

UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES  
CRISTINE GOBBO MENEZES

DINÂMICA E ESTRUTURA DE POPULAÇÕES DE *Utricularia*  
(LENTIBULARIACEAE): ESPÉCIES AMEAÇADAS E NÃO-  
AMEAÇADAS

Mogi das Cruzes, SP  
2010

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES  
CRISTINE GOBBO MENEZES

DINÂMICA E ESTRUTURA DE POPULAÇÕES DE *Utricularia*  
(LENTIBULARIACEAE): ESPÉCIES AMEAÇADAS E NÃO-  
AMEAÇADAS

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Biotecnologia, subárea Taxonomia Molecular, da Universidade de Mogi das Cruzes como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre.

Área de Concentração: Biotecnologia Aplicada a Recursos Naturais e Agronegócios

Profº Orientador: Dr. Vítor Fernandes Oliveira de Miranda

Mogi das Cruzes, SP  
2010

FINANCIAMENTO



FICHA CATALOGRÁFICA

Universidade de Mogi das Cruzes - Biblioteca Central

Menezes, Cristine Gobbo

Dinâmica e estrutura de populações de *Utricularia* (Lentibulariaceae) : espécies ameaçadas e não-ameaçadas / Cristine Gobbo Menezes. – 2010.

119 f.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de Mogi das Cruzes, 2010

Área de concentração: Biotecnologia Aplicada a Recursos Naturais e Agronegócios

Orientador: Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Vítor Fernandes Oliveira de Miranda

1. *Utricularia* 2. Genética de populações 3. Morfometria 4. Espécies ameaçadas I. Miranda, Vítor Fernandes Oliveira de

CDD 576.58

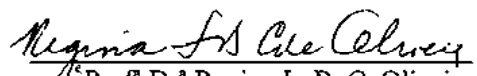
**ADENDO**

ADENDO À ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE APRESENTAÇÃO DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

Às quinze horas e trinta minutos do dia quatorze de maio de dois mil e dez, na Universidade de Mogi das Cruzes, realizou-se a defesa de dissertação “Dinâmica e estrutura de populações de *utricularia* (lentibulariaceae): comparação entre espécies ameaçadas e não ameaçadas” para obtenção do grau de Mestre pelo(a) candidato(a) **Cristine Gobbo Menezes**.

Em adendo, o título da dissertação, conforme sugestão da banca, foi alterado para “Dinâmica e estrutura de populações de *utricularia* (lentibulariaceae): espécies ameaçadas e não ameaçadas”, o que deverá constar nas cópias definitivas da dissertação.

Mogi das Cruzes, 14 de maio de 2010.

  
Profª Drª Regina L. B. C. Oliveira  
Coordenadora do Programa  
Pós-Graduação em Biotecnologia

ATAS

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE APRESENTAÇÃO DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

Às quinze horas e trinta minutos do dia catorze de maio de dois mil e dez, na Universidade de Mogi das Cruzes, realizou-se a defesa de dissertação "Dinâmica e estrutura de populações de *utricularia* (lentibulariaceae): comparação entre espécies ameaçadas e não ameaçadas" para obtenção do grau de Mestre pelo(a) candidato(a) **Cristine Gobbo Menezes**. Tendo sido o número de créditos alcançados pelo(a) mesmo(a) no total de 54 (cinquenta e quatro), a saber: 30 unidades de crédito em disciplinas de pós-graduação e 24 unidades de crédito no preparo da dissertação, o(a) aluno(a) perfaz assim os requisitos para obtenção do grau de Mestre. A Comissão Examinadora estava constituída dos Senhores Professores Doutores Vitor Fernandes Oliveira de Miranda e Welington Luiz Araújo da Universidade de Mogi das Cruzes e Mauricio Bacci Junior da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, sob a presidência do(a) primeiro(a), como orientador(a) da dissertação. A Sessão Pública da defesa de dissertação foi aberta pelo Senhor Presidente da Comissão que apresentou o(a) candidato(a). Em seguida o(a) candidato(a) realizou uma apresentação oral da dissertação. Ao final da apresentação da dissertação, seguiram-se as arguições pelos Membros da Comissão Examinadora. A seguir a Comissão, em Sessão Secreta, conforme julgamento discriminado por cada membro, considerou o(a) candidato(a)

aprovado por unanimidade  
(aprovado(a)/reprovado(a)) (unanimidade/maioria)

Mogi das Cruzes, 14 de maio de 2010.

Comissão Examinadora

[Assinatura]  
Prof. Dr. Vitor Fernandes Oliveira de Miranda

[Assinatura]  
Prof. Dr. Welington Luiz Araújo

[Assinatura]  
Prof. Dr. Mauricio Bacci Junior

Julgamento

aprovado  
(aprovado(a)/reprovado(a))

APROVADA  
(aprovado(a)/reprovado(a))

APROVADA  
(aprovado(a)/reprovado(a))

*Dedico ao meu querido avô Dante, por  
todo amor e carinho que tanto me  
ensinou.*

## AGRADECIMENTOS

O estereótipo do cientista ou do trabalho científico de isolamento social e temperamentos excêntricos está muito aquém da realidade, na qual vínculos de amizade e colaboração criados e mantidos ao longo do tempo facilitam a realização do trabalho e enriquecem seus resultados. Por este motivo, neste humilde trabalho agradeço a tantas instituições, empresas e pessoas queridas que tornaram minha jornada de dois anos mais fácil.

Inicialmente agradeço à Fapesp pela concessão da bolsa de mestrado e à Faep e UMC pela estrutura oferecida. Agradeço especialmente à Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Regina Lúcia da Costa de Oliveira pela disponibilização dos laboratórios do NIB (Núcleo Integrado de Biotecnologia), além de toda estrutura necessária para o desenvolvimento deste trabalho. Agradeço também à técnica Maíra Correa Moura, ao analista Maurício Cavalcante dos Santos e à coordenadora Lázara Maria Alves, todos do ICMBio, pela atenção dispensadas. Meus agradecimentos aos curadores e técnicos dos herbários da Universidade de Mogi das Cruzes (HUMC), Universidade Estadual de Campinas (UEC), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESA) e do Instituto de Botânica de São Paulo (IBt) por permitir o acesso às coleções.

Meus agradecimentos sinceros à equipe do PARNA Serra dos Órgãos pelas informações prestadas e ao Abrigo 4 Pedra do Sino pelo amparo prestado; ao PARNA Floresta da Tijuca pela infraestrutura e apoio oferecidos, especialmente à Loreta Figueira e ao Henrique Zaluar pela recepção e informações. À Patrícia & família da pousada Vale do Pico (Bananal: SP) que me auxiliaram na localização de estradas e regiões com ambientes típicos de *Utricularia*. À equipe da pousada Madeira Sol (Teresópolis: RJ) pela recepção e dicas de trajetos as duas paulistas perdidas! Um agradecimento especial à equipe e direção da Pousada Piuval (Poconé: MT) pela autorização de coleta em sua propriedade e auxílio com o transporte de barco. À Fazenda Santa Maria do Espinho e Saco Grande (Itararé: SP) e, especialmente os seus caseiros, pela autorização de coleta na propriedade e auxílio durante nossa breve estada. Finalmente, ao casal Maria José de Almeida Garcia Silva e José Carlos Damando, meus sinceros agradecimentos pela

hospitalidade com que me receberam em sua casa em Guará (SP) e por toda ajuda para localização dos pontos de coleta próximos à cidade.

Minha sincera gratidão aos amigos que auxiliaram nas viagens de coleta, tanto no trabalho quanto na manutenção do ânimo: Victor André Gil Vieira, Débora Clivati e Raphael Francisco Marques. E àqueles que colaboraram apontando localidades com ocorrência de *Utricularia*: Fernando Rivadavia, Paulo Baleeiro e Paulo Minatel. Meu “muitíssimo obrigada” à Marcos Ferramosca que contribuiu com informações e fotos, além de participar das coletas no Mato Grosso, apesar de tantos reveses, e suportar ser bombardeado por e-mails durante mais de um ano.

À Moara Bertotti e, muito especialmente, à Saura Rodrigues da Silva pela inestimável contribuição com a morfometria de *Utricularia*. À Dr. Alexandre W. Hilsdorf, Ângelo Bernak Oliveira, Aurélio Lourenço Cordeiro, Me. Carolina Agostini Mittelstaedt, Cristiane Aparecida Oliveira de Santana, Dr<sup>a</sup>. Helena Storchová, Dr. Laurence Mound, Dr. Lubomir Adamec, Dr<sup>a</sup>. Maria do Carmo E. Amaral, Dr. Todd Michael, Dr. Waldir Mantovani, e, finalmente, ao Dr. Maurício Bacci Jr. e Dr. Wellington Luis Araujo pela contribuição com informações e sugestões relevantes durante a defesa.

À todos os amigos e colegas do NIB, especialmente, Almir, Aline, Ana Cláudia, Ana Mari, Cristiane, Daiene, Deibs, Emy, Fernanda e Felipe, que partilharam risadas e momentos de desespero, sempre me ajudando a persistir e encontrar soluções para os problemas apresentados. Aos amigos do Laboratório de Sistemática Vegetal: Ângelo Bernak Oliveira, Aurélio Lourenço Cordeiro, Cristiane Aparecida Oliveira de Santana, Débora Clivati, Kathlen Lysak, Saura Rodrigues da Silva, e Dr. Vítor Fernandes Oliveira de Miranda pelo apoio, risadas e companheirismo, além de muitos bons momentos em coleta e laboratório compartilhados. Aos professores e amigos do curso oferecido pela RLB minha gratidão pelas sugestões, dicas e conselhos, em especial à Dr<sup>a</sup> Andrea Premoli, Dr<sup>a</sup> Loreta Freitas e ao Dr. Victor H. G. Merchan, e aos amigos Gustavo Mori e Patrícia Francisco de Oliveira. Aos amigos que, embora distantes, se fizeram presentes e me “aguentaram” nos momentos em que precisei: Aline (Brigadeiro) Dal Olio, Aline (Linoca) Silva, Ana Carolina Rodrigues, Bruno Cavalheiro, Bruno Leite, Carlos

Eduardo Tolussi, Débora (Cuca) Rodrigues, Fabrício Cardoso, Pablo Rotaru, Roberta Ferrari, Roberto Bueno Mendes e Tércio N. Feijó.

Aos amigos e tantas pessoas queridas que nestes anos me assistiram, apoiaram e incentivaram, mesmo que neste momento não estejam mais ao meu lado, muito obrigada!

Ao meu professor, orientador e amigo Vítor Miranda todo meu carinho e gratidão. Sua confiança e apoio em todas as circunstâncias, somada às críticas veladas e construtivas foram parte fundamental deste aprendizado.

Por fim, e muito especialmente, agradeço à minha família: avós, pais, irmãos, sobrinhos e “agregados”, pelo carinho, compreensão e apoio incondicionais não somente nestes dois anos, mas ao longo de toda minha vida. Sem esta base sólida e amorosa jamais chegaria até aqui. Muito obrigada!



*“A mente que se abre a uma nova idéia jamais retorna ao seu tamanho original.”*

*"A emoção mais bela que podemos experimentar é o sentimento do mistério. É a emoção fundamental que está no berço de toda verdadeira arte e ciência. Aquele que desconhece essa emoção, aquele que não consegue mais se maravilhar, ficar arrebatado de admiração, é como se estivesse morto; é uma vela que foi apagada. Sentir que por trás de qualquer coisa que possa ser experimentada há algo que nossa mente não consegue captar, algo cuja beleza e solenidade nos atinge apenas indiretamente: essa é a religiosidade. Nesse sentido, e apenas nesse sentido, sou devotamente religioso."*

Albert Einstein

Extraídas do livro “Albert Einstein sua vida, seu universo”  
(Walter Isaacson).

## RESUMO

*Utricularia* é um gênero cosmopolita de plantas carnívoras que concentra na região neotropical tanto a maior riqueza de espécies quanto maior grau de endemismo. No Brasil algumas espécies foram adicionadas a listas regionais de espécies ameaçadas, dentre elas a endêmica *Utricularia longifolia*. Neste trabalho empregaram-se métodos filogeográficos e morfometria para estudar a estrutura genética de populações de *Utricularia* spp. Foram amostradas populações de *Utricularia* spp. nos Estados de Mato Grosso, Rio de Janeiro e São Paulo. As amostras mantidas a -20°C para extração de DNA e em FAA70 para morfometria. Para a extração de DNA utilizou-se protocolo CTAB adaptado, e as reações de amplificação das regiões *rpl20-rps12* (cpDNA), ITS 1 e ITS2 (rDNA) otimizadas. As sequências foram editadas com o aplicativo *BioEdit* e alinhadas empregando o *ClustalW*. A identificação dos haplótipos, bem como o cálculo de índices de diversidade e testes de neutralidade, foram laborados com emprego do aplicativo DNAsp. A rede de haplótipos foi construída com base no critério de *Neighbor-Joining* e emprego do aplicativo *Network*. A estrutura genética foi investigada com emprego do *Structure*. Os resultados da morfometria foram analisados através de testes estatísticos básicos, de agrupamento, correlação múltipla e ANOVA. A maior diversidade nucleotídica e haplotípica foi observada em Angra dos Reis (RJ), a maior população amostrada. As populações amostradas nos municípios de Angra dos Reis e Rio de Janeiro (RJ) apresentaram *D* de Tajima significativamente negativo, sugerindo efeito gargalo recente. As populações de Angra dos Reis (RJ) e Bananal (SP) compartilharam os haplótipos mais frequentes em ambas, assim como foram agrupadas pelo *Structure*; por outro lado o haplótipo cloroplastidial mais frequente no município do Rio de Janeiro, apresentou distribuição rara nas demais populações investigadas. No entanto, este compartilhamento de haplótipos entre as três populações parece ser vestigial, sendo que os agrupamentos obtidos através da morfometria de *Utricularia longifolia* corroboram esta hipótese. Com estes resultados é possível inferir que a população de Angra dos Reis ocupou recentemente a região, recebendo contribuições de linhagens amplamente distribuídas no Rio de Janeiro e em Bananal, que foram posteriormente eliminadas, e diversificou-se através de mutações pontuais. A morfometria de *Utricularia foliosa* indicou diferença significativa entre amostras coletadas a curta distância (<100m) em São Paulo e nenhuma diferença intrapopulacional significativa no Mato Grosso. No entanto, houve diferença significativa entre as amostras provenientes dos dois Estados. Além disso, os resultados da morfometria de *Utricularia nigrescens* e *Utricularia pusilla* refletiram os problemas na identificação destas espécies, uma vez que não foram obtidos agrupamentos exclusivos para cada espécie, sugerindo a necessidade de uma revisão taxonômica da seção *Setiscapella*, à qual estão submetidas.

**Palavras-chave:** Genética de populações, morfometria, espécies ameaçadas.

## ABSTRACT

*Utricularia* is a near cosmopolitan carnivorous plant and the species richest region are in the neotropics, as well as the highest degree of endemism. Bladderworts are herbs with various habits, from epiphytic to aquatic, and can reproduce vegetative or sexually. Some species are endangered in Brazil. The morphological intraspecific variation in plants has been employed in different studies but in phylogeographic approaches haplotypic distribution and diversity have been used successfully in endangered species evaluation and management. In this study, morphometric and phylogeographic methods were used to evaluate the dynamism and genetic structure of *Utricularia* sp. populations. Samples from São Paulo, Rio de Janeiro and Mato Grosso were collected and properly fixed to morphometric studies and DNA isolation. Morphometric data was described statistically as well as tested by clusters, multiple correlations and ANOVA. For DNA isolation was used CTAB modified protocol and for *rpl20-rps12* (cpDNA), ITS 1 and ITS2 (rDNA) amplification, protocols were optimized. Resulting sequences were aligned using ClustalW. Haplotypes identification, diversity index and neutrality were tested using DNAsp. Haplotypes network were drawn based on Neighbor-Joining and using Network. Genetic structure was investigated using Structure. The morphometric data from *Utricularia foliosa* pointed differences among samples from close places (<100m) in São Paulo but no differences among samples from Mato Grosso from 30 to 180 km apart each other. However, samples from both states were different from each other. Furthermore, morphometric data of *Utricularia nigrescens* and *Utricularia pusilla* reflected taxonomic problems, indicating the need of the *Section Setiscapella* revision. Clusters grouped by morphometric data were congruent to the haplotypes distribution so that population from Rio de Janeiro was isolated but genetically close related to Angra dos Reis. *Utricularia longifolia* population previously classified as threatened (Bananal and Rio de Janeiro) are less diverse than population from Angra dos Reis, which means that the genetic diversity probably was not protected by the Floresta da Tijuca National Park.

