

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

**FILOGENIA DAS CARNÍVORAS "TIPO-ORQUÍDEA" (gen.  
*Utricularia* sect. *Orchidioides* E *Iperua*: LENTIBULARIACEAE)  
COM OBSERVAÇÕES SOBRE O SISTEMA ESTOLÃO-  
TUBÉRCULO**

**Fernanda Gomes Rodrigues**  
**Bióloga**

**2017**

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

**FILOGENIA DAS CARNÍVORAS "TIPO-ORQUÍDEA" (gen.  
*Utricularia* sect. *Orchidioides* E *Iperua*: LENTIBULARIACEAE)  
COM OBSERVAÇÕES SOBRE O SISTEMA ESTOLÃO-  
TUBÉRCULO**

**Fernanda Gomes Rodrigues**

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

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

**2017**

R696f Rodrigues, Fernanda Gomes  
Filogenia das carnívoras "tipo-orquídea" (gen. *Utricularia* sect. *Orchidioides* e *Iperua*: Lentibulariaceae) com observações sobre o sistema estolão-tubérculo / Fernanda Gomes Rodrigues. -- Jaboticabal, 2017  
v, 47 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017  
Orientador: Vitor Fernandes Oliveira de Miranda  
Banca examinadora: Maurício Bacci Júnior, Daniel Guariz Pinheiro  
Bibliografia

1. Filogenia molecular. 2. morfologia. 3. seção *Orchidioides*. 4. seção *Iperua*. 5. tubérculo. 6. *Utricularia*. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 575.86

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

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: FILOGENIA DAS CARNÍVORAS "TIPO-ORQUÍDEA" (gen. *Utricularia* sect. *Orchidioides* E *Iperua*: LENTIBULARIACEAE) COM OBSERVAÇÕES SOBRE O SISTEMA ESTOLÃO-TUBÉRCULO

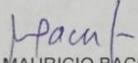
AUTORA: FERNANDA GOMES RODRIGUES

ORIENTADOR: VITOR FERNANDES OLIVEIRA DE MIRANDA

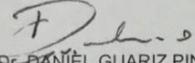
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em AGRONOMIA (GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS), pela Comissão Examinadora:



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



Prof. Dr. MAURICIO BACCI JUNIOR  
Departamento de Bioquímica e Microbiologia / UNESP / Rio Claro/SP



Prof. Dr. DANIEL GUARIZ PINHEIRO  
Departamento de Tecnologia / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 19 de maio de 2017

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**Fernanda Gomes Rodrigues**, nascida em 26 de abril de 1989, natural de São José do Rio Preto, SP. Graduada em Ciências Biológicas pela Faculdade de Ciências e Letras – Unesp, Câmpus de Assis, onde realizou estágio curricular e estágio para profissionais depois de graduada, ambos em marcadores moleculares microssatélites com espécies de Orchidaceae. Recebeu bolsa PIBID na produção de materiais didáticos destinados à Rede Pública de Ensino na área de Ciências e Biologia. Lecionou por dois anos no Cursinho Pré-Vestibular da ONG Zimbauê, no campo de Biologia e por um ano na Rede Pública de Ensino nas áreas de Ciências para Ensino Fundamental II e Biologia, Física, Matemática e Química para o Ensino Médio em Assis, SP. Atualmente cursa Mestrado Acadêmico pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, no Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas).

## EPÍGRAFE

*“Para os pobres de espírito a natureza é cinza.  
Para os espíritos curiosos, o mundo inteiro arde  
e brilha com uma luz intensa.”*

*(Ralph Waldo Emerson)*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço aos meus pais, minha família e ao Fernando pelo total apoio, incentivo e admiração em minha dedicação aos estudos e ao ensino das Ciências.

Agradeço a confiança do Prof. Vitor F. O. de Miranda em me orientar e através do exemplo e incentivo, me proporcionar o grandioso aprendizado adquirido em bancada, campo, ensino e em filosofia da ciência. Assim como a toda equipe do Laboratório de Sistemática Vegetal - LSV, pela amizade, colaborações, troca de ideias, discussões e intercâmbio cultural.

Agradeço ao Nílber (Universidade Federal do Rio de Janeiro) e a todos que participaram da expedição de coleta do LSV no Rio de Janeiro, fundamentais em minha primeira coleta de campo.

Agradeço aos laços de amizade construídos em Jaboticabal e Bebedouro, que me trouxeram muita felicidade e foram essenciais em momentos de ansiedade e saudades da família.

Agradeço aos Drs. Bartosz J. Płachno (Polônia), pela colaboração no trabalho e análises histoquímicas; Lubomír Adamec (República Checa) pela colaboração no trabalho e amostras vegetais; Carlos Rohrbacher (Brasil) e Barry Rice (EUA) que forneceram parte do material vegetal; Martin Hingst, Nicole Rebbert, Barry Rice, David Banks e Ron Lane por gentilmente fornecer as fotos de algumas espécies. Agradecimentos também são devidos à horticulora Lucyna Kurleto, pelo seu cuidado consciencioso da coleção de plantas carnívoras no Jardim Botânico da Universidade Jagiellonian em Cracóvia, na Polônia.

Por fim, agradeço ao financiamento da CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, sem o qual esse trabalho não seria possível.

## SUMÁRIO

	Página
RESUMO .....	ii
ABSTRACT .....	iii
LISTA DE FIGURAS .....	iv
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	4
2.1. A família Lentibulariaceae Rich. ....	4
2.2. Gênero <i>Utricularia</i> L. ....	6
2.2.1. <i>Utricularia</i> sect. <i>Orchidioides</i> e <i>Iperua</i> .....	7
2.2.2. Abordagem <i>Fuzzy Arberiam Morphology</i> (FAM) .....	9
2.2.3. Filogenia Molecular em <i>Utricularia</i> .....	10
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	12
3.1. Amostras de plantas e marcadores de DNA .....	12
3.2. Amplificação e sequenciamento .....	12
3.3. Sequências e análises filogenéticas .....	13
3.4. Caracteres morfológicos .....	15
3.5. Histoquímica de órgãos e tecidos de armazenamento .....	16
3.6. Função fotossintética de estolões e tubérculos .....	17
4. RESULTADOS .....	18
4.1. Filogenia das seções de <i>Utricularia: Orchidioides</i> e <i>Iperua</i> .....	18
4.2. Distribuição dos caracteres morfológicos .....	22
4.3. Análise histológica de estolões e tubérculos .....	24
5. DISCUSSÃO .....	30
5.1. Filogenia do complexo <i>Orchidioides-Iperua</i> - uma seção é suficiente .....	30
5.2. <i>Utricularia cornigera</i> Studnička .....	31
5.3. Distribuição de caracteres morfológicos .....	32
5.4. Função e evolução do sistema estolão-tubérculo: existem diferenças entre estolões e tubérculos? .....	34
6. CONCLUSÕES .....	36
7. REFERÊNCIAS .....	37

**FILOGENIA DAS CARNÍVORAS "TIPO-ORQUÍDEA" (gen. *Utricularia* sect. *Orchidioides* E *Iperua*: LENTIBULARIACEAE) COM OBSERVAÇÕES SOBRE O SISTEMA ESTOLÃO-TUBÉRCULO**

**RESUMO** - As plantas carnívoras "tipo-orquídea" (*Utricularia*) compreendem 15 espécies separadas em duas seções: *Orchidioides* e *Iperua*. Essas espécies robustas e principalmente epífitas foram originalmente agrupadas dentro de sect. *Orchidioides* pelos primeiros sistemas taxonômicos. Estas espécies foram divididas mais tarde em duas seções quando sect. *Iperua* foi proposta. Devido a falta de fortes evidências apoiadas em uma perspectiva filogenética robusta, apresentamos uma proposta filogenética baseada em quatro sequências de DNA diferentes (plastidial e nuclear) e morfologia para testar a monofilia de ambas as seções. Em comparação com todos os estudos filogenéticos anteriores, cobrimos o maior número de espécies dentro das seções: 11 espécies das seções *Orchidioides* e *Iperua* com 14 espécies como grupo externo. A máxima verossimilhança e inferência Bayesiana foram aplicadas às sequências de DNA de *rps16*, *trnL-F*, *matK*, ITS e em três caracteres morfológicos: (1) a crista da corola, (2) os órgãos primários no embrião e (3) os tubérculos. Além disso, apresentamos uma análise histoquímica dos estolões e tubérculos sob uma perspectiva evolutiva. Nossas análises mostraram a paráfília de sect. *Iperua*, já que *Utricularia humboldtii* está mais relacionada com o clado de sect. *Orchidioides*. *Utricularia cornigera* está agrupada ao clado de sect. *Iperua*, baseado em seqüências de cpDNA, mas é alinhada à sect. *Orchidioides* de acordo com o conjunto de dados ITS. Os caracteres morfológicos também não sustentam a divisão das espécies "tipo-orquídea" em duas seções. Além disso, de acordo com análises histológicas, o sistema estolão-tubérculo de ambas as seções têm como função principal o armazenamento de água, sendo esta uma importante adaptação derivada de estolões pelo menos duas vezes na história filogenética das plantas carnívoras "tipo-orquídeas". Assim, nosso estudo fornece fortes evidências, baseadas em sequências de DNA de dois compartimentos genômicos (plastidial e nuclear) e morfologia, para agrupar as seções *Utricularia* sect. *Orchidioides* e sect. *Iperua*.

**Palavras-chave:** filogenia molecular, morfologia, seção *Orchidioides*, seção *Iperua*, tubérculo, *Utricularia*

**PHYLOGENY OF THE “ORCHID-LIKE” BLADDERWORTS (gen. *Utricularia* sect. *Orchidioides* AND *Iperua*: LENTIBULARIACEAE) WITH REMARKS ON THE STOLON-TUBER SYSTEM**

**ABSTRACT** - The “orchid-like” bladderworts (*Utricularia*) comprises of 15 species separated into two sections: *Orchidioides* and *Iperua*. These robust and mostly epiphytic species were originally grouped within the section *Orchidioides* by the first taxonomical systems. These species were later split into two sections when sect. *Iperua* was proposed. Due to the lack of strong evidence based on a robust phylogenetic perspective, we present a phylogenetic proposal based on four different DNA sequences (plastidial and nuclear) and morphology to test the monophyly of both sections. In comparison with all previous phylogenetic studies, we covered the largest number of species across the sections: 11 species from sections *Orchidioides* and *Iperua* with 14 species as an external group. The maximum likelihood and Bayesian inferences were applied to DNA sequences of *rps16*, *trnL-F*, *matK*, ITS and three morphological characters: (1) the crest of the corolla, (2) the primary organs in the embryo and (3) tubers. Additionally, we present a histochemical analysis of the stolons and tubers from an evolutionary perspective. Our analyses showed the paraphyly of sect. *Iperua*, since *Utricularia humboldtii* is more related to the clade of sect. *Orchidioides*. *Utricularia cornigera* is grouped in the sect. *Iperua* clade based on cpDNA sequences, but it is nested to the sect. *Orchidioides* according to ITS dataset. Morphological characters do not support the breaking up of the “orchid-like” species into two sections, either. Moreover, according to histological analyses, the stolon-tuber systems from both sections serves exclusively for water storage, are important adaptations and have been derived from stolons at least twice in the phylogenetic history of “orchid-like” bladderworts. Thus, our study provides strong evidence, based on DNA sequences from two genomic compartments (plastid and nucleus) and morphology to group the *Utricularia* sect. *Orchidioides* into the sect. *Iperua*.

**Keywords:** molecular phylogeny, morphology, section *Orchidioides*, section *Iperua*, tuber, *Utricularia*.

## LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Espécies de <i>Utricularia</i> “tipo-orquídea” da sect. <i>Orchidioides</i> : (A) <i>U. quelchii</i> N.E.Br., (B) <i>U. asplundii</i> P.Taylor e (F) <i>U. alpina</i> Jacquin.; sect. <i>Iperua</i> : (C) <i>U. humboldtii</i> Schomb., (D) <i>U. reniformis</i> A.St.-Hil., (E) <i>U. nephrophylla</i> Benj. e (G) <i>U. geminiloba</i> Benj. (As setas apontam a crista da corola) (Crédito das fotos a Martin Hingst (A), Nicole Rebbert - utricularien.de (B), Barry Rice (C) e Ron Lane (F)).....	2
Figura 2. Árvores de inferência bayesianas para (A) <i>rps16</i> , (B) <i>trnL-F</i> , (C) <i>matK</i> e (D) ITS. Números acima dos ramos são as probabilidades posteriores, seguidas por <i>bootstraps</i> de máxima verossimilhança. (- denota ramos com um valor de suporte <50).....	20
Figura 3. Inferência bayesiana para análise combinada ( <i>rps16</i> + <i>trnL-F</i> + <i>matK</i> + ITS). Números acima dos ramos são as probabilidades posteriores, seguidas por <i>bootstraps</i> de máxima verossimilhança. (- denota ramos com um valor de suporte <50).....	21
Figura 4. Distribuição dos caracteres morfológicos com base na árvore combinada bayesiana. (A) Crista no lábio inferior da corola, (B) órgãos primários no embrião e (C) tubérculos. (Detalhe em B: Crédito fotográfico para Barry Rice).....	23
Figura 5. Anatomia e histoquímica de estolões de <i>Utricularia reniformis</i> . A-B. Anatomia geral do estolão, notar o córtex parenquimatoso (Pc) que envolve o cilindro ectofílico central (CC); Floema (pf), xilema (x), barra = 100 µm. C. Reação para lipídeos (Sudan IV), gotículas lipídicas (seta), barra = 50 µm. D. Seção após tratamento com IKI, notar a ausência de grãos de amido, barra = 100 µm. E. Seção tratada com vermelho de rutênio para pectinas e mucilagem, notar a reação positiva das pectinas nas paredes celulares, barra = 200 µm. F. Seção semi-fina, notar os vacúolos e o núcleo com inclusão de proteína paracristalina, barra = 20 µm.....	25
Figura 6. Anatomia e histoquímica de tubérculos de <i>Utricularia geminiloba</i> . A-C Anatomia geral do tubérculo, notar o córtex parenquimatoso (Pc) que envolve o cilindro ectofílico central (CC); Floema (pf), xilema (x), barra = 100 µm. D. Reação para lipídeos (Sudan IV), nota reação positiva na célula barrareira do tricoma (seta), barra = 100 µm. E. Reação para lipídeos (Sudan IV), barra = 100 µm. F. Seção após tratamento com IKI,	

notar a falta de grãos de amido, mas a reação positiva para a proteína nos núcleos e tricomas, barra = 100  $\mu$  m. G. Seção tratada com vermelho de rutênio para pectinas e mucilagem, notar a reação positiva das pectinas nas paredes celulares, barra = 100  $\mu$  m. H. Seção semi-fina, notar os vacúolos e o núcleo com inclusão de proteína paracristalina, barra = 20  $\mu$  m.....26

