

# RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)  
autor(a), o texto completo desta tese  
será disponibilizado somente a partir  
de 17/06/2022.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CARACTERIZAÇÃO DO PROTEOMA DE *Genlisea violacea*  
A.St.-Hil. (LENTIBULARIACEAE)**

**Néstor Darío Franco Marulanda**  
Engenheiro de Produção Biotecnológica

**2020**

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

**CARACTERIZAÇÃO DO PROTEOMA DE *Genlisea violacea*  
A.St.-Hil. (LENTIBULARIACEAE)**

**Néstor Darío Franco Marulanda**

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

**Coorientadora: Profa. Dra. Janete Aparecida Desidério**

**Coorientador: Prof. Dr. Tiago Santana Balbuena**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do Câmpus de Jaboticabal – UNESP para obtenção do Título de Doutor em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas).

**2020**

M389c

Marulanda, Néstor Darío Franco

Caracterização do proteoma de *Genlisea violacea* A.St.-Hil.  
(Lentibulariaceae) / Néstor Darío Franco Marulanda. --

Jaboticabal, 2020

146 p. : il., tabs.

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

Orientador: Vitor Fernandes Oliveira de Miranda

Coorientadora: Janete Aparecida Desidério

1. Plantas Proteínas. 2. Plantas carnívoras. 3. Espectrometria  
de massa. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

## CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: CARACTERIZAÇÃO DO PROTEOMA DE *Genlisea violacea* A.St.-Hil.  
(LENTIBULARIACEAE)

**AUTOR: NESTOR DARIO FRANCO MARULANDA**

**ORIENTADOR: VITOR FERNANDES OLIVEIRA DE MIRANDA**

**COORIENTADORA: JANETE APPARECIDA DESIDERIO**

**COORIENTADOR: TIAGO SANTANA BALBUENA**

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

Prof. Dr. VITOR FERNANDES OLIVEIRA DE MIRANDA (Participação Virtual)  
Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / FCAV / UNESP



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



Pós-doutorando JOSÉ ROBERTO APARECIDO DOS SANTOS PINTO (Participação Virtual)  
IB/UNESP / Câmpus de Rio Claro



Prof. Dr. JACKSON ANTONIO MARCONDES DE SOUZA (Participação Virtual)  
Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Pesquisador Dr. ALESSANDRO DE MELLO VARANI (Participação Virtual)  
Departamento de Tecnologia / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Jaboticabal, 17 de junho de 2020

## DADOS CURRICULARES DO AUTOR

**Néstor Darío Franco Marulanda**, nascido em 19 de novembro de 1982, natural de Pereira, Risaralda, Colômbia. Graduado no ano 2007 em Engenharia de Produção Biotecnológica da Universidade Francisco de Paula Santander, UFPS, Colômbia. Realizou estágio e projeto de conclusão de curso no laboratório de micropropagação de plantas do Programa de Gestão e Inovação Tecnológica da *Cooperación Colombiana de Investigación Agropecuaria* – COORPOICA (2005-2007) e foi Chefe do Laboratório de Micropropagação de Plantas de GREENLEAF Colômbia (2007-2013). No período de 2014 a 2016 realizou Mestrado no Programa de Pós-graduação em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas), da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP, Câmpus de Jaboticabal, no Laboratório de Sistemática Vegetal sob orientação do Prof. Dr. Vitor Fernandes Oliveira de Miranda, e, em 2016, começou seu Doutorado no mesmo programa desenvolvendo a pesquisa da presente tese como bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço os meus orientadores Dr. Vitor F.O. de Miranda e Dra. Janete Aparecida Desidério e Dr. Tiago Santana Balbuena pela ajuda e orientação no trabalho e pela confiança.

Prof. Dr. Manoel Victor F. Lemos pelo apoio ao permitir o uso de materiais e equipamento do Laboratório de Genética de Bacterias.

Ao Grupo de pesquisa do Laboratório de Proteômica Vegetal, pela receptividade, discussões metodológicas, conversas, em especial à Amanda Cristina Baldassi pela paciência e os ensinamentos.

Ao grupo de pesquisa do Laboratório de Sistemática Vegetal pelo apoio nas coletas e discussões científicas e sugestões feitas no decorrer desses anos.

A Jorge Augusto Petroli Marchesi pela paciência e apoio em todo momento.

Igualmente agradeço a FAPESP, CAPES e CNPq, pelo financiamento do trabalho em questão.

