e 20 repetições. Depois, foram selecionadas manualmente as sequências entre 8 e 16 repetições (Tabela 3.1)

Tabela 3.1. Número de sequências com *SSR* encontrados em cada etapa.

	<i>SSR_pipeline</i>	Seleção manual	Seleção por desenho de <i>primers</i>
Dinucleotídeos	109.872	264	8
Trinucleotídeos	55.931	140	9
Tetranucleotídeos	7.974	57	4
Total	173.777	461	21

Posteriormente foram desenhados *primers* para amplificar essas regiões empregando a ferramenta que emprega BLAST e Primer3 no NCBI (YE et al., 2012). Durante o desenho foram selecionadas 21 sequências caracterizadas por gerar produtos hipotéticos maiores a 100pb (Tabela 3.3). Os *primers* foram escolhidos pelo tamanho entre 20 e 22 nucleotídeos, por ter diferenças de temperatura de anelamento menor a 5 °C entre o *forward* o *reverse*, %GC entre 45-55% e por não apresentar anelamento entre *primers* nem estruturas secundárias.

Extração de DNA

Para o teste foi extraído DNA total de cinco indivíduos de cinco populações diferentes. As populações são originárias de diferentes localidades dos Estados da Bahia, Goiás e São Paulo. O tecido foi coletado e desidratado em sílica gel e as extrações foram realizadas com o protocolo de cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) (LODHI et al., 1994). Os DNAs foram quantificados espectrofotometricamente em NanoDrop (NanoDrop 800, Thermo Scientific Corp, San Jose, CA, USA). Os *vouchers* foram depositados no herbário JABU (UNESP, Jaboticabal).

Tabela 3.2. Populações estudadas.

População	Localidade	Coordenadas geográficas	<i>n</i>
-----------	------------	----------------------------	----------

População 1 var. aurea	Cachoeira da Fumaça, Parque Nacional Chapada Diamantina. Município Lençóis, Bahia.	12°36'3.8"S 41°27'21.2"O	4
População 2 var. aurea	Trilha do Pico das Almas, Parque Nacional Chapada Diamantina. Município Rio de Contas, Bahia.	13°31'13.1"S 41°56'19.0"O	5
População 3 var. aurea	Pico das Almas, Parque Nacional Chapada Diamantina. Município Rio de Contas, Bahia.	13°31'25.1"S 41°57'32.9"O	5
População 4 var. aurea	Campos do Jordão, Serra da Mantiqueira. Município Campos do Jordão, São Paulo.	22°46'11.60"S 45°31'50.70"O	5
População 5 var. minor	Paralelo 14, Parque Nacional Chapada dos Veadeiros. Município Alto Paraíso, Goiás.	14° 6'48.20"S 47°38'17.10"O	4

Teste dos *primers*

Os *primers* foram testados nos indivíduos das cinco populações. Estabeleceu-se o perfil térmico de cada par de *primer*, fizeram-se as primeiras PCRs e quando foi necessário foram realizados ajustes nas condições das PCRs. Os produtos das PCR foram separados e visualizados em géis de agarose a 3% com 0,2 µg/mL de brometo de etídeo e buffer TAE 1X, corridos durante 1 hora a 85V.

Desenho de *primers* por sistema de cauda M13

Depois de testar os SSR por PCR, foram selecionados os *primers* que amplificaram bandas específicas e os que mostraram polimorfismo. A partir dos *loci* amplificados foi feita uma modificação dos *primers forward*, adicionando uma cauda ou sequência tipo M13 (CACGACGTTGTAAAACGAC) no extremo 5' (Tabela 3.4, SCHUELKE, 2000). Além disso, foram sintetizados três *primers* com unicamente a

sequência M13 e uma marcação no 6-FAM-, HEX- ou NED- azul, verde e amarela, respectivamente) (Applied Biosystems) no extremo 5' de cada (Figura 3.1).

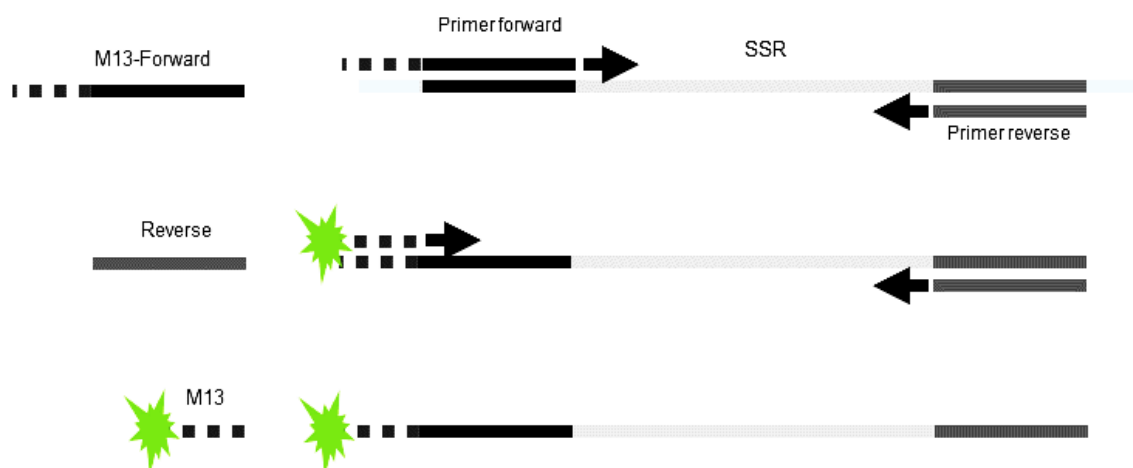


Figura 3.1. Sistema de *primer* com cauda M13.

Genotipagem

As 12 regiões microssatélites foram amplificadas em reações individuais em 10µL, usando 1X de tampão para PCR (10 mM Tris pH 8.4, 50 mM KCl, 3 mM MgCl₂), 0,2 µM de *primer* M13-*forward*, 0,8 µM de *primer* reverse, 0,8 µM *primer* M13 marcado com fluorescência, 0,15 mM de dNTPs, 0,5 U polimerase e 30 ng de DNA. Os perfis térmicos de amplificação foram estruturados da seguinte forma: desnaturação inicial a 94 °C por 4 min; seguido de 35 ciclos de 30s a 94 °C, 45s a 45-50 °C, e 45 a 72 °C, com uma extensão final de 72 °C por 5 min.

Depois foram preparadas placas de 96 poços com a mistura de produtos de três PCR marcados com fluorescências diferentes (0,5µL de cada), 0,5µL de *ladder* GeneScan™ 500 ROX (Applied Biosystems) e 8µL formamida. A separação e identificação dos *amplicons* foi feita por eletroforese capilar num sequenciador ABI 3730 XL DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, California (CA)), e a genotipagem foi feita usando o programa Gene Mapper (BIOSYSTEMS, 2005) no

Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO) na UNESP Jaboticabal.

Transferibilidade

Também foi testada a transferibilidade destes SSR em três indivíduos de quatro espécies relacionadas: *G. filiformis* A.St.-Hil., *G. repens* Benj., *G. tuberosa* Rivadavia, Gonella & A.Fleischm., e *G. violacea* A.St.-Hil. Para isso foram utilizadas as mesmas características de reação e genotipagem empregadas em *G. aurea*.

Análise de dados

A partir dos dados de genotipagem se estimou o tamanho das sequências com a cauda M13, o número de *locus* (k), e heterozigosidade observada e esperada (H_o e H_e), empregando o programa GenAEx 6.5 (PEAKALL; SMOUSE, 2012). Além disso, foi calculado o desvio por equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) com o programa GENEPOP 4.2 program (<http://genepop.curtin.edu.au/>) e foram determinados os alelos nulos com o programa Micro-Checker (VAN OOSTERHOUT et al., 2004).

Tabela 3.3. Características dos 12 *loci* de microssatélites polimórficos para *Genlisea aurea* calculados com o Primer3. *Primers forward* (F) e *reverse* (R). O tamanho dos fragmentos estão apresentados em pares de bases.

Nome	Sequência	Tm	%GC	Tamanho (pb)	Motif
Gar01	F:CTTCGAACCAGTCACAAGCG	49	55	121	GT-16
	R: GACATGTTCGAGCGAGGCAA	49	55		
Gar02	F:CCAAGCAACACCACCACAAC	49	55	139	TC-16
	R:CCTGACCCTGAACTTGTTTTGT	48	46		
Gar03	F:ACAGGGGAATACTCTGCACT	47	50	100	AT-16
	R:CTGGTTCATTCGCGCACAAG	49	55		

Gar04	F:AGAACAATGGCACCAGCATT	45	45	109	TA-15
	R:TAGGAGCTCGGCTCAGATTT	47	50		
Gar05	F:GCTAGACATATGCAATCCCA	45	50	151	CA-15
	R:CGCACGAAGTCACCATTTAG	47	45		
Gar06	F:TAGTGGCAGTGTACTTGCGG	49	55	127	TA-11
	R:TATCCGTTGTGGACTTCGGC	49	55		
Gar07	F:TTTGCACTCCGCGTCTATCT	47	50	125	TG-14
	R:CATCGCGTTGCTAACGAACA	47	50		
Gar08	F:TTTGCACTCCGCGTCTATCT	49	52	140	TG-14
	R:GGAACCTCGTCCACGAAGAA	49	55		
Gar09	F:ATAATCTATTTCTAACCCTACG	43	30	104	TCC-12
	R:GGTTTTGAAAAGCAGGATCT	43	40		
Gar10	F:AACCACTACGCTTTGTCCTC	47	50	108	TCC-12
	R:CGTTCATTTCTTTCTGCGGT	43	55		
Gar11	F:AGGAGACACTTCATTCTGCTGC	47	50	113	CCT-12
	R:GTTGAGACCAGTGCATCAGC	49	55		
Gar12	F:CAACCCCAAACAACATCATCCA	48	45	117	ATT-11
	R:TGCTGCTTAGTGCAACAACAA	45	43		
Gar13	F:TGGCTAACATTGGCTCTATCT	45	43	133	TGA-11
	R:GCCGTGTTTACCTTCA	47	48		
Gar14	F:AAGAAGGCATAGGCACCACG	49	55	115	CAT-11
	R:CCGCTGGATTTGCTCCTTCT	49	55		
Gar15	F:CCAATCGCATTACACCACCC	49	55	111	ATG-11
	R:CCAGAACTGGATTCGCCCT	49	55		
Gar16	F:TCCATCAGACAGTCAACCAGG	49	52	142	CAT-11
	R:CCGGTAAGTAAGGGTCATGT	47	50		
Gar17	F:TCCGCTTCCTTCGACCTTAG	49	55	131	CTT-11
	R:GCGGACTTTAGACACAGAAGG	50	50		
Gar18	F:GGCACCGTTTTGAGTTTCG	49	55	111	TACA-9
	R:GCGTACCTGGTTAGGTTGCT	49	55		
Gar19	F:TGAAGGAGGTCGTCGGGG	50	67	126	ATGA-8
	R:ACATGGGAATGGGAACGACA	47	50		
Gar20	F:TTCGAATCAGTGAGCCC	42	53	100	CTTT-8
	R:AACCTATTGCAGGCAGTCATC	45	45		
Gar21	F:CTGGCCATTGACATCGGGTA	49	55	90	ATTC-8
	R:TGTCTGAAAGACGACAACCA	45	45		

Tabela 3.4. Sequência de *primer forward* com cauda M13 no extremo 5'.

Nome do oligonucleotídeo	Sequência
GAR6F	CACGACGTTGTAAAACGACTAGTGGCAGTGTACTTGCGG
GAR8F	CACGACGTTGTAAAACGACTGTCCTCTGGAACCTCTACCA
GAR11F	CACGACGTTGTAAAACGACAGGAGACACTTCATTCTG
GAR12F	CACGACGTTGTAAAACGACCAACCCCAACATCATCCA
GAR14F	CACGACGTTGTAAAACGACAAGAAGGCATAGGCACCACG
GAR15F	CACGACGTTGTAAAACGACCCAATCGCATTACACCACCC
GAR16F	CACGACGTTGTAAAACGACTCCATCAGACAGTCAACCAGG
GAR17F	CACGACGTTGTAAAACGACTCCGCTTCCTTCGACCTTAG
GAR18F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCACCGGTTTTGAGTTTCG
GAR19F	CACGACGTTGTAAAACGACTGAAGGAGGTCGTCGGGG
GAR20F	CACGACGTTGTAAAACGACTTCGAATCAGTGAGCCC
GAR21F	CACGACGTTGTAAAACGACCTGGCCATTGACATCGGGTA
M13	CACGACGTTGTAAAACGAC

Resultados

Na busca *in silico* foram encontrados um total de 173.777 sequências com di, tri e tetra nucleotídeos repetidos em tandem, e selecionadas 461 sequências com 8 a 16 repetições. Dos 21 *loci* testados em 24 espécimes, 12 são polimórficos (Tabela 3.5).

Tabela 3.5. Características dos microssatélites polimórficos para *Genlisea aurea*. N, número de amostras; k, número de alelos; Ho e He, heterozigosidade observada e esperada; F null, frequência de alelos nulos ($P < 0.05$).