Figura 7. Anatomia e histoquímica de estolões de *Utricularia nelumbifolia*. A-B. Anatomia geral do estolão, notar o córtex parenquimatoso (Pc) que envolve o cilindro ectofilico central (CC); Floema (pf), xilema (x), lacuna (La), barra = 100  $\mu$  m. C. Autofluorescência de tecidos sob UV; Córtex parenquimatoso (Pc), cilindro central (CC), xilema (seta), barra = 100  $\mu$  m. D. Reação negativa para lipídeos (Sudan III), barra = 100  $\mu$  m. E. Reação para lipídios (Sudan IV), notar a reação positiva na cutícula das células epidérmicas e da célula barreira do tricoma, célula terminal (tc), célula barreira (seta), célula basal (bc), barra = 50  $\mu$  m. F. Seção após tratamento com IKI, notar a ausência de grãos de amido, barra = 100  $\mu$  m.....28

Figura 8. Anatomia e histoquímica de tubérculos de *Utricularia alpina*. A-B. Anatomia geral do tubérculo, notar o córtex parenquimatoso (Pc) que envolve o cilindro central ectofilico (CC); Barra = 100  $\mu$  m. C. Seção após tratamento com IKI, reação positiva para a proteína nos núcleos, barra = 100  $\mu$  m. D. Reação para lipídeos (Sudan IV), barra = 100  $\mu$  m.....29

Figura 9. Hábito de *Utricularia reniformis* (A) e tubérculo de *U. geminiloba* antes (B) e após (C) uma experiência de 30 dias para verificar a função fotossintética (L = folha, E = estolão, T = tubérculo). (Crédito da foto a David Banks (A)) Barra = 5 mm.....30

## 1. INTRODUÇÃO

Lentibulariaceae é uma família cosmopolita que apresenta a maior diversidade de espécies, hábitos e formas de vida entre as plantas carnívoras. Cerca de 350 espécies estão distribuídas em três gêneros: *Pinguicula*, *Genlisea* e *Utricularia*, dos quais *Pinguicula* é grupo irmão do clado *Genlisea-Utricularia* (JOBSON; ALBERT, 2002; MÜLLER et al., 2004). O gênero *Utricularia* apresenta como armadilhas pequenas vesículas chamadas utrículos, que têm um mecanismo de sucção ativo desencadeado quando os tricomas próximos à sua entrada são estimulados por pequenos organismos (POPPINGA et al., 2016). Com base na morfologia vegetativa, das inflorescências e *habitat*, Taylor (1989) dividiu as espécies do gênero *Utricularia* em dois subgêneros: *Polypompholyx* e *Utricularia* e estes em 35 seções. No entanto, dentro do subgênero *Utricularia* há controversas sobre a classificação de dois táxons infragêneros muito próximos: as seções *Orchidioides* e *Iperua*.

As nove espécies de *Utricularia* sect. *Orchidioides* A.DC. estão distribuídas na América Central, Antilhas e América do Sul e são chamadas de carnívoras “tipo-orquídeas” (Figura 1 A-C). Além disso, são epífitas perenes ou terrestres, com um conjunto de tubérculos na base do pedúnculo (Figura 9 B-C). Por outro lado, *Utricularia* sect. *Iperua* P.Taylor tem seis espécies distribuídas na América do Sul (Figura 1 D-G). Estas podem ser litófitas, terrestres ou epífitas-aquáticas (e.g. *U. nelumbifolia* e *U. humboldtii* que têm como *habitat* fitotelma em bromélias) e a maioria delas formam estolões carnosos (Figura 9A), com exceção de *U. geminiloba* que apresenta tubérculos (Figura 9 B-C), semelhante a *Orchidioides*. Ambas as seções contêm exemplares muito semelhantes em suas flores e folhas robustas, morfologias de armadilhas e cálices (TAYLOR, 1989).

De Candolle (1844) criou a seção *Orchidioides*, que incluía espécies com tubérculos. Kamieński (1895) expandiu mais tarde esta seção e incluiu espécies não tuberosas como *Utricularia nelumbifolia* e *U. reniformis*. Barnhart (1961), por



Figura 1. Espécies de *Utricularia* “tipo-orquídea” da sect. *Orchidioides*: (A) *U. quelchii* N.E.Br., (B) *U. asplundii* P.Taylor e (F) *U. alpina* Jacquin.; e sect. *Iperua*: (C) *U. humboldtii* Schomb., (D) *U. reniformis* A.St.-Hil., (E) *U. nephrophylla* Benj. e (G) *U. geminiloba* Benj. (As setas apontam a crista da corola) (Crédito das fotos a Martin Hingst (A), Nicole Rebbert - utricularien.de (B), Barry Rice (C) e Ron Lane (F)).

outro lado, propôs o novo gênero *Orchyllium* para agregar a espécie *U. alpina* (como *Orchyllium alpinum*) como espécie-tipo. Huynh (1968) questionou a seção *Orchidioides* desde que incluiu espécies de diferentes grupos baseados em caracteres do pólen. Taylor (1986), baseado nas diferenças morfológicas da corola, sementes e pólen, dividiu a seção *Orchidioides* e propôs a seção *Iperua*, com *Utricularia humboldtii* Schomb. como espécie-tipo.

Há discussões interessantes sobre a morfologia genérica de *Utricularia* e se as espécies têm ou não um *bauplan* com órgãos vegetativos bem delimitados como em outras angiospermas ou se elas se encaixam dentro do conceito de FAM (*Fuzzy Arberian Morphology*) (RUTISHAUSER; ISLER, 2001; RUTISHAUSER, 2016). Assim, não é uma tarefa fácil classificar as espécies por meio de caracteres morfológicos. Taylor (1989), em sua monografia, levanta algumas dúvidas sobre a morfologia de *Utricularia*. Nas seções *Orchidioides* e *Iperua*, especificamente, *U. reniformis* foi questionada, pois tem estolões espessos, como os tubérculos.

Estudos moleculares recentes buscam sanar algumas dúvidas apresentadas na classificação taxonômica de Taylor (1989) e também consideraram estas seções usando uma abordagem filogenética. Jobson et al. (2003) mostraram a monofilia de seções de *Iperua* e *Orchidioides* com uso das sequências plastidiais *rps16* e *trnL-F* e Müller e Borsch (2005), por outro lado, propuseram a exclusão da seção *Iperua* com base no intron plastidial *trnK* e o gene *matK*. No entanto, por não ser o principal objetivo destes trabalhos, ambas as seções são pouco representadas em número de espécies e tipo de marcador molecular.

Assim, o nosso objetivo foi testar a hipótese de agrupamento das seções *Orchidioides* e *Iperua*, por meio de um estudo com amplo número de espécies, o uso de marcadores moleculares representativos e observar a distribuição de caracteres morfológicos que foram relevantes na criação dessas seções. Dessa forma, avaliamos 11 das 15 espécies descritas para ambas as seções, além de incluirmos também a recentemente espécie descrita *Utricularia cornigera* Studnička, uma espécie com

semelhança morfológica às espécies da seção *Iperua* (STUDNIČKA, 2009). Foram avaliados um amplo número de marcadores moleculares de dois compartimentos genômicos (sequências de DNA plastidial *rps16*, *trnL-F* e *matK* e região nuclear ITS) e também realizamos uma análise filogenética das seguintes características morfológicas: 1) a crista no lábio inferior da corola, 2) órgãos primários no embrião e 3) a presença de tubérculos, além de termos realizado uma análise histoquímica com discussão da função e evolução destes órgãos.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. A família Lentibulariaceae Rich.

Considerada a família de plantas carnívoras mais diversa por apresentar diferentes hábitos de vida, distribuição cosmopolita e mecanismos diversos para a captura de presas, Lentibulariaceae possui aproximadamente 350 espécies distribuídas em três gêneros: *Pinguicula* L., *Genlisea* A.St.-Hil. e *Utricularia* L. (FISHER et al., 2004; GUISANDE et al., 2007).

*Pinguicula*, grupo-irmão do clado *Genlisea-Utricularia* e único que apresenta raízes verdadeiras, possui o mecanismo de captura de presas menos complexo entre os três gêneros: suas folhas apresentam tricomas que secretam mucilagem adesiva e enzimas nas quais insetos são aderidos e digeridos (CASPER, 1966) e que também são capazes de se movimentar, aumentando o contato com a presa (DARWIN, 1888; LLOYD, 1942).

As espécies de *Genlisea* possuem armadilhas foliares subterrâneas em formato de “Y”, espiraladas ao longo da maior parte de sua extensão denominadas rizófilos (FLEISCHMANN, 2012). Micro-organismos como protozoários e algas entram através de pequenas aberturas dos rizófilos e ficam aprisionadas devido à presença de “pelos

de retenção” que permitem apenas o movimento unidirecional em direção à extremidade distal, onde a digestão é então feita por enzimas (BARTHLOTT et al., 1998; GOEBEL, 1891; JUNIPER et al. 1989; LLOYD, 1942; PŁACHNO et al., 2008).

*Utricularia*, grupo-irmão de *Genlisea*, constitui um grupo monofilético juntamente com *Pinguicula* (JOBSON; ALBERT, 2002; MÜLLER et al., 2000, 2005, 2006). O gênero possui uma das mais complexas armadilhas em plantas carnívoras: os utrículos, pequenas vesículas de origem foliar que se fecham por uma válvula devido a um mecanismo de sucção ativo, desencadeado quando os tricomas próximos à sua entrada são estimulados por pequenos organismos (POPPINGA et al., 2016).

Os gêneros *Genlisea* e *Utricularia* apresentam as maiores taxas de mutação de DNA conhecidos entre todas as plantas com flores (CARRETERO-PAULET et al., 2015a, 2015b; JOBSON; ALBERT, 2002; JOBSON et al., 2004; MULLER et al., 2004, 2006; WICKE et al., 2013;) e apresentam espécies com genoma reduzido, inclusive com cromossomos de dimensões bacterianas (ALBERT et al., 2010; GREILHUBER et al., 2006; IBARRA-LACLETTE et al., 2011). *Genlisea tuberosa*, espécie com um genoma de 61 Mpb, é o menor conhecido em plantas atualmente (FLEISCHMANN et al., 2014).

Tais peculiaridades genômicas em Lentibulariaceae coincidem com sua alta plasticidade e adaptação a diversos *habitats*. Desta maneira, a evolução da riqueza de espécies pode ser originária de elevadas taxas de mutação e redução do genoma (RUTISHAUSER, 2016). Assim, têm aumentado o número de estudos sobre contração genômica em vegetais com o uso destas espécies como modelos para se investigar os processos relacionados à evolução genômica (IBARRA-LACLETTE et al., 2011; IBARRA-LACLETTE et al., 2013, LEUSHKIN et al., 2013, VU et. al, 2015).

## 2.2. Gênero *Utricularia* L.

Dentro da família Lentibulariaceae, o gênero *Utricularia* se destaca por ser o mais rico, com aproximadamente 230 espécies, agrupando cerca de 35% das espécies na família (GUISANDE et al., 2007) sendo 65 espécies catalogadas no Brasil, dentre as quais 16 são endêmicas (MIRANDA et al., 2016). Taylor (1989) baseando-se na morfologia vegetativa, no particular das armadilhas e das inflorescências, dividiu o gênero *Utricularia* em dois subgêneros: *Polypompholyx* (Lehm.) P.Taylor, contendo três espécies distribuídas em duas seções e *Utricularia*, o mais representativo com 33 seções e mais de 215 espécies.

*Utricularia* apresenta armadilhas consideradas, funcional e arquitetonicamente, as mais complexas do reino vegetal (DARWIN, 1888; LLOYD, 1942; REIFENRATH et al., 2006, VINCENT et al., 2011, ADAMEC, 2011, 2013). Estas estruturas são folhas modificadas em forma de vesículas com tricomas em sua entrada, que quando estimulados por pequenos organismos, funcionam como gatilhos, desencadeando um rápido processo de expansão do utrículo. A diferença de pressão criada força a entrada de água e assim, a presa é succionada e depois digerida no interior da armadilha (POPPINGA et al., 2016; REIFENRATH et al., 2006), por enzimas digestivas não só secretadas por glândulas internas, mas também pela comunidade microbiana presente em associação no seu interior (CARAVIERI et al., 2014; SIROVÁ et al., 2009).

O gênero *Utricularia* também apresenta maior polimorfismo morfológico, especialização para captura de presas e alta diversidade em plasticidade fenotípica, de *habitat* e nutricional, quando comparado aos demais gêneros na família (LLOYD, 1942; TAYLOR, 1989; JUNIPER et al., 1989). Provavelmente, isso se deve a consequência do grande número de *habitats* em que são encontradas, podendo ser terrestres, aquáticas e livres, aquáticas e fixas, reofíticas, litofíticas e epífitas, sendo que a maioria é de ambiente terrestre e aquático (TAYLOR, 1989; GUISANDE et al., 2007), somado às altas taxas mutacionais em seu genoma (JOBSON; ALBERT, 2002).

No decorrer do processo de diversificação e expansão da área de ocorrência deste gênero surgiram, a partir do hábito terrestre, os hábitos: litofítico, reofítico, epifítico, aquático-fixo e aquático-livre (TAYLOR, 1989), tendo algumas espécies a capacidade de apresentar mais de um hábito e colonizar diferentes ambientes. Por meio de reconstruções filogenéticas (JOBSON et al., 2003; MÜLLER et al., 2004; MÜLLER; BORSCH, 2005), acredita-se que *Utricularia* tenha origem neotropical, região com a maior riqueza de espécies, tendo havido uma posterior dispersão para as regiões Afrotropical e Australásia, assim como para o resto do mundo (GUISANDE et al., 2007).

*Utricularia* é cosmopolita ausente nos polos e, geralmente, encontrado em condições consideradas limítrofes para a maioria das plantas (TAYLOR, 1989). No entanto, são tolerantes a estes ambientes, já que os nutrientes são absorvidos pelas folhas modificadas em armadilhas ao invés de raízes (JUNIPER et al., 1989; PEROUTKA et al., 2008), além de possuírem órgãos especializados possibilitando que estas plantas entrem em dormência ou se regenerarem (TAYLOR, 1989).

### **2.2.1. *Utricularia* sect. *Orchidioides* e *Iperua***

Dentro do subgênero *Utricularia*, *Orchidioides* e *Iperua* são duas seções muito próximas que apresentam espécies robustas com flores exuberantes (e.g. *U. humboldtii*, com inflorescências que podem chegar a 2m de altura com corola de até 10 cm de largura), chamando a atenção de colecionadores que realizam hibridizações com espécies dentro e entre as seções (STUDNIČKA, 2005a). Além de chamarem atenção por sua beleza, são muito semelhantes entre as espécies destas seções os padrões morfológicos das armadilhas, dos cálices, grandes folhas e flores, e em alguns casos, o hábito epífita (TAYLOR, 1989). Tais similaridades trazem dúvidas quanto à classificação morfológica destas espécies dentro das seções, uma vez que uma mesma espécie pode apresentar diversos hábitos.

A seção *Orchidioides* foi criada por De Candolle (1844), que agrupou espécies com características orquídeas, se referindo aos tubérculos. A seção ficou representada por espécies de *Utricularia* conhecidas até então com essa característica, *Utricularia montana* (*U. alpina*) e *U. unifolia*. Kamieński (1895) expandiu mais tarde esta seção e incluiu *Utricularia endresii* e as espécies não tuberosas *U. nelumbifolia*, *U. humboldtii* e *U. reniformis*, por também serem robustas e se assemelharem de forma geral às orquídeas.