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

## SUMÁRIO

	Página
1. CAPÍTULO I – Considerações gerais.....	1
Introdução .....	1
Revisão de literatura .....	4
Síndrome de carnivoría em plantas.....	4
Família Lentibulariaceae.....	4
O gênero <i>Genlisea</i> A.St.-Hil. ....	8
A espécie objeto do estudo: <i>Genlisea violacea</i> A.St.-Hil. ....	8
Proteômica e sequenciamento <i>de novo</i> de peptídeos.....	10
Proteômica de plantas carnívoras.....	11
Estudos ômicos na família Lentibulariaceae .....	12
Referências .....	14
2. CAPITULO II – ARTIGO: Label-free shotgun proteomics reveals different functions and protein profiles in dimorphic leaves of two morphotypes of the carnivorous plant <i>Genlisea violacea</i> A.St.-Hil. (Lentibulariaceae).....	23
Highlight.....	23
Abstract .....	24
Significance.....	24
Graphical Abstract.....	25
1. Introduction.....	25
2. Materials and Methods.....	28
2.1. Plant material and protein extraction.....	28



2.2. Peptide <i>In-gel</i> digestion and MS/MS acquisition.....	28
2.3. UPLC-MS analysis.....	29
2.4 <i>De novo</i> sequencing, protein identification and Gene Ontology analyses .....	30
2.5 Protein quantification and statistical analyses .....	31
3.Results .....	32
3.1 <i>De novo</i> peptide sequencing, protein identification and single amino acid substitutions.....	32
3.2 Gene Ontology annotation of leaves and traps proteins.....	36
3.2.1. Biological process domain.....	37
3.2.2. Cellular component domain .....	39
3.2.3. Molecular function domain.....	40
3.3. Protein quantification.....	43
4.Discussions.....	47
5.Conclusions .....	55
References .....	56
SUPPLEMENTARY FIGURES .....	68
SUPPLEMENTARY TABLES .....	74

## CARACTERIZAÇÃO DO PROTEOMA DE *Genlisea violacea* A.St.-Hil. (LENTIBULARIACEAE)

**RESUMO** - A família Lentibulariaceae, da ordem Lamiales, é a maior entre as famílias de plantas carnívoras e está composta pelos gêneros *Pinguicula*, *Genlisea* e *Utricularia*. Filogeneticamente o gênero *Pinguicula* é o grupo irmão do clado *Genlisea-Utricularia*. Cada gênero exibe especializações morfológicas em suas armadilhas que permitem a captura e digestão de pequenos organismos. O gênero *Pinguicula* apresenta diferentes características pleiomórficas, sendo o único gênero da família com raízes e com folhas pegajosas modificadas em armadilhas, por sua vez, o gênero *Utricularia* apresenta armadilhas em forma de vesículas, chamadas de utrículos, e o gênero *Genlisea* apresenta folhas utriculíferas submersas com forma de “Y” invertido como armadilhas. As proteínas expressas nos tipos foliares de *Genlisea*, folhas e armadilhas, são pouco conhecidas, e análise diferencial das proteínas expressas nos dois tipos foliares podem auxiliar no entendimento dos seus processos biológicos. Deste modo, neste trabalho foi realizado o estudo proteômico dos tipos foliares de dois morfotipos de *Genlisea violacea*, de flor roxa e flor branca. Para tal, amostras de folhas e armadilhas dos dois morfotipos foram empregadas para extração das proteínas totais, realizado o sequenciamento *de novo* dos peptídeos e criado um inventário de proteínas presentes nos tipos foliares de cada morfotipo. Além disso, foram realizadas quantificações das proteínas compartilhadas por folhas e armadilhas dos dois morfotipos. Assim, foram identificadas um total de 482 proteínas exclusivas para folhas fotossintéticas e 14 para as armadilhas e 65 proteínas foram compartilhadas pelos dois tipos foliares. A análise comparativa mostrou que oito proteínas foram expressas diferentemente entre os dois tipos de folhas. As análises funcionais e a quantificação indicaram que as proteínas das folhas fotossintéticas estão envolvidas principalmente na fotossíntese e respostas aos estímulos e as proteínas das armadilhas estão relacionadas à respiração, transporte e digestão. A identificação em larga escala das proteínas de *Genlisea violacea* permite esclarecer algumas diferenças e similitudes funcionais entre folhas fotossintetizantes e as armadilhas, aumentando nossa compreensão da biologia deste gênero de plantas carnívoras.