Locus	Primer sequence 5'-3'	Repeat motif	Size (bp)	N	k	Ho	He	F null
Gar06	F:TAGTGGCAGTGTACTTGCGG R:TATCCGTTGTGGACTTCGGC	TA	113-165	22	8	0,636	0,799	0,090
Gar08	F:TTTGCACTCCGCGTCTATCT R:GGAACCTCGTCCACGAAGAA	TG	132-170	23	6	0,391	0,707	0,185
Gar11	F:AGGAGACACTTCATTCTG	CCT	102-153	16	9	0,400	0,756	0,203

	R:GTTGAGACCAAGTGCATCAGC								
Gar12	F:CAACCCCAAACAACATCATCCA R:TGCTGCTTAGTGCAACAACAA	ATT	98-163	22	9	0,364	0,757	0,224	
Gar14	F:AAGAAGGCATAGGCACCACG R:CCGCTGGATTTGCTCCTTCT	CAT	89-144	24	12	0,500	0,783	0,159	
Gar15	F:CCAATCGCATTACACCACCC R:CCAGAACTGGATTTGCCCCT	ATG	112-169	22	12	0,273	0,855	0,314	
Gar16	F:TCCATCAGACAGTCAACCAGG R:CCGGTAAGTAAGGGTCATGT	CAT	142-169	23	6	0,913	0,756	-0,089	
Gar17	F:TCCGCTTCCTTCGACCTTAG R:GCGGACTTTTAGACACAGAAGG	CTT	66-117	22	3	0,136	0,274	0,1079	
Gar18	F:GGCACCGGTTTTGAGTTTCG R:GCGTACCTGGTTAGGTTGCT	TACA	101-133	18	6	0,833	0,679	-0,092	
Gar19	F:TGAAGGAGGTCGTCGGGG R:ACATGGGAATGGGAACGACA	ATGA	102-146	20	6	0,050	0,649	0,363	
Gar20	F:TTCGAATCAGTGAGCCC R:AACTATTGCAGGCAGTCATC	CTTT	95-107	24	4	0,083	0,672	0,352	
Gar21	F:CTGGCCATTGACATCGGGTA R:TGTCTGAAAGACGACAACCA	ATTC	97-109	22	6	0,182	0,667	0,291	

O número de alelos variou de três até doze alelos. A heterozigosidade observada variou de 0,050 a 0,913, e a heterozigosidade esperada de 0,274 a 0,855. Um desvio significativo de HWE ($P < 0,05$) foi detectado para 11 loci, e 10 loci mostraram potencial alelos nulos ($P < 0,05$).

Também foi testada a transferibilidade destes SSR em três indivíduos de quatro espécies relacionadas: *G. filiformis* A.St.-Hil., *G. repens* Benj., *G. tuberosa* Rivadavia, Gonella & A. Fleischm., e *G. violacea* A.St.-Hil. Todos os loci mostraram transferibilidade, e apenas quatro foram parcialmente positivos (*locus* Gar08 foi negativo para *G. repens*, Gar11 para *G. filiformis*, Gar16 para *G. tuberosa*), com Gar18 positivo apenas em *G. violacea* (Tabela 3.6). Porém, deveriam ser realizadas mais análises para determinar a utilidade destes SSR na estimação de diversidade genética em outras espécies.

Tabela 3.6. Transferibilidade de amplificação em *Genlisea filiformis*, *G. tuberosa* e *G. violacea* usando marcadores microsatélites desenvolvidos para *G. aurea*. Os valores

indicam o tamanho dos fragmentos em pares de base (pb). Três indivíduos foram testados em cada espécie. Os *primers* que não amplificaram estão indicados com na.

Locus	<i>G. filiformis</i>	<i>G. repens</i>	<i>G. tuberosa</i>	<i>G. violacea</i>
Gar06	175	190-210	210	100
Gar08	120	na	120	120
Gar11	na	100	100	150
Gar12	350	260	250	260
Gar14	110	110	110	110
Gar15	130	130	130	130
Gar16	180-200	150	na	150
Gar17	160	180	160	160
Gar18	na	na	na	120
Gar19	100	100	100	100
Gar20	100	100	100	150
Gar21	80	80	80	80

Conclusões

O presente trabalho resultou em doze marcadores microssatélites para *Genlisea aurea*, os quais podem ser empregados para futuros estudos em filogeografia e conservação. Além disso, nosso estudo demonstra que esses microssatélites são transferíveis em outras espécies de *Genlisea* como *G. filiformis*, *G. repens*, *G. tuberosa* e *G. violacea*. Assim, esses marcadores são potencialmente úteis para análises de diversidade dessas espécies e espécies relacionadas.

Referências

- ABDUL-MUNEER, P. M. Application of Microsatellite Markers in Conservation Genetics and Fisheries Management: Recent Advances in Population Structure Analysis and Conservation Strategies. **Genetics Research International**, v. 2014, n. 6, p. 1–11, 2014.
- ADAMEC, L. Soil fertilization enhances growth of the carnivorous plant *Genlisea violacea*. **Biologia**, v. 63, n. 2, p. 201–203, 1 jan. 2008.
- BARTHLOTT, W.; POREMBSKI, S.; FISCHER, E.; GEMMEL, B. First protozoa-trapping plant found. **Nature**, v. 392, n. 6675, p. 447–447, abr. 1998.
- BFG; FORZZA, R. C.; GRACINEIDE, S. S.; RAFAEL, F.; FLÁVIO, M.; MARIA, C. E.; ANDRÉ, M.; IVANILZA, M.; REGINA, H. P.; ELISETE, A.; LIDYANNE, Y. S.; FILHO, A.; JOÃO, L. M.; ANDREA, O.; ARICLENES, A. M.; MARÍA, M.; MARTA, C.; VIVIAN, A.; LUCAS, A. V.; MICHEL, J. F.; JOSÉ, F. A.; LUIS, C.; PAUL, E.; RAFAEL, A. X.; ROSELI, L. C.; CLÁUDIA, P.; JAMES, L.; MARIA, R. C.; RICARDO, S.; DOUGLAS, C.; STEFANO, D.; RODRIGO, D.; JULIE, H. A.; VALQUÍRIA, F. Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. v. 66, n. 4, 2015.
- BILLOTTE, N.; LAGODA, P. J. L.; RISTERUCCI, A. M.; BAURENS, F. C. Microsatellite-Enriched Libraries : Applied Methodology for the Development of SSR Markers in Tropical Crops. **Fruits**, v. 54, n. 4, p. 277–288, 1999.
- BIOSYSTEMS, A. **GeneMapper® Software**, 2005. .
- CLIVATI, D.; GITZENDANNER, M. A.; HILSDORF, A. W. S.; ARAÚJO, W. L.; OLIVEIRA DE MIRANDA, V. F. Microsatellite markers developed for *Utricularia reniformis* (Lentibulariaceae). **American journal of botany**, v. 99, n. 9, p. e375–8, set. 2012.

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

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

FLEISCHMANN, A.; MICHAEL, T. P.; RIVADAVIA, F.; SOUSA, A.; WANG, W.; TEMSCH, E. M.; GREILHUBER, J.; MULLER, K. F.; HEUBL, G. Evolution of genome size and chromosome number in the carnivorous plant genus *Genlisea* (Lentibulariaceae), with a new estimate of the minimum genome size in angiosperms. **Annals of Botany**, v. 114, n. 8, p. 1651–1663, 1 dez. 2014.

GREILHUBER, J.; BORSCH, T.; MÜLLER, K.; WORBERG, A.; POREMBSKI, S.; BARTHLOTT, W. Smallest Angiosperm Genomes Found in Lentibulariaceae, with Chromosomes of Bacterial Size. **Plant Biology**, v. 8, n. 6, p. 770–777, nov. 2006.

GUICHOUX, E.; LAGACHE, L.; WAGNER, S.; CHAUMEIL, P.; LÉGER, P.; LEPAIS, O.; LEPOITTEVIN, C.; MALAUSA, T.; REVARDEL, E.; SALIN, F.; PETIT, R. J. Current trends in microsatellite genotyping. **Molecular Ecology Resources**, v. 11, n. 4, p. 591–611, 2011.

ILLUMINA. **An Introduction to Next-Generation Sequencing Technology**. Disponível em: <<http://www.illumina.com/technology/next-generation-sequencing.html>>.

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

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. A conservação do Cerrado brasileiro. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 147–155, 2005.

LEUSHKIN, E. V.; SUTORMIN, R. a; NABIEVA, E. R.; PENIN, A. a; KONDRASHOV, A. S.; LOGACHEVA, M. D. The miniature genome of a carnivorous plant *Genlisea aurea* contains a low number of genes and short non-coding sequences. **BMC genomics**, v. 14, n. 1, p. 476, jan. 2013.

LLOYD, F. E. **The carnivorous plants**. New York: Dover Publications, Inc., 1976.

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, mar. 1994.

MILLER, M. P.; KNAUS, B. J.; MULLINS, T. D.; HAIG, S. M. SSR_pipeline: A Bioinformatic Infrastructure for Identifying Microsatellites From Paired-End Illumina High-Throughput DNA Sequencing Data. **Journal of Heredity**, v. 104, n. 6, p. 881–885, 2013.

MIRANDA, V. F. O.; MENEZES, C. G.; SILVA, S. R.; DÍAZ, Y. C. A.; RIVADAVIA. **Lentibulariaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/FichaPublicaTaxonUC/FichaPublicaTaxonUC.do?id=FB146>>. Acesso em: 1 jan. 2016.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; DA FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, n. 6772, p.

853–858, 24 fev. 2000.

PASHLEY, C. H. EST Databases as a Source for Molecular Markers: Lessons from *Helianthus*. **Journal of Heredity**, v. 97, n. 4, p. 381–388, 22 jun. 2006.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GenALEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. **Bioinformatics**, v. 28, n. 19, p. 2537–2539, 2012.

PŁACHNO, B. A. J. P.; ISZKURNO, M. A. K. O.-K.; WIĄTEK, P. I. Ś.; ARNOWSKI, D. O. W. D. Prey Attraction In Carnivorous *Genlisea* (Lentibulariaceae). v. 50, n. 2, p. 87–94, 2008.

PŁACHNO, B.; WOŁOWSKI, K. Algae commensal community in *Genlisea* traps. **Acta Societatis Botanicorum Poloniae**, v. 77, n. 1, p. 77–86, 2008.

SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nature biotechnology**, v. 18, n. February, p. 233–234, 2000.

VAN OOSTERHOUT, C.; WF, H.; WILLS, D.; SHIPEY, P. Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes**, v. 4, p. 535–538, 2004.

YE, J.; COULOURIS, G.; ZARETSKAYA, I.; CUTCUTACHE, I.; ROZEN, S.; MADDEN, T. L. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. **BMC Bioinformatics**, v. 13, n. 1, p. 134, 2012.

CAPÍTULO IV – Genética populacional de *Genlisea violacea* A.St.-Hil. e *Genlisea aurea* A.St.-Hil. (LENTIBULARIACEAE)

Resumo

Genlisea é o gênero dentro da família Lentibulariaceae com menor número de espécies, formado por dois subgêneros: subgen. *Tayloria* e *Genlisea*. O subgênero *Tayloria* é endêmico do Brasil, e está formado por oito espécies, e a espécie tipo é *Genlisea violacea*. O subgênero *Genlisea* está dividido em três seções, uma delas a seção neotropical *Genlisea* é neotropical e a espécie tipo é *Genlisea aurea*. Estas espécies ocorrem no cerrado e na mata atlântica, uns dos biomas mais frágeis do mundo. De acordo com estudos genômicos e citogenéticos, algumas espécies, como *G. aurea*, possuem os menores genomas conhecidos em plantas, com variações de tamanho entre populações. Porém, até agora não havia estudos de genética populacional e nem se conhece praticamente seu estado de conservação. Neste trabalho foi estudada a estrutura genética de algumas populações de *G. violacea* (da Serra da Canastra, MG) e *G. aurea* (dos estados de Bahia, Minas Gerais, Goiás, São Paulo e Santa Catarina) e foi analisada a diversidade genética no contexto reprodutivo e geográfico. Nas populações de *G. violacea* estudadas, encontrou-se pouca variabilidade, como maior variação dentro que entre populações, que refletem o sistema reprodutivo misto e uma dispersão de pólen por meio dos polinizadores. No caso de *G. aurea*, a diversidade genética é média-baixa e também existe maior variação dentro que entre populações. Na estruturação genética de *G. aurea* se observa uma separação entre as populações da Bahia e do sul e centro oeste do país, possivelmente devido à barreira geográfica formada pelos vales do Rio de Contas, Rio Pardo e Rio Jequitinhonha, que limitam a dispersão de pólen entre as populações da Chapada Diamantina e das outras regiões. Portanto, o isolamento destas populações indica que necessitam atenção para sua conservação.

Palavras-chave: Conservação; diversidade genética; espécies endêmicas; estrutura populacional.

Introdução

Os gêneros *Pinguicula*, *Genlisea* e *Utricularia* constituem a família Lentibulariaceae que representa a maior família de plantas carnívoras (FLEISCHMANN; STAATSSAMMLUNG; MENZINGER, 2015; FLEISCHMANN, 2012). O Brasil é um centro de diversidade da família; porém, apenas ocorrem os gêneros *Genlisea* e *Utricularia* (TAYLOR, 1991; MCPHERSON, 2010). São 82 espécies de *Genlisea* e *Utricularia* que se distribuem em todos os biomas do Brasil, das quais 26 espécies são endêmicas (MIRANDA et al., 2015).