Uma divisão diferente em Lentibulariaceae foi proposta por Barnhart (1961), que criou um número expressivo de gêneros dentro da família. Em seu trabalho, Barnhart (1961) propôs o novo gênero *Orchyllium* com cerca de 10 espécies, várias delas representando as maiores espécies (mais robustas) dentro da família. Dentro do novo gênero sugerido, Barnhart (1961) agrupou espécies epífitas e terrestres, que se assemelham às orquídeas – por serem cultivadas como orquídeas e introduzidas constantemente ao cultivo, e incluiu *U. alpina* (como *Orchyllium alpinum*) como espécie-tipo.

Huynh (1968) estudou espécies de *Utricularia* a partir da morfologia do pólen e as dividiu em grupos numéricos, questionando a seção *Orchidioides* quando separou *U. quelchii* das demais espécies incluídas anteriormente nesta seção e incluiu *U. humboldtii*, descrita anteriormente por De Candolle (1844) como *species dubiae*. Este grupo, denominado de grupo III, agregava características polínicas como: endoabertura não muito definida, aberturas maiores do que nos grupos anteriores e a presença de uma faixa equatorial cuja largura coincide com o comprimento das ectoaberturas.

Diferentemente dos autores anteriores, Taylor (1989) dividiu o gênero *Utricularia* em subgêneros e seções com base não apenas na morfologia vegetativa ou em características de apenas uma estrutura reprodutiva como fez Huynh (1968), mas também na morfologia da inflorescência e no hábito das espécies. Especificamente, quanto às espécies agrupadas anteriormente como “tipo-orquídeas” (em sect. *Orchidioides* e gen. *Orchyllium*), Taylor (1989) manteve a denominação originada por

De Candolle (1844) e agrupou na seção *Orchidioides* nove espécies das Antilhas, América Central e América do Sul, epífitas ou terrestres que apresentam tubérculos e sementes estreitamente cilíndricas ou fusiformes, semelhantes às de orquídeas.

Baseando-se principalmente nas diferenças morfológicas da corola, sementes e pólen, Taylor (1986, 1989) observou que algumas espécies incluídas por autores anteriores não se encaixavam em sect. *Orchidioides* e propôs a criação de uma seção exclusiva denominada *Iperua*, com *Utricularia humboldtii* Schomb. como espécie-tipo. Nesta seção, encontram-se cinco espécies da América do Sul, litófitas e epífitas terrestres ou aquáticas, com estolões carnosos e uma excessão com tubérculos (*U. geminiloba*). A seção *Iperua* tem como caracteres exclusivos a presença de “cristas” (protuberâncias) no lábio inferior da corola e sementes amplamente cilíndricas, com algumas espécies que apresentam testa fina, transparente e um embrião com órgãos foliares clorofilados (TAYLOR, 1989).

### **2.2.2. Abordagem *Fuzzy Arberiam Morphology* (FAM)**

A morfologia vegetativa de *Utricularia* não apresenta um *bauplan* definido, ou seja, um conjunto de regras arquitetônicas comuns a um grupo de organismos. Sua inflorescência típica, com flores bilabiadas, é comum com as que ocorrem em Lamiales (CLIVATI et al., 2014; PŁACHNO et al., 2017), por outro lado, a parte vegetativa dessas espécies apresenta órgãos com transição difusa e distinção muitas vezes vaga. Assim, esse gênero se adequa à abordagem de modelo morfológico FAM (*Fuzzy Arberiam Morphology*), observada também em *Genlisea* e na família Podostemaceae (RUTISHAUSER; ISLER, 2001; RUTISHAUSER, 2016).

Formulada por Agnes Arber (1950), a abordagem FAM trata as categorias estruturais como "folhas" e "raízes" em plantas vasculares como conceitos com fronteiras difusas (*fuzzy*), permitindo formas de transição entre elas. Essa abordagem

complementa a tradicional Morfologia Clássica de Plantas (abordagem CLAM), que defende que categorias estruturais de plantas vasculares são consideradas conceitos com fronteiras claras e sem intermediários (RUTISHAUSER; ISLER, 2001).

A morfologia pouco convencional em *Utricularia* é alvo de discussão, causando controvérsias na classificação taxonômica de suas espécies. Por fugirem do padrão clássico, as espécies de *Utricularia* são conhecidas como morfologicamente desajustadas, no entanto, estas plantas são altamente especializadas em seus *habitats*, com adaptações fisiológicas extremas (RUTISHAUSER, 2016). Exemplos dessas adaptações são órgãos que possibilitam a sobrevivência de espécies em temperaturas e condições ambientais desfavoráveis, como turiões, propágulos resistentes ao congelamento do ambiente aquático, que possibilitam que essas plantas se regenerem (ADAMEC, 2008) ou tubérculos, que armazenam nutrientes e proporcionam que algumas espécies passem por períodos de dormência e resistam à estiagem (TAYLOR, 1989). Desta maneira, é interessante um maior conhecimento da morfologia vegetativa em *Utricularia*, pois além de colaborar com a classificação taxonômica, contribui para um melhor entendimento da morfologia FAM e evolução dessas estruturas.

### **2.2.3. Filogenia Molecular em *Utricularia***

Atualmente, a taxonomia em *Utricularia* é baseada na classificação de Taylor (1989) por esta ser a obra mais completa taxonomicamente já que aborda o maior número de espécies dentro do gênero, além de considerar diversas estruturas morfológicas, *habitat* e hábito. No entanto, devido à morfologia não convencional de *Utricularia* dificultar sua classificação, algumas dúvidas são levantadas. Desta maneira, estudos em biologia molecular vêm sendo realizados com intuito de esclarecer a classificação e evolução destas espécies.

De acordo com estudos filogenéticos, Lentibulariaceae é uma família monofilética, sendo o gênero *Pinguicula* um grupo irmão de *Genlisea* e *Utricularia* (JOBSON et al., 2003; MÜLLER et al., 2002; MÜLLER et al., 2004). Jobson et al. (2003) utilizaram sequências de DNA cloroplastidial (cpDNA) de íntrons *rps16* e região *trnL-F* e propuseram a divisão do subgênero *Polypompholyx* em duas seções *Polypompholyx* e *Pleiochasia* Kam. Esta divisão também foi observada por Müller e Borsh (2005), que realizaram um estudo utilizando o íntron cloroplastidial *trnK* e o gene *matK* e, além disso, propuseram o ressurgimento do subgênero *Bivalvaria* S.Kurz e a exclusão das seções *Psyllosperma* e *Iperua* criadas por Taylor (1989).

A exclusão da seção *Iperua*, no trabalho de Müller e Borsch (2005), foi proposta devido a *Utricularia humboldtii*, sua espécie-tipo, se agrupar filogeneticamente à seção *Orchidooides*. O mesmo não foi visto em Jobson et al. (2003), pois *U. humboldtii* é ausente e as análises com as espécies incluídas comprovaram a monofilia dos clados, sustentando a existência das duas seções. Ambos os estudos não tiveram grande representatividade em número de espécies das seções e marcadores moleculares, mas obtiveram êxito com o uso das sequências plastidiais que validaram a classificação de Taylor (1989) na maioria das espécies.

Veleba et al. (2014) reunindo os dados de Jobson et al. (2003) e Müller e Borsch (2005), acrescentados de sequências nucleares ITS em espécies de *Pinguicula*, obtiveram o mesmo resultado com *Utricularia humboldtii* e apresentaram apenas uma seção denominada *Orchidooides*, como proposto por Müller e Borsch (2005).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Amostras de plantas e marcadores de DNA

As amostras vegetais foram obtidas tanto de populações naturais como de plantas cultivadas e as sequências de DNA foram obtidas a partir do banco de dados *Genbank* / NCBI (Tabela 1). De acordo com estudos anteriores, quatro sequências de DNA foram selecionadas como marcadores devido ao seu sinal filogenético: (1) *rps16* (OXELMAN et al., 1997; JOBSON; ALBERT, 2002; JOBSON et al., 2003); (2) *trnL-F* (TABERLET et al., 1991; JOBSON; ALBERT, 2002; JOBSON et al., 2003); (3) *matK* (MÜLLER; BORSCH, 2005; SILVA et al., 2016), e (4) região ITS (HILLIS; DIXON, 1991).

Obtivemos, portanto, um total de 76 seqüências, das quais 26 foram produzidas neste estudo, com sequências para cinco espécies de *Utricularia* sect. *Orchidioides* (que tem um total de nove espécies descritas) e seis para *Utricularia* sect. *Iperua*, com inclusão de *U. cornigera*, representando assim todas as espécies conhecidas desta seção. Além disso, 14 espécies de outras seções foram usadas como um grupo externo (Tabela 1).

#### 3.2. Amplificação e sequenciamento

O DNA foi extraído com o emprego do método CTAB (DOYLE; DOYLE, 1987), modificado por Lodhi et al. (1994). As reações de amplificação dos marcadores nucleares foram realizadas em 25 µL de solução contendo 20 mM de MgCl<sub>2</sub>, 100 mM de dNTPs, 10 mM de cada iniciador, 1 U de *Dream Taq Polimerase* (Fermentas) e, em média, 50 ng de molde de DNA. Para a região ITS, os iniciadores e o adjuvante de sulfóxido de dimetilo (DMSO) foram utilizados como recomendado por Miranda et al.

(2010). Para o *matK* e *trnL-F* os iniciadores utilizados foram de acordo com Lim et al. (2012) e Taberlet et al. (1991), respectivamente.

Os perfis térmicos das reações de amplificação foram adaptados a partir de referências anteriores (ver item 3.1.). Para o espaçador intergênico *trnL-F* o perfil térmico foi de 95°C de 3'; 30 ciclos de 1' a 94°C, 45" a 52°C, 1' a 72°C e 5' de extensão final a 72°C. Para o gene *matK*, foi de 94°C a 1', 35 ciclos de 40" a 94°C, 20" a 52°C, 50" a 72°C e 10' de extensão final a 72°C. Para os ITS foi de 95°C a 3', 35 ciclos de 30" a 95°C, 30" a 54°C, 1' a 72°C e 5' de extensão final a 72°C. Os *amplicons* foram verificados por eletroforese em gel de agarose a 0,8%, precipitados com 100% de isopropanol, purificados com etanol a 70% e sequenciados pelo método desenvolvido por Sanger et al. (1975) em um sequenciador automático, modelo 3730xl ABI (*Applied Biosystems*).

### 3.3. Sequências e análises filogenéticas

A identidade de cada sequência foi verificada com a aplicação do BLASTN (ALTSCHUL et al., 1990). Utilizando o programa Geneious v10.0 (KEARSE et al., 2012), verificou-se sua qualidade *phred* de cada base onde, quando esta estava abaixo do ideal (30), ajustes manuais como a inserção de máscaras e corte de extremidades foram feitos utilizando o programa BioEdit v7.5.0.2 (HALL, 1999). O MAFFT v7 (Kato et al., 2002) foi utilizado para alinhar as sequências, com parâmetros pré estabelecidos pela própria plataforma online. Os conjuntos de dados (matrizes) foram criados no BioEdit v7.5.0.2 (HALL, 1999) com a adição de máscaras (*missing data* = "?"; WIENS, 2006).

Produzimos cinco conjuntos de dados: um para cada marcador isolado e um para uma análise combinada (evidência total). Para o fragmento *matK*, as sequências obtidas a partir do *GenBank* (ver Tabela 1) foram trimadas para obter uma região

homóloga de acordo com as sequências amplificadas pelos iniciadores 3F\_KIM e 1R\_KIM (LIM et al., 2012). Em cada conjunto de dados gerado, foi realizada uma inferência bayesiana na plataforma CIPRES (MILLER et al., 2010) com parâmetros pré estabelecidos pela plataforma online. Além disso, foi realizada uma análise de máxima verossimilhança também com a plataforma CIPRES (MILLER et al., 2010), pela qual foi empregado o melhor ajuste (*best - of - fit*) conforme selecionado pelo *Akaike Information Criterion* (AIC) (AKAIKE, 1973), gerado pelo programa jModelTest v2.1.1 (DARRIBA et al., 2012), sendo o modelo de melhor ajuste para os marcadores plastidiais o GTR + G (TAVARÉ, 1986) e do espaçador nuclear o TIM3 + I + G. O programa PAUP \* 4.0 (SWOFFORD, 1998) foi utilizado para se obter os valores de *bootstrap* (2.000 pseudorréplicas e busca heurística com 1.000 repetições com adição aleatória de sequências e o algoritmo TBR) da análise de máxima verossimilhança. As árvores obtidas de ambas as análises foram editadas pelos programas TreeGraph 2 (STÖVER, 2010) e FigTree v1.3.1 (RAMBAUT, 2009).

### 3.4. Caracteres morfológicos

Realizamos testes filogenéticos das três características morfológicas que supostamente sustentam as diferenças entre as seções e foram, portanto, historicamente empregadas nas circunscrições taxonômicas de *Orchidioides* e *Iperua*. Estes foram: (1) crista na protuberância do lábio inferior da corola (Figura 1C, E), (2) a presença de tubérculos (TAYLOR, 1986, 1989) e (3) os órgãos primários no embrião, de acordo com Płachno e Świątek (2010). Uma matriz binária de presença e ausência destes caracteres morfológicos foi gerada para cada espécie presente neste estudo, usando o programa NDE Nexus Data Editor (PAGE, 2001), que sobrepôs a árvore de inferência Bayesiana combinada (evidência total), para a qual foi utilizado o programa Mesquite (MADDISON; MADDISON, 2010).

Tabela 1. Espécies de *Utricularia* incluídas neste estudo, sua origem e acesso ao *GenBank*, por marcador molecular.