**Palavras chave:** Plantas carnívoras, armadilhas, proteômica, sequenciamento *de novo*, LC-MS/MS.

**CHARACTERIZATION OF THE PROTEOM OF *Genlisea violacea* A.St.-Hil.  
(LENTIBULARIACEAE)**

**ABSTRACT** – The family Lentibulariaceae, of the order Lamiales, is the largest among the families of carnivorous plants and is composed of the genera *Pinguicula*, *Genlisea* and *Utricularia*. Phylogenetically the genus *Pinguicula* is the sister group of the *Genlisea-Utricularia* clade. Each genus exhibits morphological specializations in its traps that allow the capture and digestion of small organisms. The genus *Pinguicula* present different pleisomorphic characteristics, being the only genus of the family with roots and sticky leaves modified in traps, in turn, the genus *Utricularia* presents traps in the form of vesicles, called utricles, and the genus *Genlisea* presents submerged utriculiferous leaves. inverted “Y” shape like traps. The proteins expressed in the leaf types of *Genlisea*, leaves and traps, are little known, and differential analysis of the proteins expressed in the two leaf types can help in the understanding of their biological processes. Thus, in this work, the proteomic study of the leaf types of two morphotypes of *Genlisea violacea*, of purple and white flowers, was carried out. For this, samples of leaves and traps of the two morphotypes were used to extract the total proteins, after that a *de novo* peptide sequencing was carried out and an inventory of proteins present in the leaf types of each morphotype was generated. In addition, quantifications of the proteins shared by leaves and traps of the two morphotypes were performed. Thus, a total of 482 exclusive proteins for photosynthetic leaves and 14 for traps were identified and 65 proteins were shared by the two leaves types. Comparative analysis showed that eight proteins were expressed differently between the two types of leaves. Functional analysis and quantification indicated that photosynthetic leaf proteins are mainly involved in photosynthesis and responses to stimuli and trap proteins are related to respiration, transport and digestion. The large-scale identification of *Genlisea violacea* proteins allows to clarify some differences and functional similarities between photosynthetic leaves and traps, increasing our compression of the biology of this genus of carnivorous plants.

**Keywords:** Carnivorous plants, traps, proteomics, *de novo* sequencing, LC-MS/MS.

## CAPÍTULO 1 - Considerações gerais

### Introdução

As plantas carnívoras apresentam diferentes adaptações para atrair, capturar e digerir presas (JUNIPER; ROBINS; JOEL, 1989; ELLISON, 2006; ELLISON; ADAMEC, 2018). Na história evolutiva das angiospermas, a síndrome da carnívoría surgiu em momentos diferentes, agrupando 10 famílias de cinco ordens (GIVNISH, 2015; WHEELER; CARSTENS, 2018). Dentro da ordem Lamiales, no clado das Asterídeas, encontra-se a família Lentibulariaceae Rich. (APG IV, 2016), a maior família de plantas carnívoras, agrupando cerca de 350 espécies nos gêneros *Pinguicula* L., *Genlisea* A. St.-Hil. e *Utricularia* L. (FLEISCHMANN, 2012; FLEISCHMANN; STAATSSAMMLUNG; MENZINGER, 2015). No Brasil, centro de diversidade da família (TAYLOR, 1991; MCPHERSON, 2010), até o momento, foram descritas 86 espécies dos gêneros *Genlisea* e *Utricularia*, dos quais 30 são endêmicas (MIRANDA et al., 2015.; FLORA DO BRASIL 2020, em construção). Além disso, nesta família encontram-se os menores genomas de plantas conhecidos, particularmente em espécies dos gêneros *Genlisea* e *Utricularia*, com genomas de aproximadamente de 60 Mpb (ALBERT et al., 2010). Cada gênero da família apresenta especializações morfológicas, com adaptações à captura e digestão de artrópodes e outros pequenos organismos (JUNIPER et al., 1989). O gênero *Pinguicula* apresenta estados de carácter pleiosomórficos para as características raízes (presença) e armadilhas (folhas adesivas), enquanto os gêneros *Genlisea* e *Utricularia* apresentam estados de carácter apomórficos para esses caracteres, não apresentando raízes e com armadilhas complexas (JUNIPER; ROBINS; JOEL, 1989; TAYLOR, 1989; MÜLLER et al., 2006).