**Keywords:** *Utricularia*, population genetics, morphometric, endangered species.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1.	Diferença entre caracteres morfométricos de utrículos de <i>Utricularia foliosa</i> proveniente do Estado de Mato Grosso.	43
Quadro 2.	Diferença entre caracteres morfométricos de utrículos de <i>Utricularia foliosa</i> proveniente de três lagoas no município de Mogi das Cruzes, São Paulo.	47
Quadro 3.	Médias, desvios-padrão e significância dos caracteres de utrículos de <i>Utricularia foliosa</i> provenientes de três localidades de Mato Grosso e três lagoas em Mogi das Cruzes, São Paulo.	48
Quadro 4.	Médias e desvios-padrão dos caracteres amostrados em <i>Utricularia longifolia</i> proveniente de três localidades.	54
Quadro 5.	Comparativo entre características morfológicas de <i>Utricularia nigrescens</i> e <i>Utricularia pusilla</i> .	66
Quadro 6.	Comparativo entre dimensões descritas <i>versus</i> observadas de características morfológicas de <i>Utricularia nigrescens</i> e <i>Utricularia pusilla</i> .	67
Quadro 7.	Médias, desvios-padrão e significância do diâmetro do estolão entre <i>Utricularia nigrescens</i> e <i>Utricularia pusilla</i> .	67
Gráfico 1.	Diagramas de dispersão e correlação do caráter 'comprimento do pedicelo do utrículo' com a altitude e temperatura entre os Estados de São Paulo e Mato Grosso.	49
Gráfico 2.	Dimorfismo do utrículo de <i>Utricularia foliosa</i> .	50
Gráfico 3.	Diagrama de dispersão 3D de valores médios obtidos na morfometria de <i>Utricularia foliosa</i> e <i>Utricularia longifolia</i> .	61
Gráfico 4.	Diagramas de dispersão 3D de caracteres reprodutivos entre espécies de hábitos terrestre, litofítico e aquático-livre.	63
Gráfico 5.	Diagramas de dispersão e <i>box-plot</i> da razão comprimento/largura (C/L) de folha, utrículo e diâmetro do estolão de <i>Utricularia nigrescens</i> e <i>Utricularia pusilla</i> .	69
Gráfico 6.	Frequência dos haplótipos identificados para rDNA (ITS1) em <i>Utricularia longifolia</i> .	75

Gráfico 7.	Frequência dos haplótipos identificados para rDNA (ITS2) em <i>Utricularia longifolia</i> .	75
Gráfico 8.	Frequência dos haplótipos identificados para cpDNA ( <i>rpl20-rps12</i> ) de <i>Utricularia longifolia</i> .	76
Gráfico 9.	Probabilidade média de cada $K$ e $\Delta k$ baseados em 20 réplicas/ $K$ e testadas de 2 a 7 populações.	80
Gráfico 10.	Distribuição de diferenças entre pares de nucleotídeos para as três regiões estudadas ( <i>rpl20-rps12</i> , ITS1 e ITS2).	82
Figura 1.	Representantes dos três gêneros de Lentibulariaceae.	19
Figura 2.	Flor de <i>Utricularia nigrescens</i> Sylvén representando a morfologia floral do gênero.	22
Figura 3.	Representantes de flores de <i>Utricularia</i> spp.	23
Figura 4.	Inseto da ordem Thysanoptera encontrado dentro do cálcio de uma flor de <i>Utricularia foliosa</i> , potencial polinizador da espécie.	25
Figura 5.	Mapa com a distribuição das localidades visitadas para a coleta das espécies estudadas de <i>Utricularia</i> .	41
Figura 6.	Sazonalidade alta em Santo Antonio do Leverger (MT).	43
Figura 7.	Tamanho dos indivíduos de <i>Utricularia foliosa</i> coletados no Mato Grosso e a distância entre as localidades.	44
Figura 8.	Tamanho dos indivíduos de <i>Utricularia foliosa</i> coletados em São Paulo e Mato Grosso.	50
Figura 9.	Fenograma baseado em caracteres dos utrículos para 6 populações de <i>Utricularia foliosa</i> .	51
Figura 10.	Fenograma baseado em caracteres reprodutivos e estolão para 6 populações de <i>Utricularia foliosa</i> .	52
Figura 11.	Fenograma baseado em caracteres reprodutivos para três populações de <i>Utricularia longifolia</i> .	55
Figura 12.	Fenograma baseado em caracteres vegetativos para três populações de <i>Utricularia longifolia</i> .	56
Figura 13.	Variações na morfologia foliar de <i>Utricularia longifolia</i> correlacionadas à fatores ambientais	.58
Figura 14.	Mapa de distribuição no Brasil das espécies <i>Utricularia nigrescens</i> , <i>Utricularia pusilla</i> e <i>Utricularia subulata</i> .	64

Figura 15.	Características florais entre <i>Utricularia nigrescens</i> e <i>U. pusilla</i> .	68
Figura 16.	Fenograma baseado em 5 caracteres reprodutivos de <i>Utricularia nigrescens</i> (N=48) e <i>Utricularia pusilla</i> (N=27).	70
Figura 17.	Fenograma baseado em 6 caracteres vegetativos de <i>Utricularia nigrescens</i> (N=104) e <i>Utricularia pusilla</i> (N=99).	71
Figura 18.	Representação gráfica dos resultados da análise bayesiana combinada dos polimorfismos encontrados nas regiões ITS1, ITS2 e <i>rpl20-rps12</i> de indivíduos de <i>Utricularia longifolia</i> .	81
Figura 19.	Rede de haplótipos do rDNA (ITS1; 16 sequências) de <i>Utricularia longifolia</i> baseado no método <i>Median-Joining Network</i> ( $\epsilon=0$ )	83
Figura 20.	Rede de haplótipos do rDNA (ITS2; 18 sequências) de <i>Utricularia longifolia</i> baseado no método <i>Median-Joining Network</i> ( $\epsilon=0$ )	84
Figura 21.	Rede de haplótipos do cpDNA ( <i>rpl20-rps12</i> ) de <i>Utricularia longifolia</i> baseado no método <i>Median-Joining Network</i> .	85
Figura 22.	Área de coleta de <i>Utricularia foliosa</i> , em trecho da Área de Proteção Ambiental Várzea do Rio Tietê, no Município de Mogi das Cruzes, Distrito de César de Souza, Bairro do Rio Acima, próximo à Estrada do Afia Faca.	102
Figura 23.	Ambiente de ocorrência de <i>Utricularia foliosa</i> . Área de propriedade da fazenda Ypiranga, Pousada Piuval, Poconé, MT.	103
Figura 24.	Ambiente à margem da estrada Transpantaneira (Poconé: MT) onde foram coletadas amostras de <i>Utricularia foliosa</i> .	104
Figura 25.	Ambiente em Santo Antônio do Leverger (MT: Chácaras do Aricá) onde foram encontradas, além de <i>Utricularia foliosa</i> , outras quatro espécies de <i>Utricularia</i> .	105
Figura 26.	Área onde foram coletadas amostras de <i>Utricularia breviscapa</i> , em trecho da APA Várzea do Rio Tietê, no Município de Mogi das Cruzes, Distrito de César de Souza, Bairro do Rio Acima, próximo à Estrada do Afia Faca.	107
Figura 27.	Localização do Parque Nacional Serra da Bocaina.	109
Figura 28.	Ambiente no qual a população de <i>Utricularia longifolia</i> se estabeleceu em Bananal, SP.	110

Figura 29.	Detalhes da população de <i>Utricularia longifolia</i> amostrada em Bananal, SP.	111
Figura 30.	Angra dos Reis (RJ), Rodovia BR-101: local de estabelecimento da população de <i>Utricularia longifolia</i> .	113
Figura 31.	Angra dos Reis, RJ, BR-101. Detalhes da população de <i>Utricularia longifolia</i> .	114
Figura 32.	Rio de Janeiro, RJ, Floresta da Tijuca. Paredão rochoso onde foram coletadas amostras da população de <i>Utricularia longifolia</i> , estéril, simpátrica à <i>Utricularia nephrophylla</i> (detalhe).	115
Figura 33.	Chapada dos Guimarães, MT. Ambiente onde se estabeleceram populações de <i>Genlisea filiformis</i> e <i>Utricularia</i> , incluindo <i>Utricularia nigrescens</i> e <i>Utricularia pusilla</i> .	117
Figura 34.	<i>Utricularia pusilla</i> encontrada em Itararé (SP), na localidade registrada na exsicata de Rivadavia (1993; 1995) para <i>Utricularia nigrescens</i> .	119

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Localidades visitadas e espécies de <i>Utricularia</i> estudadas, com indicação da coordenada geográfica e <i>status</i> local de ameaça.	32
Tabela 2.	Caracteres morfológicos e critérios utilizados na morfometria de cada <i>Utricularia</i> estudada.	34
Tabela 3.	Descrição das etapas e soluções do protocolo de extração de DNA genômico vegetal com CTAB, adaptado para purificação de amostras contaminadas com carboidratos.	36
Tabela 4.	Iniciadores utilizados para amplificação das regiões de rDNA e cpDNA	38
Tabela 5.	Distância estimada entre as localidades amostradas no Mato Grosso.	42
Tabela 6.	Distância estimada entre as lagoas amostradas em Mogi das Cruzes, São Paulo.	46
Tabela 7.	Distância estimada entre as localidades de coleta de <i>Utricularia longifolia</i> Gardner.	53
Tabela 8.	Caracteres reprodutivos correlacionados significativamente ( $P < 0,05$ ) à fatores ambientais	57
Tabela 9.	Caracteres vegetativos correlacionados significativamente ( $P < 0,05$ ) à fatores ambientais	57
Tabela 10.	Caracterização das localidades de origem e sequências obtidas de <i>Utricularia longifolia</i> Gardner (Lentibulariaceae)	72
Tabela 11.	Haplótipos de rDNA (espaçador ITS1) obtido a partir de 16 indivíduos de <i>Utricularia longifolia</i> .	73
Tabela 12.	Haplótipos de rDNA (espaçador ITS2) obtido de 18 indivíduos de <i>Utricularia longifolia</i> .	73
Tabela 13.	Haplótipos de cpDNA ( <i>rp120-rps12</i> ) obtido a partir de 37 indivíduos de <i>Utricularia longifolia</i> .	74
Tabela 14	Diversidade haplotípica e testes de neutralidade para cada população de <i>Utricularia longifolia</i> e região do nDNA e cpDNA utilizados.	76



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	18
1.1	LENTIBULARIACEAE	18
1.2	UTRICULARIA L.	19
1.3	BIOLOGIA REPRODUTIVA DE UTRICULARIA	21
1.3.1	Morfologia de estruturas reprodutivas	21
1.3.2	Fenologia reprodutiva e mecanismos de reprodução sexual	24
1.3.3	Mecanismos de reprodução clonal	27
1.4	VARIAÇÃO NUCLEOTÍDICA APLICADA AO ESTUDO DE POPULAÇÕES	28
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	30
<b>3</b>	<b>MÉTODO</b>	31
3.1	ESPÉCIES ESTUDADAS	31
3.2	COLETA & CONSERVAÇÃO	33
3.3	MORFOMETRIA	33
3.3.1	Obtenção de dados	33
3.3.2	Análise morfométrica	35
3.4	MÉTODOS MOLECULARES	35
3.4.1	Extração de DNA genômico	35
3.4.2	Amplificação do espaçador ITS1 e ITS2 (rDNA)	37
3.4.3	Amplificação da região <i>rpl20-rps12</i> (cpDNA)	37
3.4.4	Purificação do produto de PCR	38
3.4.5	Reação de seqüenciamento	39
3.4.6	Análise das seqüências	40
<b>4</b>	<b>RESULTADOS &amp; DISCUSSÃO</b>	41
4.1	COMPARAÇÃO MORFOMÉTRICA	42
4.1.1	<i>Utricularia foliosa</i>	42
4.1.2	<i>Utricularia longifolia</i>	52
4.1.3	Aspectos morfométricos em <i>Utricularia</i> spp. comparados ao hábito	60
4.1.4	<i>Utricularia nigrescens</i> Sylvén & <i>Utricularia pusilla</i> Vahl.	63
4.2	ESTRUTURA E DIVERSIDADE GENÉTICAS DE POPULAÇÕES DE <i>Utricularia longifolia</i> Gardner.	72
4.2.1	Variabilidade genética em <i>Utricularia longifolia</i>	73
4.2.2	Estruturação populacional em <i>Utricularia longifolia</i>	79
4.2.3	Análise filogeográfica de <i>Utricularia longifolia</i> Gardner	81
4.2.4	Implicações para a conservação	87
	<b>CONCLUSÕES</b>	88
	<b>REFERÊNCIAS</b>	90
	<b>APÊNDICE</b>	100

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 LENTIBULARIACEAE

Lentibulariaceae Rich. é dentre as famílias de plantas carnívoras a mais rica, agrupando cerca de 320 espécies e constituída de três gêneros: *Pinguicula* L., *Genlisea* A.St-Hil. e *Utricularia* L. (Figura 1; JUNNIPER *et al.* 1989; TAYLOR 1989; BARROSO 1991; FISHER *et al.* 2004; GUISANDE *et al.* 2007). A morfologia divergente das armadilhas presentes na família são sinapomorfias para os gêneros: armadilhas adesivas em *Pinguicula*, “folhas utriculíferas” – duas folhas dispostas em hélice com tricomas internos direcionados para impedir a saída da presa – em *Genlisea*, e por fim, uma armadilha de sucção em *Utricularia*. A atração da presa é, provavelmente, mediada por fatores químicos, apesar de se tratar de uma questão ainda pouco compreendida (BARTHLOTT *et al.* 1998; PLACHNO *et al.* 2008). Entretanto, para *Pinguicula* pode envolver fatores visuais e olfativos (FISHER *et al.* 2004; JÜRGENS *et al.* 2009).

Lentibulariaceae está amplamente distribuída sendo considerada cosmopolita; *Pinguicula* apresenta seu centro de diversidade no México se estendendo pela América do Sul andina. *Genlisea* ocorre nas áreas tropicais da América do Sul, África e Madagascar, enquanto *Utricularia* está amplamente distribuída apresentando alta diversidade na América do Sul (Brasil, Venezuela e Guiana), Austrália e Índia (TAYLOR, 1989; FISCHER *et al.*, 2004).



Figura 1. Representantes dos três gêneros de Lentibulariaceae. A: *Pinguicula lithophytica* (RODRIGUEZ, 2009). B: *Genlisea aurea* (FERRAMOSCA, 2008). C: *Utricularia longifolia* (MULLINS, 2005). Fotos cedidas pelos autores.

## 1.2 *Utricularia* L.

O gênero foi descrito com 7 espécies (LINNAEUS, 1753), as quais, atualmente, são consideradas oito porque *U. caerulea* agrupava duas espécies. (TAYLOR, 1989). Vahl (1804) descreveu mais 34 espécies, incluindo o primeiro registro do gênero na África tropical. Labillardière (1804) descreveu as primeiras espécies australianas. Muitos outros autores contribuíram para a taxonomia de *Utricularia* descrevendo novas espécies (BROWN, 1810; SMITH, 1819; WALLICH, 1828-1830; LE CONTE, 1824), mas, merecem destaque A. St. Hilaire e Girard, que de 1830 a 1838 descreveram muitas espécies da América do Sul, especialmente do Brasil.

Devido ao interesse e intenso trabalho de tantos botânicos, em aproximadamente 90 anos o gênero *Utricularia* saltou de 8 espécies para 131 (TAYLOR, 1989), um aumento de aproximadamente 18 novas espécies descritas/ano, e atualmente contém aproximadamente 220 espécies distribuídas em dois subgêneros (*Polypompholyx* e *Utricularia*) e 35 seções (TAYLOR, 1989; GUISANDE *et al.*, 2007). *Utricularia* apresenta a maior riqueza de espécies, além de maior divergência morfológica e especialização para captura de presas, quando

comparado aos demais gêneros da família: *Pinguicula* e *Genlisea*. Entre as demais famílias de plantas carnívoras, *Utricularia* agrupa cerca de 35% das espécies (GUISANDE *et al.*, 2007).

O gênero pode ser caracterizado por seus utrículos – folhas modificadas em vesículas adaptadas para captura de presas por sucção – que apresentam alta divergência morfológica, sendo por isso, muito utilizado para taxonomia (LLOYD, 1942; JUNNIPER *et al.*, 1989; TAYLOR, 1989; BARROSO, 1991) além de despertar grande interesse quanto às adaptações morfológicas para a carnivoría (ADAMEC *et al.*, 2006; Reifenrath *et al.*, 2006), composição da sua “dieta” e conteúdo do utrículo (DÍAZ-OLARTE *et al.*, 2007; DACUNHASANTINO & BIANCHINIJR, 2008; PEROUTKA *et al.*, 2008; SIROVÁ *et al.*, 2009); bem como os benefícios nutricionais da carnivoría (ADAMEC, 2006; ADAMEC, 2008a; ADAMEC, 2008; SIROVÁ *et al.*, 2009).

*Utricularia* é um gênero cosmopolita ausente nos pólos e, geralmente, em regiões muito áridas e algumas ilhas oceânicas (TAYLOR, 1989). A região neotropical contém a maior riqueza de espécies, destacando-se entre as terrestres e epífitas de tanques de Bromeliaceae, enquanto as espécies aquáticas ocorrem com maior frequência no Hemisfério Norte (GUISANDE *et al.*, 2007). Reconstruções filogenéticas recentes (JOBSON *et al.*, 2003; MÜLLER *et al.*, 2004; MÜLLER & BORSCH, 2005) têm permitido inferir sobre a biogeografia de *Utricularia*, indicando que a maior linhagem dentro do gênero, que inclui a cosmopolita seção *Utricularia*, teve origem neotropical concordando tanto com a ampla distribuição de representantes desta linhagem nas savanas da América do Sul (MÜLLER & BORSCH, 2005) quanto com a predominância do hábito terrestre – indicado como estado plesiomórfico – entre estes representantes (GUISANDE *et al.*, 2007). Portanto, no decorrer do processo de diversificação e expansão da área de ocorrência de *Utricularia* 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.

Guisande *et al.*(2007) utilizando uma análise discriminante do tamanho máximo atingido por algumas estruturas (rizóide, folha, estolão, semente, corola e inflorescência) conseguiram apenas distinguir o grupo de espécies epífitas e

aquáticas-livres, as espécies com os demais hábitos apresentaram sobreposição com as espécies terrestres. De acordo com os autores (GUISANDE *et al.*, 2007), esta sobreposição de características morfológicas entre as espécies terrestres, reofíticas, litofíticas e aquáticas-fixas, contribui para a capacidade de algumas espécies ocorrerem em mais de um tipo de ambiente, além de corroborar a hipótese de plesiomorfia do hábito terrestre.