Seção	Espécie (voucher)	Acesso <i>GenBank</i> <sup>(Procedência das amostras)</sup>			
		<i>rps16</i>	<i>trnL-F</i>	<i>matK</i>	ITS
<i>Orchidioides</i>	<i>U. asplundii</i> (TS000261)	AF482558.1	AF482631.1	KY68970 <sup>1</sup>	KY689711 <sup>1</sup>
	<i>U. quelchii</i> (TS000260)	-	KY689702 <sup>1</sup>	AF531846.1	-
	<i>U. endresii</i> (TS000262)	-	AF482642.1	KY799062 <sup>1</sup>	KY689709 <sup>1</sup>
	<i>U. alpina</i> (TS000263)	AF482556.1	AF482629.1	AF531822.1	KY689712 <sup>1</sup>
	<i>U. praetermissa</i> (TS000264)	-	KY689703 <sup>1</sup>	KY689698 <sup>1</sup>	KY689705 <sup>1</sup>
	<i>Iperua</i>	<i>U. humboldtii</i> (TS000199)	-	KY689704 <sup>2</sup>	AF531836.1
<i>U. geminiloba</i> (VFOM2045)		-	AF482646.1	KX604216.1	KY689716 <sup>1</sup>
<i>U. nephrophylla</i> (VFOM2047)		AF482588.1	AF482664.1	AF531827.1	KY689707 <sup>1</sup>
<i>U. reniformis</i> (VFOM2044)		AF482595.1	AF482671.1	KX604218.1	KY689706 <sup>1</sup>
<i>U. nelumbifolia</i> (VFOM2055)		AF482586.1	AF482662.1	KX604217.1	KY689708 <sup>1</sup>
<i>U. cornigera</i> (TS000265)		-	KY689701 <sup>1</sup>	KY689699 <sup>1</sup>	KY689710 <sup>1</sup>
<i>Utricularia</i>		<i>U. aurea</i> (TS000267)	AF482559.1	AF482632.1	KX604176.1
	<i>U. australis</i>	AF482560.1	AF482633.1	AF531823.1	-
	<i>U. intermedia</i>	AF482575.1	AF482651.1	AF531839.1	-
	<i>U. macrorhiza</i> (TS000266)	AF482581.1	AF482657.1	AF531835.1	KY689719 <sup>3</sup>
	<i>U. minor</i> (TS000268)	-	GU169706.1	JN894028.1	KY689721 <sup>3</sup>
	<i>U. vulgaris</i> (TS000269)	-	JQ728994.1	JN894054.1	KY689722 <sup>3</sup>
	<i>Psyllosperma</i>	<i>U. huntii</i>	AF482574.1	AF482650.1	-
<i>U. praelonga</i>		AF482591.1	AF482667.1	AF531843.1	-
<i>U. longifolia</i> (VFOM1680)		AF482580.1	AF482656.1	AF531834.1	KY689718 <sup>1</sup>
<i>U. hispida</i> (VFOM1637)		-	-	AF531829.1	KY689717 <sup>1</sup>
<i>U. calycifida</i>		-	-	AF531824.1	-
<i>Foliosa</i>	<i>U. tricolor</i> (VFOM2043)	AF482600.1	AF482677.1	KX604210.1	KY689720 <sup>1</sup>
	<i>U. tridentata</i>	-	-	AF531825.1	-
	<i>U. amethystina</i> (VFOM1644)	AF482557.1	AF482630.1	-	KY689713 <sup>1</sup>

<sup>1-3</sup> Procedência de amostras sequenciadas neste estudo: <sup>1</sup> Coleção de Plantas Carnívoras - Carlos Rohrbacher; <sup>2</sup> Coleção de Plantas Carnívoras - Barry Rice; <sup>3</sup> Coleção de Plantas Carnívoras - Instituto de Botânica da Academia Checa de Ciências, Třeboň, República Tcheca (*vouchers* depositados no Herbário JABU - UNESP / FCAV).

### 3.5. Histoquímica de órgãos e tecidos de armazenamento

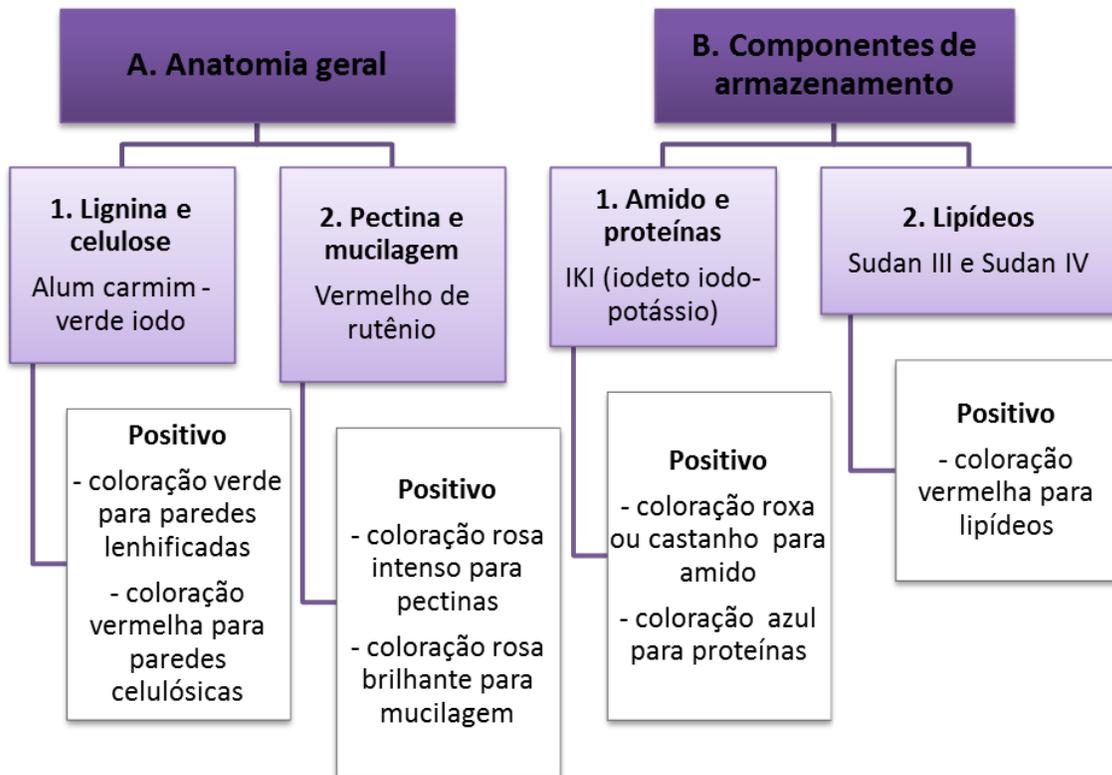
Para melhor compreensão e comparação dos tecidos de armazenamento, realizou-se análise histoquímica dos estolões de *Utricularia reniformis*, *U. nelumbifolia* (seção *Iperua*) e tubérculos de *U. geminiloba* (seção *Iperua*) e *U. alpina* (seção *Orchidioides*). Os estolões de *U. reniformis*, *U. nelumbifolia* e tubérculos de *U. geminiloba* foram coletados de populações naturais em dezembro de 2015, ou foram retirados da coleção do Jardim Botânico da Jagiellonian *University* em Cracóvia, Polônia, e os *vouchers* foram depositados no Herbário JABU (VFOde Miranda et al., 2044, 2055 e 2045, respectivamente).

Os seguintes reagentes foram utilizados para mostrar a anatomia geral e os componentes de armazenamento: IKI (iodeto iodo-potássio) para amido + proteínas, soluções etanólicas saturadas de Sudan III e Sudan IV para lípidos, alum carmim e iodo verde 0,1 % (w/v) para lignina + celulose e vermelho de rutênio para pectina + mucilagem (FILUTOWICZ; KUŹDOWICZ, 1951; RUZIN 1999) (Esquema 1).

O material (estolões espessos de *Utricularia reniformis*, *U. nelumbifolia* e tubérculos de *U. geminiloba*, *U. alpina*) foi fixado em 2,5% (v/v) de glutaraldeído / 2,5% (v/v) formaldeído em 0,05 M tampão de cacodilato de sódio (pH 7,0) durante vários dias, lavados três vezes no mesmo tampão e pós-fixados em 1% (w/v) de tetróxido de ósmio em solução durante 1,5 h a 0°C. Seguiu-se com desidratação utilizando uma série de etanol graduada e infiltração seguida de incorporação utilizando um *kit* de incorporação de epóxi (Fluka).

As seções semifinas (0.9 – 1.0  $\mu$ m) preparadas para microscopia de luz (LM) foram coradas para histologia geral utilizando azul de metileno aquoso / azure II (MB / All) durante 1-2 min (HUMPHREY; PITTMAN, 1974) e examinadas com um microscópio óptico “Olympus” BX60.

**Esquema 1.** Reações esperadas para os reagentes histoquímicos utilizados, classificados de acordo com as estruturas a serem observadas.



### 3.6. Função fotossintética de estolões e tubérculos

Para verificar a presença de cloroplastos e possível atividade fotossintética em estolões e tubérculos, esses órgãos foram colocados em estufa. Três fragmentos de estolão (cerca de 2 cm) de *Utricularia reniformis* e três tubérculos de *U. geminiloba* foram colocados em placas de Petri com papel absorvente úmido e armazenados a 25°C sob condições de luz natural durante 30 dias. As fotografias dos fragmentos e tubérculos foram então captadas.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Filogenia das seções de *Utricularia*: *Orchidioides* e *Iperua*

As árvores filogenéticas de inferência bayesiana e máxima verossimilhança (ML) são congruentes em sua topologia geral (Figuras 2-3) e mostram os grupos suportados por probabilidades posteriores (PPs) e ML *bootstraps* em  $\geq 50\%$  na maioria dos clados (Tabela 2).

Tabela 2. Matrizes e análises estatísticas de alinhamentos e cladogramas inferidos pela máxima verossimilhança (ML) e inferência bayesiana (IB). (PP = probabilidades posteriores).

Conjunto de dados	Genoma	Terminais (n)	Caracteres considerando gaps (bp)	Clados com suporte $\geq 50\%$ (n (%)) <sup>1</sup>	
				PP (IB)	bootstrap (ML)
<i>rps16</i>	Plastidial	14	926	11 (84)	10 (77)
<i>trnL-trnF</i>	Plastidial	22	1.091	16 (76)	12 (57)
<i>matK</i> <sup>2</sup>	Plastidial	23	883	19 (86)	16 (72)
ITS	Nuclear	17	962	12 (75)	10 (62)
Combinado	Nuclear + Plastidial	25	3.864	20 (83)	17 (71)

<sup>1</sup> A percentagem de clados (%) foi calculada a partir do total de possíveis clados das árvores (= número de terminais -1).

<sup>2</sup> As sequências obtidas a partir de *GenBank* (ver tabela 1) foram trimadas para se obter uma região homóloga de acordo com o fragmento amplificado pelos iniciadores 3F\_KIM e 1R\_KIM (LIM et al., 2012).

Na análise do *íntron rps16*, em que foram utilizadas as sequências das seções estudadas em Jobson e Albert (2002), encontrou-se um resultado semelhante ao da classificação de Taylor (1989) (Figura 2A). Os outros marcadores plastidiais (*trnL-F* e

*matK*, Figuras 2B, C) mostram a sect. *Iperua* como um grupo parafilético, pela inclusão de *U. humboldtii* (taxonomicamente reconhecida como pertencente à sect. *Iperua*) na seção *Orchidioides*. Além disso, as sequências *trnL-F* e *matK* posicionaram *U. cornigera* na sect. *Iperua*.

A árvore resultante do espaçador *trnL-F* (Figura 2B) apresentou que *U. humboldtii* é um grupo irmão para as outras espécies na seção *Orchidioides* e que *U. cornigera* deve ser incluída na seção *Iperua* como um grupo irmão ao clado *U. nelumbifolia-U. reniformis*. Com este marcador, a análise ML mostrou as espécies *U. nelumbifolia*, *U. reniformis*, *U. cornigera* e *U. geminiloba* como grupo monofilético (Figura 2B). *U. humboldtii* está em posição similar, alinhada como um ramo externo do clado formado por *U. praetermissa*, *U. endresii*, *U. quelchii*, *U. asplundii* e *U. alpina*.

A árvore *matK* (Figura 2C) mostrou que *U. humboldtii* está intimamente relacionada como um grupo irmão da seção *Orchidioides*, assim uma topologia semelhante ao conjunto de dados *trnL-F* foi encontrada (Figura 2B).

Além disso, enquanto os marcadores plastidial *trnL-F* e *matK* mostraram *Utricularia cornigera* alinhada ao clado da sect. *Iperua*, o conjunto de dados ITS (Figura 2D), por outro lado, mostrou esta espécie agrupada em sect. *Orchidioides* como um grupo irmão de *U. praetermissa*, com valores máximos de suporte de ambas as análises (100% de PP e ML *bootstrap*). As seções *Iperua* e *Orchidioides* foram mostradas como parafiléticas (Figura 2D), com *U. humboldtii* ausente nesta análise.

A árvore resultante dos conjuntos de dados concatenados apresenta a seção *Iperua* como um grupo parafilético, que mostra *Utricularia humboldtii* como um ramo externo da sect. *Orchidioides* (Figura 3 - Clado A). *U. cornigera* é mostrada no clado da sect. *Orchidioides*, como um grupo monofilético com *U. asplundii*, *U. quelchii* e *U. praetermissa* - mas este clado não é fortemente suportado (PP 53% e ML *bootstrap* <50%). Apesar deste baixo suporte, o clado da sect. *Orchidioides*, que inclui *U. cornigera*, é fortemente suportado pela inferência bayesiana e ML *bootstrap*, com 100% e 99% em cada análise, respectivamente (Figura 3).

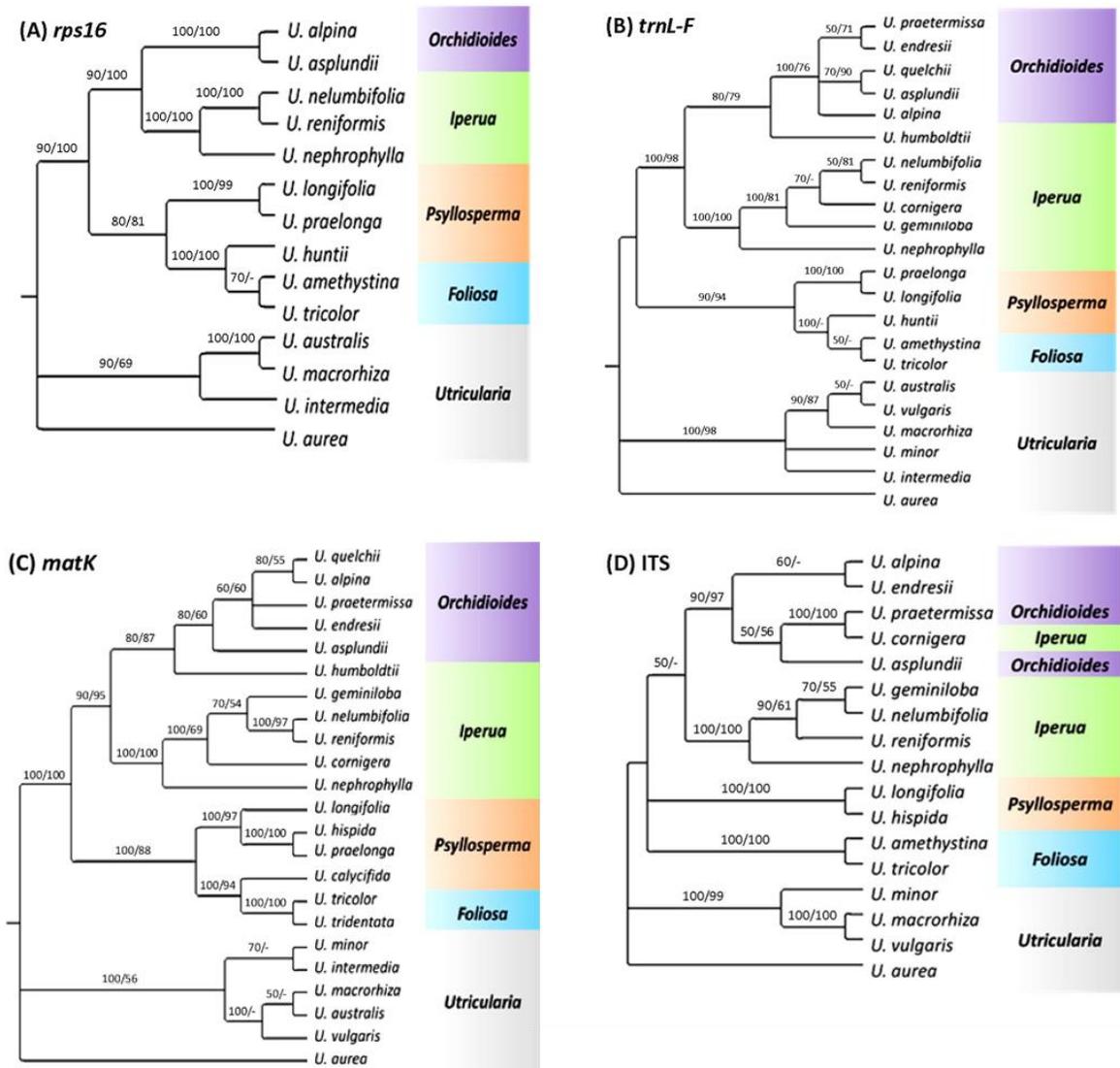


Figura 2. Árvores de inferência bayesiana para (A) *rps16*, (B) *trnL-F*, (C) *matK* e (D) ITS. Números acima dos ramos são as probabilidades posteriores, seguidas por *bootstraps* de máxima verossimilhança. (- denota ramos com um valor de suporte <50).