Genlisea é o gênero dentro da família com menor número de espécies e estão distribuídas nas Américas do Sul e Central, África e Madagascar (FISCHER; POREMBSKI; BARTHLOTT, 2000; FLEISCHMANN et al., 2011). Caracterizam-se por serem pequenas rosetas com folhas fotossintéticas e folhas modificadas em forma de Y invertido, subterrâneas que funcionam como armadilhas, que não possuem raízes e habitam ambientes subaquáticos e com poucos nutrientes (LLOYD, 1976; FROMM-TRINTA, 1979; JUNIPER; ROBINS; JOEL, 1989; FLEISCHMANN, 2012). As espécies de *Genlisea* são hermafroditas, têm duas anteras aderidas à corola, o ovário é súpero e o estigma é bilabiado com o lábio inferior cobrindo as anteras (FROMM-TRINTA, 1979; FLEISCHMANN, 2012). As corolas são amarelas, roxas ou brancas, bilabiadas e com um cálcio no lábio inferior (FROMM-TRINTA, 1979; FLEISCHMANN, 2012). Ademais, são poucos os estudos de biologia reprodutiva em espécies de *Genlisea*, porém as características florais e as observações feitas em campo indicam que são alógamas, e em cultivo podem se autopolinizar (FLEISCHMANN et al., 2011; FLEISCHMANN, 2012). Neste sentido, as flores bilabiadas, de cores amarelas e roxas, com cálcio e oferta de néctar são polinizadas por abelhas (FAEGRI; PIJL, 1979; PINHEIRO et al., 2014). Estas flores precisam de um polinizador para serem autopolinizadas, ou seja, são autógamas facultativas.

Existem dois subgêneros de *Genlisea*, subgen. *Tayloria* Fromm-Trinta e *Genlisea*. O subgênero *Tayloria* é endêmico do Brasil, e está formado por oito espécies (FLEISCHMANN et al., 2011; FLEISCHMANN, 2012), sendo *G. violacea* A.St.-Hil. a espécie tipo deste subgênero (FROMM-TRINTA, 1979). *G. violacea* ocorre no cerrado, nos Estados de Minas Gerais, São Paulo e Espírito Santo (MIRANDA et

al., 2015); porém nos últimos anos não houve registros em São Paulo e Espírito Santo (SPECIES LINK,). Nove espécies do subgênero *Genlisea* ocorrem no Brasil e duas são endêmicas (*G. aurea* e *G. tuberosa*; FLEISCHMANN, 2012). *G. aurea* é a espécie tipo do subgênero e ocorre no centro e sul do Brasil (Mato Grosso, Tocantins, Bahia, Goiás, Distrito Federal, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina) em regiões de altitude do cerrado e a mata atlântica (FLEISCHMANN et al., 2011; MIRANDA et al., 2015), contudo não se conhece o estado atual das populações e no caso do estado de Rio de Janeiro, apenas há registros históricos. Ambas as espécies, *G. violacea* e *G. aurea*, encontram-se relacionadas na Lista Oficial de Espécies da Flora do Estado de São Paulo Ameaçadas de Extinção (Resolução SMA Nº 48 de 22 de setembro de 2004).

O cerrado e a mata atlântica são biomas muito frágeis devido à transformação do território pelo desenvolvimento de atividades antrópicas, principalmente a agricultura, a pecuária e a urbanização (MYERS et al., 2000; KLINK; MACHADO, 2005). Estes biomas concentram uma alta concentração de endemismos (MYERS et al., 2000; BFG et al., 2015). Esta alta porcentagem de endemismos, assim como a acelerada perda de hábitat, coloca ao cerrado e à mata atlântica nos 25 *hotspot* de conservação do planeta (MYERS et al., 2000). Várias espécies de *Genlisea* e *Utricularia* se distribuem nestes biomas, em rios e ambientes úmidos, alagados e com poucos nutrientes (TAYLOR, 1989; FLEISCHMANN, 2012).

Pelas características do ambiente que habitam, as populações naturais de *Genlisea violacea* e *G. aurea* não se encontram em um contínuo, uma vez que ocupam locais muito úmidos e de altitude, podendo estar relativamente distribuídas em populações isoladas entre si. Mesmo assim, as atividades antrópicas podem estar contribuindo com esse isolamento e também afetar as relações ecológicas das espécies, deixando-as mais vulneráveis. Neste sentido, é muito importante conhecer a estrutura e dinâmica genética das espécies, com o emprego de marcadores microssatélites, por exemplo, para se entender sua diversificação e seu estado de conservação. Assim, o objetivo deste trabalho foi estudar a estrutura genética de algumas populações de *G. violacea* e *G. aurea*, e analisar a diversidade genética no contexto reprodutivo e geográfico.

Material e Métodos

Populações amostradas

No caso de *Genlisea violacea* foram coletados 112 indivíduos de três populações (duas com duas subpopulações) de três localidades no Parque Nacional Serra da Canastra no Estado de Minas Gerais, Brasil (Figura 1, Tabela 1). De *Genlisea aurea* foram coletados 111 indivíduos de nove populações de localidades nos Estados de Bahia, Goiás, Minas Gerais, Santa Catarina e São Paulo, Brasil (Figura 1, Tabela 1). As coletas foram realizadas com autorização do SISBIO N° 26938 e N°43985, do Instituto Chico Mendes/ MMA.

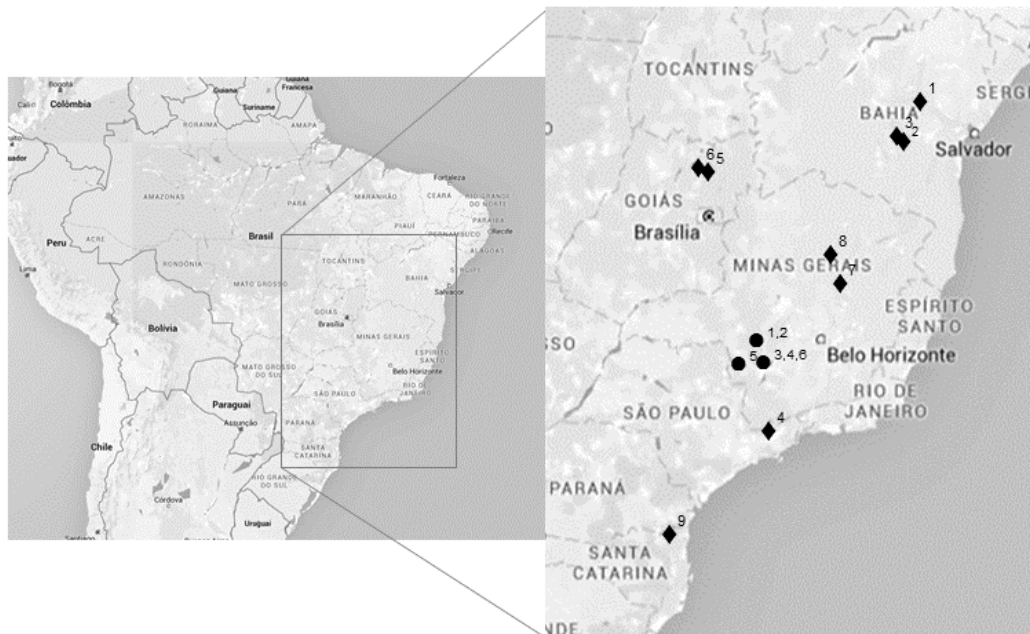


Figura 4.1. Localidade das populações estudadas. (●) Populações de *Genlisea violacea*; (◆) Populações de *Genlisea aurea*. Os números representam as populações conforme descritas na tabela 4.1.

Tabela 4.1. Populações de *Genlisea violacea* e *G. aurea* estudadas.

População (ano de coleta)	Localidade	Coordenadas geográficas	n
<i>G.violacea</i>			
População 1 (2013)	Nascente do Rio São Francisco, Parque Nacional Serra da Canastra. Município São Roque de Minas. Minas Gerais.	20°14'31.81"S 46°26'46.54"O	20
População 2 (2013)	Nascente do Rio São Francisco, Parque Nacional Serra da Canastra. Município São Roque de Minas. Minas Gerais.	20°14'31.81"S 46°26'46.54"O	15
População 3 (2013)	Cachoeira Diquadinha, lago de Furnas, Parque Nacional Serra da Canastra. Município Capitólio. Minas Gerais. 2013	20°38'32.6"S 46°15'49.0"O	21
População 4 (2014)	Cachoeira Diquadinha, lago de Furnas, Parque Nacional Serra da Canastra. Município Capitólio. Minas Gerais. 2014	20°38'32.6"S 46°15'49.0"O	20
População 5 (2015)	Delfinópolis, Município Delfinópolis, Minas Gerais.	20°21'3.32"S 46°51'20.74"O	20
População 6 (2015)	Cachoeira Diquadinha, lago de Furnas, Parque Nacional Serra da Canastra. Município Capitólio. Minas Gerais. 2015	20°38'32.6"S 46°15'49.0"O	16
<i>G.aurea</i>			
População 1 var. <i>aurea</i> (2014)	Cachoeira da Fumaça, Parque Nacional Chapada Diamantina. Município Lençóis, Bahia.	12°36'3.8"S 41°27'21.2"O	5
População 2 var. <i>aurea</i> (2014)	Trilha do Pico das Almas, Parque Nacional Chapada Diamantina. Município Rio de Contas, Bahia.	13°31'13.1"S 41°56'19.0"O	20
População 3 var. <i>aurea</i> (2014)	Pico das Almas, Parque Nacional Chapada Diamantina. Município Rio de Contas, Bahia.	13°31'25.1"S 41°57'32.9"O	18
População 4 var. <i>aurea</i> (2014)	Campos do Jordão, Serra da Mantiqueira. Município Campos do Jordão, São Paulo.	22°46'11.60"S 45°31'50.70"O	30
População 5 var. <i>minor</i> (2015)	Paralelo 14, Parque Nacional Chapada dos Veadeiros. Município Alto Paraíso, Goiás.	14° 6'48.20"S 47°38'17.10"O	16
População 6 var. <i>minor</i> (2015)	Paralelo 14, Parque Nacional Chapada dos Veadeiros. Município Alto Paraíso, Goiás.	13°56'43.30"S 47°29'40.10"O	16
População 7 var. <i>aurea</i> (2015)	Material de cultivo, coletado na Serra do Cipó. Município Santana do Riacho, Minas Gerais.	19°10'08.00"S 43°43'50.00"O	2
População 8 var. <i>minor</i> (2015)	Material de cultivo, coletado na estrada para Macacos (1.304 m), Município Diamantina, Minas Gerais, Brasil.	18°14'56.00"S 43°36'00.00"O	2
População 9 var. <i>aurea</i> (2015)	Serra do Quiriri. Município Guaruvá. Santa Catarina	20°01'37.00"s 48°51'18.00"O	2

Extração de DNA

O tecido foi coletado e desidratado em sílica gel e as extrações foram realizadas com o protocolo de cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) (LODHI et al., 1994). Os DNAs foram quantificados espectrofotometricamente em NanoDrop (NanoDrop 800, Thermo Scientific Corp, San Jose, CA, USA). Os *vouchers* foram depositados no Herbario JABU (UNESP, Jaboticabal).

Amplificação de microssatélites

Foram empregados 12 marcadores microssatélites *G. aurea* (Gar6, Gar8, Gar11, Gar12, Gar14, Gar15, Gar16, Gar17, Gar18, Gar19, Gar20 e Gar21) desenvolvidos no Laboratório de Sistemática Vegetal (Capítulo III). Cada microssatélite foi amplificado em cada indivíduo em reações de volume total de 10µL, usando 1X PCR *buffer* (10 mM Tris pH 8,4, 50 mM KCl, 3 mM MgCl₂), 0,2 µM de *primer* M13-*forward*, 0,8 µM de *primer reverse*, 0,8 µM *primer* M13 marcado com fluorescência (FAM, NED e HEX), 0,15 mM de dNTPs, 0,5 U polymerase e 30 ng de DNA. O perfil térmico da reação foi: desnaturação inicial a 94 °C por 4 min; seguido de 35 ciclos de 30s a 94 °C, 45s a 45-50 °C, e 45 a 72 °C, com uma extensão final de 72 °C por 5 min.

Genotipagem

Foram preparadas as amostras para genotipagem em placas de 96 poços misturando produtos de três PCR marcados com fluorescências diferentes (0,5µL de cada), 0,5µL de ladder GeneScan™ 500 ROX (Applied Biosystems) e 8µL formamida. A separação e identificação dos alelos amplificados foi feita por eletroforeses capilar num sequenciador ABI 3730 XL DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, California (CA)), e a genotipagem foi realizada usando o programa GeneMarker (SoftGenetix, State College, Pennsylvania, EUA).

Análise de diversidade genética

Inicialmente para as espécies estudadas foram calculadas as variáveis de diversidade genética para cada *locus* com os dados de todas as populações em conjunto. Assim, a partir dos dados de genotipagem foi calculado para cada *locus*: o número de alelos (N_a), o número de alelos efetivos (N_e , KIMURA; CROW, 1964), o índice de Shannon (I ; LEWONTIN, 1972), a heterozigosidade observada e esperada (H_o e H_e), a endogamia entre as populações (F_{is}), a endogamia total (F_{it}), a endogamia dentro das populações (F_{st}) e o fluxo genético (N_m ; NEI, 1987) empregando o programa GenAEx 6.5 (PEAKALL; SMOUSE, 2012) e pelo programa POPGENE 1.32 (YEH, 1999).