O gênero *Genlisea* está composto por 31 espécies de ervas rosetadas (FLEISCHMANN, 2012; SILVA et al., 2020a), com folhas aéreas fotossintéticas e folhas subterrâneas não-fotossintéticas modificadas em armadilhas, com aparência de raiz, chamadas folhas utriculíferas (FLEISCHMANN, 2012). Dentre as presas de

*Genlisea* encontram-se bactérias, protozoários, algas e integrantes da microfauna, como nematoides, rotíferos, anelídeos e pequenos artrópodes (BARTHLOTT et al., 1998; STUDNICKA, 2003; PŁACHNO; FABER; JANKUN, 2005; PŁACHNO et al., 2006; CARAVIERI et al., 2014; KOLLER-PEROUTKA et al 2014). Dentro das armadilhas, os tricomas permitem capturar e digerir as presas (PŁACHNO; KOZIERADZKA-KISZKURNO; SWIATEK, 2007). Pouco se sabe sobre a produção de enzimas hidrolíticas e mecanismos de digestão nos gêneros de Lentibulariaceae. Entretanto, em *Genlisea*, por meio de testes enzimáticos, já foi detectada atividade da fosfatase nas células terminais dos tricomas no interior das armadilhas (PŁACHNO et al., 2006).

A disponibilidade de sequências genômicas tem contribuído para a descoberta de enzimas e para o melhor entendimento dos mecanismos e evolução da carnivoría em diferentes famílias de plantas (RAVEE et al., 2018). Entretanto, poucos estudos com enfoque proteômico têm sido desenvolvidos em plantas carnívoras (HATANO; HAMADA, 2008; 2012; SCHULZE et al., 2012; BITEAU et al. 2013; LEE et al., 2016; ZAKARIA et al., 2019). Entre os estudos proteômicos, as abordagens mais comuns usadas para identificar proteínas com dados de espectrometria de massa em tandem (MS / MS) dependem de banco de dados disponível para comparação com dados experimentais (MA et al., 2003). Assim, no sequenciamento de peptídeos *de novo*, a identidade dos peptídeos originada pela digestão de proteínas pode ser inferida diretamente a partir dos espectros de massa adquiridos, permitindo a identificação de proteínas sem a existência de um genoma de referência (MA, 2015).

No gênero *Genlisea* há proteoma disponível apenas para *Genlisea aurea* (LEUSHKIN et al., 2013), mas não para a espécie-tipo do subgênero *Tayloria*, *Genlisea violacea*. Essa espécie, endêmica do Brasil, encontrada em São Paulo e Minas Gerais (FLEISHMANN et al, 2011; BFG, 2015; FLORA DO BRASIL 2020, em construção; MIRANDA et al., 2015), e exibe uma alta variação na morfologia, incluindo variações no tamanho da planta, dos tricomas e cor e tamanho da corola, apresentando plantas com flores violetas/lilás, ou brancas (FLEISCHMANN et al., 2010, 2011; FLEISCHMANN, 2012).

Nesse contexto, o presente trabalho visa caracterizar e comparar os proteomas das folhas fotossintetizantes e utriculíferas (armadilhas) dos morfotipos de flores roxas e brancas de *Genlisea violacea* e como objetivos específicos: (i) identificar as proteínas das folhas fotossintetizantes e armadilhas dos morfotipos de flor roxa e branca de *Genlisea violacea*; (ii) verificar a variação da produção de proteínas compartilhadas nos diferentes tipos foliares de cada morfotipo, (iii) comparar a produção de proteínas relacionadas à carnivoría nos diferentes tecidos da espécie estudada.