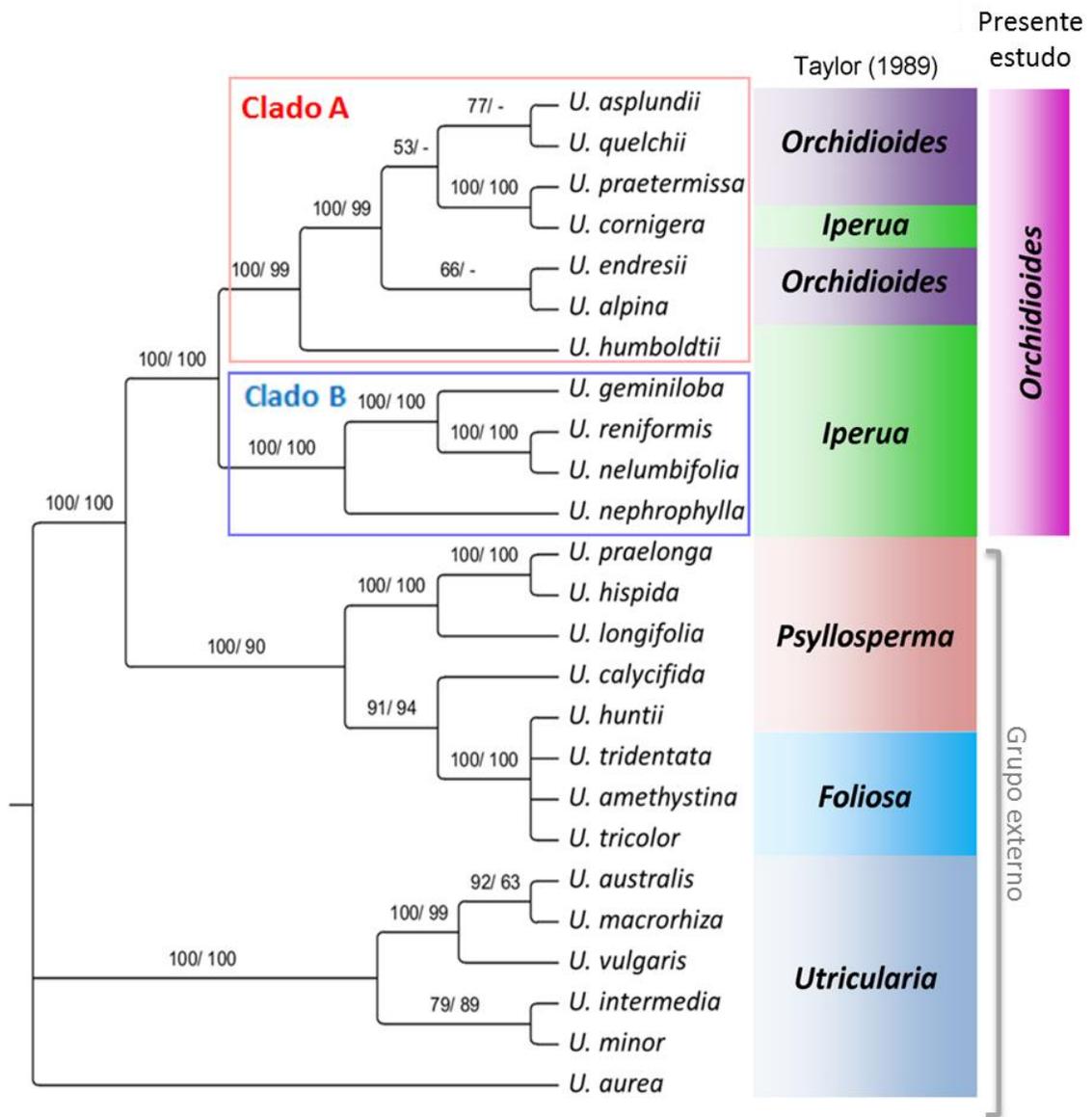


Figura 3. Inferência bayesiana para análise combinada (*rps16* + *trnL-F* + *matK* + ITS). Números acima dos ramos são as probabilidades posteriores, seguidas por *bootstraps* de máxima verossimilhança. (- denota ramos com um valor de suporte <50).

## 4.2. Distribuição dos caracteres morfológicos

Ambas as características de cristas no lábio inferior da corola (Figura 4A) e tubérculos (Figura 4C) não suportam a visão de que são sinapomórficas para as seções *Orchidioides* e *Iperua*.

De acordo com a análise combinada, a crista na corola possivelmente apareceu pelo menos duas vezes. Uma vez na linhagem ancestral do complexo *Orchidioides-Iperua* (Figura 4A - clado A + clado B), que foi perdido pela linhagem ancestral do clado *Iperua* surgindo posteriormente como uma reversão em *U. cornigera* (Figura 4A - clado A)

Os órgãos primários do embrião (Figura 4B) ocorrem em *U. cornigera* (STUDNIČKA, 2009), *U. humboldtii* (Figura 4B – clado A) e *U. nelumbifolia* (Figura 4B – clado B) e nas espécies de sect. *Utricularia* (PŁACHNO; ŚWIĄTEK, 2010 e respectivas referências). A falta de informações sobre a embriologia de várias espécies torna difícil traçar uma hipótese robusta e bem sustentada para a evolução desse caráter.

O caráter tubérculos também foi mostrado como homoplásico, com duas origens independentes: um para seção *Orchidioides*, com a reversão para *U. cornigera* (Figura 4C – clado A) que carece de tubérculos, e outra para *U. geminiloba* (Figura 4C – clado B).

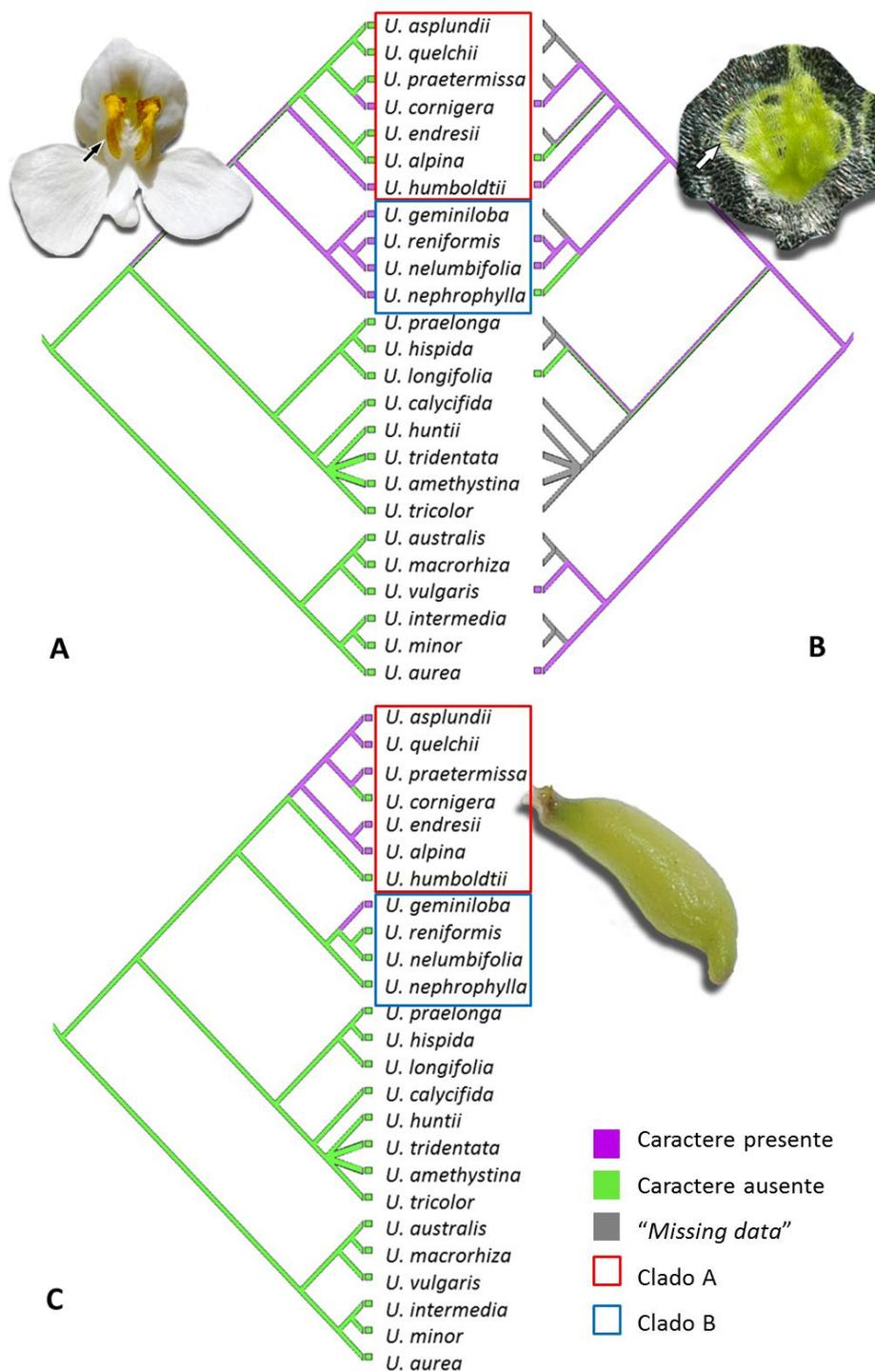


Figura 4. Distribuição dos caracteres morfológicos com base na árvore combinada bayesiana. (A) Crista no lábio inferior da corola, (B) órgãos primários no embrião e (C) tubérculos. (Detalhe em B: Crédito fotográfico para Barry Rice).

### 4.3. Análise histológica de estolões e tubérculos

Em nossas análises, os estolões espessos de *Utricularia reniformis* (Figuras 5 e 9A) e *U. nelumbifolia* (Figura 7) e os tubérculos de *U. geminiloba* (Figuras 6, 9B, C) e *U. alpina* (Figura 8) têm anatomia e substâncias de armazenamento semelhantes.

No geral, como mostrado nas secções transversais, a epiderme e o córtex parenquimatoso circundam o cilindro ectofílico central. Somente os estolões de *U. nelumbifolia* têm muitas lacunas (Figura 7A-D). O córtex consiste em grandes células de parênquima com grandes vacúolos, os elementos do xilema e do floema são separados uns dos outros. Em ambos os órgãos ocorrem pequenos tricomas epidérmicos, cada um constituído por uma célula basal, uma curta, central e uma cabeça longa (Figura 7E).

Muito pequenas e raras gotículas lipídicas foram observadas no citoplasma das células corticais (Figura 5C). As paredes celulares coradas com vermelho de rutênio (Figuras 5E e 6G) não apresentaram mucilagem e as coradas com IKI não apresentaram amido ou proteínas de armazenamento (Figuras 5D, 6F, 7F e 8C). As inclusões de proteínas paracristalinas estavam ocasionalmente presentes nos núcleos de vários tipos de células (Figuras 5F, 6H). As paredes celulares da célula de barreira dos tricomas coraram seletivamente com Sudan (Figuras 6D e 7E).

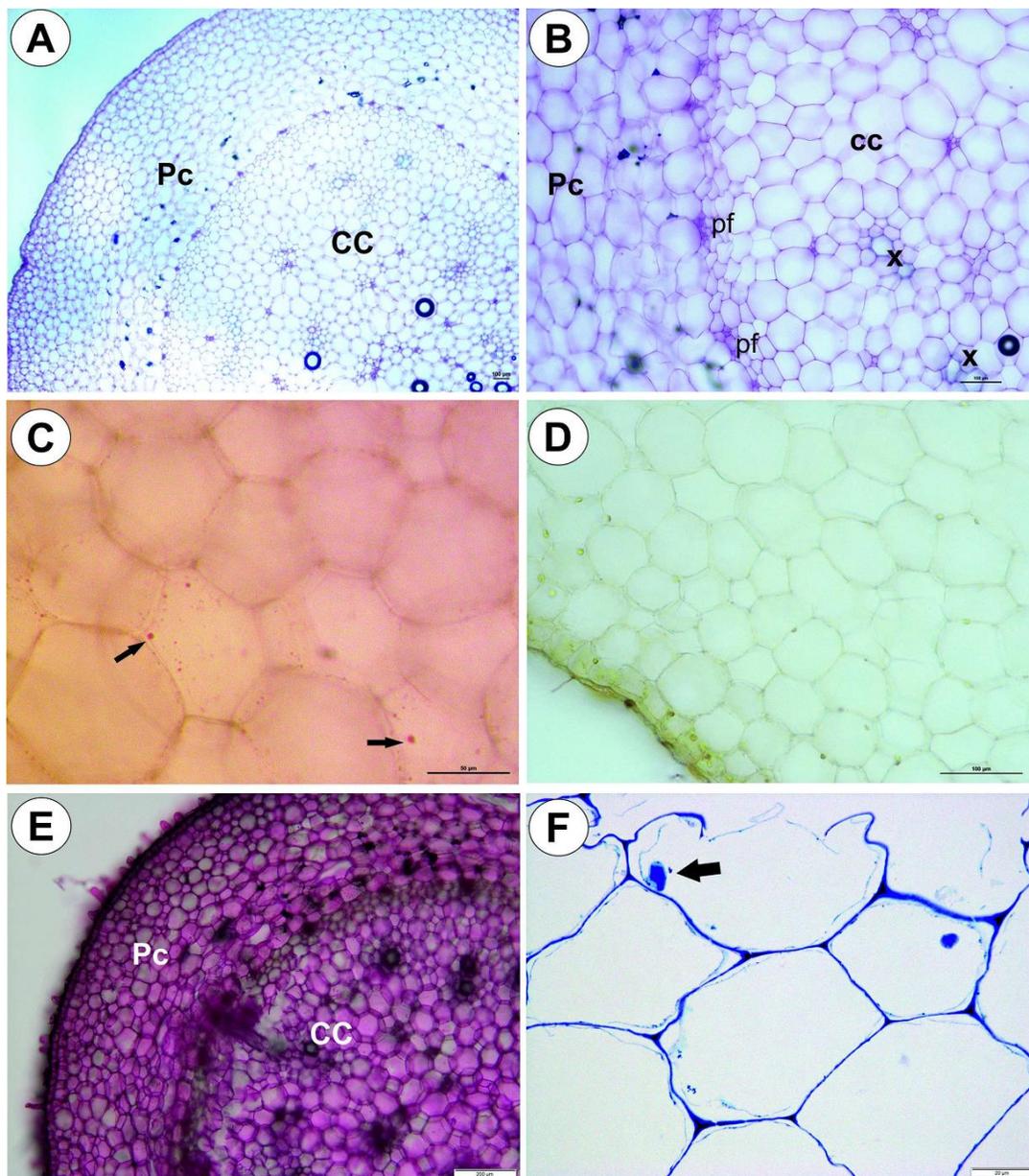


Figura 5. Anatomia e histoquímica de estolões de *Utricularia reniformis*. A-B. Anatomia geral do estolão, notar o córtex parenquimatoso (Pc) que envolve o cilindro ectofílico central (CC); Floema (pf), xilema (x), barra = 100  $\mu$ m. C. Reação para lípidos (Sudan IV), gotículas lipídicas pequenas (seta), barra = 50  $\mu$ m. D. Seção após tratamento com IKI, notar a ausência de grãos de amido, barra = 100  $\mu$ m. E. Seção tratada com vermelho de rutênio para pectinas e mucilagem, notar a reação positiva das pectinas nas paredes celulares, barra = 200  $\mu$ m. F. Seção semi-fina, notar os vacúolos e o núcleo com inclusão de proteína paracristalina, barra = 20  $\mu$ m.