Para cada população foi estimado: o número de alelos (N_a), o número de alelos efetivos (N_e , KIMURA; CROW, 1964), o índice de Shannon (I , LEWONTIN, 1972), a heterozigosidade observada e esperada (H_o e H_e), e a endogamia (F ; NEI, 1987). Adicionalmente foi construída uma matriz fluxo genético entre populações por determinação do N_m com o aplicativo GenAEx 6.5 (PEAKALL; SMOUSE, 2012). Além disso, calculou-se para as espécies o desvio por equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) com o programa GENEPOP 4.2 (<http://genepop.curtin.edu.au/>) e se determinaram os alelos nulos com o programa Micro-Checker (VAN OOSTERHOUT et al., 2004). Finalmente, foi feita uma matriz de distâncias genéticas entre as populações (NEI, 1972) e com estas distâncias foi construído um dendograma pelo método UPGMA utilizando o programa POPGENE (YEH, 1999) e uma análise de coordenadas principais (PCO) em função das distâncias, empregando o aplicativo GenAEx 6.5 (PEAKALL; SMOUSE, 2012).

Estrutura genética de populações

A estrutura genética foi estudada por meio de uma análise bayesiana realizada com o programa Structure 2.3.4 (PRITCHARD; STEPHENS; DONNELLY, 2000). Para as análises foram rodadas 20.000 gerações (*Length of burnin period*) com 50.000 réplicas MCMC (*Markov Chain Monte Carlo*) empregando o modelo de ancestralidade *Admixture*, com K_{n+5} (K = número de *clusters*; n = número de populações amostradas) e o restante dos parâmetros de acordo com os valores predefinidos do programa.

Depois foi calculado o ΔK para determinar o melhor K , ou seja, o número de populações geneticamente estimadas (EVANNO; REGNAUT; GOUDET, 2005) com a ajuda do programa *Structure Harvester* (EARL; VONHOLDT, 2012).

Mesmo assim, foi avaliada a estrutura populacional com análises de variância molecular hierárquicas (AMOVA; EXCOFFIER; SMOUSE; QUATTRO, 1992) com auxílio do aplicativo GenAEx 6.5 (PEAKALL; SMOUSE, 2012). As AMOVAs foram realizadas entre as populações de cada espécie e entre grupos geográficos definidos pelo k determinado pelo ΔK com maior valor e com maior sentido biológico.

Resultados

Diversidade genética de *Genlisea violacea*

Os 12 *loci* analisados para todas populações em conjunto foram polimórficos em *Genlisea violacea*, e o número de alelos variou de três até treze (Tabela 4.2). A heterozigosidade observada variou de 0,018 a 0,618 e a heterozigosidade esperada de 0,251 a 0,841. A diversidade determinada pelo índice de Shannon variou de 0,475 a 2,039, sendo os *loci* Gar6, Gar8, Gar12 e Gar18 os que apresentaram maior diversidade alélica (Tabela 4.2). Todos os parâmetros calculados nos aplicativos GenAEx e POPOGENE tiveram os mesmos resultados.

A maior endogamia entre e dentro de populações assim como endogamia total foram detectadas nos *loci* Gar6, Gar15, Gar19 e Gar20, e o maior fluxo genético nos *loci* Gar8, Gar17 Gar19 e Gar21 (Tabela 4.2). Todos os *loci* estão em equilíbrio HWE ($P < 0,001$) e em correspondência com isso no conjunto de dados, todos os *loci* mostraram sinais de alelos nulos.

Tabela 4.2. Diversidade genética para cada *locus* *SSR* nas populações estudadas de *Genlisea violacea*. Na, número de alelos. Ne, número de alelos efetivos. I, índice de Shannon. Ho e He, heterozigosidade observada e esperada. Fis, Fit e Fst, endogamia entre as populações, total e dentro das populações, respectivamente. Nm, fluxo genético. Null, alelos nulos.

Locus	Na	Ne	I	Ho	He	Fis	Fit	Fst	Nm	Null
Gar6	11	4,000	1,695	0,093	0,754	0,860	0,880	0,146	1,469	0,736
Gar8	13	2,501	1,510	0,518	0,600	0,089	0,130	0,045	5,318	0,051
Gar11	8	1,635	0,911	0,243	0,389	0,329	0,368	0,058	4,042	0,105
Gar12	12	6,129	2,039	0,618	0,841	0,157	0,273	0,148	1,566	0,119
Gar14	8	2,024	1,056	0,342	0,508	0,277	0,318	0,057	4,150	0,109
Gar15	7	2,094	1,107	0,208	0,525	0,520	0,600	0,176	1,262	0,207
Gar16	8	1,923	1,008	0,388	0,482	0,120	0,156	0,063	3,708	0,062
Gar17	7	1,957	1,009	0,505	0,482	-0,066	-0,035	0,029	8,300	-0,010
Gar18	8	3,960	1,577	0,569	0,490	0,175	0,239	0,078	2,945	0,101
Gar19	7	2,185	1,038	0,018	0,545	0,967	0,968	0,041	5,816	0,340
Gar20	4	2,149	0,845	0,135	0,537	0,710	0,746	0,124	1,769	0,260
Gar21	3	1,336	0,475	0,138	0,251	0,386	0,414	0,045	5,273	0,090
Média	8	2,655	1,189	0,315	0,556	0,374	0,430	0,089	2,557	0,151

Ao analisar as populações de *G. violacea* se determinou que o número de alelos variou de 3,333 a 4,583, heterozigosidade observada variou de 0,224 a 0,346 e a heterozigosidade esperada de 0,415 a 0,550 (Tabela 4.3). A maior diversidade encontrada foi nas populações 1 e 4, e a maior endogamia nas populações 4, 5 e 6 (Tabela 4.3).

O maior fluxo genético se observou entre as populações 1 e 2, e entre as populações 5 e 6 (Tabela 4.4). O menor fluxo se observou entre as populações 3 e 5, as populações 2 e 3 e as populações 1 e 5 (Tabela 4.4).

Tabela 4.3. Diversidade genética para cada *locus SSR* nas populações de *Genlisea violacea* estudadas. Na, número de alelos. Ne, número de alelos efetivos. I, índice de Shannon. Ho e He, heterozigosidade observada e esperada. F, coeficiente de endogamia.

Locus	Na	Ne	I	Ho	He	F
Pop1	4,500	2,352	1,043	0,336	0,552	0,362
Pop2	3,833	2,163	0,901	0,334	0,478	0,263
Pop3	4,583	2,180	0,986	0,346	0,504	0,332
Pop4	4,417	2,664	1,057	0,319	0,550	0,438
Pop5	4,167	2,272	0,945	0,319	0,505	0,438
Pop6	3,333	1,953	0,750	0,224	0,415	0,473
Média	4,138	2,264	0,947	0,313	0,501	0,384

Tabela 4.4. Matriz de fluxo genético entre as populações estudadas de *Genlisea violacea*.

	Pop1	Pop2	Pop3	Pop4	Pop5	Pop6
Pop1	0,000					
Pop2	13,469	0,000				
Pop3	3,467	2,683	0,000			
Pop4	4,159	3,304	3,763	0,000		
Pop5	2,694	3,786	2,483	4,451	0,000	
Pop6	3,089	4,531	4,552	3,930	15,450	0,000

Como se observa na tabela 4.5 e nas figuras 4.2 e 4.3, segundo a distância genética, as populações 1 e 2 são as mais próximas, sendo as duas mais distantes que as demais. As populações 4 e 6 também ficam próximas entre si, e estas na sua vez mais próximas das populações 3 e 5, em comparação às populações 1 e 2. A população geneticamente mais distante das demais é a população 3.

Tabela 4.5. Matriz de distância genética das populações estudadas de *Genlisea violacea*. Identidade genética (sobre a diagonal) distância genética (abaixo da diagonal).

População	1	2	3	4	5	6
1	-	0,93	0,87	0,87	0,84	0,88
2	0,07	-	0,85	0,86	0,89	0,91
3	0,14	0,17	-	0,87	0,85	0,92
4	0,14	0,15	0,14	-	0,89	0,90
5	0,17	0,12	0,16	0,12	-	0,95
6	0,13	0,09	0,09	0,11	0,05	-

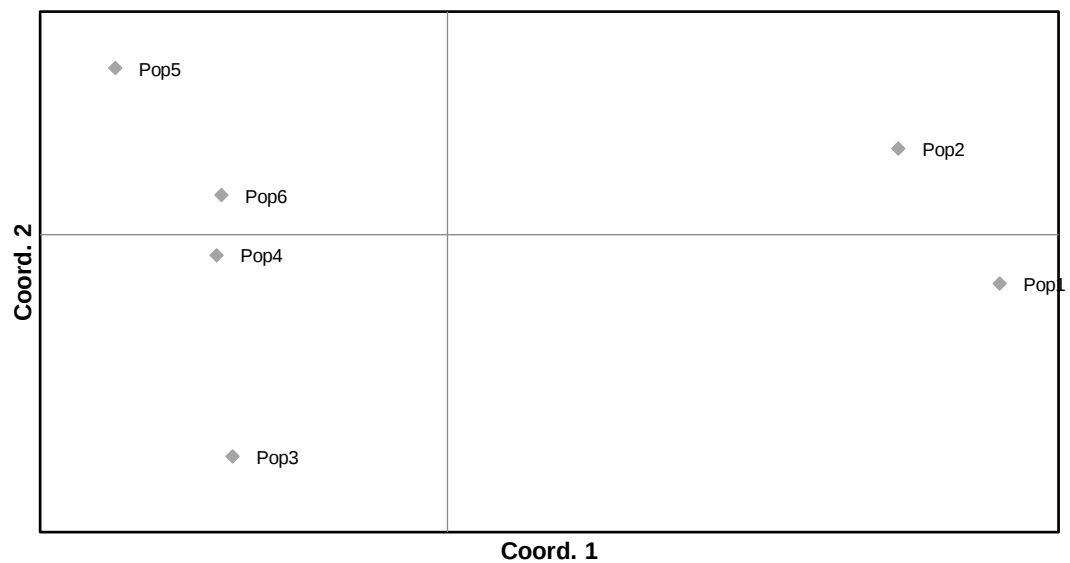


Figura 4.2. Análise de coordenadas principais das distâncias genéticas das populações de *Genlisea violacea*.

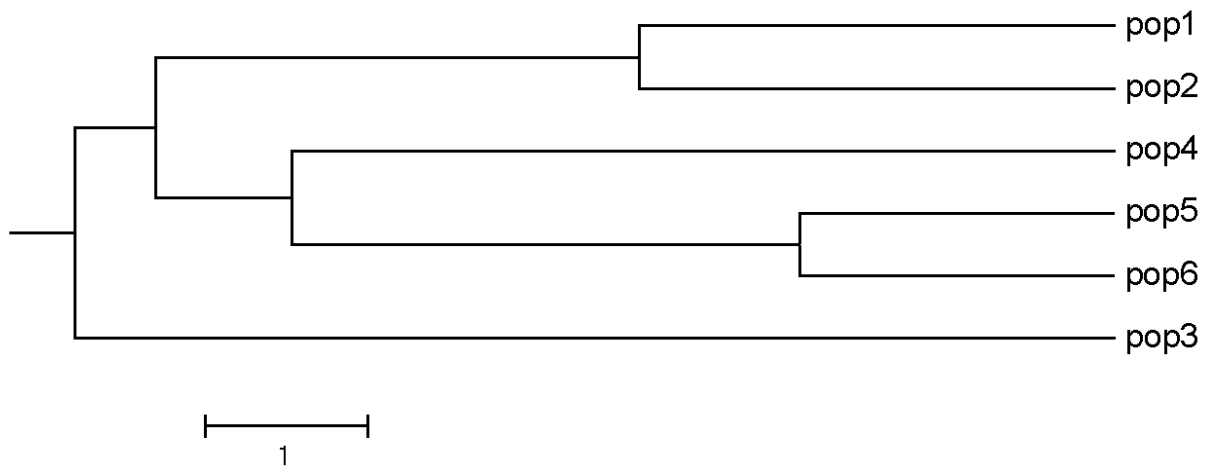


Figura 4.3. Agrupamento por distância genética de populações de *Genlisea violacea*.

Estrutura genética de *Genlisea violacea*

O cálculo de ΔK separou em *clusters* (K) as populações de *G. violacea* analisadas (Figura 4.4). O melhor *cluster* obtido, ou seja, com o maior ΔK (= 5,875), foi o $K = 10$. Porém, ao observar como se distribui essa estruturação nas populações, parece não haver suporte biológico. Neste sentido, o segundo mais alto é $\Delta K = 4,821$ para $K = 3$ e, ao observar como se distribui a estrutura e ao comparar com as distâncias genéticas calculadas e da distribuição geográfica das populações, este parece ter mais significado biológico.