A compreensão dos mecanismos de dispersão das espécies pode auxiliar a compreender a história biogeográfica do gênero, no entanto, as informações disponíveis são escassas e estão disponíveis apenas para espécies terrestres e aquáticas (MÜLLER & BORSCH, 2005) para as quais aves migratórias podem ser os vetores de dispersão carregando em seus pés propágulos como sementes e *turions*, ou mesmo pequenos fragmentos de estolão (TAYLOR, 1989). Todavia, outros aspectos da biologia reprodutiva de *Utricularia* não podem ser negligenciados uma vez que influenciam no sucesso da colonização e manutenção de populações em diferentes ambientes, dentre elas, estratégias de atração do polinizador, mecanismos de cruzamento sexual, produção e sobrevivência de propágulos e seu sucesso reprodutivo, e reprodução vegetativa.

### 1.3 BIOLOGIA REPRODUTIVA DE *Utricularia*

#### 1.3.1 Morfologia de estruturas reprodutivas

Apesar das espécies de *Utricularia* não estarem sujeitas ao conflito polinizador-presa, a que podem estar submetidas outras espécies carnívoras, o comprimento da inflorescência é muitas vezes compatível com as espécies carnívoras que buscam a proteção dos polinizadores aumentando a separação entre as flores e suas armadilhas (ANDERSON & MIDGLEY, 2001; GUISANDE *et al.*, 2007). O escapo floral alongado em *Utricularia* pode sugerir um investimento na exposição das flores para atração dos polinizadores ou facilitar a dispersão de sementes, embora sejam escassas as informações sobre os polinizadores de

*Utricularia*, como tamanho, comportamento ou eficiência na polinização (HOBBHANN *et al.*, 2006).

A morfologia floral é quase uniforme entre as espécies de *Utricularia*, no entanto, existe uma alta diversidade de detalhes que variam de modo espécie-específicos e são úteis para a taxonomia do grupo (TAYLOR, 1989). O cálice, que em *Pinguicula* e *Genlisea* apresenta 5 sépalas, em *Utricularia* foi reduzido para quatro sépalas no subgênero *Polypompholyx* e duas sépalas no subgênero *Utricularia*, sendo um importante caráter diagnóstico do gênero (FISHER *et al.*, 2004). A corola é simpétala (Figura 2), sendo o lábio superior formado pela fusão de duas pétalas e o inferior pela fusão de três pétalas (FISHER *et al.*, 2004). O lábio superior, frequentemente, é menor do que o inferior e bilobado; já o lábio inferior é, frequentemente, trilobado. Na base do lábio superior existe uma cavidade que abriga os órgãos reprodutivos, esta bolsa é fechada por uma expansão do lábio inferior, frequentemente, inflada, e em algumas espécies bem pronunciada, chamada palato. A partir da base do lábio inferior parte um tubo com tamanho e morfologia variáveis, chamado cálcar, onde o pequeno volume de néctar é armazenado (TAYLOR, 1989).

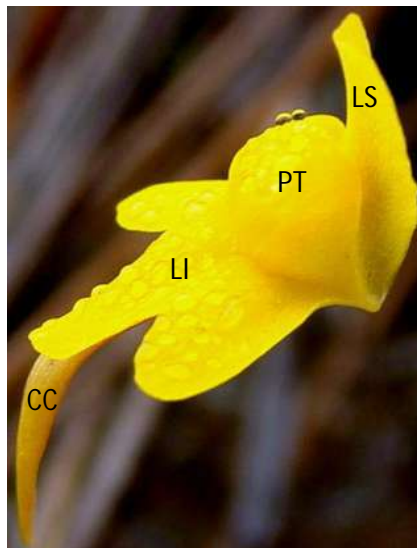


Figura 2. Flor de *Utricularia nigrescens* Sylvén representando a morfologia floral do gênero. LS: lábio superior; PT: palato; LI: lábio inferior; CC: cálcar.



As flores variam muito quanto ao tamanho, margem e pilosidade da corola, sendo estas características úteis para a identificação de espécie (Figura 3). Podem variar entre 2mm a 10cm de largura, mas frequentemente se enquadram entre 5mm e 2cm. O tamanho máximo da corola é muito similar entre as espécies terrestres, aquáticas-livres e aquáticas-fixas; dentre as reofíticas e litofíticas estes valores são inferiores, enquanto as espécies epífitas apresentam flores maiores, que podem indicar uma estratégia para atração de polinizadores (GUISANDE *et al.*, 2007). A cor da corola é geralmente amarela ou violeta, mas também ocorrem as cores vermelha, azul, branca e marrom, além de combinações entre elas (TAYLOR, 1989; Figura 3).

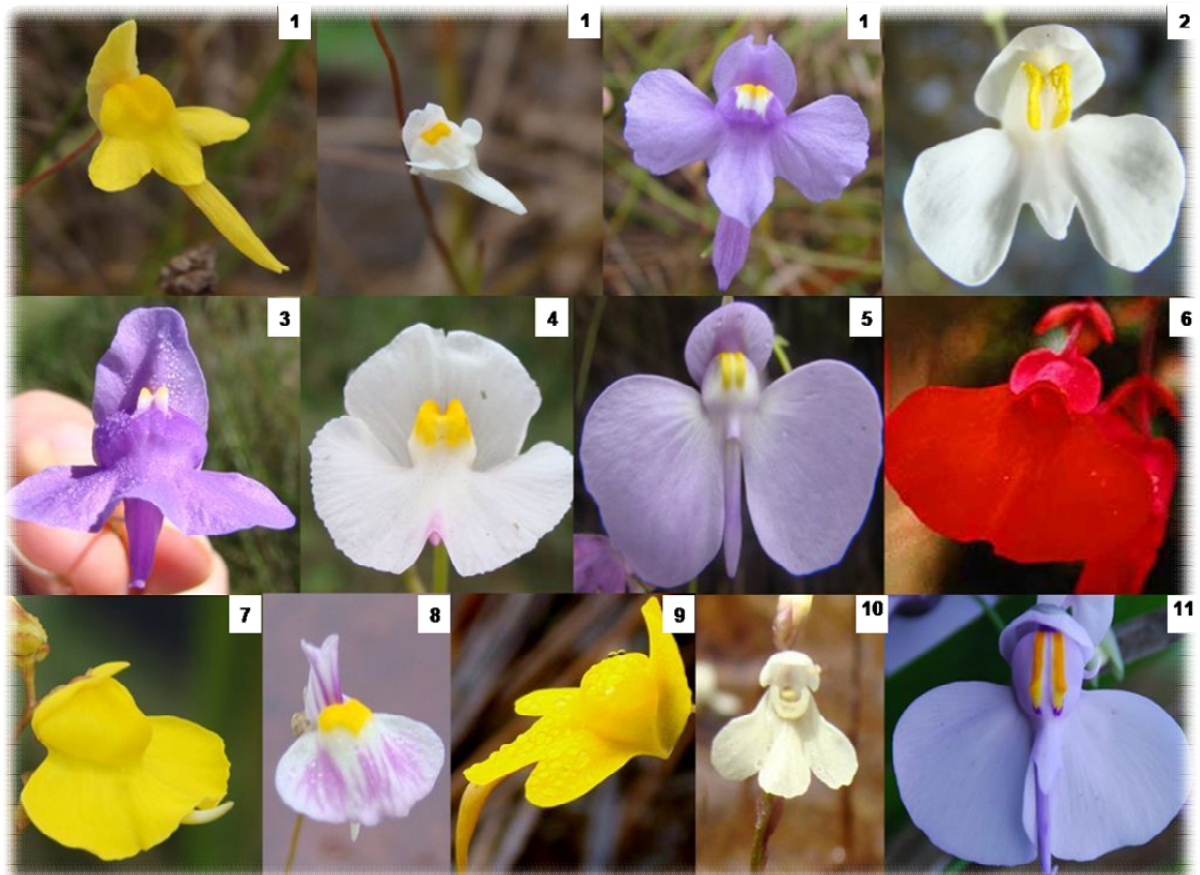


Figura 3. Flores de *Utricularia* spp. 1. *Utricularia amethystina* (FERRAMOSCA, 2010; três morfotipos florais); 2. *Utricularia nephrophylla*; 3. *Utricularia tricolor*; 4. *Utricularia poconensis* (FERRAMOSCA, 2008); 5. *Utricularia geminiloba*; 6. *Utricularia campbeliana* (RIVADAVIA, 1998); 7. *Utricularia praelonga* (MIRANDA, 2008); 8. *Utricularia tenuissima*; 9. *Utricularia nigrescens*; 10. *Utricularia neottioides* (FERRAMOSCA, 2008); 11. *Utricularia reniformis* (MIRANDA, 2008). Fotos cedidas pelos autores.

A morfologia dos estames apresenta pouca variação em Lentibulariaceae, com filamentos curtos e inflados, bitecas e deiscência longitudinal das anteras. O gineceu consiste de dois carpelos fundidos formando um ovário unilocular, um estilete de tamanho variável e o estigma, geralmente, bilabiado (FISHER *et al.*, 2004).

### 1.3.2 Fenologia reprodutiva e mecanismos de reprodução sexual

A fase reprodutiva corresponde a um período crítico na manutenção das populações vegetais, uma vez que é altamente relacionada às variações ambientais sazonais como fotoperíodo, umidade, temperatura e disponibilidade de polinizadores e dispersores. Estes fatores podem influenciar na intensidade e qualidade da floração e frutificação, bem como o desenvolvimento e estabelecimento de plântulas, sendo por este motivo relevante para estudos populacionais (LOCATELLI & MACHADO, 2001; THURY *et al.*, 2000; TANNUS *et al.*, 2006).

A fenologia reprodutiva de *Utricularia* é pouco estudada, a julgar pela coloração e forma das flores considera-se que sejam, em geral, polinizadas por insetos (JUNNIPER *et al.*, 1989) com tamanho suficiente para pressionar o lábio inferior da corola ou palato para baixo e expondo a abertura para o cálcara, onde é armazenado néctar, passando pelas estruturas reprodutivas (HOBBHANN *et al.*, 2006). Apesar das observações de visitantes florais de *Utricularia* terem sido mais casuais do que fruto de estudos sistemáticos, foram observados indivíduos de *Hymenoptera*, *Diptera*, *Lepidoptera* e beija-flores (TAYLOR, 1989). Contudo, foi encontrado no cálcara de *Utricularia foliosa* um indivíduo de Phlaeothripidae (*Thysanoptera*; Figura 4A; Silva *comunicação pessoal*). Insetos desta ordem são conhecidos fitófagos, mas também podem atuar como polinizadores, fungívoros e, eventualmente, ectoparasitas (PINENT *et al.*, 2008), porém não apresentam o tamanho esperado para polinizadores de *Utricularia*. Todavia, visitantes florais que não se ajustem às síndromes florais podem ser negligenciados em estudos da biologia reprodutiva, apesar da importância potencial de sua atuação para o sucesso



reprodutivo de algumas espécies, como observado em *Trytoniopsis revoluta* (Iridaceae; MERXEM *et al.*, 2009).

Tão poucas são as informações sobre os polinizadores e dispersores de *Utricularia* quanto sobre o regime de floração, períodos de maior ocorrência e fatores ambientais sazonais de importância. Mittelstaedt & Miranda (*em preparação*) fizeram um levantamento dos períodos de floração de 60 espécies de *Utricularia* que ocorrem no Brasil, a partir de materiais depositados em herbários nacionais e internacionais, com representantes de 17 seções do gênero. Foram identificadas diferenças fenológicas entre espécies aquáticas e terrestres, sendo que as primeiras apresentaram dois picos de floração (março e agosto), enquanto as terrestres floresceram entre fevereiro e julho. De modo geral, as espécies apresentaram pico de floração concordante com o período mais úmido de cada região geopolítica brasileira.

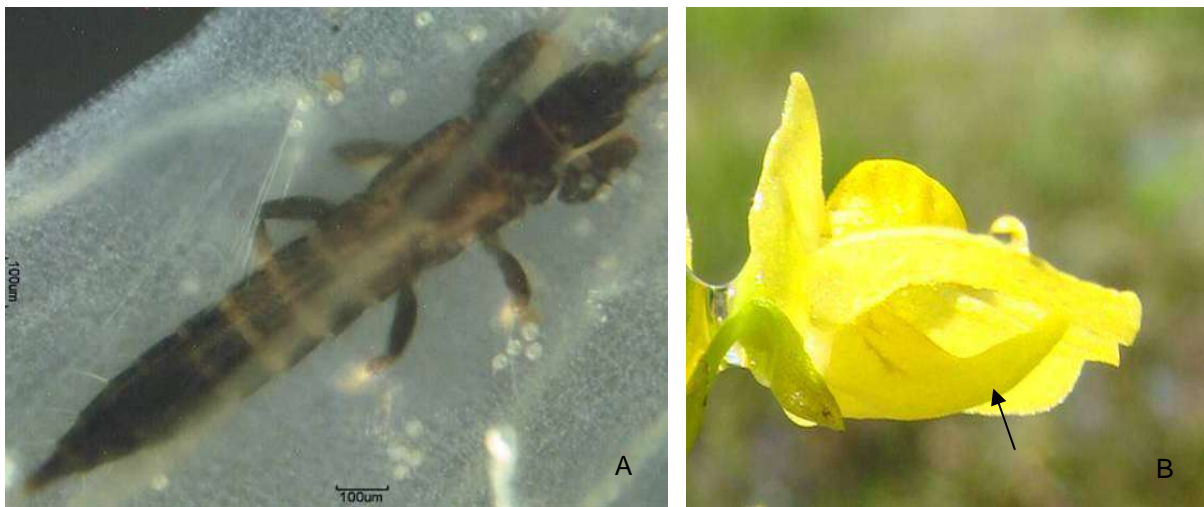


Figura 4. Inseto da ordem *Thysanoptera* encontrado dentro do cálcar de uma flor de *Utricularia foliosa*, potencial polinizador da espécie. A. Indivíduo de Phlaeothripidae (*Thysanoptera*) dentro do cálcar de *Utricularia foliosa* (SILVA, 2009). B. Flor de *Utricularia foliosa*, a seta indica o posicionamento do cálcar. Fotos cedidas pelos autores.

Quanto ao período de floração, algumas espécies como *Utricularia gibba* e *Utricularia subulata* podem apresentar flores ao longo de todo o ano, enquanto outras espécies têm a floração restrita a um período do ano, como *Utricularia*

*breviscapa* que floresce entre março e junho (CORDEIRO & MIRANDA, *em preparação*) no Município de Mogi das Cruzes (São Paulo: Brasil).

Todavia, espécies de *Utricularia* que ocorrem em ambientes efêmeros podem apresentar eventos de floração em massa, como conhecido para 12 espécies indianas, e melhor observado para três delas: *Utricularia albocaerulea* apresentou entre 300-600 flores/ m<sup>2</sup>; para *Utricularia reticulata* observou-se 500-1100 flores/m<sup>2</sup>; enquanto *Utricularia purpurascens* saltou, em uma semana, de menos que 1 flor/m<sup>2</sup> para 300-700 flores/m<sup>2</sup> (HOBBHANN *et al.*, 2006).

Ambientes sazonais, que sofrem drásticas mudanças em poucas semanas, como o platô indiano onde se observaram eventos de floração em massa de três *Utricularia* (HOBBHANN *et al.*, 2006) poderiam sugerir a ocorrência de reprodução autogâmica em uma eventual escassez de polinizadores, uma vez que este tipo de reprodução é bem conhecido para inúmeras espécies de *Utricularia*. No entanto, as espécies estudadas demonstraram incapacidade de se autopolinizar, embora sejam autocompatíveis se a transferência de pólen for mediada por um visitante floral entre as flores de uma mesma inflorescência ou de indivíduos clonais (HOBBHANN *et al.*, 2006). A necessidade de um vetor de transferência de pólen para a autopolinização é um fato raro para espécies do gênero, onde a ocorrência de autopolinização é bem registrada (LLOYD, 1942; JUNNIPER *et al.*, 1989; TAYLOR, 1989; FISHER *et al.*, 2004; GUISANDE *et al.*, 2007).

As flores casmógamas de *Utricularia* são o tipo mais frequente, adaptadas para a reprodução cruzada uma vez que demonstram características atrativas para a polinização por diferentes animais, como coloração da corola e guias de néctar (WhitEhead & PEAKALL, 2009), odor (TAYLOR, 1989) e produção de néctar com elevadas concentrações de açúcar (HOBBHANN *et al.*, 2006). Embora apresente estes atributos, muitas espécies de *Utricularia* com flores casmógamas podem em eventual escassez de polinizadores realizar a autopolinização sem necessitar de um vetor de transferência de pólen (TAYLOR, 1989; GUISANDE *et al.*, 2007).

Por outro lado, certas *Utricularia* desenvolvem flores cleistógamas eventualmente, quando estimuladas por fatores ambientais estressantes (TAYLOR, 1989; GUISANDE *et al.*, 2007) ou como modo exclusivo de reprodução sexual. O balanço entre estratégias reprodutivas de cleistogamia e casmogamia pode garantir

estabilidade evolutiva com um pequeno incremento de diversidade genética através da reprodução cruzada (CULLEY & KLOOSTER, 2007).

### 1.3.3 Mecanismos de reprodução clonal

A reprodução clonal implica na capacidade da planta produzir indivíduos completos – que atingirão a fase reprodutiva – seja a partir da fragmentação da “planta-mãe”, da produção de propágulos vegetativos especializados, como os *turions*, ou não-especializados. Essa estratégia de reprodução pode estar associada à manutenção em ambientes estressantes, no entanto, também é encontrada em todos os tipos de ambientes (DIJK & TUSSENBROEK, 2009; SOSNOVÁ *et al.*, 2009). Considerando o baixo sucesso da reprodução sexual encontrado em algumas espécies de *Utricularia* (KAMEYAMA *et al.*, 2005; KAMEYAMA & OHARA, 2006), bem como as estratégias de estabelecimento e manutenção em ambientes abertos, tipicamente ruderais (ELLISON & GOTELLI, 2001; ELLISON *et al.*, 2003), é possível afirmar que as espécies de *Utricularia* apresentam reprodução assexuada predominante.