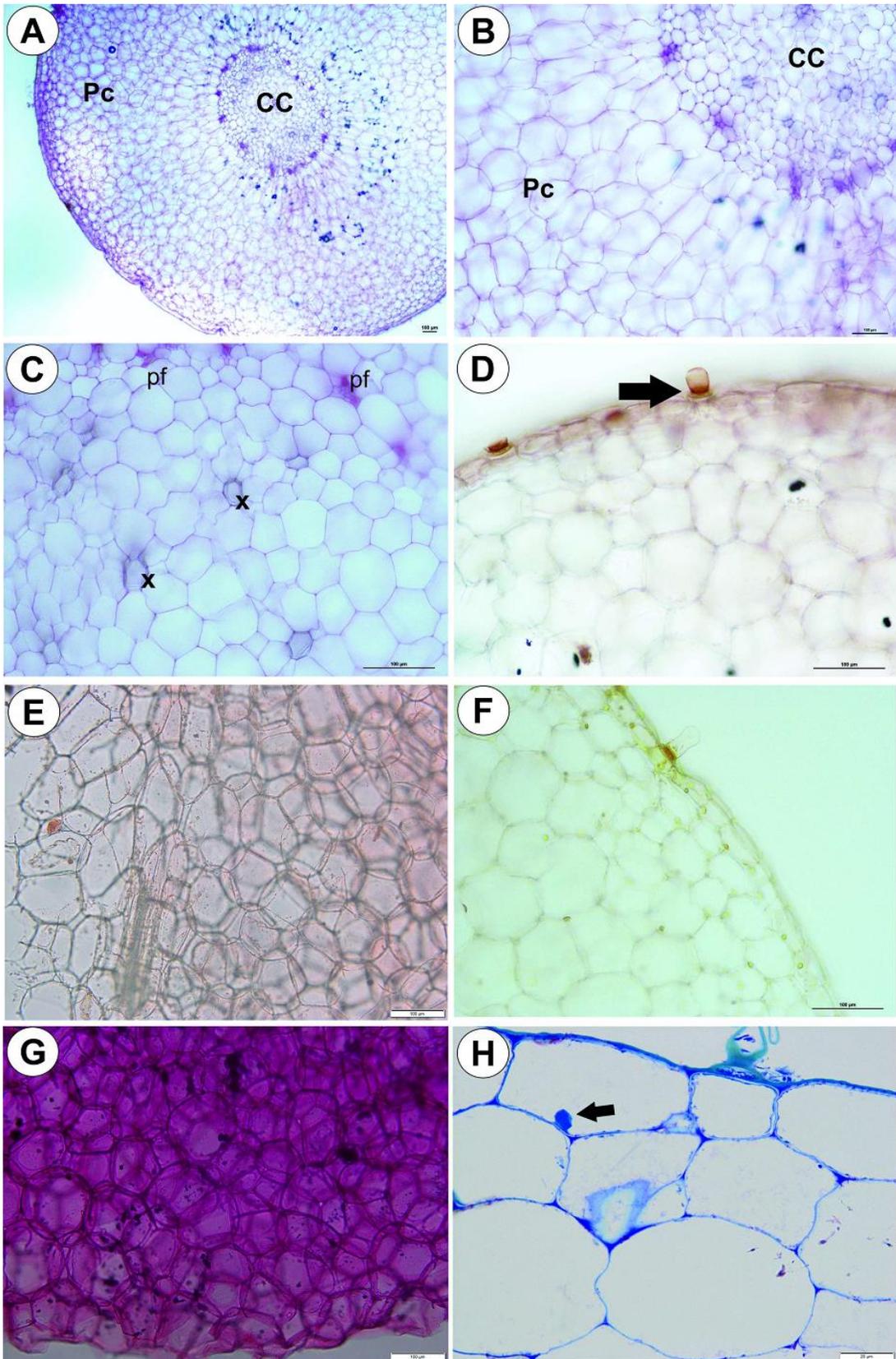


Figura 6. Anatomia e histoquímica de tubérculos de *Utricularia geminiloba*. A-C Anatomia geral do tubérculo, notar o córtex parenquimatoso (Pc) que envolve o cilindro ectofílico central (CC); Floema (pf), xilema (x), barra = 100  $\mu$ m. D. Reação para lipídeos (Sudan IV), notar reação positiva na célula barreira do tricoma (seta), barra = 100  $\mu$ m. E. Reação para lipídeos (Sudan IV), barra = 100  $\mu$ m. F. Seção após tratamento com IKI, notar a falta de grãos de amido, mas a reação positiva para a proteína e tricomas, barra = 100  $\mu$ m. G. Seção tratada com vermelho de rutênio para pectinas e mucilagem, notar a reação positiva das pectinas nas paredes celulares, barra = 100  $\mu$ m. H. Seção semifina, notar os vacúolos e o núcleo com inclusão de proteína paracristalina, barra = 20  $\mu$ m.

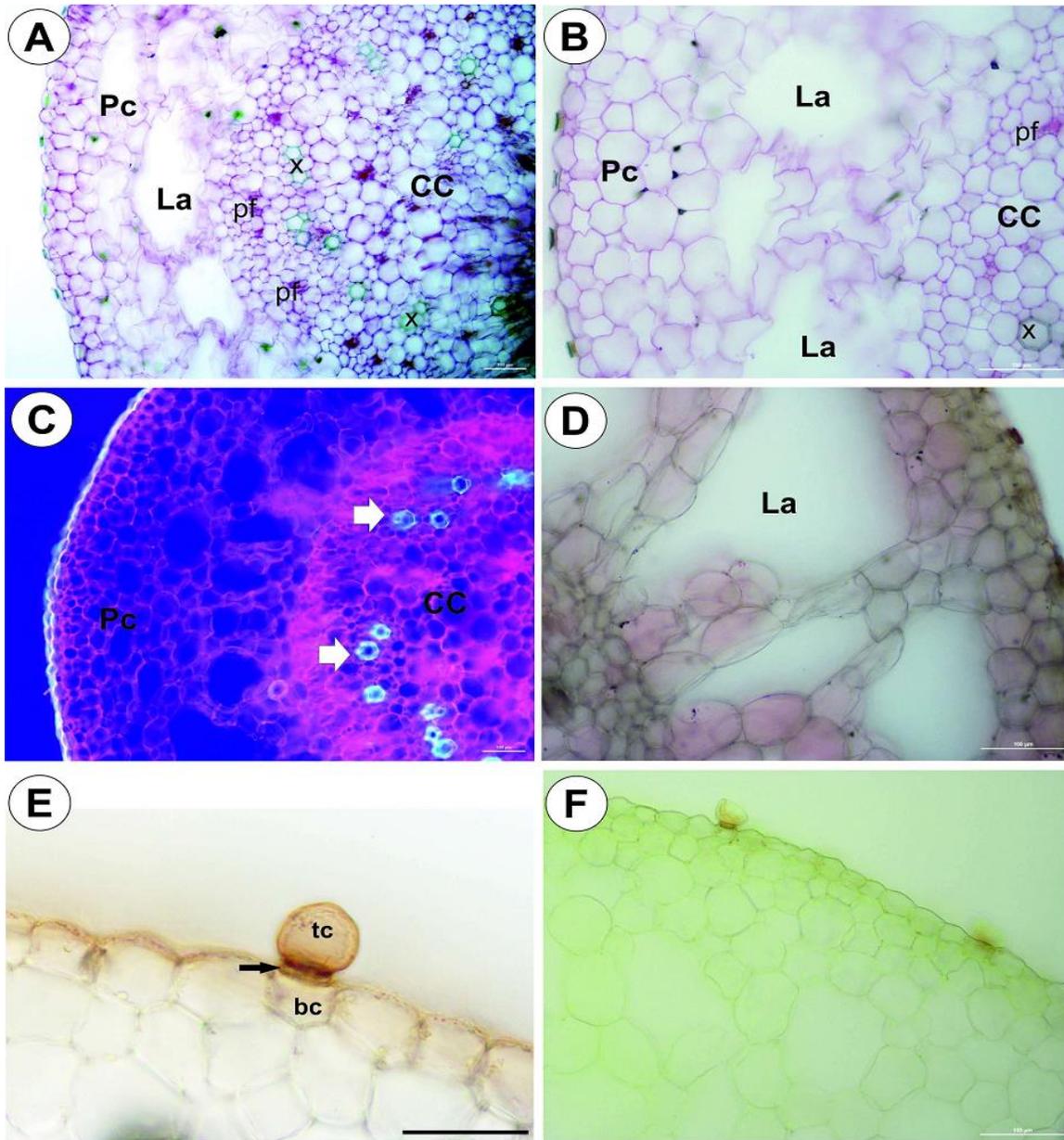


Figura 7. Anatomia e histoquímica de estolões de *Utricularia nelumbifolia*. A-B. Anatomia geral do estolão, notar o córtex parenquimatoso (Pc) que envolve o cilindro ectofílico central (CC); Floema (pf), xilema (x), lacuna (La), barra = 100  $\mu$ m. C. Autofluorescência de tecidos sob UV; Córtex parenquimatoso (Pc), cilindro central (CC), xilema (seta), barra = 100  $\mu$ m. D. Reação negativa para lipídeos (Sudan III), barra = 100  $\mu$ m. E. Reação para lipídios (Sudan IV), notar a reação positiva na cutícula das células epidérmicas e da célula barreira do tricoma, célula terminal (tc), célula barreira (seta), célula basal (bc), barra = 50  $\mu$ m. F. Seção após tratamento com IKI, notar a ausência de grãos de amido, barra = 100  $\mu$ m.

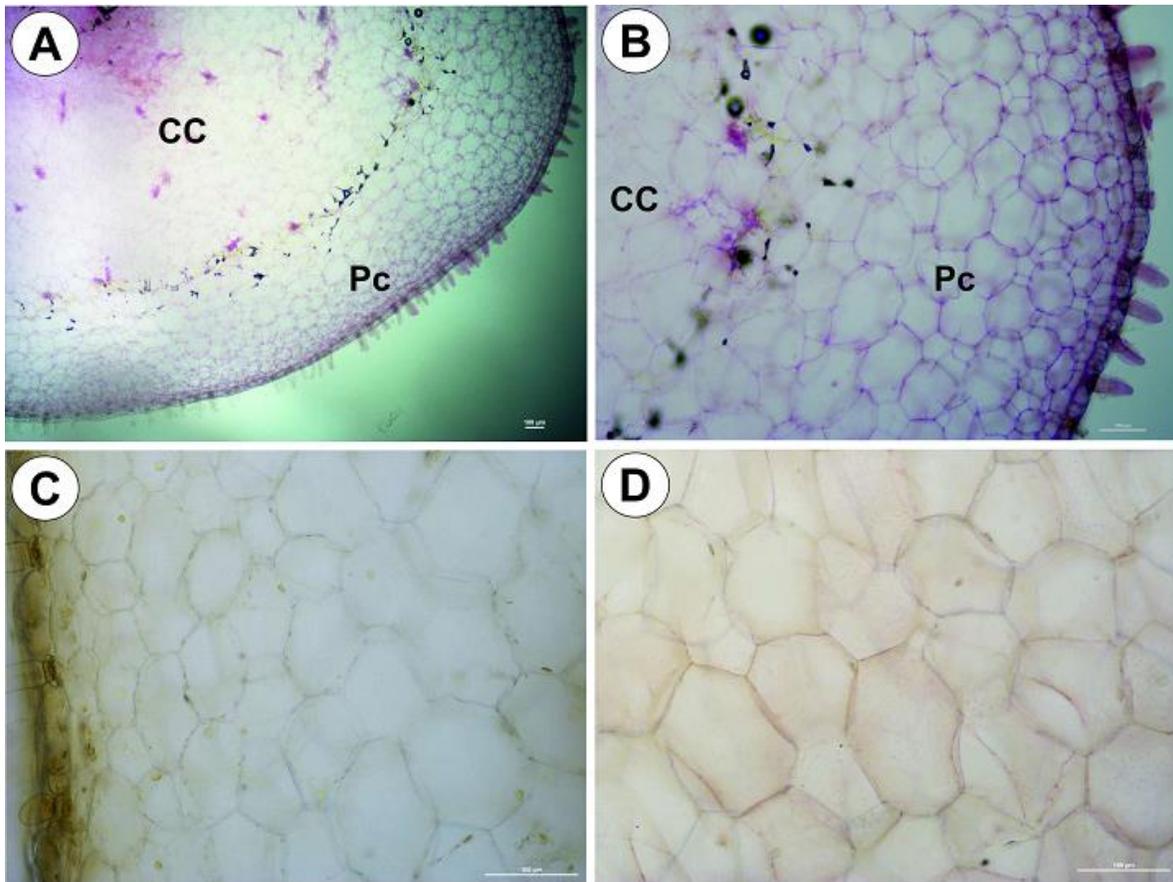


Figura 8. Anatomia e histoquímica de tubérculos de *Utricularia alpina*. A-B. Anatomia geral do tubérculo, notar o córtex parenquimatoso (Pc) que envolve o cilindro central ectofílico (CC); Barra = 100  $\mu\text{m}$ . C. Seção após tratamento com IKI, reação positiva para a proteína nos núcleos, barrara = 100  $\mu\text{m}$ . D. Reação para lipídeos (Sudan IV), barra = 100  $\mu\text{m}$ .