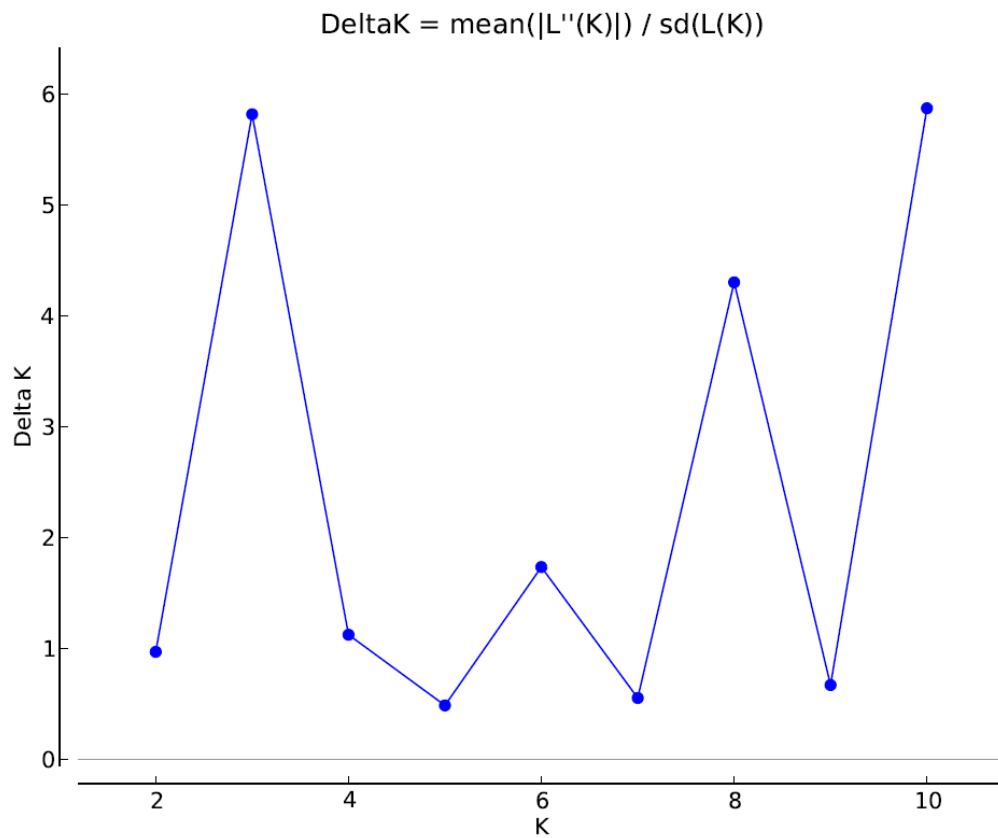


Figura 4.4. Valor ΔK ótimo de K clusters para *Genlisea violacea* ($\Delta K = 5,87$ em $K = 3$).

A estrutura genética inferida por análise bayesiana para $K = 3$ pode ser observada na figura 4.5, na qual se identifica uma primeira população genética formada pelas populações geográficas 1, 2 e 3 (predominante verde), a segunda formada pela população 4 e a terceira pelas populações 5 e 6. Também é possível observar que dentro de cada população genética há fenótipos semelhantes às outras populações.

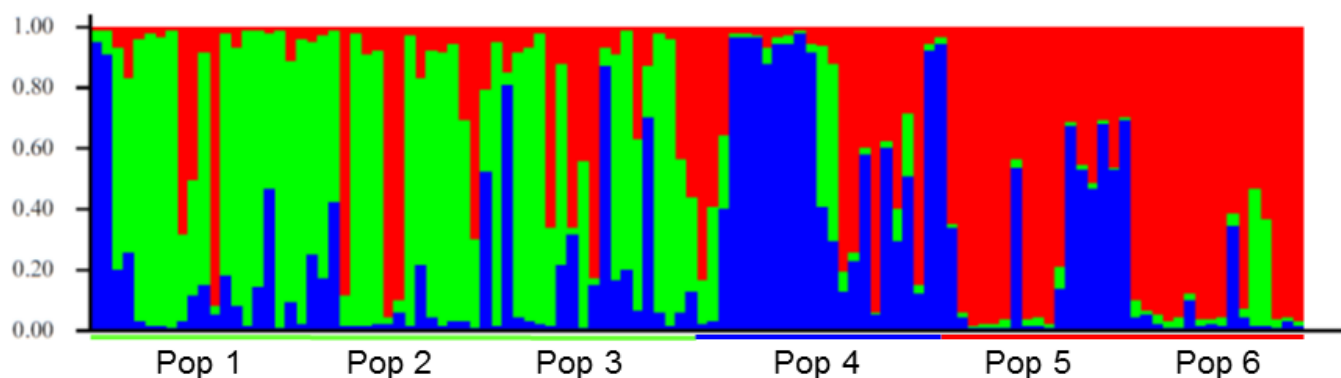


Figura 4.5. Estrutura genética de *Genlisea violacea* inferida por análise bayesiana. $K = 3$. $F_{st1} = 0,184$; $F_{st2} = 0,101$; $F_{st3} = 0,129$. Verde, população genética 1; azul, população genética 2; vermelho, população genética 3.

A AMOVA para as seis populações geográficas analisadas como um grupo indica que existem diferenças significativas entre populações; porém a porcentagem de variância entre populações é baixa, quando comparada a variância dentro das populações (Tabela 4.6).

Tabela 4.6. Análise de variância molecular hierárquica (AMOVA) para o conjunto de todas as populações estudadas de *Genlisea violacea*.

Fontes de variação	GL	SQ	MS	Variância	%	F	P
Entre populações	5	55,828	11,166	0,425	12	0,115	0,001
Dentro de populações	106	345,038	3,255	3,255	88		
Total	111	400,866					

Quando a AMOVA é feita com as três populações genéticas, que correspondem ao agrupamento bayesiano, observam-se diferenças significativas nos diferentes

grupos hierárquicos (Tabela 4.7). Contudo, existe pouca diferença na variação entre grupos geográficos ($\Phi_{st} = 0,066$; $P = 0,001$) e entre populações ($\Phi_{is} = 0,069$; $P = 0,001$). Entretanto, a variação dentro de populações é alta ($\Phi_{it} = 0,131$; $P = 0,001$).

Tabela 4.7. Análise de variância molecular hierárquica (AMOVA) para três grupos geográficos ($k = 3$) determinados por análise bayesiana das populações estudadas de *Genlisea violacea*.

Fontes de variação	GL	SQ	MS	Variância	%	F	P
Entre regiões	2	32,765	16,382	0,246	7	$\Phi_{st} = 0,066$	0,001
Entre populações	3	23,063	7,688	0,243	6	$\Phi_{is} = 0,069$	0,001
Dentro de populações	106	345,038	3,255	3,255	87	$\Phi_{it} = 0,131$	0,001
Total	111	400,866		3,744	100		

Diversidade genética de *Genlisea aurea*

Os 12 *loci* analisados para todas as populações de *Genlisea aurea* em conjunto foram polimórficos, e o número de alelos variou de seis a dezesseis (Tabela 4.8). A heterozigosidade observada variou de 0,168 a 0,600 e a heterozigosidade esperada de 0,348 a 0,861. A diversidade determinada pelo índice de Shannon variou de 0,795 a 2,198, sendo os *loci* Gar6, Gar8, Gar14 e Gar15 os que apresentaram mais diversidade alélica (Tabela 4.8).

Além disso, a maior endogamia entre e dentro de populações assim como endogamia total foi detectada nos *loci* Gar6, Gar14, Gar17 e Gar19 (Tabela 4.8). O maior fluxo genético nos *loci* Gar6, Gar14, Gar17 e Gar19 (Tabela 4.8). Todos os *loci* estão em equilíbrio HWE ($P < 0,001$) exceto o *locus* Gar21 que tem um desvio significativo de HWE ($P < 0,001$). Os *loci* Gar 20 e Gar21 não possuem alelos nulos (Tabela 4.8).

Tabela 4.8. Diversidade genética para cada *locus SSR* nas populações de *Genlisea aurea* estudadas. Na, número de alelos. Ne, número de alelos efetivos. I, índice de Shannon. Ho e He, heterozigosidade observada e esperada. Fis, Fit e Fst, endogamia entre as populações, total e dentro das populações. Nm, fluxo genético. Null, alelos nulos.

Locus	Na	Ne	I	Ho	He	Fis	Fit	Fst	Nm	Null
Gar6	14	6,825	2,198	0,418	0,857	0,261	0,492	0,312	0,550	0,235
Gar8	16	4,891	2,056	0,559	0,796	0,055	0,271	0,229	0,843	0,132
Gar11	12	4,922	1,906	0,600	0,797	0,101	0,360	0,289	0,616	0,110
Gar12	13	2,392	1,329	0,358	0,585	-0,103	0,342	0,404	0,370	0,141
Gar14	14	4,905	1,955	0,306	0,800	0,264	0,436	0,234	0,818	0,273
Gar15	12	6,972	2,172	0,587	0,861	-0,055	0,176	0,219	0,893	0,145
Gar16	8	3,187	1,474	0,432	0,689	0,171	0,465	0,355	0,454	0,151
Gar17	8	4,276	1,688	0,168	0,770	0,599	0,849	0,621	0,153	0,338
Gar18	7	4,844	1,680	0,585	0,797	-0,141	0,109	0,219	0,892	0,116
Gar19	6	2,999	1,344	0,304	0,669	0,265	0,531	0,362	0,441	0,217
Gar20	7	1,974	1,010	0,514	0,496	-0,105	0,065	0,154	1,379	-0,013
Gar21	7	1,530	0,795	0,315	0,348	-0,248	-0,025	0,179	1,146	0,023
Média	10	4,142	1,634	0,429	0,706	0,084	0,362	0,304	0,574	0,156

Nas populações de *G. aurea* se determinou que o número de alelos variou de 1,583 a 6,000, heterozigosidade observada variou de 0,375 a 0,583 e a heterozigosidade esperada de 0,281 a 0,640 (Tabela 4.9). A maior diversidade encontrada foi nas populações 4, 5 e 6, e a maior endogamia nas populações 2, 5 e 6 (Tabela 4.9).

O maior fluxo genético se observou entre as populações 4 e 6, e entre as populações 5 e 6 (Tabela 4.10). O menor fluxo se observou entre as populações 1 com as populações 7, 8 e 9, e entre a população 8 e população 9 (Tabela 4.10).

Tabela 4.9. Diversidade genética para cada *locus* SSR nas populações de *Genlisea aurea* estudadas. Na, número de alelos. Ne, número de alelos efetivos. I, índice de Shannon. Ho e He, heterozigosidade observada e esperada. F, coeficiente de endogamia.

Locus	Na	Ne	I	Ho	He	F
Pop1	2,667	2,084	0,751	0,467	0,450	-0,015
Pop2	4,917	2,873	1,167	0,441	0,598	0,300
Pop3	4,750	2,659	1,028	0,439	0,515	0,194
Pop4	6,000	3,129	1,302	0,453	0,640	0,262
Pop5	4,833	3,099	1,193	0,375	0,599	0,344
Pop6	5,250	3,043	1,221	0,376	0,593	0,336
Pop7	2,083	1,961	0,614	0,583	0,396	-0,467
Pop8	1,667	1,606	0,422	0,417	0,292	-0,448
Pop9	1,583	1,550	0,393	0,458	0,281	-0,619
Média	3,750	2,445	0,899	0,445	0,489	-0,013

Tabela 4.10. Matriz de fluxo genético entre as populações estudadas de *Genlisea aurea*.

	Pop1	Pop2	Pop3	Pop4	Pop5	Pop6	Pop7	Pop8	Pop9
Pop1	0,000								
Pop2	1,889	0,000							
Pop3	0,794	2,098	0,000						
Pop4	1,033	1,519	1,294	0,000					
Pop5	0,897	1,421	1,252	1,894	0,000				
Pop6	0,772	1,203	1,165	2,780	2,278	0,000			
Pop7	0,397	0,906	0,619	1,485	1,592	1,060	0,000		
Pop8	0,336	1,005	0,697	1,434	1,209	1,268	0,875	0,000	
Pop9	0,338	0,805	0,627	1,135	1,043	0,822	0,541	0,405	0,000

Como se observa na tabela 4.11 e nas figuras 4.6 e 4.7, segundo as distâncias genéticas as populações 1, 2 e 3 são as mais próximas entre si, porém mais distantes das demais, principalmente das populações 7, 8 e 9, e estas últimas três são mais

distantes às demais populações. Assim, segundo a distância parecem se formar três agrupamentos.

Tabela 4.11. Matriz de distância genética das populações estudadas de *Genlisea aurea* Identidade genética (sobre a diagonal) distância genética (abaixo da diagonal).