Os efeitos da predominância da reprodução clonal sobre a biologia e genética de populações são pouco conhecidos, uma vez que as teorias ecológicas e evolutivas têm sido desenvolvidas sobre os indivíduos como unidade de estudo (SÁNCHEZ, 2007), enquanto espécies clonais freqüentemente formam manchas adensadas de *ramets* – indivíduos geneticamente idênticos originados da fragmentação ou do desenvolvimento de estruturas de propagação clonal – e apresentam baixa mobilidade dos propágulos (DIJK & TUSSENBROEK, 2009).

Dada à capacidade de espécies clonais originarem novos indivíduos a partir de fragmentos de um indivíduo adulto, os modelos tradicionais para o desenvolvimento de órgãos bem como a classificação em três órgãos básicos: raiz, caule e folha, nem sempre podem ser aplicados (RUTISHAUSER & ISLER, 2001). Há necessidade de considerar modelos mais flexíveis para o desenvolvimento do plano corpóreo, como a organização modular, na qual repetições modulares constituem os diferentes órgãos (RUTISHAUSER & ISLER, 2001; SÁNCHEZ, 2007).

Além disso, em plantas clonais é frequentemente difícil identificar plântulas e indivíduos adultos, além de ocorrer sobreposição de gerações através da manutenção de genótipos no tempo e espaço. Assim esses fatores certamente impactam sobre a biologia de populações (SÁNCHEZ, 2007).

Os impactos da reprodução vegetativa sobre a estrutura e dinâmica populacional podem ser mensurados tanto através de espaçadores intergênicos, quanto da análise morfométrica; ambas as abordagens têm sido utilizadas para a identificação de variação intra e interespecífica (VEASEY *et al.*, 2001; ELLISON *et al.*, 2004; PINHEIRO & BARROS, 2007; DIJK & TUSSENBROEK, 2009). Embora a reprodução clonal potencialmente reduza a diversidade genética nas populações (e.g. *Utricularia australis*; KAMEYAMA & OHARA, 2006), como resultado também pode aumentar a adaptabilidade e capacidade de colonização especialmente em ambientes perturbados (ELLISON & GOTELLI, 2001; ELLISON *et al.*, 2003).

#### 1.4 VARIAÇÃO NUCLEOTÍDICA APLICADA AO ESTUDO DE POPULAÇÕES

A variação nucleotídica encontrada em genomas plastidiais tem sido a principal fonte de informação para estudos filogeográficos devido à sua herança uniparental, que permite reconstruir linhagens maternas (BEHEREGARAY, 2008; SCHAAL *et al.*, 1998; NIELSEN & BEAUMONT, 2009; AVISE, 2009) por outro lado, *loci* nucleares poderiam, em princípio, subsidiar análises filogeográficas, no entanto, a herança biparental exigiria um tempo de coalescência quatro vezes maior do que um genoma haplóide em decorrência do efeito dobrado da diploidia de genes autossômicos somado à dupla transmissão através de ambos os genitores (AVISE, 2009).

Por outro lado, espaçadores nucleares por não serem transcritos tendem a acumular mutações úteis ao estudo evolutivo, sendo os espaçadores ITS, se não uma exceção um grupo menos variável dentre outros espaçadores porque são responsáveis pela estabilidade da estrutura secundária da família multigênica 18S-23S, o que implica que mutações compensatórias possam ocorrer nos sítios localizados na região de caule da estrutura secundária do ITS (BALDWIN *et al.*,

1995; FELINER & ROSSELLÓ, 2006). Dada esta importância evolutiva da estrutura secundária da região ITS, mecanismos de restrição evolutiva e homogeneização das múltiplas cópias no genoma foram descritos e violam as premissas de neutralidade e independência dos caracteres, tornando polêmica a utilização de suas sequências para fins filogenéticos (FELINER & ROSSELLÓ, 2007). Apesar disto, as regiões ITS1 e ITS2 têm sido amplamente utilizada para estudar o relacionamento interespecífico, e em alguns casos intraespecífico. (MARTEL *et al.*, 2004; LORENZ-LEMKE *et al.*, 2006; EIDSEEN *et al.*, 2007; PARRA-O *et al.*, 2007)

Estudos filogeográficos em plantas ainda são escassos, comparado ao volume produzido para outros organismos, apesar de se tratar de uma ferramenta potencialmente valiosa para estudar a diversidade morfológica e adaptações, bem como investigar padrões de fluxo gênico e estrutura populacional; tal escassez, conforme sugerido por Schaal *et al.* (1998), deve-se à falta de variação genética útil disponível para a análise filogeográfica. Enquanto investigações filogeográficas com modelos animais baseiam-se fortemente sobre a variação encontrada no DNA mitocondrial (mtDNA), em plantas este genoma apresenta taxas de mutação até 100 vezes mais lenta (Avisé, 2009), além de apresentar uma estrutura complexa na qual recombinações entre seqüências homólogas do cromossomo circular produzem moléculas circulares menores, subgenômicas (CHIES, 2003).

Como alternativa à impossibilidade de utilizar o mtDNA em plantas, para fins filogeográficos tem sido freqüente o uso de espaçadores do DNA cloroplastidial (cpDNA; SCHAAL *et al.*, 1998) que também apresenta genoma haplóide e transmissão comumente uniparental e materna (em angiospermas), ocorrendo eventualmente transmissão paterna ou biparental (CHIES, 2003; MUSCHNER *et al.*, 2006; AVISE, 2009). No entanto, de modo geral o cpDNA é uma molécula com substituições lentas (cerca de 3-4 vezes mais rápida que o mtDNA; AVISE, 2009) apresentando taxas mutacionais intermediárias entre o mtDNA e o DNA nuclear em plantas, tanto que seus genes – como o *rbcL* – são freqüentemente usados para reconstrução filogenética de táxons superiores (APGIII 2009), sendo em alguns casos úteis também para o estudo infragenérico (WILLIAMS *et al.*, 1994).

Alguns estudos têm revelado que o padrão de distribuição de haplótipos de cloroplasto de uma fração considerável de espécies contém pouca ou nenhuma variação genética (SCHAAL *et al.*, 1998). Embora as taxas de mutação do cpDNA

sejam relativamente lentas, regiões espaçadoras de genes cloroplastidiais têm sido amplamente utilizado para fins filogeográficos em plantas, sendo identificados de 6 a 13 haplótipos entre distintos grupos de angiospermas, com  $N$  entre 121 e 392 indivíduos amostrados (COLLEVATTI *et al.*, 2003; ZHANG *et al.*, 2005; LORENZ-LEMKE *et al.*, 2006; IKEDA *et al.*, 2008).

Finalmente, análises baseadas em cpDNA utilizando métodos filogeográficos e construção de redes de haplótipos têm sido utilizadas com êxito para fins de conservação, identificando divergência entre localidades de maneira mais eficaz que marcadores AFLP foram capazes (em *Cedrela odorata*; CAVERS, 2004), além de evidenciar estruturação genética em diferentes ecótipos (CAVERS *et al.*, 2003a) e de modo combinado auxiliar a propor estratégias de conservação (CAVERS *et al.*, 2003; CAVERS *et al.*, 2003; CAVERS, 2004).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

Estudar a estrutura genética e dinâmica de populações de *Utricularia* (Lentibulariaceae) ameaçadas e não-ameaçadas.

### 2.2 ESPECÍFICOS

Estudar a variação morfométrica de *Utricularia foliosa*.

Estudar a variação morfométrica de *Utricularia longifolia* correlacionada à características ambientais.

Estudar a variação morfométrica correlacionada ao hábito distinto entre *Utricularia foliosa* e *Utricularia longifolia*.

Estudar a variação morfométrica entre *Utricularia nigrescens* e *Utricularia pusilla*.

Estimar a diversidade e a estrutura genética local e entre localidades distintas de *Utricularia longifolia*, baseado na identificação de haplótipos obtidos de sequências não-codificadoras de rDNA e cpDNA.

### 3 MÉTODOS

#### 3.1 ESPÉCIES ESTUDADAS

As espécies estudadas (Tabela 1) foram selecionadas de acordo com o hábito de vida, distribuição – sendo *Utricularia longifolia* e *Utricularia nigrescens* endêmicas do Brasil – e sua inclusão na Lista Vermelha de Espécies Vegetais Ameaçadas do Estado de São Paulo (MAMEDE *et al.*, 2007).

Tabela 1. Localidades visitadas para as espécies de *Utricularia* estudadas, com indicação da coordenada geográfica e *status* local de ameaça.

Espécie	Hábito	Localidades visitadas	Coleta (s/ñ)	Coordenadas Geográficas (long., lat.)	Status local de ameaça <sup>3</sup>
<i>Utricularia breviscapa</i> L.	Aquática-livre	Mogi das Cruzes (SP)	S	-46.143889 , -23.532778	Não ameaçada
		Santo Antonio do Leverger (MT)	Ñ <sup>1</sup>	-56.047778 , -15.724722	Não ameaçada
		Santo Antonio do Leverger (MT)	Ñ <sup>1</sup>	-55.815833 , -15.992222	Não ameaçada
<i>Utricularia foliosa</i> L.	Aquática-livre	Maricá (RJ)	Ñ <sup>2</sup>	-	Não ameaçada
		Mogi das Cruzes (SP)	S	-46.143889 , -23.532778	Não ameaçada
		Poconé (Pousada Piuval: MT)	S	-56.589722 , -16.388056	Não ameaçada
		Poconé (Rod. Transpantaneira: MT)	S	-56.666667 , -16.403056	Não ameaçada
		Santo Antonio do Leverger	S	-56.047778 , -15.724722	Não ameaçada
Saquarema (RJ)	Ñ <sup>2</sup>	-	Não ameaçada		
<i>Utricularia longifolia</i> Gardner	Terrestre/ litofítica	Angra dos Reis (RJ)	S	-44.485278,-23.011389	Não ameaçada
		Bananal (SP)	S	-44.377778,-22.798611	Em Perigo
		Rio de Janeiro (RJ)	S	-43.229167,-22.958611	Criticamente em Perigo
		Teresópolis (RJ)	Ñ <sup>2</sup>	-	Não ameaçada
<i>Utricularia nigrescens</i> Sylvén	Terrestre	Chapada dos Guimarães (MT)	S	-55.833333 , -15.383333	Não ameaçada
		Guará (SP)	Ñ <sup>2</sup>	-	Em perigo
		Itararé (SP)	Ñ <sup>2</sup>	-	Em perigo

<sup>1</sup>: Localizado N<5 indivíduos na população;

<sup>2</sup>: Não foram localizadas populações da espécie procurada;

<sup>3</sup> Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas no Estado de São Paulo (MAMEDE *et al.*, 2007); Espécies ameaçadas de Extinção (SMMA/RJ, 2010)



## 3.2 COLETA & CONSERVAÇÃO

Os pontos de coleta foram selecionados baseados nos registros de coleta do *SpeciesLink* (CRIA, 2009), bem como no acervo dos herbários da Universidade de Mogi das Cruzes (HUMC), Universidade de São Paulo (SPF), Universidade Estadual de Campinas (UEC), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESA) e do Instituto de Botânica de São Paulo (IBt).

Foram realizadas expedições de coleta entre março de 2008 a maio de 2009, durante as quais foram registradas as coordenadas geográficas, altitude e características relevantes do ambiente (detalhadas no Apêndice A), bem como coletados cerca de 30-50 espécimes por população. As amostras foram fracionadas inicialmente em duas: tecido congelado para extração de DNA genômico; *ramets* fixados em FAA70 e conservados em coleção líquida do Herbário Mogiense (HUMC) para estudos morfológicos.

## 3.3 MORFOMETRIA

### 3.3.1 Obtenção de dados

Os caracteres morfológicos mensurados, de acordo com a disponibilidade de estruturas para cada população amostrada e características próprias de cada espécie, estão dispostos na tabela 2. Foi empregado o microscópio estereoscópico óptico CZM4 (Labomed) acoplado à câmera fotográfica digital (3 megapixel); as estruturas estudadas foram fotografadas e posteriormente mensuradas através do aplicativo *Motic Images Plus*. Os dados foram organizados em matriz para posterior análise estatística.

Tabela 2. Caracteres morfológicos e critérios utilizados na morfometria de cada *Utricularia* estudada.

Caracteres medidos	Critérios utilizados	<i>Utricularia foliosa</i>	<i>Utricularia nigrescens</i>	<i>Utricularia pusilla</i>	<i>Utricularia longifolia</i>
		S	S	S	S
Comprimento do eixo floral	A partir da base à primeira bráctea da inflorescência	S	S	S	S
Lg. do eixo floral	Aproximadamente na porção central	S	S	S	S
Cp. das escamas do eixo floral	Maior comprimento	N	S	S	S
Lg. das escamas do eixo floral	Maior largura	N	S	S	S
Cp. da inflorescência	Desde a primeira bráctea ao ápice (incluindo a flor terminal)	S	S	S	S
Lg. da inflorescência	Aproximadamente na porção central	S	S	S	S
Cp. do pedicelo floral	Da bráctea à base do cálice	S	S	S	S
Lg. do pedicelo floral	Aproximadamente na porção central	S	S	S	S
Cp. da sépala	Maior comprimento	S	N	N	N
Lg. da sépala	Maior largura	S	N	N	N
Lg da bráctea	Maior comprimento	N	N	S	N
Cp da bráctea	Maior largura	N	N	S	N
Cp. do lábio superior da flor	Maior comprimento	S	S	N	S
Lg. do lábio superior da flor	Maior largura	S	S	N	S
Cp. do cálcar	Maior comprimento	S	S	N	S
Lg do cálcar	Maior largura	S	S	N	S
Cp. do lábio inferior da flor	Maior comprimento	S	S	N	S
Lg. do lábio inferior da flor	Maior largura	S	S	N	S
Lg. da porção direita do lábio inferior	Maior largura	N	S	N	N
Altura porção direita do lábio inferior	Maior altura	N	S	N	N
Cp. do utrículo	Desde a entrada à parede oposta	S	S	S	S
Lg. do utrículo	Maior largura	S	S	S	S
Cp. do pedicelo do utrículo	A partir da inserção do pedicelo no estolão à inserção do pedicelo no utrículo	S	S	S	S
Diâmetro do estolão	Próximo à base do eixo floral	S	S	S	S
Diâmetro do pecíolo foliar	Na base do limbo foliar	N	N	N	S
Diâmetro do nervura central	Aproximadamente na porção central	N	N	N	S
Lg. foliar	Maior largura	N	S	S	S
Cp. foliar	Maior comprimento	N	S	S	S

S: indica caracteres mensurados para a espécie; N: caracteres não mensurados.

### 3.3.2 Análise morfométrica

Fenogramas foram construídos com base na distância euclidiana, utilizando o critério de UPGMA, com o emprego do aplicativo *Statistica* (StatSoft Inc.), para verificar a congruência dos dados morfométricos com a distribuição geográfica das espécies e populações. Testes de correlação múltipla foram empregados para avaliar a plasticidade fenotípica em diferentes condições ambientais (como altitude, distância geográfica, latitude) obtidos em campo, através de GPS, e em bases de dados climáticos do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), Embrapa e Alerta Rio. Uma comparação morfométrica entre diferentes hábitos de *Utricularia* spp. foi realizada adicionando às análises *Utricularia reniformis*, morfotipo “*Enfant Terrible*”, uma vez que esta espécie é estritamente litofítica. Foi realizada estatística descritiva básica e análise de variância, seguido de regressão múltipla utilizando o aplicativo *Statistica* (StatSoft Inc.).

## 3.4 MÉTODOS MOLECULARES

### 3.4.1 Extração de DNA genômico

Foram testados três *kits* para extração de DNA genômico de plantas (*Plant DNAzol Invitrogen*, *PureLink™ Spin Column®* da Invitrogen e *Invisorb Spin Plant Mini Kit* da Uniscience) e um protocolo CTAB adaptado para purificação de amostras contaminadas com carboidratos. Dentre os protocolos testados optou-se pela extração com CTAB utilizando-se preferencialmente 0,2g de tecido vegetal congelado, embora tenha sido possível realizar a extração com amostras menores (0,02-0,15g de tecido vegetal congelado).

As amostras foram pulverizadas em nitrogênio líquido e imediatamente ressuspensas em 2mL do tampão 1 de extração (Tabela 3) e centrifugadas. A

seguir o sobrenadante foi descartado e adicionado o tampão 2 de extração e novamente centrifugado as amostras, ao final o sobrenadante foi descartado; a amostra foi homogeneizada em 300 $\mu$ L do tampão 3 e transferida para novos tubos, onde fora previamente adicionado 300 $\mu$ L do tampão 3 de extração frio (4°C), procedendo à terceira centrifugação. Concluídas estas etapas iniciais de limpeza, adicionou-se 800 $\mu$ L de uma solução CTAB saturada com NaCl com adição, no momento de uso, de RNase A bovina e beta-mercaptoetanol, e levadas ao banho-maria a 37°C por aproximadamente 45min. Posteriormente, duas lavagens com uma solução de clorofórmio:isoamílico (24:1) foram realizadas, seguidas de precipitação com isopropanol/ etanol. Ao final, o *pellet* foi seco a vácuo e eluído em TE pH 8,0.

Tabela 3. Descrição das etapas e soluções do protocolo de extração de DNA genômico vegetal com CTAB, adaptado para purificação de amostras ricas em carboidratos.