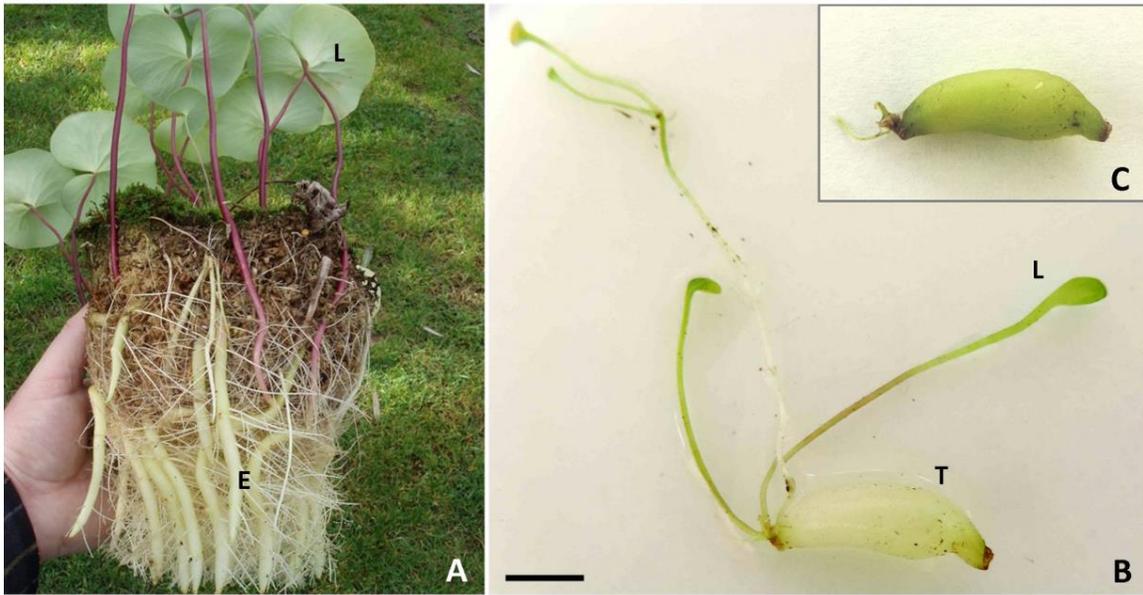


Figura 9. Hábito de *Utricularia reniformis* (A) e tubérculo de *U. geminiloba* antes (B) e após (C) uma experiência de 30 dias para verificar a função fotossintética (L = folha, E = estolão, T = tubérculo). (Crédito da foto a David Banks (A)) Barra = 5 mm.

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1. Filogenia do complexo *Orchidioides-Iperua* - uma seção é suficiente

Nossos resultados apoiam a parafilia de *Utricularia* sect. *Iperua*, enquanto que sect. *Orchidioides* revelou-se monofilética (Figuras 2 e 3). A espécie chave que faz a sect. *Iperua* parafilética é *U. humboldtii*, que é a espécie tipo atribuída a esta seção (TAYLOR, 1986, 1989). Resultados semelhantes foram obtidos por Müller et al. (2004) com base no *matK* e no íntron *trnK* e, posteriormente, Müller e Borsch (2005) sugeriram a aceitação de apenas a sect. *Orchidioides*, apoiando De Candolle (1844) e Kamiński (1895). De Candolle baseou seu sistema em apenas três espécies do complexo: *U.*

*alpina* (como *U. montana*) e *U. unifolia*, classificada como sect. *Orchidioides* e, curiosamente, *U. humboldtii*, que foi mantida em sua seção como *species dubiae*.

*Utricularia humboldtii*, uma espécie perene e uma das maiores terrestres do gênero, produz flores exuberantes que é um traço comum do complexo *Orchidioides-Iperua*. Esta espécie é encontrada como epífita terrestre ou mesmo aquática, uma vez que as plantas podem projetar estolões aéreos horizontais que atingem e crescem entre as folhas de bromélias (TAYLOR, 1989). Enquanto as espécies de sect. *Iperua* são distribuídas na América do Sul, principalmente no sul e sudeste do Brasil (BFG, 2015, MIRANDA et al., 2015), *U. humboldtii* é a única espécie desta seção que ocorre nas terras altas da Guiana. Assim, os clados A e B (Figura 3) também são suportados pela distribuição de espécies (com exceção de *U. cornigera*, que é endêmica do sudeste do Brasil) (BFG, 2015, MIRANDA et al., 2015).

## 5.2. *Utricularia cornigera* Studnička

Em nossa análise com os marcadores plastidiais *trnL-F* (Figura 2B) e *matK* (Figura 2C), *Utricularia cornigera* está alinhada à sect. *Iperua* relacionada ao clado *U. reniformis-U. nelumbifolia* e com *U. geminiloba*, apesar da incongruência encontrada com esta espécie ao considerar ambos os marcadores. A hipótese de um híbrido natural, proveniente do cruzamento entre *U. reniformis* e *U. nelumbifolia* (FLEISCHMANN, 2012), foi refutada por Studnička (2013; 2015) por uma experiência de cruzamento. As sementes e padrão de germinação resultantes se assemelham as de *U. geminiloba* (STUDNIČKA, 2005).

No entanto, na análise de ITS, *Utricularia cornigera* é incluída à sect. *Orchidioides*, com suporte máximo em ambas as análises filogenéticas (PP e ML), e também permaneceu em *Orchidioides* na árvore concatenada (Figura 3). Enquanto o DNA materno (cpDNA, neste caso) suporta uma estreita relação com as espécies de

sect. *Iperua*, a região ITS, de origem biparental, sugere que *U. cornigera* tem a mesma espécie ancestral comum relacionada ao clado *Orchidioides*.

As múltiplas cópias da região ITS encontradas em genomas eucarióticos podem ser um problema quando se utilizam estes dados para inferências filogenéticas, uma vez que não se pode garantir que as sequências obtidas sejam ortólogas (MIRANDA et al., 2010). No entanto, apesar das múltiplas cópias, a evolução em concerto ocorre quando as diferenças de sequências entre cópias no mesmo genoma se homogeneizam para a mesma sequência por meio de mecanismos como o cruzamento desigual de alta frequência e a conversão genética (ÁLVAREZ; WENDEL, 2003). Considerando que a importância da região ITS para as inferências filogenéticas se deve principalmente ao seu alto sinal para solucionar a filogenia de táxons relacionados (HILLIS; DIXON, 1991), os resultados apresentados neste estudo são muito importantes. Contudo, outras análises com o uso de diferentes marcadores nucleares devem abordar esta questão. As topologias apresentadas pelo ITS e a análise combinada proporcionam suporte filogenético para o reconhecimento de *U. cornigera* como espécie.

### 5.3. Distribuição de caracteres morfológicos

Taylor (1986, 1989) utilizou três caracteres principais para justificar a divisão da seção *Orchidioides* e para a criação da seção *Iperua*: a crista no lábio inferior da corola e a morfologia das sementes e do pólen. O pólen já foi estudado nas espécies destas seções por Hyunh (1968), que colocou *Utricularia alpina*, *U. praetermissa*, *U. jamesoniana* e *U. humboldtii* em um grupo, semelhante aos nossos resultados moleculares, que incluiu *U. humboldtii* na seção *Orchidioides* (Figura 3 - clado A).

A característica crista no lábio inferior da corola (Figura 4A) é exclusiva da seção *Iperua* segundo Taylor (1989). No entanto, uma vez que nossos resultados moleculares

mostraram que *U. humboldtii* e *U. cornigera* estão intimamente relacionadas com o clado da seção *Orchidioides*, esse caráter torna-se inútil como diagnóstico para esta seção (Figura 4A – Clado A).

Para as sementes e embriões, Taylor (1989) observou que os da seção *Orchidioides* são mais uniformes, o que é notavelmente diferente daqueles da seção *Iperua*: neste último, *Utricularia humboldtii* e *U. nelumbifolia* formam testa fina e transparente, contendo embriões clorofilados com numerosos órgãos primários (GOEBEL, 1891; MERL, 1915; LLOYD, 1942 - ver seta na Figura 4B).

Os órgãos primários dos embriões de *U. nelumbifolia* e *U. reniformis* A.St.-Hil. 'Enfant Terrible' foram estudados por Płachno e Świątek (2010). Em *U. nelumbifolia*, os órgãos primários são homólogos aos encontrados nas plântulas da seção *Utricularia*; Similares à estrutura da "folha", mas com a função provável da absorção de nutrientes do ambiente. Estes numerosos órgãos embrionários primários são adaptações para germinação em tanques de bromélias (Studnička 2009; 2011). Płachno e Świątek (2010) também discordaram da seção *Iperua*, pois verificaram que os embriões de *U. nelumbifolia* e *U. reniformis sensu stricto* tinham estruturas semelhantes, ao contrário de *U. humboldtii*. Nas últimas espécies, a parte basal do embrião não é tão proeminente e os órgãos primários dominam (GOEBEL, 1893). De qualquer forma, o padrão de germinação de *U. reniformis* 'Enfant Terrible' é diferente do de *U. reniformis sensu stricto* (GOEBEL, 1893; MERL, 1925), *U. humboldtii* e *U. nelumbifolia*. Quanto às demais espécies desta seção, o embrião em *U. nephrophylla* não apresenta "folhas" primordiais (MERL, 1925) e / ou, como em *U. geminiloba*, não estão suficientemente desenvolvidas (TAYLOR, 1989) ou não foram observadas (PŁACHNO; ŚWIĄTEK, 2010). A espécie recentemente descrita *U. cornigera* (STUDNIČKA, 2009) tem embriões verdes com numerosos órgãos primários, ao contrário da "verdadeira" *U. reniformis*.

Tubérculos, como um órgão especializado em armazenamento de água, ocorrem em todas as espécies da sect. *Orchidioides*, como adaptação para estas espécies que

são epífitas (TAYLOR, 1989). Na seção *Iperua*, os tubérculos estão presentes apenas em *U. geminiloba* (Figura 4C – Clado B) que é encontrada como litófita ou terrestre. Apesar das diferenças entre essas formas de vida, os *habitats* epifíticos e litofíticos podem representar restrições similares, com condições sazonais severas e altamente variáveis. *U. geminiloba* é comumente encontrada em paredes graníticas com pouca matéria orgânica (TAYLOR, 1989; MIRANDA, pers. observ.) e, portanto, os tubérculos são uma importante fonte de água nas estações secas.

Taylor (1989) observou grande similaridade entre os tubérculos em geral e os estolões de *U. reniformis* (Figura 7), que são crassos, sem constrição e quase como tubérculos muito alongados. Contudo, o autor não obteve mais informações sobre estas estruturas.

#### **5.4. Função e evolução do sistema estolão-tubérculo: existem diferenças entre estolões e tubérculos?**

A anatomia dos estolões espessos de *Utricularia reniformis* e dos tubérculos de *U. geminiloba* assemelha-se à anatomia dos estolões de *U. alpina* (BRUGGER; RUTISHAUSER, 1989) e *U. longifolia* (RUTISHAUSER; ISLER, 2001). Mas, neste caso, com um córtex mais desenvolvido. Ao contrário de nossa observação em *U. reniformis* e *U. geminiloba*, os estolões espessos de *U. humboldtii* (BRUGGER E RUTISHAUSER, 1989) e *U. nelumbifolia* apresentam muitas lacunas (Figura 7). Nossa observação concorda com a de Adlassnig et al. (2005), na medida em que os tubérculos de *U. alpina* são constituídos por células parenquimáticas desenvolvidas compreendendo um vacúolo muito desenvolvido. Darwin (1875) também analisou os tubérculos de *U. alpina* e não encontrou amido e sugeriu que sua função fosse de órgãos de armazenamento de água (JUNIPER et al., 1989).

Taylor (1989) reconheceu que os tubérculos das espécies da seção *Orchidioides* funcionavam como pseudobulbos de orquídeas, o que permite a sobrevivência das espécies em períodos secos. Devido a este ao estresse hídrico em espécies que crescem muito acima do solo, a aquisição e armazenamento de água são os principais fatores abióticos para o crescimento de espécies epífitas, enquanto a disponibilidade de nutrientes e a irradiação solar continuam sendo uma preocupação secundária (ZOTZ; HIETZ, 2001; LAUBE; ZOTZ, 2003). Assim, na maioria das epífitas, existem estruturas adaptativas como pseudobulbos (Orchidaceae), velame (Orchidaceae, Araceae, Bromeliceae) e também tricomas foliares (Bromeliaceae), que facilitam a absorção de água (BENZING; SHEEMANN, 1978). Além disso, quando expostos à luz, os tubérculos e estolões podem desempenhar um papel importante como órgãos fotossintéticos (Figura 9B, C).

Na seção *Iperua*, *Utricularia geminiloba* é uma espécie terrestre e litofítica que é freqüentemente encontrada em paredes úmidas e pode sobreviver por períodos secos, como *U. reniformis*, que é terrestre, epífita e também litofítica. De acordo com Taylor (1989), nem sempre é certo se uma espécie de *Utricularia* é uma holoepífita, uma epífita facultativa ou acidental, como algumas espécies foram raramente observadas em seu *habitat* natural. Por exemplo, *U. alpina*, embora normalmente uma epífita, cresce ocasionalmente no solo (TAYLOR, 1989).

A partir deste estudo, é possível inferir a estreita relação entre tubérculos e estolões espessos como uma estratégia de sobrevivência crucial para epífitas e litófitas. No entanto, outras seções do gênero *Utricularia* também possuem espécies com tubérculos ou estolões espessos (por exemplo, nas seções *Aranella*, *Chelidon*, *Phyllaria*, *Pleiochasia*, *Utricularia*) e até mesmo uma espécie de *Genlisea* (RIVADAVIA et al., 2013). Nestes casos, também pode ocorrer uma função de armazenamento de nutrientes, particularmente para espécies encontradas em ambientes pobres e sazonalmente estressantes. Por exemplo, *U. menziesii*, que tem um período de dormência durante todo o verão australiano quente e seco (TAYLOR, 1989). Os tubérculos desta espécie podem desempenhar um papel importante no armazenamento

de carboidratos (RICE, 2011), mas estudos posteriores com análise histológica são necessários para comprovar essa suposição. Desta forma, é possível que o sistema estolão-tubérculo, com sua função primária de armazenamento de água, tenha se originado independentemente (como homoplasias) dentro do gênero *Utricularia* como uma adaptação aos déficits hídricos, com ocorrência comum no complexo *Orchidioides-Iperua*.

## 6. CONCLUSÕES

Nossas análises filogenéticas, com maior representatividade em número de espécies e marcadores moleculares dentre os estudos já realizados nestas seções, apresentam a seção *Iperua* como parafilética, com a inclusão de sua espécie tipo *Utricularia humboldtii* e a espécie *U. cornigera* à seção *Orchidioides*. Desta forma, a distribuição de caracteres morfológicos sobre a filogenia não sustenta a criação da seção *Iperua*, como feito por Taylor (1989).