## Referências

- ADLASSNIG, W.; PEROUTKA, M.; LAMBERS, H.; LICHTSCHEIDL, I. K. The roots of carnivorous plants. **Plant and Soil**, v. 274, n. 1-2, p. 127-140, 2005.
- ALBERT, V.; WILLIAMS, S.; CHASE, M. Carnivorous plants: phylogeny and structural evolution. **Science**, v. 257, n. 5076, p. 1491–1495, 1992.
- ALBERT, V. A.; JOBSON, R. W.; MICHAEL, T. P.; TAYLOR, D. J. The carnivorous bladderwort (*Utricularia*, Lentibulariaceae): a system inflates. **Journal of Experimental Botany**, v.61, n.1, p. 5-9, 2010.
- ALCARAZ, L. D.; MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, S.; TORRES, I.; IBARRA-LACLETTE, E.; HERRERA-ESTRELLA, L. The metagenome of *Utricularia gibba*'s traps: into the microbial input to a carnivorous plant. **Plos One**, v. 11, n. 2, p. e0148979, 2016.
- ALHAIDER, A., ABDELGADER, A.G., TURJOMAN, A.A., NEWELL, K., HUNSUCKER, S.W., SHAN, B., MA, B., GIBSON, D.S., DUNCAN, M.W.: Through the eye of an electrospray needle: mass spectrometric identification of the major peptides and proteins in the milk of the one-humped camel (*Camelus dromedarius*). **Journal of Mass Spectrometry**, v. 48, n. 7, p. 779-794, 2013.
- APG, I. V. Angiosperm Phylogeny Group IV. 2016.
- ARANGUREN, Y.; PŁACHNO, B. J.; STPICZYŃSKA, M.; MIRANDA, V. F. O. Reproductive biology and pollination of the carnivorous *Genlisea violacea* (Lentibulariaceae). **Plant Biology**, v.20, n.3, p. 591-601, 2018.
- BÁRTA, J.; STONE, J. D.; PECH, J.; SIROVÁ, D.; ADAMEC, L.; CAMPBELL, M. A.; ŠTORCHOVÁ, H. The transcriptome of *Utricularia vulgaris*, a rootless plant with minimalist genome, reveals extreme alternative splicing and only moderate sequence similarity with *Utricularia gibba*. **BMC plant biology**, v. 15, n. 1, p. 78, 2015.
- BARTHLOTT, W.; POREMBSKI, S.; FISCHER, E.; GEMMEL, B. First protozoa-trapping plant found. **Nature**, v. 392, n. 6675, p. 447, 1998.
- BAUER, U., PAULIN, M., ROBERT, D., SUTTON, G. P. Mechanism for rapid passive-dynamic prey capture in a pitcher plant. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 43, p. 13384-13389, 2015.
- BFG - The Brazil Flora Group. Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. **Rodriguésia**, v.66, n.4, p.1085-1113. 2015.
- BITEAU, Flore et al. A simple SDS-PAGE protein pattern from pitcher secretions as a new tool to distinguish *Nepenthes* species (Nepenthaceae). **American journal of botany**, v. 100, n. 12, p. 2478-2484, 2013.

BUTTS, C. T.; BIERMA, J.C.; MARTIN, R.W. Novel proteases from the genome of the carnivorous plant *Drosera capensis*: Structural prediction and comparative analysis. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 84, n. 10, p. 1517-1533, 2016.

CAO, H. X.; SCHMUTZER, T.; SCHOLZ, U.; PECINKA, A.; SCHUBERT, I.; VU, G. T. H. Metatranscriptome analysis reveals host-microbiome interactions in traps of carnivorous *Genlisea* species. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 526, 2015.

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. 1966.

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

CATUSSE, J.; STRUB, J.M.; JOB, C.; VAN DORSSELAER, A.; JOB, D. Proteomewide characterization of sugarbeet seed vigor and its tissue specific expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 29, p. 10262-10267, 2008.

CHEN, S; HARMON, A, C. Advances in plant proteomics. **Proteomics**, v. 6, n. 20, p. 5504-5516, 2006.

CHEN, L.; TOVAR-CORONA, J.M.; URRUTIA, A.O. Alternative splicing: a potential source of functional innovation in the eukaryotic genome. **International journal of evolutionary biology**, v.2012, 2012.

CIESLAK, T., et al. Phylogenetic analysis of *Pinguicula* (Lentibulariaceae): chloroplast DNA sequences and morphology support several geographically distinct radiations. **American Journal of Botany**. v. 92, n 10, p. 1723-1736, 2005.

CROSS, Adam T. Carnivorous plants. A Jewel in the Crown of a Global Biodiversity Hotspot. **Perth: Kwongan Foundation and the Western Australian Naturalists' Club Inc**, 2019.

DARWIN, C. 1875. Insectivorous plants. New York: D. Appleton and Company.

DE SOUSA ABREU, R., et al. Global signatures of protein and mRNA expression levels. **Molecular BioSystems**, v.5, n.12, p.1512-1526, 2009

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



ELLISON, A.M. Nutrient limitation and stoichiometry of carnivorous plants. **Plant Biology**, v. 8, n. 06, p. 740-747, 2006

ELLISON, A.M, ADAMEC, L. 2018. Introduction: what is a carnivorous plant? In: Adamec L, Ellison AM eds. *Carnivorous Plants: Phys-iology, Ecology, and Evolution*. London: **Oxford University Press**.p.3-6, 2018.