População	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	-	0,74	0,57	0,56	0,51	0,45	0,29	0,30	0,32
2	0,30	-	0,80	0,68	0,64	0,60	0,45	0,55	0,49
3	0,55	0,22	-	0,66	0,64	0,64	0,41	0,53	0,49
4	0,58	0,39	0,41	-	0,67	0,74	0,53	0,59	0,53
5	0,68	0,44	0,44	0,40	-	0,71	0,53	0,54	0,50
6	0,79	0,51	0,44	0,30	0,34	-	0,43	0,56	0,43
7	1,24	0,80	0,89	0,63	0,63	0,84	-	0,67	0,59
8	1,20	0,59	0,64	0,53	0,62	0,58	0,40	-	0,60
9	1,12	0,72	0,71	0,63	0,69	0,84	0,52	0,51	-

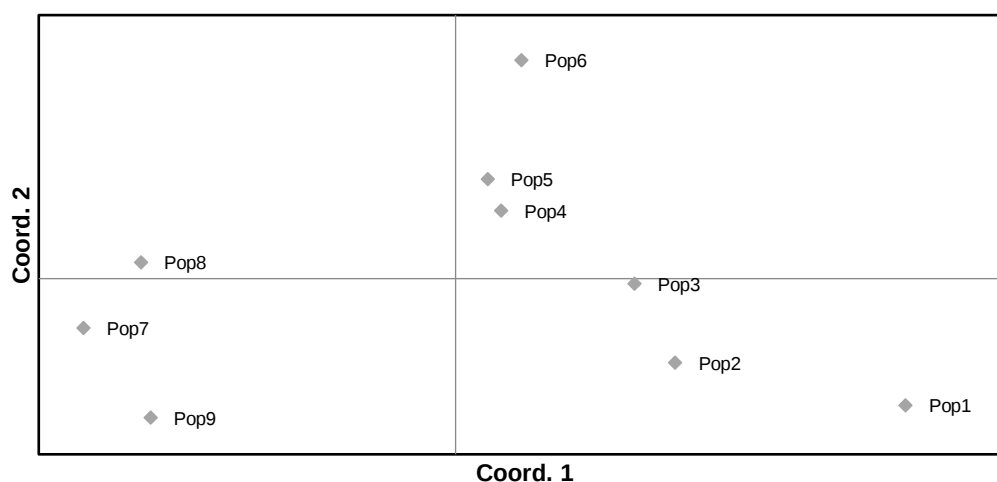


Figura 4.6. Análise de coordenadas principais das distâncias genéticas das populações de *Genlisea aurea*.

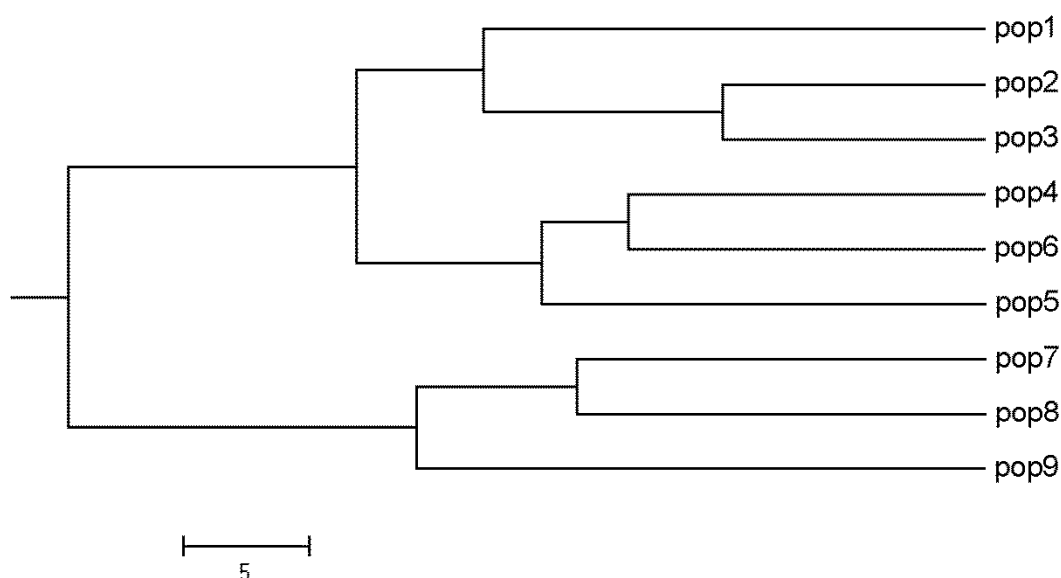


Figura 4.7. Agrupamento por distância genética de populações de *Genlisea aurea*.

Estrutura genética de *Genlisea aurea*

O cálculo de ΔK separou em *clusters* (K) as populações de *G. aurea* analisadas (Figura 4.8). O melhor *cluster*, ou seja, com o maior ΔK ($= 195,859$), é o $K = 2$ (Apêndice 2). Porém, ao observar como se distribui essa estruturação nas populações, parece não haver significado biológico (além de ser um valor muito distante dos demais de ΔK). O subsequente maior ΔK foi 55,956, de $K = 6$. Porém, nesta estruturação algumas populações geográficas ficam divididas em várias populações genéticas. Assim, o terceiro maior ΔK ($= 48,383$) foi escolhido, com $K = 3$, o qual é mais suportado pelas análises de distância genética assim como apresenta maior sentido biológico.

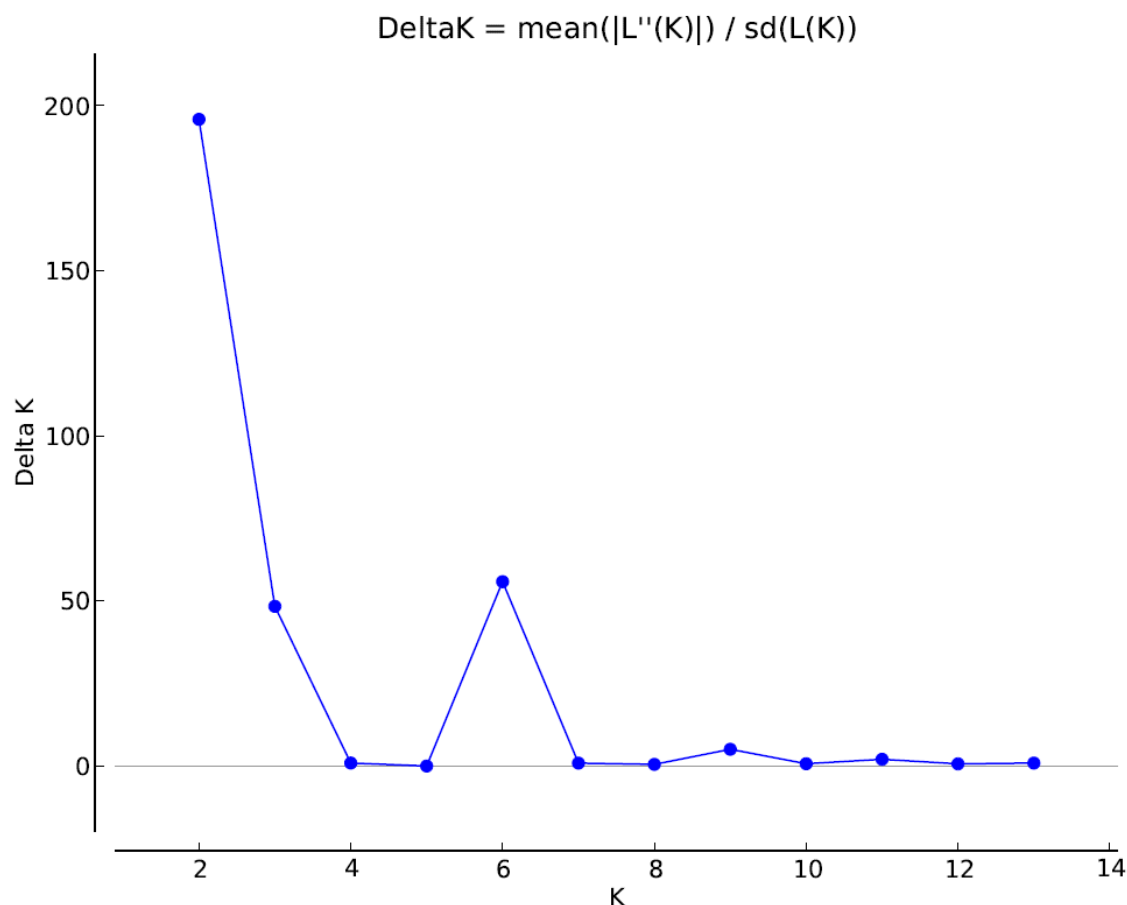


Figura 4.8. Valor ΔK ótimo de K clusters para *Genlisea aurea* ($\Delta K = 48,333$ em $K = 3$).

A estrutura genética inferida por análise bayesiana para $K = 3$ pode ser observada na figura 4.9, na qual se identifica uma primeira população genética formada pelas populações 1, 2 e 3 (predominante vermelha), a segunda formada pela população 4 (predominante azul) e a terceira pelas populações 5, 6, 7, 8 e 9 (predominante verde). Também é possível observar que dentro de cada população genética há alguns fenótipos semelhantes às outras populações.

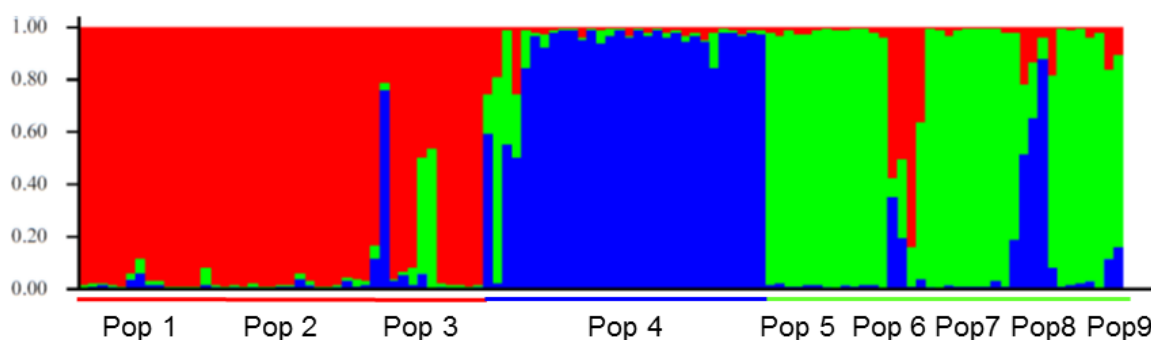


Figura 4.9. Estrutura genética de *Genlisea aurea* inferida por análise bayesiana, $K = 3$. $F_{st1} = 0,166$; $F_{st2} = 0,087$; $F_{st3} = 0,164$. Vermelho, população genética 1; azul, população genética 2; verde, população genética 3.

A AMOVA para as nove populações geográficas analisadas como um grupo indica que existem diferenças significativas entre populações, a porcentagem de variância entre populações é de 19%, e dentro de populações 81% (Tabela 4.12).

Tabela 4.12. Análise de variância molecular hierárquica (AMOVA) para o conjunto de todas as populações estudadas de *G. aurea*.

Fontes de variação	GL	SQ	MS	Variância	%	F	P
Entre populações	8	115,345	14,418	0,918	19	0,190	0,001
Dentro de populações	102	400,204	3,924	3,924	81		
Total	110	515,550					

Quando a AMOVA é feita com as três populações genéticas, que correspondem ao agrupamento bayesiano, se observam diferenças significativas nos diferentes grupos hierárquicos (Tabela 4.13). Contudo, existe maior diferença na variação entre populações ($\Phi_{is} = 0,176$; $P = 0,001$) que entre grupos geográficos ($\Phi_{st} = 0,021$; $P = 0,004$). Ademais, a variação dentro de populações é alta ($\Phi_{it} = 0,193$; $P = 0,001$).

Tabela 4.13. Análise de variância molecular hierárquica (AMOVA) para três grupos geográficos ($k = 3$) determinados por análise bayesiana das populações estudadas de *Genlisea aurea*.

Fontes de variação	GL	SQ	MS	Variância	%	F	P
Entre regiões	2	50,104	25,052	0,101	2	$\Phi_{st} = 0,021$	0,004
Entre populações	6	65,241	10,874	0,837	17	$\Phi_{is} = 0,176$	0,001
Dentro de populações	102	400,204	3,924	3,924	81	$\Phi_{it} = 0,193$	0,001
Total	110	515,550					

Discussão

Diversidade genética de *Genlisea violacea*

O uso de microssatélites é um protocolo que permite medir a diversidade genética e determinar o estado de conservação das populações (ABDUL-MUNEER, 2014). Os *loci* analisados refletem um alto polimorfismo e a diversidade genética é média-baixa nas populações estudadas de *G. violacea*, sendo que alguns *loci* como Gar6 e Gar19 que apresentam uma heterozigosidade observada bem menor que a teórica esperada (Tabela 4.2). Entretanto, para o *locus* Gar17 há um excesso de heterozigosidade observada e um valor negativo que indica endocruzamento com o mesmo genótipo. A presença de alelos nulos pode indicar que há muitos alelos e baixa heterozigosidade em alguns *loci*, indicando a presença de muitos alelos e poucos heterozigotos. Isso pode se dever a uma endogamia alta ou pelas frequências alélicas distintas nas subpopulações, as quais reduzem a heterozigosidade total (efeito Wahlund; TEMPLETON, 2006).

Ao analisar as variáveis genéticas das populações se observa que a diversidade é média-baixa e mais ou menos uniforme entre elas. A maior diversidade genética foi encontrada na população 1 do Rio São Francisco e na população 4 de Furnas (coletada em 2014). A população com menor heterozigosidade é a população 6 que é de Furnas (coletada em 2015). A primeira população encontra-se num ambiente menos alterado no interior do Parque Nacional da Serra da Canastra, onde há escasso tráfego de pessoas e onde tem se observado alta atividade de visitação de insetos polinizadores (Capítulo 2). No caso da população 2 de Furnas, resulta interessante que a maior diversidade foi detectada no primeiro ano de coleta e foi decrescendo nos próximos três anos. Neste sentido, nos trabalhos de campo realizados ano após ano na mesma localidade também tem se percebido um aumento substancial de atividades humanas onde ocorre a população.

A maior endogamia foi observada na população de Furnas coletada em 2015, seguido das populações de Delfinópolis e Furnas coletadas em 2014 (Tabela 4.2). Por outro lado, a menor endogamia se observou nas populações 1 e 2 do Rio São Francisco.