Etapa	Soluções	Composição	Centrifugação
	2mL tampão 1 (B1)	B1: 0,4M Sacarose; 10mM Tris-HCl pH8,0; 5mM betamercaptoetanol (BME); 0,7mM fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF); 5mM MgCl <sub>2</sub> ; Água destilada auto-clavada.	4000 rpm (ou 1940g) por 20 min, a 4°C.
	1mL tampão 2 (B2)	B2: 0,25M Sacarose, 10mM Tris-HCl pH8,0; 5mM BME; 1mM PMSF; 5mM MgCl <sub>2</sub> ; 1% Triton X-100; Água destilada auto-clavada.	12000g por 10min, a 4°C
<b>Extração</b>	300 $\mu$ L + 300 $\mu$ L tampão 3	B3: 1,7M Sacarose, 10mM Tris-HCl pH8,0; 2mM MgCl <sub>2</sub> ; 1mM PMSF; 0,15% Triton X-100, 5mM BME, Água destilada auto-clavada.	14000g por 60min, a 4°C
	CTAB-estoque	CTAB-estoque: 2% CTAB; 1,4M NaCl, 200mM EDTA pH 8,0; 100mM Tris-HCl pH 8,0.	
	800 $\mu$ L CTAB-trabalho	CTAB-trabalho: CTAB-estoque (800 $\mu$ L/amostra); 100mM BME (8 $\mu$ L/ amostra); 5mg/mL RNase A bovina (8 $\mu$ L/amostra).	Banho-maria a 37°C por 30-45 min.

Tabela 3. (Continuação) Descrição das etapas e soluções do protocolo de extração de DNA genômico vegetal com CTAB, adaptado para purificação de amostras ricas em carboidratos.

<b>Lavagem Orgânica</b>	500µL clorofórmio:isoamílico (24:1), inverter por 5min (repetir 1x)	clorofórmio:isoamílico (24:1)	13.400rpm por 10min a 4°C
<b>Precipitação</b>	2/3 V resgatado na lavagem orgânica (~300µL) isopropanol 100%; inverter por 5min e incubar refrigerado por, no mínimo, 20min.		14.000rpm por 30min a 4°C
<b>Lavagem</b>	Lave o pellet com etanol 70%		14.000 rpm/ 5min
<b>Solubilização</b>	Tampão TE pH 8,0		

### 3.4.2 Amplificação do espaçador ITS1 e ITS2 (rDNA nuclear)

A reação de amplificação dos espaçadores ITS1 e 2 foram otimizadas utilizando como reação padrão: 1µL *Template* (solução-estoque de DNA extraído); 2,5µL Tampão (10x); 1µL MgCl<sub>2</sub> (50mM); 0,2µL Mix dNTP (250mM cada); 2µL dos iniciadores senso e anti-senso (6pmol/µL; Tabela 4); 1µL Dimetilsulfóxido (DMSO 5%); 0,13µL Taq DNA Polimerase (Invitrogen) e água MiliQ auto-clavada para completar 25µL de volume final.

As reações em cadeia (PCR) foram realizadas em termocicladores PTC-100 (*MJ Research*) com desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguido de 31 ciclos com desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento dos iniciadores 48°C por 30 segundos e extensão a 70°C por 2 minutos, seguido de um passo extra para extensão final a 70°C por 5 minutos.

### 3.4.3 Amplificação da região *rpl20-rps12* (cpDNA)

A reação de amplificação da região *rpl20-rps12* foi otimizada utilizando como reação padrão: 1µL *template* (solução-estoque de DNA extraído); 2,5µL Tampão

(10x); 0,75µL MgCl<sub>2</sub> (50mM); 0,2µL Mix dNTP (250mM cada); 2µL dos iniciadores rpl20 e rps12 (6pmol/µL; Tabela 4); 0,2L Taq DNA Polimerase (Invitrogen) e água MiliQ auto-clavada para completar 25µL de volume final.

As reações em cadeia (PCR) foram realizadas em termocicladores PTC-100 (*MJ Research*) com desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos com desnaturação a 94°C por 40 segundos, anelamento dos iniciadores 50°C por 50 segundos e extensão a 70°C por 1 minuto, seguido de um passo extra para extensão final a 70°C por 10 minutos.

Tabela 4. Iniciadores utilizados para amplificação das regiões rDNA e cpDNA.

Região	Iniciadores	Seqüências
ITS1*	Senso	GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G
	Antisenso	GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC
ITS2*	Senso	GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC
	Antisenso	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC
rpl20-rps12**	Senso	TTT GTT CTA CGT CTC CGA GC
	Antisenso	GTC GAG GAA CAT GTA CTA GG

Fonte: \*White *et al.* 1990; \*\*Hamilton 1999.

#### 3.4.4 Purificação do produto de PCR

Para a purificação do produto de PCR, inicialmente, utilizou-se o *kit* de purificação GFX TM (*GE Healthcare*) seguindo as instruções do fabricante. Posteriormente, foi adotado um protocolo de lavagem orgânica e precipitação com isopropanol e etanol, conforme descrito a seguir: adicionou-se água MilliQ auto-clavada para completar o volume da reação em 200µL, transferindo esta solução para tubos de 1,5mL; adicionou-se 200µL de clorofórmio:isoamílico (24:1), em seguida os tubos foram invertidos durante 5 minutos e centrifugados a 13.400rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para novos tubos, tomando cuidado para não carregar acidentalmente a fase com clorofórmio, repetindo-se a lavagem. Após a segunda centrifugação, o sobrenadante foi transferido para novos tubos de

1,5mL e adicionou-se 300µL de isopropanol 75%; os tubos foram agitados no vórtex, seguido de um *spin down* e permaneceram em repouso a 4°C durante, no mínimo, 20 minutos. Após o período de precipitação, seguiu-se à centrifugação a 13.400 rpm por 30 minutos, preferencialmente a 4°C. Após descartar todo o isopropanol, adicionou-se 250µL de etanol 70% gelado agitando os tubos no vórtex, seguido de uma centrifugação a 13.400 rpm por 10 minutos. Todo o etanol foi descartado e os *pellets* foram secos a vácuo e posteriormente eluídos em 15µL de água MilliQ auto-clavada. A concentração de *template* foi posteriormente estimada pela comparação da intensidade das bandas das amostras com a intensidade da banda do DNA íntegro do fago λ (25ng/µL) em gel de agarose 2% (Figura 4).

#### 3.4.5 Reação de seqüenciamento

Foram utilizadas reações de seqüenciamento com volume final igual a 10 e 15µL, de acordo com a concentração de *template* após a purificação da PCR. A reação padrão utilizada continha: 0,8µL de iniciador (6 pmol/µL); 3µL *Save \$*; 2µL *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Perkin Elmer Applied Biosystems)*; 1 a 6µL *template* purificado, de acordo com sua concentração e com o volume final da reação; água MilliQ auto-clavada. As reações foram realizadas em termocicladores PTC-100 (*MJ Research*) com desnaturação inicial a 96°C por 2 minutos, seguida de 25 ciclos com desnaturação a 96°C por 45 segundos, anelamento a 52°C por 30 segundos e extensão a 60°C por 4 minutos.

O produto desta reação foi precipitado utilizando isopropanol 75%, como anteriormente descrito para o final da purificação do produto de PCR, e em seguida foi eluído em 10µL de formamida. O seqüenciamento foi lido e resolvido pelo seqüenciador automático ABI 377 (*Perkin Elmer Applied Biosystems*). Para cada amostra foi seqüenciada a fita senso e anti-senso e o eletroferograma checado para gerar, posteriormente, uma seqüência-consenso.

### 3.4.6 Análise das seqüências

As seqüências de cpDNA e rDNA foram editadas e alinhadas com o auxílio dos programas *BioEdit Sequence Alignment Editor* (HALL, 1999) e *ClustalW Multiple Alignment* (THOMPSON *et al.*, 1994). Os picos nos eletroferogramas foram checados buscando eliminar das seqüências falsos polimorfismos gerados por erros de leitura do seqüenciador; após o alinhamento de todas as seqüências, os eletroferogramas foram novamente checados. As extremidades das seqüências, por conterem falsos *InDels*, foram excluídas da análise.

Os índices de diversidade haplotípica e nucleotídica, conteúdo GC e testes de neutralidade  $D$  de Tajima (TAJIMA, 1983) e  $D$  e  $F$  de Fu & Li (Fu 1997), assim como a busca por haplótipos e sítios polimórficos e a construção dos gráficos de *Mismatch Distribution* foram estimados pelo aplicativo DNAsp (*DNA Sequence Polymorphism*; LIBRADO & ROZAS, 2009). A estrutura populacional foi estudada através de análise bayesiana com emprego do aplicativo *Structure 2.3.1*. (PRITCHARD *et al.*, 2000).

A filogenia intraespecífica foi estimada pelo cálculo e desenho de redes de haplótipos através do critério de *Median Joining* ( $\epsilon=0$ ; BANDELT *et al.*, 1999) com o emprego do software NETWORK 4.5.1.0. ([www.fluxus-engineering.com](http://www.fluxus-engineering.com)). As filogenias produzidas não foram polarizadas por um grupo-externo.



## 4 RESULTADOS & DISCUSSÃO

A localização das populações amostradas de *Utricularia* está indicada na figura 5. Os resultados obtidos tanto a partir da morfometria destas amostras, quanto da obtenção de seqüências de rDNA e cpDNA – exclusivamente para *Utricularia longifolia* Gardner – estão apresentados nos itens seguintes.

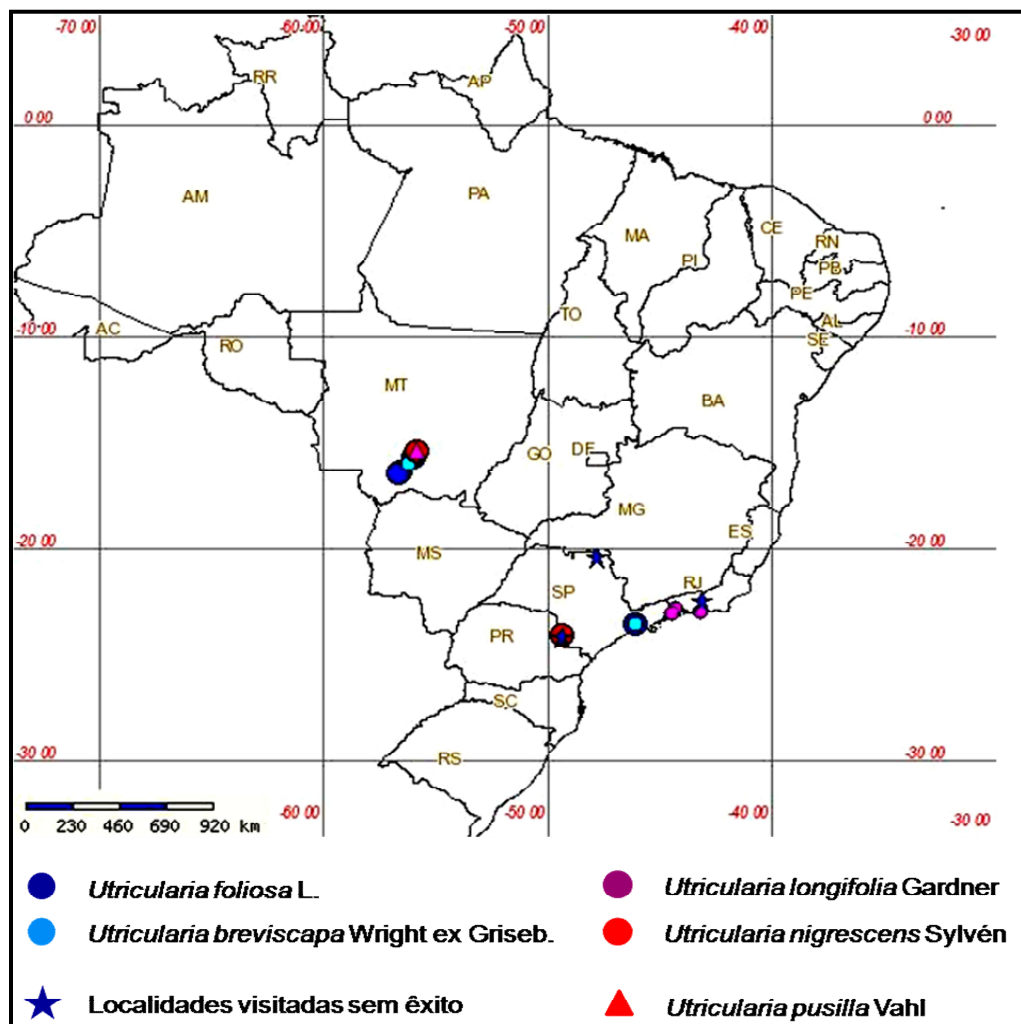


Figura 5. Mapa com a distribuição das localidades visitadas para a coleta das espécies estudadas de *Utricularia*. Mapa gerado através do aplicativo *SpeciesMapper*. (CRIA, 2010)

## 4.1 COMPARAÇÃO MORFOMÉTRICA

### 4.1.1 *Utricularia foliosa* L.

Foram estudadas populações do Mato Grosso (região pantaneira) e São Paulo (várzea do Rio Tietê). As condições ambientais e fotos dos locais de coleta estão detalhadas no apêndice A.

#### 4.1.1.1 *Variação intrapopulacional no Mato Grosso*

As populações amostradas em Mato Grosso estão localizadas, de modo geral, à margem de estradas – exceto o ponto Pousada Piuval – e portanto, expostas a distúrbios ambientais frequentes. Além disso, estas áreas estão sujeitas à sazonalidade marcada do Pantanal, sendo que Santo Antonio do Leverger apresenta sazonalidade severa (Figura 6). E, finalmente, as localidades amostradas estão alguns quilômetros distantes entre si, fator que pode contribuir para uma estruturação maior dentro de cada localidade, principalmente se for considerada a predominância da reprodução clonal nesta espécie. As distâncias entre as localidades amostradas estão descritas na tabela 5.

Tabela 5. Distância geográfica estimada entre as localidades amostradas no Mato Grosso.

	Pousada Piuval	Transpantaneira	Santo Antonio do Leverger
Pousada Piuval	-	-	-
Transpantaneira	30km	-	-
Santo Antonio do Leverger	180km	150km	-



Figura 6. Santo Antonio do Leverger (MT) durante o período seco (FERRAMOSCA, 2008). A e B: área onde durante a cheia encontram-se seis espécies de *Utricularia* é sujeita à seca intensa. C: Indivíduo seco de *Utricularia* sp. encontrado no local. D: Indivíduo seco de *Drosera* sp. Fotos cedidas pelo autor.

Embora a distância entre os pontos amostrados seja alta (Tabela 5) não houve diferenças significativas (Quadro 1) entre os indivíduos das três localidades.

Localidades	Comprimento do utrículo			Largura do utrículo			Comprimento do pedicelo do utrículo		
	PPP	TPT	SAL	PPP	TPT	SAL	PPP	TPT	SAL
Pousada Piuval (Poconé) PPP	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Transpantaneira (Poconé) TPT	NS	-	-	NS	-	-	NS	-	-
Santo Antonio do Leverger SAL	NS	NS	-	NS	NS	-	NS	NS	-

Quadro 1. Diferença entre caracteres morfométricos de utrículos de *Utricularia foliosa* proveniente de três localidades no Estado de Mato Grosso. NS: diferença estatisticamente não significativa.



Apesar das características do utrículo mensuradas não apresentarem diferença significativa, foi observada variação quanto ao tamanho dos indivíduos entre as três localidades (Figura 7). Santo Antonio do Leverger apresentou os menores indivíduos, está mais distante das outras duas localidades, e apresenta um regime de sazonalidade severo, uma vez que durante o período seco do Pantanal a área se modifica completamente e a vegetação herbácea definha (Figura 6).

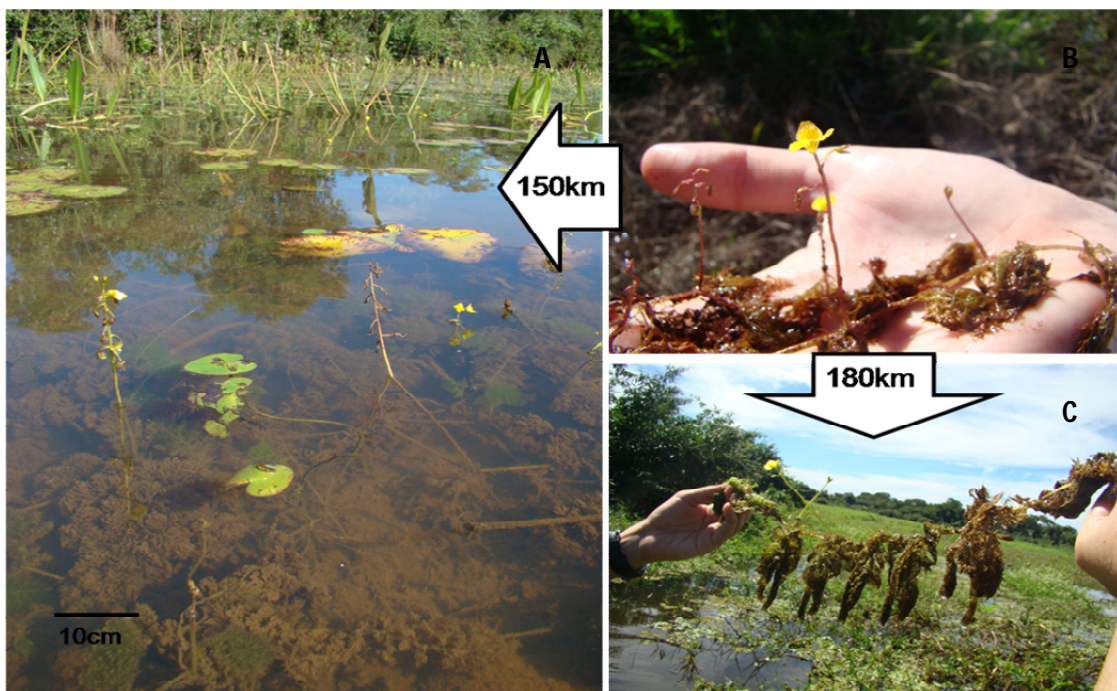


Figura 7. Indivíduos de *Utricularia foliosa* coletados no Mato Grosso e a distância entre as localidades. A: Poconé, estrada Transpantaneira. B: Santo Antonio do Leverger. C: Poconé, Pousada Piuval.