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

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

FLEISCHMANN, A. Systematics and evolution of Lentibulariaceae: II. *Genlisea*. In: Ellison AM, Adamec L.eds *Carnivorous plants: physiology, ecology and evolution*. **Oxford University Press**, Oxford, p.81-88, 2018

FLEISCHMANN, A., et al. Evolution of genome size and chromosome number in the carnivorous plant genus *Genlisea* (Lentibulariaceae), with a new estimate of the minimum genome size in angiosperms. **Annals of Botany**, v. 114, n. 8, p. 1651-1663, 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., ROCCIA, A. Systematics and evolution of Lentibulariaceae: I. *Pinguicula*. In: Ellison AM, Adamec L (eds) *Carnivorous plants: physiology, ecology and evolution*. **Oxford University Press**, pp 70–80, 2018.

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

FLEISCHMANN, A.; STAATSSAMMLUNG, B.; MENZINGER, M. Taxonomic Utricularia news. **Carnivorous Plant Newsletter**, v. 44, p.13–16, 2015.

FLORA DO BRASIL 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://www.floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB8569>> Acesso em: 01Jul.2019.

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.

FUKUSHIMA, K., et al. Genome of the pitcher plant *Cephalotus* reveals genetic changes associated with carnivory. **Nature ecology & evolution**, v. 1, n. 3, p. 0059, 2017.

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

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, 2006.

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.

GYGI, S. P.; ROCHON, Y.; FRANZA, B. R.; AEBERSOLD, R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. **Molecular and Cellular Biology**, v.19, n.3, p. 1720-1730, 1999.

HATANO, N.; HAMADA, T. Proteome analysis of pitcher fluid of the carnivorous plant *Nepenthes alata*. **The Journal of Proteome Research**, v. 7, n. 2, p. 809-816, 2008.

HATANO, N; HAMADA, T. Proteomic analysis of secreted protein induced by a component of prey in pitcher fluid of the carnivorous plant *Nepenthes alata*. **Journal of proteomics**, v. 75, n. 15, p. 4844-4852, 2012.

IBARRA-LACLETTE, E.; ALBERT, V.A.; PÉREZ-TORRES, C.A.; ZAMUDIO-HERNÁNDEZ, F.; DE J ORTEGA-ESTRADA, M.; HERRERA-ESTRELLA, A.; HERRERA-ESTRELLA, L. Transcriptomics and molecular evolutionary rate analysis of the bladderwort (*Utricularia*), a carnivorous plant with a minimal genome. **BMC Plant Biology**, v.11, n.1, p.101, 2011.

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

IDEKER, T.; GALITSKI, T.; HOOD, L. A new approach to decoding life: systems biology. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 2, n. 1, p. 343-372, 2001.

JOBSON, R.W.; ALBERT, V.A. Molecular rates parallel diversification contrasts between carnivorous plant sister lineages<sup>1</sup>. **Cladistics**, v. 18, n. 2, p. 127-136, 2002.

JOBSON, R.W.; NIELSEN, R.; LAAKKONEN, L.; WIKSTRÖM, M.; ALBERT, V. 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, 2004.

JOBSON, R. W., BALEEIRO, P. C., BARRETT, M. D. Six new species of *Utricularia* (Lentibulariaceae) from Northern Australia. **Journal of Plant Systematics**, v.21, p.57-77., 2018.

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

KOLLER-PEROUTKA, M.; LENDL, T.; WATZKA, M.; ADLASSNIG, W. Capture of algae promotes growth and propagation in aquatic *Utricularia*. **Annals of Botany**, v. 115, n. 2, p. 227-236, 2014.

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

LAN, T., et al. Long-read sequencing uncovers the adaptive topography of a carnivorous plant genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2017, v.114, n.22, p.E4435-E4441, 2017.

LEE, L.; ZHANG, Y.; OZAR, B.; SENSEN, C.W.; SCHRIEMER, D.C. Carnivorous nutrition in pitcher plants (*Nepenthes spp.*) via an unusual complement of endogenous enzymes. **Journal of proteome research**, v. 15, n. 9, p. 3108-3117, 2016.

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, 2013.

Li, H. T., et al. Origin of angiosperms and the puzzle of the Jurassic gap. **Nature Plants**, v.5, n:5, p.461, 2019

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

MA, B., et al. PEAKS: powerful software for peptide de novo sequencing by tandem mass spectrometry. **Rapid communications in mass spectrometry**. v. 17, n. 20, p. 2337-2342, 2003.