Curiosamente, considerando a distância geográfica entre as duas localidades (70 Km), o fluxo genético é maior entre a população 5 de Delfinópolis e a população 6 de Furnas, sendo as duas coletadas em 2015. Tomando em conta que geograficamente as populações 5 e 6 são mais distantes entre si do que as populações 3, 4 e 6 (essas três representam populações de uma mesma localidade, coletas em anos consecutivos), parece que o fluxo está relacionado ao tempo e a origem geográfica, ou seja, que a dinâmica populacional está variando com o tempo. Adicionalmente, encontrou-se um fluxo génico alto entre as populações 1 e 2, que mantêm uma endogamia menor; porém a distância geográfica das demais populações que estão nos limites do PARNA Serra da Canastra restringe o fluxo com aquelas. Portanto, o fluxo deve estar condicionado à proximidade geográfica entre estas populações, relacionado possivelmente ao compartilhamento de polinizadores assim como pela troca de diásporos. Nesse aspecto, considerando que a reprodução para as espécies em geral de *Genlisea* é predominantemente sexuada (PŁACHNO; ŚWIĄTEK, 2010; FLEISCHMANN, 2012) os diásporos são representados basicamente por sementes.

Seguindo o mesmo padrão, a distância genética entre as populações 1 e 2 é baixa, quando comparada às distâncias entre as demais populações. A distância entre a população 6 (de Furnas) e 5 também é menor do que as distâncias entre as mesmas duas em anos anteriores. Estas diferenças genéticas ficam também em evidência nos fenótipos florais que ocorrem nessas populações (Capítulo II). Assim, as referidas diferenças e similaridades genéticas podem ser evidenciadas nos agrupamentos das figuras 4.2 e 4.3.

Assim a distância genética entre as populações analisadas é baixa entre si, porém se observa maior fluxo em algumas e uma diferença entre grupos genéticos (Figuras 4.2 e 4.3), relacionada com a origem geográfica e o tempo. No caso das populações de Furnas que foram coletadas em três anos seguidos (a população 3 em 2013, a população 4 em 2014 e a população 6 em 2015), houve variação nas frequências alélicas. Na população coletada em 2015 a diversidade genética é um pouco menor e a endogamia maior, indicando que o fluxo nesta população poderia estar afetado. Assim, as flutuações encontradas para as referidas variáveis genéticas

devem estar sofrendo influências por elementos bióticos e/ou abióticos seletivos que conduzem à deriva gênica, que ano a ano podem modificar as frequências alélicas (TEMPLETON, 2006).

Estrutura genética de *Genlisea violacea*

A estrutura genética representa como está distribuída a variação genética em diferentes grupos hierárquicos de uma espécie (BROWN, 1978). Fazendo uma predição da estrutura genética nas populações estudadas se obtiveram vários modelos avaliados pelo ΔK (EVANNO; REGNAUT; GOUDET, 2005). Na figura 4.4 se observa que o maior ΔK (5,875) tem um K de 10 grupos populacionais ou populações genéticas, porém este modelo não tem correspondência com a amostragem formando *clusters* muito diversos constituídos por indivíduos com similaridades genéticas de várias populações (Apêndice 1). O segundo maior ΔK (5,821), que tem pouca diferença com o anterior (5,875), agrupa melhor as populações amostradas em três populações genéticas.

A dinâmica populacional pode ser determinada pela distribuição geográfica e também pela variação temporal, como indicado pela análise de estrutura populacional. Neste sentido, a primeira população genética inclui as populações geográficas 1 e 2 da Serra da Canastra e a população 3 de Furnas (todas coletadas no 2013). A segunda população genética está formada por todos os indivíduos da população 4 de Furnas (coletada no 2014). A terceira população genética está constituída pelas populações 5 de Delfinópolis e 6 de Furnas, ambas coletadas no 2015.

Na figura 4.4 se pode observar que as populações agrupadas possuem muitos indivíduos com genótipos semelhantes às outras populações. O alto fluxo genético observado entre as populações é refletido nos F_{st} calculados para cada *cluster* de $k = 3$ ($F_{st1} = 0,184$; $F_{st2} = 0,101$; $F_{st3} = 0,129$). Então, as seis populações amostradas, agrupadas em três populações genéticas, não parecem estar tão diferenciadas, portanto, poderiam ser vulneráveis e sofrer um evento de gargalo na ocorrência de um evento ambiental em nível regional que possa impor algum risco.

Esta diferenciação da estrutura populacional também se evidencia na análise de AMOVA na qual se comparam todas as populações (Tabela 4.6), na qual se observa uma baixa variação genética entre populações e alta dentro das populações. Este resultado deve ser produto de um sistema reprodutivo misto, e uma eficiente dispersão de pólen através de insetos (Capítulo II) e de sementes a através da água, que se evidencia pela testa reticulada e o conteúdo de lipídios protegendo o embrião (FLEISCHMANN, 2012). Sementes com testas reticuladas ou microrreticuladas podem ser adaptadas à hidrocoria, uma vez que microbolhas podem se aderir aos retículos facilitando a flutuação e, conseqüentemente, dispersão das sementes (CORNER, 2009).

Na AMOVA hierarquizada os grupos segundo o $K = 3$ (Figura 4.5), foi analisada a variação entre os três grupos geográficos, entre e dentro das populações. Do mesmo modo, se observou uma variabilidade baixa entre grupos geográficos e entre populações e uma variação alta dentro das populações. Esse resultado pode ser devido à eficiência reprodutiva da espécie, que permite um alto fluxo genético entre grupos geográficos. Além disso, estas populações encontram-se sobre a mesma formação geológica, o Cráton de São Francisco (SOUZA; RODRIGUES, 2014) nas subunidades geológicas Grupo Araxá e Grupo Canastra (HEINECK et al., 2003), possivelmente minimizando as barreiras geográficas que poderiam isolar algumas destas populações.

Uma vez que a distribuição das populações não segue um padrão genético e demográfico bem definido, alguns agrupamentos de populações de *Genlisea violacea* poderiam constituir uma metapopulação (LEVINS, 1969), constituída por subpopulações que formam um corredor de ilhas que se interconectam geneticamente por meio de polinizadores e diásporos, os quais podem manter o fluxo. Neste “corredor” populacional existem gradientes microambientais que podem atuar aumentando as variabilidades fenotípica e genotípica dentro das subpopulações. Portanto, seria importante fazer mais amostragens de populações de *G. violacea* em outras regiões geográficas para estudar dinâmica ao nível regional mais amplo e entender a vulnerabilidade da espécie como um todo.

Diversidade genética de *Genlisea aurea*

Em *Genlisea aurea* se observaram alguns padrões semelhantes aos de *G. violacea*. Na análise dos *loci* se observou alto polimorfismo, porém uma diversidade genética baixa (Tabela 4.8). A endogamia entre populações é baixa, e a endogamia dentro de populações é média, sendo fluxo genético alto. Da mesma forma, a presença de alelos nulos evidencia um efeito Wahlund (TEMPLETON, 2006) e endogamia em algumas populações.

Ao analisar a diversidade das populações se encontrou uma diversidade média-alta, com valores de endogamia negativos que indicam um excesso de heterozigosidade indicada por maior heterozigosidade observada que a esperada, e que sugerem endogamia entre os mesmos genótipos e pressões seletivas únicas em algumas populações. A maior endogamia foi encontrada na população 4 de São Paulo, e as populações 5 e 6 de Goiás, que sugerem o isolamento destas populações.

O fluxo genético é maior entre as populações das mesmas regiões como entre as populações 1 e 2, e populações 2 e 3 da Chapada Diamantina, e entre as populações 5 e 6 da Chapada dos Veadeiros. Do mesmo modo, as distâncias genéticas são menores nas populações da mesma região (Tabela 4.1). Assim, segundo as distâncias genéticas as populações formam três agrupamentos, um com as populações da Chapada Diamantina, outro com as populações de São Paulo e Goiás, e um terceiro entre as populações de Minas Gerais e Santa Catarina (Figuras 4.6 e 4.7). Além disso, como se observa no PCO ainda há uma relação entre grupos, ou seja, existem similaridades genéticas possivelmente devido ao fluxo gênico. Embora que não haja na literatura estudos de polinização em *G. aurea*, observações feitas em campo (dados não-publicados) evidenciam polinização entomofílica, provavelmente algum Hymenoptera de porte mediano ou grande como tem sido observado em *Utricularia reniformis* (CLIVATI et al., 2014) e em *U. albocaerulea*, *U. purpurascens* e *U. reticulata* (HOBBHAHN; KÜCHMEISTER; POREMBSKI, 2006) que pode voar longas distâncias (EICKWORT; GINSBERG, 1980; ZURBUCHEN et al., 2010).

Estrutura genética de *Genlisea aurea*

Na predição da estrutura genética nas populações estudadas, foi calculado ΔK para determinar qual foi o melhor modelo (EVANNO; REGNAUT; GOUDET, 2005). Foram encontrados três K muito mais elevados que os demais. Na figura 4.8 é notado que o maior ΔK ($= 46,4$) resulta em um K de 2 grupos populacionais ou populações genéticas (Apêndice 1). Porém, ao se comparar com os agrupamentos por distâncias genéticas e a distribuição geográfica, não parece haver suporte para esse valor (2). O segundo maior ΔK (55,855) sugere um $K = 6$, que agrupa melhor as populações amostradas. Para $K=6$, algumas populações geográficas ficam segregadas em populações genéticas distintas (Apêndice 3). O seguinte maior ΔK (48,382) representa o valor de $\Delta K = 3$, que distribui as populações geográficas completas em *clusters* de forma similar aos agrupamentos por distância e com mais sentido biológico. Assim no agrupamento de três estruturas populacionais ficam num *cluster* as populações da Bahia, em outro a população de São Paulo e no terceiro as populações de Goiás, Minas Gerais e Santa Catarina.

Na análise AMOVA para todas as populações em conjunto se observa que a variação entre populações é baixa, e há maior variação dentro de populações, indicando um fluxo genético alto e um processo de especiação recente. Por outro lado, a AMOVA para os três grupos geográficos indica que há pouca variação entre estas regiões, e alta variação entre e dentro de populações.

Em todas as análises (distância e estrutura) é evidente a diferença entre as populações da Bahia e as demais. Esta diferenciação deve estar relacionada às diferenças fitogeográficas e as barreiras geográficas. As populações da Bahia estão na Chapada Diamantina, uma complexa região fitogeográfica (MORO et al., 2016). A Chapada é um mosaico dos biomas *catinga* e *cerrado*, com numerosos endemismos (FROMM-TRINTA, 1979; CONCEIÇÃO; PIRANI, 2007; MORO et al., 2016). Esta região fica no extremo norte da Cadeia do Espinhaço, uma longa cadeia de montanhas de 1.100 Km entre os Estados de Minas Gerais e Bahia e com elevações acima dos 800 m (RAPINI; DE MELLO-SILVA; KAWASAKI, 2002) e com numerosos endemismos (RAPINI; DE MELLO-SILVA; KAWASAKI, 2002; CONCEIÇÃO; PIRANI,

2005, 2007; FLEISCHMANN et al., 2011; MORO et al., 2016). Assim, no norte da Cadeia do Espinhaço existe uma depressão de aproximadamente 300 Km, formada pelos vales do Rio de Contas, Rio Pardo e Rio Jequitinhonha, que constitui uma barreira geográfica e biológica que evita a migração de flora entre o norte da cadeia na Bahia e o sul em Minas Gerais (STANNARD, 1995). Assim, as populações 1, 2 e 3, ficam isoladas das demais populações estudadas. Também, o mosaico fitogeográfico dos campos rupestres dentro da Chapada Diamantina pode isolar estas populações entre elas, marcando suas diferenças genéticas.

Na estrutura genética, também pode se observar a diferenciação da única população conhecida do Estado de São Paulo, em Campos do Jordão. Este isolamento também deve estar relacionado à depressão geológica no limite da Serra da Mantiqueira, assim como a influência antrópica relacionada à alta urbanização que existe na região.

O presente estudo representa as principais regiões onde estão distribuídas as populações de *Genlisea aurea*. Entretanto, algumas populações apresentaram uma amostragem de indivíduos baixa (populações 7, 8 e 9), as quais poderiam refletir em certo viés analítico. De qualquer forma, este trabalho apresenta um avanço no conhecimento da biologia da espécie, informação que poderá servir como subsídios para propostas de conservação da espécie e também das demais congêneres.

Conclusões

As populações da Serra da Canastra estudadas de *Genlisea violacea* têm uma variabilidade genética média-baixa. Adicionalmente, a variação é alta dentro das populações, porém, baixa entre populações. Este padrão de variação genética está altamente influenciado pelo sistema reprodutivo misto, com dispersão de pólen por insetos. Ademais, estas características reprodutivas e o fato de ser uma espécie anual conferem uma dinâmica populacional que varia com o tempo, evidenciado pelo efeito gargalo e deriva genética.

As características genéticas de *G. violacea* indicam que estas populações e as suas distribuições sobre a mesma formação geológica podem representar uma metapopulação, formadas por ilhas subpopulacionais que mantêm fluxo genético entre elas. Portanto, estas populações podem ser consideradas a mesma unidade de conservação. Neste sentido, e pelo fato de estarem localizadas em ambientes altamente antropizados, estas populações devem ser vigiadas e mantidas para garantir sua conservação, assim como os demais elementos bióticos (como os polinizadores) associados à espécie.