A sazonalidade observada em Santo Antonio do Leverger deve pressionar as espécies herbáceas, incluindo *Utricularia* spp., a utilizar estratégias de dispersão de propágulos resistentes ao dessecamento ou capazes de entrar em dormência durante períodos desfavoráveis, e responder rapidamente à mudança ambiental favorável. Espécies da seção *Utricularia*, provenientes de zonas extratropicais apresentam estruturas de dispersão vegetativa chamadas *turions*, que se formam no final do período reprodutivo a partir do ápice dos estolões de onde cresce um eixo

curto densamente congestionado com folhas modificadas, que auxiliam a dispersão vegetativa em períodos menos favoráveis. Outras espécies de *Utricularia*, especialmente as litofíticas e epifíticas, produzem estruturas para resistir ao dessecamento a partir de regiões tuberosas do estolão (TAYLOR, 1989).

Contudo, em *Utricularia foliosa* não há registro de estruturas semelhantes uma vez que está adaptada às condições tropicais. Portanto, uma hipótese para a manutenção das populações neste ambiente seria a produção e dispersão de sementes capazes de resistir ao dessecamento ou com capacidade de dormência, que, por outro lado, apresente rápido desenvolvimento após mudanças ambientais favoráveis. Oliveira *et al* (em preparação) estudou a germinação de *Utricularia foliosa* a partir de amostras coletadas em Mogi das Cruzes (SP) e observou que os primeiros estágios de desenvolvimento da plântula ocorreram 16 dias após o primeiro dia de embebição das sementes, com a emergência de estruturas clorofiladas responsáveis pela fotossíntese.

Apesar da rápida resposta germinativa observada nas sementes de *Utricularia foliosa*, de modo geral, o gênero apresenta embriões pouco diferenciados, sem órgãos embrionários laterais e com pouco material de reserva, fatores estes que poderiam impedir a viabilidade do embrião por longos períodos (PLACHNO & SWITEK, 2009). Apesar disso, os frutos carnosos e altamente mucilaginosos, típicos de *Utricularia foliosa* (TAYLOR, 1989), podem minimizar o dessecamento e garantir a sobrevivência das sementes até o próximo período de chuvas. No entanto, o sucesso reprodutivo delas dependerá ainda da quantidade de material de reserva disponível e do metabolismo do embrião para garantir sua sobrevivência durante o período desfavorável.

#### 4.1.1.2 Variação intrapopulacional em São Paulo

A coleta de *Utricularia foliosa* no Estado de São Paulo foi realizada em Mogi das Cruzes, Bairro do Rio Acima, em um trecho da APA Várzea do Rio Tietê. Embora as populações estejam localizadas em uma Área de Proteção Ambiental, o local possui um histórico de degradação ambiental uma vez que abrigou até o início

da década de 1970 uma cerâmica que praticava ali a extração de argila. As cavas, abandonadas após o fechamento da Cerâmica, foram ocupadas pelo Rio Tietê e colonizadas por macrófitas, dentre elas *Utricularia foliosa* e *Utricularia breviscapa*. Atualmente, a área está sujeita à degradação praticada pelos moradores da região, que utilizam a área para pesca e pasto para bovinos e equinos, praticando queimadas e depositando resíduos irregularmente. Além disso, as lagoas amostradas estão distantes entre si apenas algumas dezenas de metros, e embora isoladas durante os períodos de estiagem, podem manter comunicação nos períodos de cheias, permitindo a troca de diásporos. A distância entre as lagoas amostradas estão dispostas na tabela 6.

Tabela 6. Distância geográfica estimada entre as lagoas amostradas em Mogi das Cruzes, São Paulo.

	Lagoa 1	Lagoa 2	Lagoa 3
Lagoa 1	-	-	-
Lagoa 2	50m	-	-
Lagoa 3	100m	50m	-

As amostras de *Utricularia foliosa* coletadas nesta área, apesar da pequena distância e eventual comunicação entre as lagoas, apresentaram diferenças significativas, sendo possível identificar, no mínimo, dois morfotipos (Quadro 2).

As lagoas amostradas mantêm comunicação com o Rio Tietê através de canais e represam ao longo do ano parte desta água; o represamento e isolamento parcial destas lagoas durante os períodos de estiagem podem alterar características da qualidade da água, tais como concentração de CO<sub>2</sub>, e de alguns minerais como N, P e K, essenciais para o crescimento da comunidade macrófita. O sucesso na captura de presas (medido como o % de utrículos com presas) em *Utricularia* está positivamente correlacionado com a concentração de P no ambiente. Assim como as concentrações de N, P e K nos estolões de *Utricularia* estão significativamente correlacionados ao sucesso na predação (ADAMEC, 2008a). Além disso, a riqueza e abundância do perifíton e fitoplâncton na coluna d'água aumentam o sucesso de

predação de *Utricularia*, seja por favorecer a atração do zooplâncton ou através do estabelecimento de relações mutualísticas com algas e cianofícias (DÍAZ-OLARTE *et al.*, 2007; ADAMEC, 2008; SIROVÁ *et al.*, 2009). Além disso, o aumento da concentração de CO<sub>2</sub> no ambiente associado à queda na concentração de N, proveniente da predação, nos estolões regulam o estímulo à produção de utrículos (ADAMEC, 2008a).

Populações	Comprimento			Largura			Comprimento do pedicelo		
	Lagoa 1	Lagoa 2	Lagoa 3	Lagoa 1	Lagoa 2	Lagoa 3	Lagoa 1	Lagoa 2	Lagoa 3
Lagoa 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lagoa 2	S	-	-	S	-	-	NS	-	-
Lagoa 3	NS	S	-	NS	S	-	NS	NS	-

Quadro 2. Diferença entre caracteres morfométricos de utrículos de *Utricularia foliosa* proveniente de três lagoas no município de Mogi das Cruzes, São Paulo. NS: diferença estatisticamente não significativa. S: diferença significativa.

Desta forma, diferenças nas concentrações destes minerais e gases dissolvidos nas águas entre as lagoas amostradas poderiam promover populações com utrículos em diferentes fases do desenvolvimento, portanto em diferentes classes de tamanho, que explicariam parcialmente as diferenças observadas entre lagoas independentemente da distância entre elas.

Por outro lado, as diferenças observadas poderiam evidenciar diferentes genótipos (ao menos dois genótipos) nesta área, especialmente estruturados devido a eventos de fundação independentes e baixo fluxo gênico. O efeito fundador produz baixa diversidade genética, e pode ter seu efeito potencializado em espécies aquáticas devido ao crescimento vegetativo predominante (ARAKI, 2000; ARAKI & KADONO, 2003; KAMEYAMA & OHARA, 2006). Neste caso, a reprodução sexual poderia ao longo do tempo produzir alterações nas populações, no entanto, o fluxo gênico pode ser limitado pela dispersão dos diásporos ou mesmo pela incapacidade de populações recentemente estabelecidas produzirem florações suficientemente

atrativas ou capazes de manter populações de polinizadores (HOBHANN *et al.*, 2006).

#### 4.1.1.3 Variação entre São Paulo e Mato Grosso

Os locais onde foram coletados os espécimes de *Utricularia foliosa* apresentaram peculiaridades, como origem antrópica das lagoas colonizadas por *U. foliosa* em Mogi das Cruzes contrapondo à distribuição em áreas alagáveis naturais, em um bioma com sazonalidade marcada como o Pantanal, além de diferenças altitudinais (Mato Grosso:  $\pm 100\text{m}$ ; São Paulo:  $\pm 750\text{m}$ ), temperatura média e regime de chuvas. Portanto, seria esperado encontrar diferenças morfológicas entre ambas as regiões que reflitam tanto às condições ambientais locais quanto a diferença genética entre elas. A divergência genética pode ser inferida uma vez que é possivelmente a manutenção de fluxo gênico entre os dois pontos seja inviável devido à distância geográfica ( $\pm 1.700\text{ km}$ ) e tendo insetos como polinizadores predominantes.

As características dos utrículos utilizadas para a comparação intrapopulacional também variaram entre as duas regiões (Quadro 3), no entanto apenas o comprimento do pedicelo do utrículo apresentou correlação significativa com a altitude ( $r: 0.97685$ ;  $p < 0,02$ ) e temperatura ( $r: -0,9276$ ;  $p < 0,015$ ), sendo estes valores médios para os municípios amostrados. Os caracteres reprodutivos mensurados (comprimento e largura: lábio inferior da corola, lábio superior da corola, cálcio, pedicelo floral, eixo floral e inflorescência), não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre as duas regiões.

<b>Caráter (mm)</b>	<b>Mato Grosso</b>	<b>São Paulo</b>	<b>ANOVA</b>
Comprimento	1,1359 $\pm$ 0,4243	1,2011 $\pm$ 0,3139	P < 0,05
Largura	0,9202 $\pm$ 0,3828	1,0010 $\pm$ 0,2994	P < 0,05
Comp. do pedicelo	0,2250 $\pm$ 0,0780	0,1311 $\pm$ 0,0518	P < 0,05

Quadro 3. Médias, desvios-padrão e significância dos caracteres de utrículos de *Utricularia foliosa* provenientes de três localidades de Mato Grosso e três lagoas em Mogi das Cruzes, São Paulo.



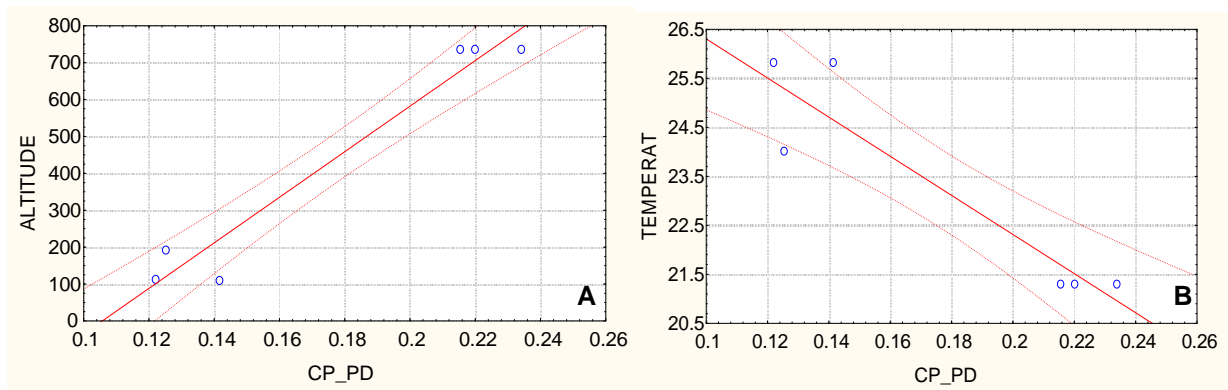


Gráfico 1. Diagramas de dispersão e correlação do caráter 'comprimento do pedicelo do utrículo' com a altitude (A;  $r: 0,977$  e  $p < 0,02$ ) e temperatura (B;  $r: -0,938$  e  $p < 0,015$ ) entre os estados de São Paulo e Mato Grosso.

Contudo, a diferença que atrai maior atenção é entre o tamanho dos indivíduos das duas regiões (Figura 8) que não pode ser mensurado através do comprimento do estolão devido à grande facilidade com que se fragmenta. Embora, fosse esperado que o diâmetro do estolão permitisse estimar indiretamente essa diferença de tamanho, não houve diferença significativa entre as populações para este carácter.

Por outro lado, foi possível observar em diagramas de dispersão (Gráfico 2) dois agrupamentos distintos de valores para o comprimento e largura dos utrículos, para as amostras provenientes de ambas as regiões, da mesma forma, a análise de agrupamentos destes valores resulta em dois grupos principais (Figura 9, setas) incoerentes com a distribuição geográfica. O dimorfismo de utrículos é característico de *Utricularia foliosa* e pode apresentar vantagens ecológicas, aumentando a amplitude de tamanho das potenciais presas, assim como pode facilitar a flutuabilidade das folhas, uma vez que em geral os utrículos maiores estão dispostos mais próximo da base dos filocládios.

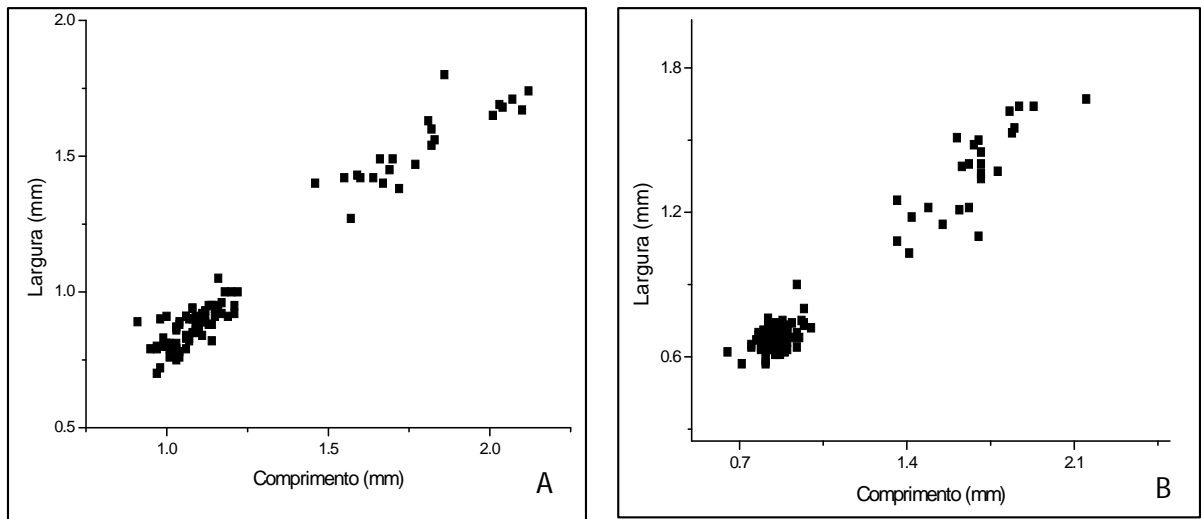


Gráfico 2. Dimorfismo do utrículo de *Utricularia foliosa*. A: Relação comprimento versus largura do utrículo de amostras do Mato Grosso. B: Relação comprimento versus largura do utrículo de amostras de São Paulo.



Figura 8. Comparação entre o tamanho de indivíduos de *Utricularia foliosa* coletados em São Paulo e Mato Grosso. A: Mogi das Cruzes, SP; crédito: Miranda, 2008. B: Santo Antonio do Leverger, MT.

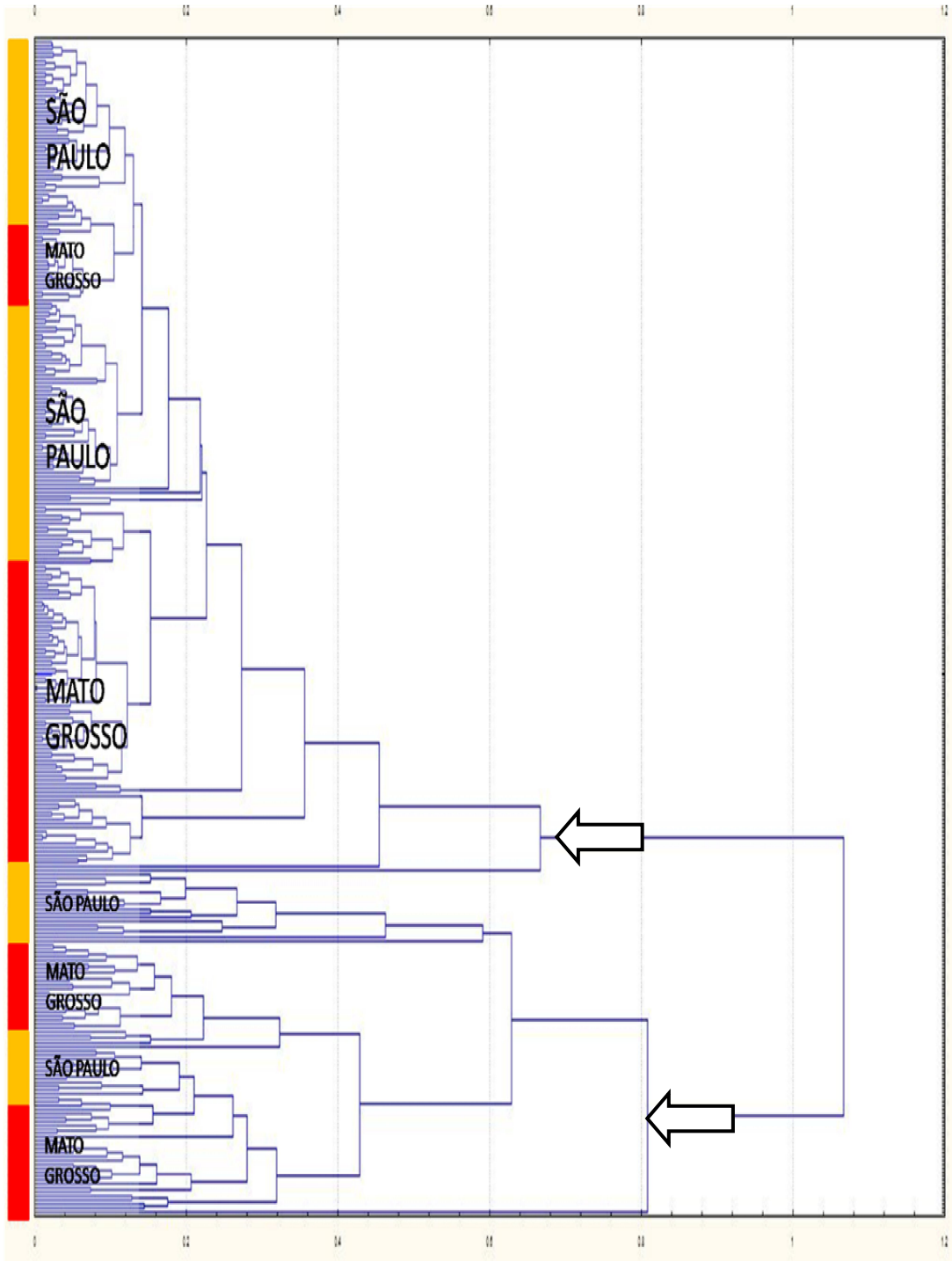


Figura 9. Fenograma construído com base em caracteres dos utrículos para 6 populações de *Utricularia foliosa* (distância Euclidiana; UPGMA; 50 indivíduos por população; N=300). Os agrupamentos estão identificados pela origem geográfica. Os agrupamentos indicados pelas setas apresentaram maior distância entre si, apesar de incluir amostras de ambas as localidades geográficas, fato que possivelmente indica o dimorfismo observado nos utrículos.