MA, B. Novor: Real-time peptide *de Novo* sequencing software. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 26, n. 11, p. 1885-1894, 2015.

MALLICK, P.; KUSTER, B. Proteomics: a pragmatic perspective. **Nature biotechnology**, v.28, n.7, p.695, 2010.

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

METCALFE, J.R.; CHALK, L. Anatomy of the dicotyledons: Clarendon Press, **Oxford**, v. 2, p.991-994, 1972.

MIRANDA, V. F. O.; MENEZES, C. G.; SILVA, S. R.; DÍAZ, Y. C. A.; RIVADAVIA. Lentibulariaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil 2020 em construção. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB146>>. Acesso em: 1 Jul. 2019.

MÜLLER, K.; BORSCH, T.; LEGENDRE, L.; POREMBSKI, S.; BARTHLOTT, W. A phylogeny of Lentibulariaceae based on sequences of *matK* and adjacent non-coding regions. **American Journal of Botany**, v. 87, p.145-146, 2000.

MÜLLER, K.; BORSCH, T.; LEGENDRE, L.; POREMBSKI, S.; THEISEN, I.; BARTHLOTT, W. Evolution of carnivory in Lentibulariaceae and the Lamiales. **Plant Biology**, v.6, n.04, p.477-490, 2004.

MÜLLER, K.; BORSCH, T. Phylogenetics of *Utricularia* and molecular evolution of the *trnK* intron in a lineage with high substitutional rates. **Plant Systematic and Evolution**, v.250, p.39-67, 2005.

MÜLLER, K.; BORSCH, T.; LEGENDRE, L.; POREMBSKI, S.; BARTHLOTT, W. Recent progress in understanding the evolution of carnivorous Lentibulariaceae (Lamiales). **Plant Biology**, v.8, n.6, p.748-757, 2006.

NOVO, J.; PASCUAL, J.; LUCAS, R.S.; ROMERO-RODRIGUEZ, C.; ORTEGA, M.R.; LENZ, C.; VALLEDOR, L. Fourteen years of plant proteomics reflected in 'Proteomics': moving from model species and 2-DE based approaches to orphan species and gel-free platforms. **Proteomics**, v. 15, n. 5-6, p. 1089-1112, 2015.

PANDEY, A.; MANN, M. Proteomics to study genes and genomes. **Nature**, v.405, n.6788, p.837, 2000.

PLACHNO, B.J.; FABER, J.; JANKUN, A. Cuticular discontinuities in glandular hairs of *Genlisea* A. St.-Hil. in relation to their functions. **Acta Botanica Gallica**, v. 152, n. 2, p. 125-130, 2005.

PLACHNO, B. J.; ADAMEC, L.; LICHTSCHEIDL, I. K.; PEROUTKA, M.; ADLASSNIG, W.; VRBA, J. Fluorescence labelling of phosphatase activity in digestive glands of carnivorous plants. **Plant Biology**. v.8, n.06, p. 813-820, 2006.

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, 2007.

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

POPPINGA, S.; WEISSKOPF, C.; WESTERMEIER, A.S.; MASSELTHER, T.; SPECK, T. Fastest predators in the plant kingdom: functional morphology and biomechanics of suction traps found in the largest genus of carnivorous plants. **AoB Plants**, v.8, 2016

RAVEE, R.; SALLEH, F.I.M.; GOH, H.H. Discovery of digestive enzymes in carnivorous plants with focus on proteases. **PeerJ**, v.6, p.4914, 2018.

REUT, M.S. Trap structure of the carnivorous plant *Genlisea* (Lentibulariaceae). **Botanica Helvetica**, v.103, n.1, p.101-111, 1993.

SCHULZE, W.X. et al. The protein composition of the digestive fluid from the venus flytrap sheds light on prey digestion mechanisms. **Molecular & Cellular Proteomics**, v.11, n.11, p.1306-1319, 2012.

SERVICE, R.F. Proteomics. High-speed biologists search for gold in proteins. **Science**, New York, NY, v.294, n.5549, p.2074, 2001.

SILVA, S.R., et al. The complete chloroplast genome sequence of the leafy bladderwort, *Utricularia foliosa* L. (Lentibulariaceae). **Conservation Genetics Resources**, p.1-4, 2016a.

SILVA, S.R., et al. The chloroplast genome of *Utricularia reniformis* sheds light on the evolution of the *ndh* gene complex of terrestrial carnivorous plants from the Lentibulariaceae family. **PloS one**, v.11, n.10, p.e0165176, 2016b.