As populações de *G. aurea* estudadas têm uma diversidade genética média-alta e endogamia baixa. Contudo, a variação é maior dentro de populações que entre populações.

Existe uma clara estruturação e diferenciação entre as populações de *G. aurea* da Bahia (que formam uma população genética) e as demais populações. Estas diferenças genéticas estão determinadas pela barreira geográfica formada pelos vales do Rio de Contas, Rio Pardo e Rio Jequitinhonha, que limitam a dispersão de pólen entre as populações da Chapada Diamantina e as populações da região sul da Cadeia do Espinhaço e no cerrado ao oeste da cadeia. A baixa diversidade genética das populações de *G. aurea* e a estrutura genética evidenciada sugere que estas populações devem ser monitoradas e devem ser preservadas nas regiões da Chapada da Diamantina e Serra da Mantiqueira.

Referências

- ABDUL-MUNEER, P. M. Application of Microsatellite Markers in Conservation Genetics and Fisheries Management: Recent Advances in Population Structure Analysis and Conservation Strategies. **Genetics Research International**, v. 2014, n. 6, p. 1–11, 2014.
- BFG; FORZZA, R. C.; GRACINEIDE, S. S.; RAFAEL, F.; FLÁVIO, M.; MARIA, C. E.; ANDRÉ, M.; IVANILZA, M.; REGINA, H. P.; ELISETE, A.; LIDYANNE, Y. S.; FILHO, A.; JOÃO, L. M.; ANDREA, O.; ARICLENES, A. M.; MARÍA, M.; MARTA, C.; VIVIAN, A.; LUCAS, A. V.; MICHEL, J. F.; JOSÉ, F. A.; LUIS, C.; PAUL, E.; RAFAEL, A. X.; ROSELI, L. C.; CLÁUDIA, P.; JAMES, L.; MARIA, R. C.; RICARDO, S.; DOUGLAS, C.; STEFANO, D.; RODRIGO, D.; JULIE, H. A.; VALQUÍRIA, F. Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. v. 66, n. 4, 2015.
- BROWN, A. H. D. Isozymes, plant population genetic structure and genetic conservation. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 52, n. 4, 1978.
- CLIVATI, D.; CORDEIRO, G. D.; PŁACHNO, B. J.; DE MIRANDA, V. F. O. Reproductive biology and pollination of *Utricularia reniformis* A.St.-Hil. (Lentibulariaceae). **Plant Biology**, v. 16, n. 3, p. 677–682, maio 2014.
- CONCEIÇÃO, A.; PIRANI, J. Delimitação de habitats em campos rupestres na Chapada Diamantina, Bahia: substratos, composição florística e aspectos estruturais. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, v. 23, n. 1, p. 85–111, 2005.
- CONCEIÇÃO, A.; PIRANI, J. Diversidade em quatro áreas de campos rupestres na Chapada Diamantina, Bahia, Brasil: espécies distintas, mas riquezas similares. **Rodriguésia**, v. 58, p. 193–206, 2007.
- CORNER, E. J. H. **The seeds of dicotyledons**. New York: Cambridge University Press, 2009.
- EARL, D. A.; VONHOLDT, B. M. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources**, v. 4, n. 2, p. 359–361, 13 jun. 2012.
- EICKWORT, G.; GINSBERG, H. Foraging and mating behavior in Apoidea. **Annual Review Entomology**, v. 25, p. 421–446, 1980.

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.

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.

FAEGRI, K.; PIJL, L. van der. **Principles of pollination ecology**. 3rd Editi ed. New York: Pergamon Press, 1979.

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

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

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

FLEISCHMANN, A.; STAATSSAMMLUNG, B.; MENZINGER, M. Taxonomic *Utricularia* news. **Carnivorous Plant Newsletter**, v. 44, n. March, p. 2013–2016, 2015.

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

HEINECK, C. A. .; LEITE, C. A. S. .; SILVA, M. A. .; VIEIRA, V. S. **Mapa geológico do estado de minas gerais, escala 1:1.000.000**. Belo Horizonte: Convênio COMIG/CPRM, 2003.

HOBBHAHN, N.; KÜCHMEISTER, H.; POREMBSKI, S. Pollination biology of mass flowering terrestrial *Utricularia* species (Lentibulariaceae) in the Indian Western Ghats. **Plant biology (Stuttgart, Germany)**, v. 8, n. 6, p. 791–804, nov. 2006.

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

KIMURA, M.; CROW, J. THE NUMBER OF ALLELES THAT CAN BE MAINTAINED IN A FINITE POPULATION. **Genetics**, v. 49, p. 725–738, 1964.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. A conservação do Cerrado brasileiro. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 147–155, 2005.

LEVINS, R. Some Demographic and Genetic Consequences of Environmental Heterogeneity for Biological Control. **Bulletin of the Entomological Society of America**, v. 15, n. 3, p. 237–240, 1 set. 1969.

LEWONTIN, R. Testing the theory of natural selection. **Nature**, v. 2, p. 181–182, 1972.

LLOYD, F. E. **The carnivorous plants**. New York: Dover Publications, Inc., 1976.

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, mar. 1994.

MCPHERSON, S. **Carnivorous plants and their habitats**. Poole, Dorset, England: Redfern Historia Natural Productions Ltd., 2010.

MIRANDA, V. F. O.; MENEZES, C. G.; SILVA, S. R.; DÍAZ, Y. C. A.; RIVADAVIA. **Lentibulariaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/FichaPublicaTaxonUC/FichaPublicaTaxonUC.do?id=FB146>>. Acesso em: 1 jan. 2016.

MORO, M. F.; NIC LUGHADHA, E.; DE ARAÚJO, F. S.; MARTINS, F. R. A Phytogeographical Metaanalysis of the Semiarid Caatinga Domain in Brazil. **The Botanical Review**, n. May, 19 maio 2016.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; DA FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 853–858, 24 fev. 2000.

NEI, M. Genetic Distance between Populations. **The American Naturalist**, v. 106, n. 949, p. 283–292, 1972.

NEI, M. **Molecular evolutionary genetics**. New York, NY: Columbia University Press, 1987.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GenALEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. **Bioinformatics**, v. 28, n. 19, p. 2537–2539, 2012.

PINHEIRO, M.; GAGLIANONE, M. C.; PEREIRA NUNES, C. E.; SIGRIST, M. R.; ALVES DOS SANTOS, I. Polinização por abelhas. In: RECH, A. R.; AGOSTINI, K.; OLIVEIRA, P. E.; MACHADO, I. C. (Ed.). **Biologia da polinização**. Rio de Janeiro: Projeto Cultura, 2014. p. 527.

PLACHNO, B. J.; ŚWIĄTEK, P. Unusual embryo structure in viviparous *Utricularia nelumbifolia*, with remarks on embryo evolution in genus *Utricularia*. **Protoplasma**, v. 239, n. 1-4, p. 69–80, 18 mar. 2010.

PRITCHARD, J.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, n. 2, p. 945–959, jul. 2000.

RAPINI, A.; DE MELLO-SILVA, R.; KAWASAKI, M. L. Richness and endemism in Asclepiadoideae (Apocynaceae) from the Espinhaço Range of Minas Gerais, Brazil - A conservationist view. **Biodiversity and Conservation**, v. 11, n. 10, p. 1733–1746, 2002.

SOUZA, D.; RODRIGUES, S. Caracterização geomorfológica da Serra da Canastra e entorno (MG). In: I Simpósio Mineiro de Geografia, Alfenas. **Anais...** Alfenas: Universidade Federal de Alfenas, 2014.

SPECIES LINK. Disponível em: <<http://www.splink.org.br/>>. Acesso em: 1 jan. 2016.

STANNARD, N. **Flora of the pico das almas, chapada diamantina - bahia brazil**. Kew: Royal Botanic Gardens, 1995.

TAYLOR, P. **The genus *Utricularia* – a taxonomic monograph**. Kew Bulletin ed. Key, London: Royal Botanic Gardens, 1989.

TAYLOR, P. The genus *Genlisea*. **Carnivorous Plant Newsletter**, v. 20, p. 20–26, 1991.

TEMPLETON, A. R. **Population genetics and microevolutionary theory**. New Jersey: Wiley, 2006.

VAN OOSTERHOUT, C.; WF, H.; WILLS, D.; SHIPEY, P. micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes**, v. 4, p. 535–538, 2004.

YEH, C. F. **Population genetics analysis (POPGENE Ver.1.31). Quick user guide**. Edmonton University of Alberta, , 1999. .

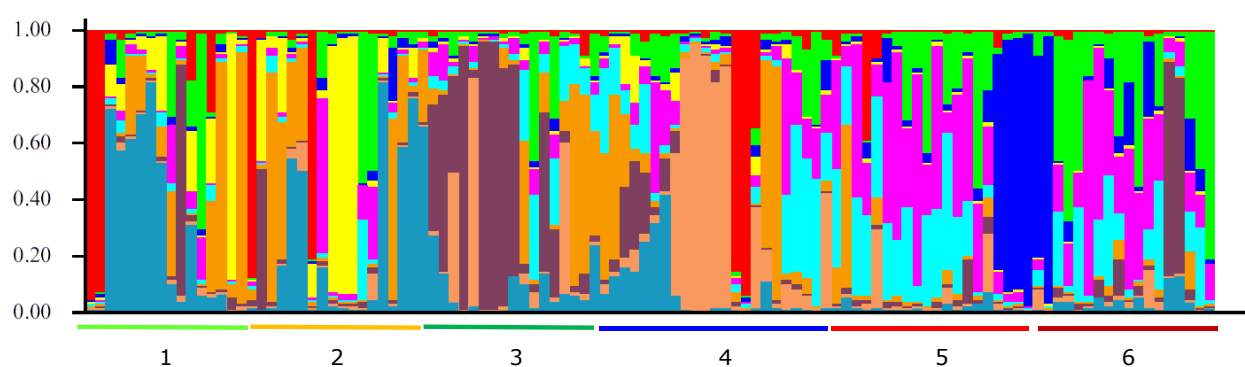
ZURBUCHEN, A.; LANDERT, L.; KLAIBER, J.; MÜLLER, A.; HEIN, S.; DORN, S. Maximum foraging ranges in solitary bees: only few individuals have the capability to cover long foraging distances. **Biological Conservation**, v. 143, n. 3, p. 669–676, mar. 2010.

CONCLUSÕES FINAIS

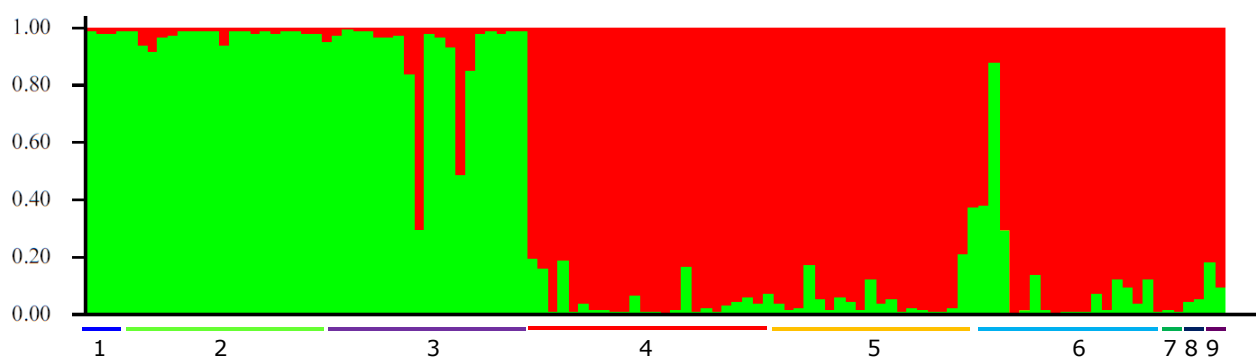
- *Genlisea violacea* é uma espécie alógama polinizada por insetos. Nas populações naturais estudadas se evidenciaram vários visitantes florais, dos quais ao menos dois são polinizadores efetivos. Estes são abelhas do gênero *Lasioglossum* (subgênero *Dialictus*: subfamília Halictinae: família Halictidae), e do gênero *Ceratina* (subgênero *Ceratinula*: subfamília Xylocopinae: família Apidae).
- Existem morfotipos florais de *Genlisea violacea* que devem estar sendo selecionados pelos polinizadores e fatores microambientais.
- A partir de dados genômicos de *G. aurea* e através de uma busca *in silico* foram desenvolvidos 12 marcadores microssatélites que podem ser empregados para se determinar a diversidade genética das populações.
- Os marcadores microssatélites desenvolvidos em *G. aurea* são transferíveis a espécies congênicas e, como se evidenciou em *G. violacea*, também permitem estimar diversidade genética nessas espécies.
- Nas populações de *G. violacea* e *G. aurea* estudadas foi observada variabilidade baixa e média, respectivamente, como maior variação dentro que entre populações, que refletem o sistema reprodutivo misto e uma dispersão entomofílica.
- Os resultados obtidos sugerem que as populações naturais de *G. violacea* e *G. aurea* necessitam ser monitoradas e protegidas para sua conservação.

APÊNDICES

Apêndice 1. Estrutura genética de *G. violacea* inferida por análise bayesiana. $k = 10$.



Apêndice 2. Estrutura genética de *G. aurea* inferida por análise bayesiana. $k = 10$.



Apêndice 3. Estrutura genética de *G. aurea* inferida por análise bayesiana. $k = 6$.