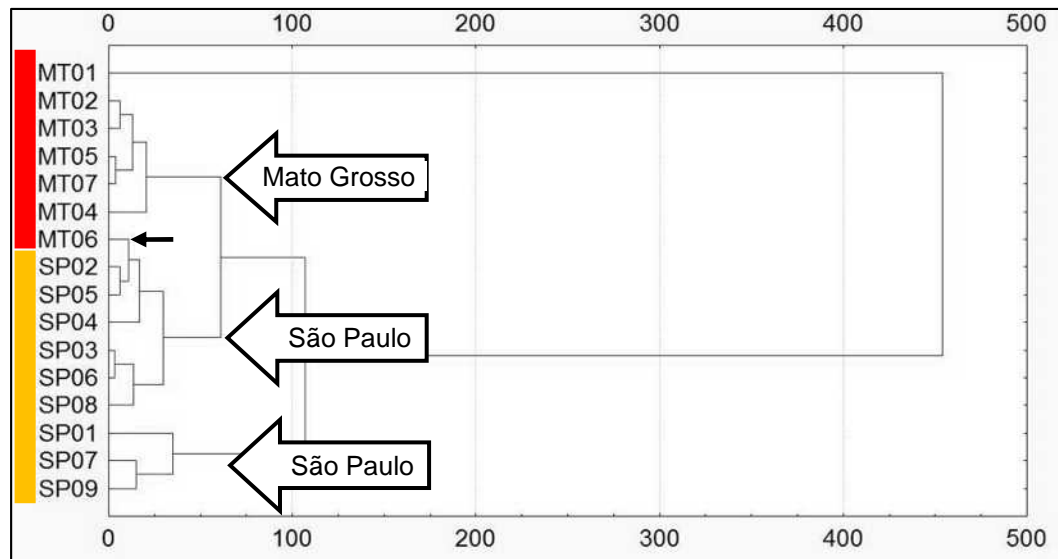


Figura 10. Fenograma construído com base nos caracteres reprodutivos e estolão, para populações de *Utricularia foliosa* de São Paulo e Mato Grosso (distância Euclidiana; UPGMA; 16 indivíduos)

A análise de *cluster* a partir de caracteres do utrículo (Figura 9) permitiu identificar agrupamentos coerentes com a distribuição geográfica, embora com um baixo grau de sobreposição. Contudo, uma análise com os demais caracteres, apesar da amostragem menor de indivíduos, separou claramente as amostras das duas regiões (Figura 10). Além disso, a população de São Paulo se dividiu em dois agrupamentos, sendo um mais próximo da população de Mato Grosso.

#### 4.1.2 *Utricularia longifolia* Gardner

##### 4.1.2.1 Variação morfométrica entre as localidades amostradas

A Serra da Bocaina abrange o nordeste do Estado de São Paulo e estende-se ao sul do Estado do Rio de Janeiro, juntamente com o Maciço da Tijuca, sobre o qual situa-se o Parque Nacional Floresta da Tijuca que integram um conjunto de escarpas rochosas que constituem a Serra do Mar e tiveram origem durante o período pré-cambriano (EIRADO *et al.*, 2006; PEREIRA *et al.*, 2001; SOARES *et al.*,

2008). Bananal (SP) localiza-se na Serra da Bocaina e a população amostrada encontrava-se a 1242m de altitude, mas a uma distância relativamente curta (Tabela 7) da população de Angra dos Reis, a 44m de altitude, situada na faixa litorânea ao sul do Estado do Rio de Janeiro onde as escarpas da Serra da Bocaina entram em contato com o mar. O ponto mais distante amostrado localiza-se no Parque Nacional Floresta da Tijuca (Rio de Janeiro; RJ) a 953m de altitude.

Tabela 7. Distância estimada entre as localidades de coleta de *Utricularia longifolia* Gardner.

	Angra dos Reis	Bananal	Rio de Janeiro
Angra dos Reis	-	-	-
Bananal	65km	-	-
Rio de Janeiro	135km	125km	-

Foram mensurados caracteres vegetativos para as três populações e reprodutivos apenas para Bananal (BN) e Angra dos Reis (AG), porque a população da Floresta da Tijuca (TJ) encontrava-se estéril durante o período de coleta. No quadro 4 estão apresentados todos os caracteres mensurados por população, os valores médios e desvios-padrão por caráter.

	Angra dos Reis			Bananal			Rio de Janeiro		
	n	Média		n	Média		n	Média	
Lg estolao	26	0,76	± 0,25	32	0,96	± 0,25	19	0,74	± 0,19
Lg utrículo	35	1,28	± 0,49	23	1,24	± 0,37	19	1,44	± 0,32
Cp utrículo	35	1,42	± 0,54	23	1,32	± 0,37	19	1,58	± 0,35
Cp apêndice do utrículo	31	1,05	± 0,43	14	0,77	± 0,34	15	1,08	± 0,48
Cp pedicelo do utrículo	35	0,75	± 0,46	21	0,67	± 0,25	18	0,69	± 0,32
Cp folha	58	141,98	± 102,08	57	266,73	± 105,11	19	150,58	± 79,92
Lg folha	58	14,26	± 6,51	57	19,86	± 8,12	19	19,42	± 7,97
Cp / Lg folha	58	9,95	± 5,18	57	14,25	± 5,12	19	7,75	± 2,97
Lg nervura foliar	30	39,57	± 20,34	52	0,62	± 0,18	19	0,42	± 0,20
Lg pecíolo foliar	29	1,06	± 0,29	48	12,39	± 2,71	19	1,30	± 0,42
Cp pedúnculo floral	25	326,20	± 128,76	7	485,42	± 47,02	-	-	-
Lg pedúnculo floral	22	1,28	± 0,61	42	1,49	± 0,45	-	-	-
Cp inflorescência	25	209,16	± 70,53	7	131,43	± 18,64	-	-	-
Cp pedicelo floral	25	25,20	± 4,12	4	13,19	± 6,09	-	-	-
Lg pedicelo floral	22	0,58	± 0,35	19	0,77	± 0,17	-	-	-
Cp cálcx	17	11,12	± 1,91	8	14,62	± 3,85	-	-	-
Cp lábio inferior	4	18,25	± 5,5	11	19	± 6,24	-	-	-
Cp lábio superior	5	11,2	± 2,59	11	11,19	± 3,22	-	-	-
Lg lábio inferior	4	71,67	± 88,99	11	28,09	± 4,80	-	-	-
Lg lábio superior	5	8,2	± 2,39	11	7,77	± 2,24	-	-	-
Cp escama	13	17,22	± 3,00	16	25,32	± 12,18	-	-	-
Lg escama	13	0,90	± 0,17	16	1,40	± 0,71	-	-	-
Lg palato	-	-	-	10	8,51	± 1,81	-	-	-

Quadro 4. Médias e desvios-padrão dos caracteres amostrados (mm) em *Utricularia longifolia* proveniente de três localidades. Não houve diferença significativa entre os valores, de acordo com o teste de Kruskal-Wallis ANOVA. Cp: Comprimento; Lg: Largura.

De modo similar ao observado para *Utricularia foliosa* no Mato Grosso, não houve diferença significativa dos caracteres morfológicos amostrados entre as

localidades, independentemente da distância entre elas. E, assim como no Mato Grosso todas as localidades amostradas situavam-se sob os domínios do Pantanal, todas as localidades onde foram amostrados indivíduos de *Utricularia longifolia* estão situadas sob os domínios da Serra do Mar (Serra da Bocaina e Maciço da Tijuca). Esta região apresenta uma história geológica comum, formada através de eventos tectônicos de fusão entre microplacas ocorridos no período pré-cambriano (EIRADO *et al.*, 2006).

Embora as diferenças entre as localidades não tenham sido significativas, a análise de agrupamentos com base em UPGMA dos caracteres reprodutivos separou as populações de Angra dos Reis e Bananal (Figura 11), assim como os caracteres vegetativos (Figura 12) agrupou as populações do Rio de Janeiro (Angra dos Reis e Floresta da Tijuca), enquanto Bananal permaneceu isolada.

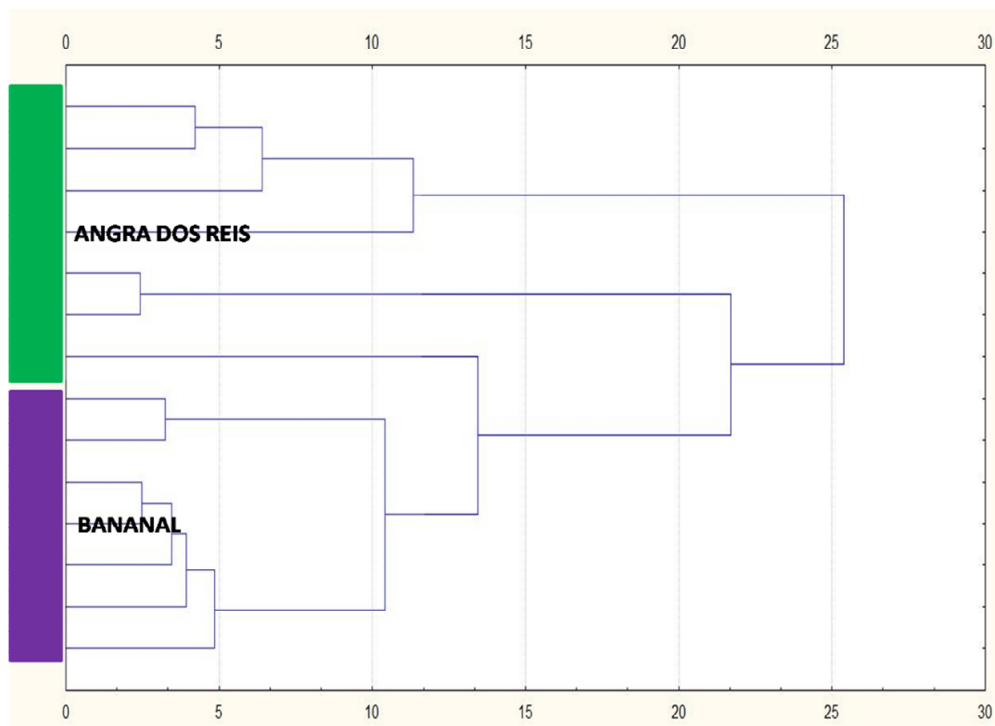


Figura 11. Fenograma construído com base em caracteres reprodutivos para três populações de *Utricularia longifolia* (distância Euclidiana; UPGMA; 7 indivíduos por população; N=14). Os agrupamentos estão identificados pela origem geográfica.

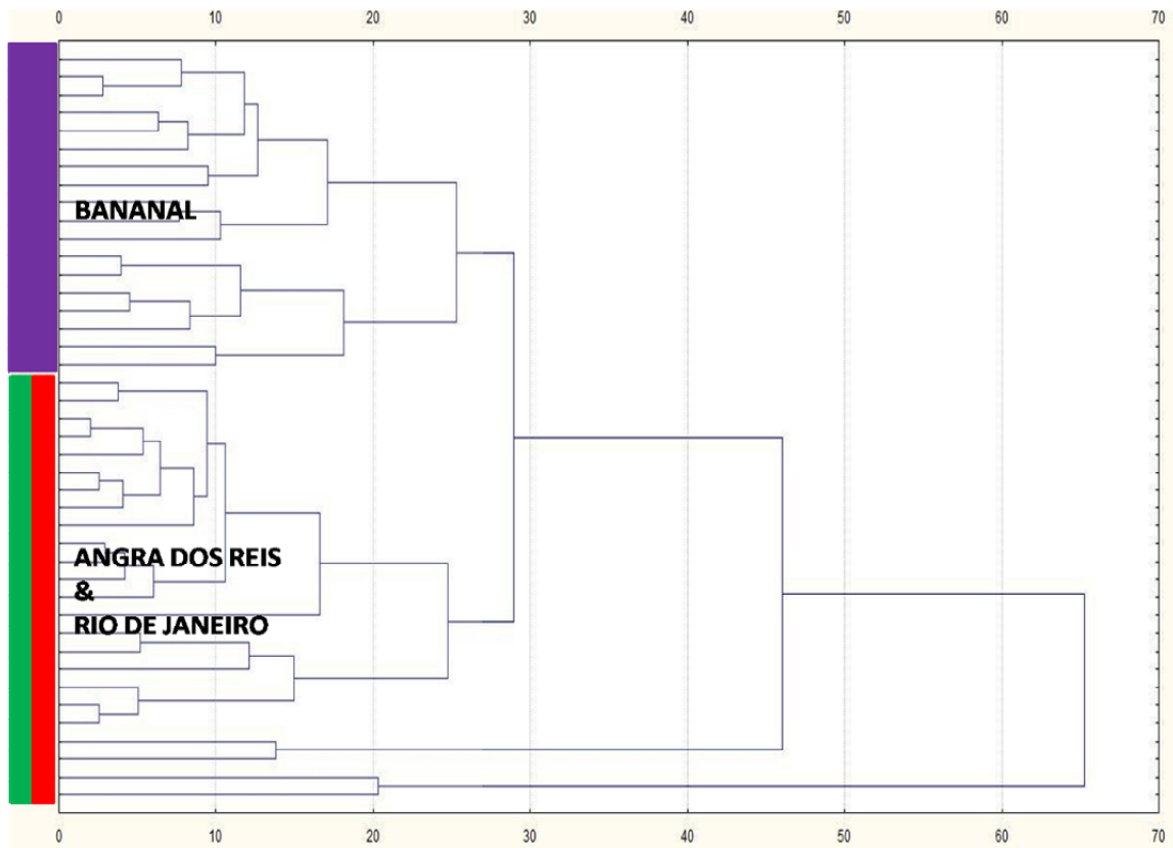


Figura 12. Fenograma construído com base em caracteres vegetativos para três populações de *Utricularia longifolia* (distância Euclidiana; UPGMA; 14 indivíduos por população; N= 42). Os agrupamentos estão identificados pela origem geográfica.

#### 4.1.2.2 Variação morfológica correlacionada ao gradiente ambiental

Apesar de não haver diferenças significativas entre as variações em *Utricularia longifolia*, observadas par-a-par, dentre todas as localidades amostradas, foi possível correlacionar variações em estruturas reprodutivas e vegetativas com as variações ambientais entre as localidades. Dentre as variações ambientais estudadas destaca-se a variação altitudinal (44m a 1242m), mas outros fatores ambientais foram estudados e estão dispostos nas tabelas 8 e 9; 5 caracteres reprodutivos e 7 vegetativos apresentaram correlação significativa ( $P < 0,05$ ) com os fatores ambientais investigados.



Tabela 8. Caracteres reprodutivos correlacionados significativamente ( $P < 0,05$ ) a fatores ambientais.

	Altitude	Temperatura	Precipitação	Evapotranspiração	Latitude	Longitude	Umidade	Radiação
Comprimento da inflorescência	-	+	+	+	-	-	+	-
Comprimento do cálcar	-	+	+	+	-	-	+	-
Comprimento da pétala superior	+	-	-	-	+	+	-	+
Largura da pétala superior	-	+	+	+	-	-	+	-
Largura do pedúnculo floral	+	-	-	-	+	+	-	+

Os sinais - e + indicam correlações negativas ou positivas, respectivamente.

Tabela 9. Caracteres vegetativos correlacionados significativamente ( $P < 0,05$ ) a fatores ambientais.

	Altitude	Temperatura	Precipitação	Evapotranspiração	Latitude	Longitude
Comprimento longitudinal dos utrículos	#	#	+	#	#	#
Comprimento dos apêndices do utrículo	-	#	+	#	-	#
Comprimento do pedúnculo do utrículo	+	+	-	#	#	#
Comprimento da folha	+	#	-	-	+	#
Largura da folha	-	-	+	#	-	-
Razão comprimento/largura foliar	+	#	+	-	-	-
Largura do pecíolo foliar	+	-	-	#	+	+

Os sinais - e + indicam correlações negativas ou positivas, respectivamente; #: ausência de correlação.