SILVA, S.R. et al. The mitochondrial genome of the terrestrial carnivorous plant *Utricularia reniformis* (Lentibulariaceae): Structure, comparative analysis and evolutionary landmarks. **PloS one**, v.12, n.7, p.e0180484, 2017.

SILVA, S.R., et al. Molecular phylogeny of bladderworts: a wide approach of *Utricularia* (Lentibulariaceae) species relationships based on six plastidial and nuclear DNA sequences. **Molecular phylogenetics and evolution**, v.118, p.244-264 ,2018a.

SILVA, S.R., et al. Comparative genomic analysis of *Genlisea* (corkscrew plants—Lentibulariaceae) chloroplast genomes reveals an increasing loss of the *ndh* genes. **PloS one**, v.13, n1, 2018b.

SILVA, S.R., et al. Intraspecific Variation within the *Utricularia amethystina* Species Morphotypes Based on Chloroplast Genomes. **International Journal of Molecular Sciences**, v.20, n.24, p. 6130, 2019.

SILVA, S.R., et al. *Genlisea hawkingii* (Lentibulariaceae), a new species from Serra da Canastra, Minas Gerais, Brazil. **Plos one**, v.15, n.1, p.e0226337, 2020a.

SILVA, S. R., et al. The Terrestrial Carnivorous Plant *Utricularia reniformis* Sheds Light on Environmental and Life-Form Genome Plasticity. **International Journal of Molecular Sciences**, v.21, n.1, p.3, 2020b.

SONG, Q. A., CATLIN, N. S., BARBAZUK, W. B., LI, S. Computational analysis of alternative splicing in plant genomes. **Gene**, v.685, p.186-195, 2019.

STEIGER, J. F. *Pinguicula* (Lentibulariaceae): the cool climate species of the northern hemisphere. Morphology, biology, cultivation. **En Second Conference of the International Carnivorous Plant Society**. p. 12-13.1998.

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

TAYLOR, P. The genus *Utricularia* – a taxonomic monograph. **Kew Bulletin** ed. Key, London: Royal Botanic Gardens, p1-724.1989.

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

ULE, J., BLENCOWE, B. J. Alternative splicing regulatory networks: Functions, mechanisms, and evolution. **Molecular Cell**, v.76, n.2, p.329-345, 2019.

VIALA, V.L.; HILDEBRAND, D.; TRUSCH, M.; ARNI, R.K.; PIMENTA, D.C.; SCHLÜTER, H.; BETZEL, C.; SPENCER, P.J. *Pseudechis guttatus* venom proteome: insights into evolution and toxin clustering. **J. Proteom.** v. 110, p. 32-44, 2014.

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

VU, G.T., et al. Comparative genome analysis reveals divergent genome size evolution in a carnivorous plant genus. **The Plant Genome**, v.8, n.3, 2015.

WHEELER, G.L.; CARSTENS, B.C. Evaluating the adaptive evolutionary convergence of carnivorous plant taxa through functional genomics. **PeerJ**, v.6, p. e4322, 2018.

WHITEWOODS, C.D.; COEN, E. Growth and development of three-dimensional plant form. **Current Biology**, v.27, n.17, p.R910-R918, 2017.

WHITEWOODS, C.D., et al. Evolution of carnivorous traps from planar leaves through simple shifts in gene expression. **Science**, v.367, n.6473, p.91-96, 2020.

WICKE.S.; SCHAÈFERHOFF, B.; DEPAMPHILIS, C.W.; MUÈLLER, K.F. Disproportional Plastome-Wide Increase of Substitution Rates and Relaxed Purifying Selection in Genes of Carnivorous Lentibulariaceae. **Molecular Biology and Evolution**, v.31, n.3, p.529-545, 2013.

WILKINS, M. R.; SANCHEZ, J. C.; GOOLEY, A. A.; APPEL, R. D.; HUMPHERY-SMITH, I.; HOCHSTRASSER, D. F.; WILLIAMS, K. L. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v.13, p.19 - 50, 1995.

ZAKARIA, W. N; AIZAT, W. M.; GOH, H. H.; NOOR, N. M. Protein replenishment in pitcher fluids of *Nepenthesx ventrata* revealed by quantitative proteomics (SWATH-MS) informed by transcriptomics. **Journal of plant research**, v. 132, n. 5, p. 681-694, 2019.