Além disso, os estolões e tubérculos das espécies da seção *Iperua* têm padrões anatômicos semelhantes aos dos tubérculos de *Orchidioides* e desempenham a mesma função primária que os órgãos de armazenamento de água, com uma origem potencialmente comum.

Nossos resultados, portanto, mostram que as seções *Orchidioides* e *Iperua* estão intimamente ligadas e apoiam sua união em uma seção chamada *Orchidioides*, como sugerido por Müller e Borsch (2005).

## 7. REFERÊNCIAS

ADAMEC, L. Foliar mineral nutrient uptake in carnivorous plants: what do we know and what should we know?. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, p. 10, 2013.

ADAMEC, L. The smallest but fastest: Ecophysiological characteristics of traps of aquatic carnivorous *Utricularia*. **Plant Signaling & Behavior**, v. 6, n. 5, p. 640-646, 2011.

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.

AKAIKE, H. Information theory and an extension of the maximum likelihood principle. In: PETROV, B. N.; CSAKI, F. (Eds). **Second International Symposium on Information Theory**. Budapest: Akademiai Kiado. p. 267–281, 1973.

ALBERT, V. A.; JOBSON, R. W.; MICHAEL, T. P.; TAYLOR, D. J. The carnivorous bladderwort (*Utricularia*, Lentibulariaceae): a system inflates. **Journal of Experimental Botany**, v. 61, n. 1, p. 5-9, 2010.

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W., MILLER, W., MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology** v. 215, p. 403-410, 1990.

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

ARBER, A. **The natural philosophy of plant form**. Cambridge University Press, 2012.

BARNHART, J. H. **Segregation of genera in Lentibulariaceae**. New York Botanical Garden, 1916.

BARTHLOTT, W.; POREMBSKI, S.; FISCHER, E.; GEMMEL, B. First protozoa trapping plant found. **Nature**, v. 392, p. 447, 1998.

BENZING, D. H.; SEEMANN, J. Nutritional piracy and host decline: a new perspective on the epiphyte-host relationship. **Selbyana**, v. 2, n. 2/3, p. 133-148, 1978.

BFG - The Brazil Flora Group. Growing knowledge: an overview of seed plant diversity in Brazil. **Rodriguésia** n. 66, p.1085–1113, 2015.

BRUGGER, J.; RUTISHAUSER, R. Bau und Entwicklung landbewohnender *Utricularia*-Arten. **Botanica Helvetica**, v. 99, n. 2, p. 91-146, 1989.

CARAVIERI, F. A.; FERREIRA, A. J.; FERREIRA, A.; CLIVATIA, D.; 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, 2014.

CARRETERO-PAULET, L.; CHANG T.; LIBRADO, P.; IBARRA-LACLETTE, E.; HERRERA-ESTRELLA, L.; ROZAS, J.; ALBERT, V. A. Genome-wide analysis of adaptive molecular evolution in the carnivorous plant *Utricularia gibba*. **Genome Biology and Evolution**, v.7, n. 2, p. 444-456, 2015a.

CARRETERO-PAULET, L.; CHANG T.; LIBRADO, P.; IBARRA-LACLETTE, E.; HERRERA-ESTRELLA, L.; ROZAS, J.; ALBERT, V. A. High gene family turnover rates and gene space adaptation in the compact genome of the carnivorous plant *Utricularia gibba*. **Molecular Biology and Evolution**, v. 32, n. 5, p. 1284-1295, 2015b.

CASPER, S. J. Monographie der Gattung *Pinguicula* L. **Bibliotheca Botanica**, 1–209, 1966.

CLIVATI, D.; Cordeiro, G. D.; PŁACHNO, B. J.; MIRANDA, V. F. O. Reproductive biology and pollination of *Utricularia reniformis* A.St.-Hil. (Lentibulariaceae). **Plant Biology**, v. 16, n. 3, p. 677-682, 2014.

DARRIBA, D.; TABOADA, G. L.; DOALLO, R.; POSADA, D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature Methods**, v. 9, n. 8, p. 772-772, 2012.

DARWIN, C. **Insectivorous plants**. J. Murray, 1888.

DE CANDOLLE, A. P. Lentibularieae. In: \_\_\_\_\_ (Ed.), **Prodromus Systematis Naturalis Regni Vegetabilis**, Paris: 1844.

DOYLE, J. J. E DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation method for small quantities of fresh tissues. **Phytochem Bull.** v. 19, p. 11-15, 1987.

FILUTOWICZ, A.; KUŹDOWICZ, A. **Mikrotechnika Roślinna**. Państwowe Wydaw. Rolnicze i Leśne, 1951.

FISHER, E.; BARTHLOTT, W.; SEINE, R.; THEISEN, I. Lentibulariaceae. In: KUBITZKI, K et al. (Eds.), **The Families and Genera of Vascular Plants**, Berlin: Springer, 2004.

FLEISCHMANN, A. **Monograph of the genus *Genlisea***. Redfern Natural History Productions, 2012.

FLEISCHMANN, A. The new *Utricularia* species described since Peter Taylor's monograph. **Carnivorous Plant Newsletter**, v. 41, n. 2, p. 67-76, 2012b.

FLEISCHMANN, A.; MICHAEL, T. P.; RIVADAVIA, F.; SOUZA, A.; WANG, M.; TEMSH E. M.; 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**, 2014.

GOEBEL, K. *Utricularia*. In: \_\_\_\_\_. **Morphologische und Biologische Studien**, V. Buitenzorg: Annales du Jardin Botanique de Buitenzorg, n. 9, p. 41–119, 1891.

\_\_\_\_\_. **Pflanzenbiologische Schilderungen**, vol. 2. Germany: N.G. Elwert'sche Verlagsbuchhandlung. 1893.

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

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

HILLIS, D. M.; DIXON, M. T. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. **Quarterly Review of Biology**, v. 66, n. 4, p. 411-453. 1991.

HUMPHREY, C. D.; PITTMAN, F. E. A simple methylene blue-azure II-basic fuchsin stain for epoxy-embedded tissue sections. **Stain Technology**, v. 49, n. 1, p. 9-14, 1974.

HUYNH, Kim-Lang. Etude de la morphologie du pollen du genre *Utricularia* L. **Pollen et Spores**, v. 10, n. 1, p. 11-55, 1968.

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.; LYONS, E., HERNÁNDEZ-GUZMÁN, G.; PÉREZ-TORRES, C. A.; CARRETERO-PAULET, L.; CHANG, T. H.; FERNÁNDEZ-CORTÉS, A. Architecture and evolution of a minute plant genome. **Nature**, v. 498, n. 7452, p. 94-98, 2013.

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

JOBSON, R. W.; 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**, v. 101, n. 52, p. 18064-18068, 2004

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

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

KAMIÉNSKI, F. Lentibulariaceae in Engler, A. e Plantl, K. A. E., **Die naturalischen Pflanzenfamilien IV**, 3b, Leipzig, 1895.

KATOH, K.; STANDLEY, D. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 4, p. 772-780, 2013.

KEARSE, M.; MOIR, R.; WILSON, A.; STONES-HAVAS, S.; CHEUNG, M.; STURROCK, S.; BUXTON, S.; COOPER, A.; MARKOWITZ, S.; DURAN, C.; THIERER, T.; ASHTON, B.; MEINTJES, P. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, v. 28, n. 12, p. 1647-1649, 2012.

LAUBE, S.; ZOTZ, G. Which abiotic factors limit vegetative growth in a vascular epiphyte?. **Functional Ecology**, v. 17, n. 5, p. 598-604, 2003.

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. 1, 2013.

LIM, G. S.; BALKE, M.; MEIER, R. Determining species boundaries in a world full of rarity: singletons, species delimitation methods. **Systematic Biology**, v. 61, n. 1, p. 165-169, 2012.

LLOYD, F. E. **The carnivorous plants**. The Ronald Press Company, New York, 1942.

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

MADDISON, W. P.; MADDISON, D. R. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. 2011; Version 2.75. Disponível em: <mesquiteproject.org/mesquite/download/download.html>, 2010. 15 out. 2016.

MERL, E. M. Beiträge zur Kenntnis der brasilianischen *Utricularien*. **Flora**, v. 118, n. 119, p. 386-392, 1925.

MERL, E. M. Beiträge zur Kenntnis der *Utricularien* und *Genliseen*. **Flora**, v. 108, p. 127-200, 1915.

MILLER, M. A.; PFEIFFER, W.; SCHWARTZ, T. Creating the CIPRES science gateway for inference of large phylogenetic trees. In: **Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)**. New Orleans: Louisiana, USA. p. 1-8, 2010.

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

MIRANDA, V. F. O.; MENEZES, C. G.; SILVA, S. R.; DÍAZ, Y. C. A.; RIVADAVIA, F. Lentibulariaceae in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://www.floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB8570>>. Acesso em: 13 out. 2016.

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

MÜLLER, K.; BORSCH, T.; LEGENDRE, L.; POREMBSKY, S.; BARTHLOTT, W. A phylogeny of Lentibulariaceae based on sequences of *matK* and adjacent noncoding regions. **American Journal of Botany**, v. 87, n. 6, p. 145–146, 2000.

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

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

OXELMAN, B.; LIDÉN, M.; BERGLUND, D. Chloroplast *rps16* intron phylogeny of the tribe Sileneae (Caryophyllaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 206, n. 1-4, p. 393-410, 1997.

PAGE, R. D. M. NDE (NEXUS data editor for windows). **Glasgow: Page, RD M**, 2001.

PEROUTKA, M.; ADLASSNIG, W., VOLGGER, M.; THOMAS, L.; URL, G. W., LICHTSCHEIDL, K., I., *Utricularia*: a vegetarian carnivorous plant? **Plant Ecology**, v. 199, n. 2, p.153-162, 2008.

PŁACHNO, B. J.; STPICZYŃSKA, M.; DAVIES, K. L.; ŚWIĄTEK, P.; MIRANDA, V. F. O. Floral ultrastructure of two Brazilian aquatic-epiphytic bladderworts: *Utricularia cornigera* Studnička and *U. nelumbifolia* Gardner (Lentibulariaceae). **Protoplasma**, v. 254, n. 1, p. 353-366, 2017.

PŁACHNO, B. J.; KOZIERADZKA-KISZKURNO, M.; ŚWIĄTEK, P. DARNOWSKI, D. W. Prey attraction in carnivorous *Genlisea* (Lentibulariaceae). **Acta Biologica Cracoviensia, Series Botanica**, v. 50, p. 87- 94, 2008.

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, p. plv140, 2016.

RAMBAUT, A. FigTree v1. 3.1: Tree figure drawing tool. **Institute of Evolutionary Biology**. University of Edinburgh. 2009.

REIFENRATH, K.; THEISENA, I.; SCHNITZLERA, J.; POREMBSKIB, S.; BARTHLOTTA, W. Trap architecture in carnivorous *Utricularia* (Lentibulariaceae). **Flora Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 201, n. 8, p. 597-605, 2006.

RICE, B. Tuberos organs in *Utricularia*, and new observations of sub-tuberos stolons on *Utricularia radiata* Small. **Carnivorous Plant Newsletter**, n. 40, p. 88–91, 2011.

RIVADAVIA, F.; GONELLA, P. M.; FLEISCHMANN, A. A new and tuberos species of *Genlisea* (Lentibulariaceae) from the Campos Rupestres of Brazil. **Systematic Botany**, v. 38, n. 2, p. 464-470, 2013.

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, 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.

RUZIN, S. E. **Plant microtechnique and microscopy**. New York: Oxford University Press, 1999.

SANGER, F.; COULSON, A. R. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. **Journal of Molecular Biology**, v. 94, n. 3, p. 441-488, 1975.

SILVA, S. R.; DIAZ Y. C. A.; PENHA, H. A.; PINHEIRO, D. G.; FERNANDES, C. C.; MIRANDA, V. F. O.; MICHAEL, T. P.; VARANI, A. M. 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, 2016.

SIROVÁ, D.; BOROVEC, J.; ČERNÁ, B.; REJMÁNKOVÁ, E.; ADAMEC, L.; VRBA, J. Microbial community development in the traps of aquatic *Utricularia* species. **Aquatic Botany**, v. 90, n. 2, p. 129-136, 2009.

STÖVER, B, MÜLLER, K. TreeGraph 2: combining and visualizing evidence from different phylogenetic analyses. **BMC Bioinformatics**, v.11, n.1, p.1, 2010.

STUDNIČKA, M. Bladderworts from South America germinating with a difference. (In Czech). **Trifid**, v.10, p.8–9, 2005b.

\_\_\_\_\_. Brazilian bladderwort *Utricularia reniformis* is a blend of two species. **Thaiszia – Journal of Botany**, v.19, p.131–143, 2009.

\_\_\_\_\_. Brief information about the species status of *Utricularia cornigera* Studnička. **Carnivorous Plant Newsletter**, v. 42, p.15–80, 2013.

\_\_\_\_\_. Second brief piece of information about the species status of *Utricularia cornigera* Studnička. **Carnivorous Plant Newsletter**, v.44, p. 204–206, 2015.

\_\_\_\_\_. Surprising phenomena in the life strategy of *Utricularia reniformis* in Brazil. **Thaiszia – Journal of Botany**, v. 21, p. 37–43, 2011.

\_\_\_\_\_. *Utricularia humboldtii* – the bladderwort in a bad place. **Trifid**, v.3, 2005a.

SWOFFORD, D. L. **PAUP\* Phylogenetic analysis using parsimony**. 1998.

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

TAVARÉ, S. Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences. **Lectures on mathematics in the life sciences**, v. 17, p. 57-86, 1986.

TAYLOR, P. New taxa in *Utricularia* (Lentibulariaceae). **Kew Bulletin**, p. 1-18, 1986.

TAYLOR, P. The Genus *Utricularia* – A Taxonomic Monograph. Kew Bulletin Additional Series XIV. **Royal Botanic Gardens**, Kew. London. 1989.

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

VINCENT, O.; WEIßKOPF, C.; POPPINGA, S.; MASSETER, T.; SPECK, T.; JOYEUX, M.; QUILLIET, C.; MARMOTTANT, P. Ultra-fast underwater suction traps. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 278, n. 1720, p. 2909-2914, 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. 8, n. 3, 2015.

WICKE, S.; SCHÄFERHOFF, B.; DEPAMPHILIS, C. W.; MÜLLER, K. F. Disproportional plastome-wide increase of substitution rates and relaxed purifying selection in genes of carnivorous Lentibulariaceae. **Molecular Biology and Evolution**, v. 31, n. 3, p. 529-545, 2013.

WIENS, J. J. Missing data and the design of phylogenetic analyses. **Journal of Biomedical Informatics**, v. 39, n. 1, p. 34-42, 2006.

ZOTZ, G.; HIETZ, P. The physiological ecology of vascular epiphytes: current knowledge, open questions. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, n. 364, p. 2067-2078, 2001.