Para os caracteres reprodutivos (Tabela 8) foi observado que a altitude, latitude, longitude e radiação solar covariaram entre si (para cada caráter apresentam mesma correlação: negativa ou positiva); e estes fatores apresentaram correlação inversa à temperatura, precipitação, evapotranspiração e umidade. Dentre os caracteres vegetativos que apresentaram correlação com fatores

ambientais (Tabela 9), o volume de precipitação correlacionou-se a todos os caracteres, seguido da altitude. Além das medições de comprimento e largura, a razão destes parâmetros foi utilizada como um índice da forma foliar e não apresentou correlação apenas com a temperatura (Tabela 9 e Figura 13).

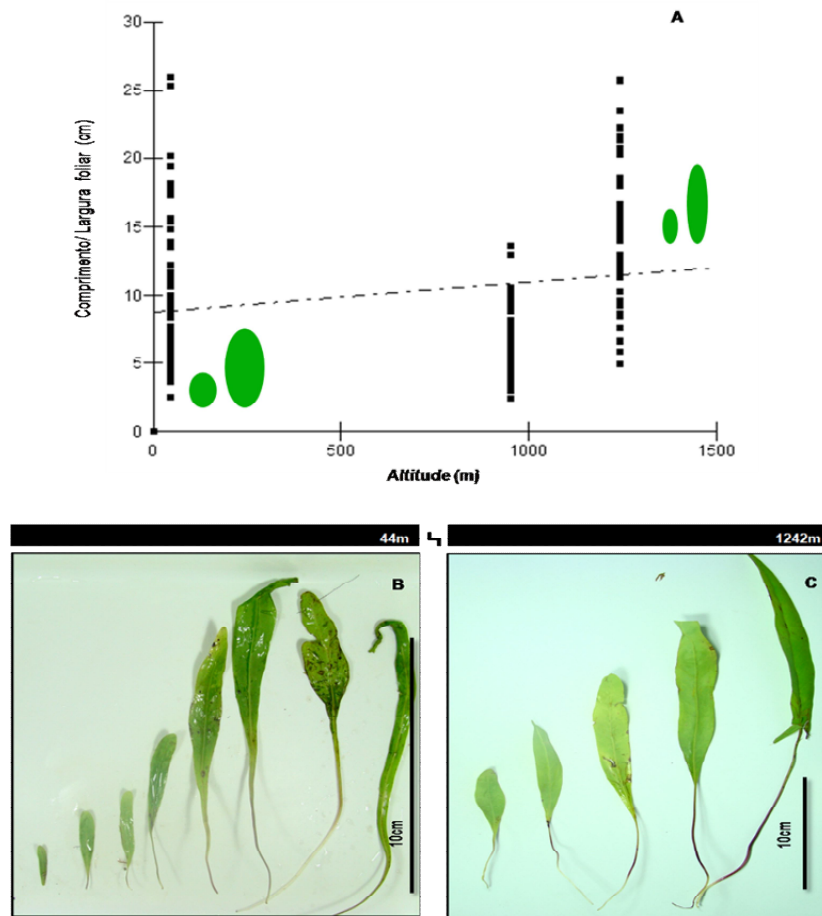


Figura 13. Variações na forma foliar de *Utricularia longifolia* correlacionadas a fatores ambientais. (A) Correlação entre altitude e a razão do comprimento/ largura foliar representada graficamente; (B e C) Folhas de *Utricularia longifolia* exemplificando a variação morfológica intrapopulacional encontrada nas altitudes mínima e máxima amostradas.

Os padrões de respostas à altitude são bem conhecidos para climas temperados e frequentemente associados à disponibilidade hídrica e temperatura, refletindo-se em tendências ao nanismo da planta. Estruturas foliares freqüentemente apresentam respostas plásticas às condições ambientais, tais como umidade e temperatura, ambas estreitamente relacionadas com gradientes

altitudinais (CLEVERING *et al.*, 2001). Nestas condições, respostas morfológicas tais como redução do limbo foliar é uma estratégia comum (WEN & HSIAO, 2001), porém, não se restringem apenas à forma, mas outras características, como o padrão de ramificação, podem ser alteradas (PALACIO & MONTSERRAT-MARTI, 2006).

Wen & Hsiao (2001) estudando uma herbácea (*Lilium longiflorum* var. *formosanum*: Liliaceae) em Taiwan, encontraram padrões similares de correlação entre a razão de comprimento/ largura foliar e a altitude. A correlação observada em *Utricularia longifolia* sugere alterações no formato foliar em função da altitude, sendo observada a predominância de folhas alongadas e estreitas nas altitudes mais elevadas. Essa resposta pode estar correlacionada as baixas temperaturas comuns a este tipo de ambiente, uma vez que resposta similares foram encontradas em outras angiospermas (PALACIO & MONTSERRAT-MARTI, 2006; WEN & HSIAO, 2001).

A caracterização dos padrões geográficos da variação fenotípica é um primeiro passo fundamental para estimar a variação genética e respostas a gradientes ambientais (URIBE-SALAS *et al.*, 2008). Em *Utricularia longifolia*, a avaliação dos caracteres par-a-par (ANOVA) entre as localidades não resultaram em diferença significativa entre as localidades estudadas, no entanto, as análises de agrupamentos com múltiplos caracteres (caracteres vegetativos e reprodutivos organizados em duas matrizes) permitiu observar agrupamentos entre as localidades, isolando a população localizada na maior altitude (Bananal, SP). Dessa forma foi possível também correlacionar alguns fatores ambientais, dentre eles altitude e precipitação, à variação observada. A diversidade e diferenciação genética devem ser investigadas para testar se os mesmos padrões são encontrados, ou se estes aqui apresentados são decorrentes exclusivamente da expressão fenotípica devido a fatores ambientais.

#### 4.1.3 Aspectos morfométricos em *Utricularia* comparados quanto ao hábito

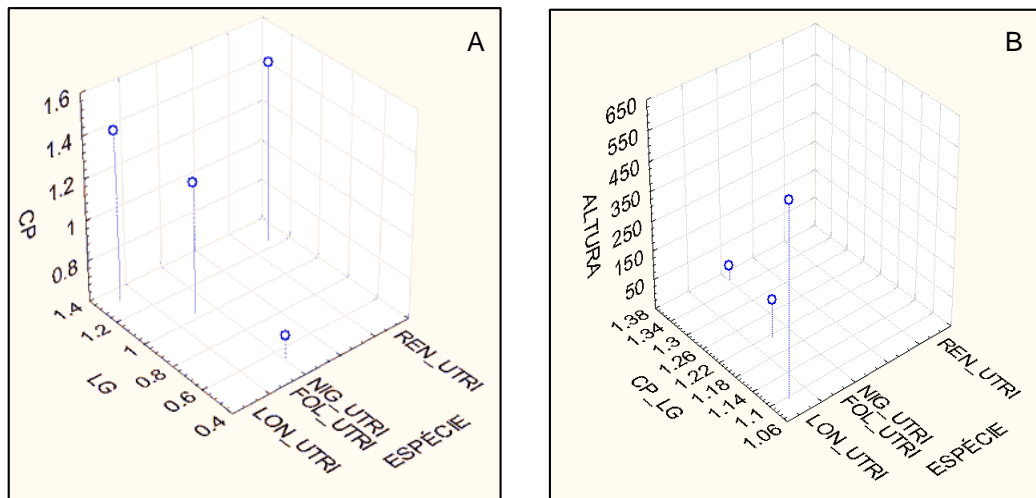
*Utricularia* é constituído de aproximadamente 220 espécies que exibem amplo repertório de hábitos, sendo o terrestre mais amplamente distribuído – especialmente na região neotropical – seguido do hábito aquático-livre (JUNNIPER *et al.*, 1989; TAYLOR, 1989; BARROSO, 1991; FISHER *et al.*, 2004; GUISANDE *et al.*, 2007;). *Utricularia foliosa* é uma erva aquática-livre com distribuição pantropical e não-ameaçada no Brasil; *Utricularia longifolia* é uma erva litofítica e terrestre, endêmica do Brasil, com distribuição restrita à Serra do Mar nos Estados do sudeste, e à Chapada Diamantina na Bahia, sendo que atualmente está ameaçada no Estado de São Paulo (classificada como Em Perigo; MAMEDE *et al.*, 2007) e no município do Rio de Janeiro (classificada como Criticamente Ameaçada; SMMA, 2009).

GUISANDE *et al.* (2007) utilizando caracteres morfológicos não foram capazes de distinguir agrupamentos de espécies coerentes com os diferentes hábitos, exceto aquático-livre e epifítico. Os autores sugeriram que a convergência morfológica presente em espécies com hábito terrestre, reofítico, litofítico ou aquático-fixo permite que estas espécies exibam mais de um hábito, é o caso de *Utricularia longifolia* que apresenta tanto o hábito litofítico quanto terrestre. No entanto, a alocação de biomassa para produção de estruturas vegetativas (utrículos, estolões e folhas) e estruturas não-clorofiladas ou reprodutivas é significativamente diferente, de acordo com o hábito: espécies aquáticas investem mais em estruturas vegetativas (entre 86% e 90% da biomassa), enquanto espécies terrestres alocam aproximadamente 90% da biomassa em estruturas reprodutivas (POREMBSKI *et al.*, 2006). Embora sejam escassos os estudos com espécies epífitas, estas parecem intermediárias quanto ao investimento, alocando aproximadamente 40% da biomassa em estruturas reprodutivas (GUISANDE *et al.*, 2007).

Utilizando os valores médios obtidos na morfometria de *Utricularia foliosa* e *Utricularia longifolia* foi estudada a correlação de medidas (comprimento e largura) de estruturas vegetativas e reprodutivas, bem como comparações entre as espécies para inferir diferenças correlacionadas aos hábitos.

Em ambas as espécies o comprimento e largura do utrículo, assim como o comprimento do pedicelo do utrículo, são fortemente correlacionados e dependentes

entre si ( $r > 0,7$  e  $p < 0,00$  em ambas). No entanto, diferem significativamente quanto ao comprimento do utrículo ( $p < 0,02$ ), sendo que *U. longifolia* possui armadilhas maiores que *U. foliosa* (Gráfico 3, A). Além disso, apenas em *Utricularia longifolia* foi observada correlação ( $r = 0,40$ ; fraca a regular) entre a razão do comprimento e largura do utrículo com a altura da inflorescência (Gráfico 3,B).

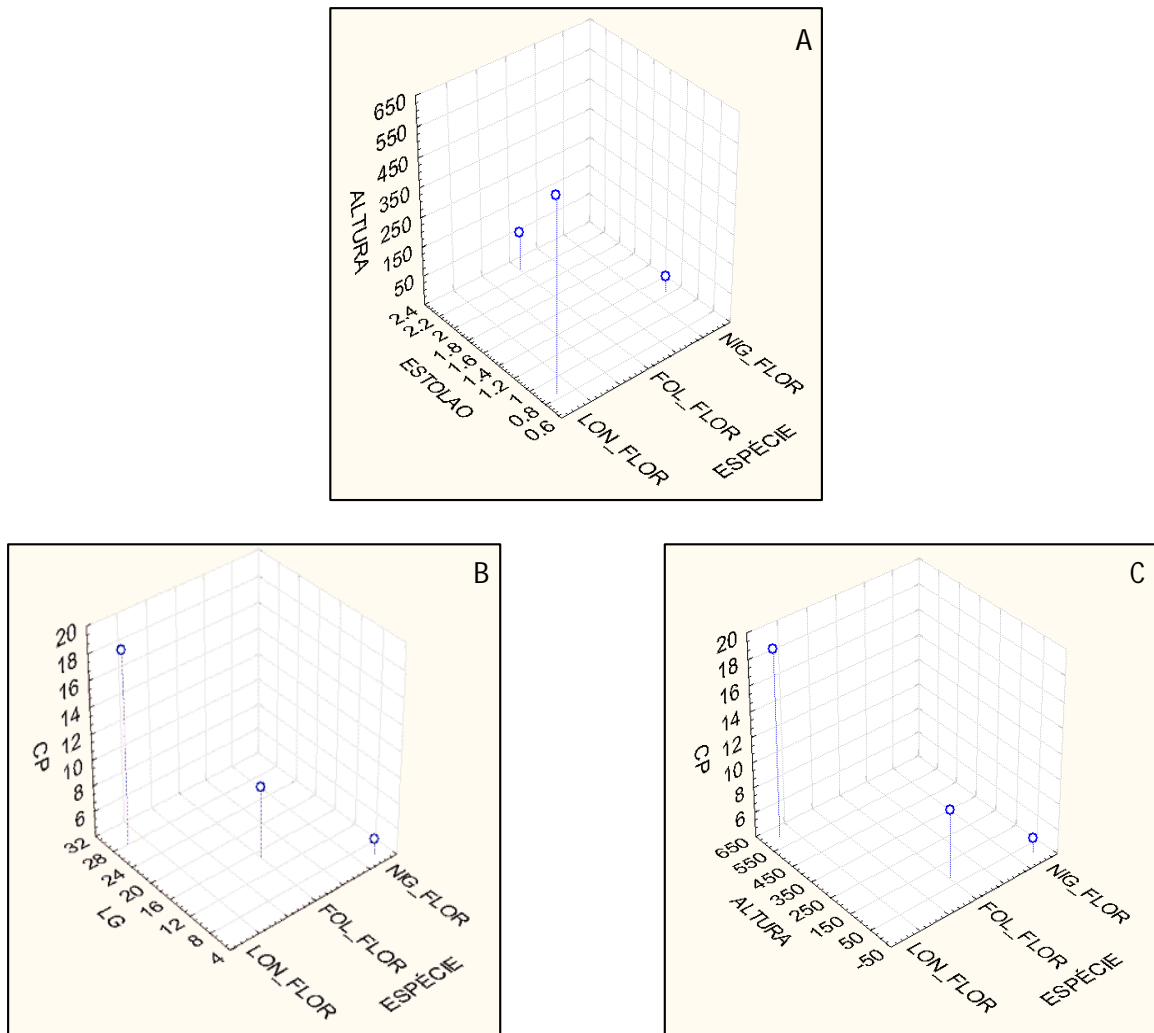


Embora, espécies terrestres invistam mais em estruturas reprodutivas (POREMBSKI *et al.*, 2006) e observações prévias indiquem que tais espécies possuem utrículos significativamente menores (SEINE *et al.*, 2002), *Utricularia longifolia* (erva litófito e terrestre) assim como *Utricularia reniformis* "Enfant Terrible" (erva estritamente litófito) apresentaram utrículos maiores que *Utricularia foliosa* (erva aquática-livre; gráfico 3A). No entanto, *Utricularia nigrescens* (erva estritamente terrestre) apresentou utrículos significativamente menores ( $p < 0,04$ ) que

*Utricularia foliosa*, conforme o esperado para espécies terrestres. Além disso, a razão entre comprimento e largura do utrículo apresentou correlação ( $r \approx 0,40$ ) com a altura da inflorescência em ambas as espécies, mas não houve regressão significativa.

As diferenças observadas quanto ao tamanho dos utrículos pode ser decorrente do hábito predominantemente litofítico dentre as amostras de *Utricularia longifolia* utilizadas na morfometria, uma vez que *Utricularia nigrescens* apresentou armadilhas menores, como esperado para o hábito terrestre. Espécies terrestres de *Utricularia* parecem ser especializadas na captura de protozoários (SEINE *et al.*, 2002), por outro lado, espécies aquáticas apresentam uma dieta mais variada (DÍAZ-OLARTE *et al.*, 2007; ADAMEC, 2008; PEROUTKA *et al.*, 2008). Portanto, a variação observada no tamanho dos utrículos deve refletir as diferenças entre as classes de presas frequentemente capturadas por cada espécie.

A largura do estolão também foi correlacionada ( $r \approx 0,40$ ) à altura da inflorescência em ambas as espécies (Gráfico 4A), mas apenas *Utricularia longifolia* obteve regressão significativa ( $p < 0,02$ ). A largura e o comprimento do lábio inferior da corola apresentaram fraca correlação ( $r \approx 0,18$ ) apenas em *Utricularia foliosa*, sendo nula em *Utricularia longifolia*. No entanto, ambas diferiram em relação ao comprimento do lábio inferior da corola e a altura total da inflorescência (Gráfico 4C), e apresentaram correlação regular ( $r \approx 0,4$ ) entre estes caracteres. Guisande *et al.* (2007) também encontraram correlação significativa entre o tamanho máximo da inflorescência e o tamanho máximo da corola, entre espécies de diferentes hábitos. Segundo Guisande *et al.* (2007) o tamanho máximo da corola foi muito similar entre espécies terrestres, aquáticas-livres e aquáticas-fixas, sendo menores em espécies reofíticas e litofíticas e maiores em espécies epífitas. Entre *Utricularia longifolia* e *Utricularia foliosa*, as diferenças encontradas no tamanho da corola (Gráfico 4B) não foram significativas, embora a amostra de *Utricularia longifolia* utilizada para morfometria apresentasse o hábito predominantemente litofítico nas três localidades de coleta.



#### 4.1.4 *Utricularia nigrescens* Sylvén versus *Utricularia pusilla* Vahl.

A seção *Setiscapella*, segundo Mittelstaedt & Miranda (*em preparação*), é parafilética, sendo que suas espécies relacionam-se evolutivamente às seções *Utricularia* e *Avesicaria*, além disso, agrupa duas espécies com um longo histórico

de conflito taxonômico. *Utricularia pusilla* já foi sinonimizada com *Utricularia subulata*, sob a seção *Setiscapella* (por De Candolle em 1844) e, dentre outras alterações, rearranjada como *Setiscapella pusilla* em 1925. *Utricularia nigrescens*, também arranjada sob a seção *Setiscapella*, aparece identificada em ilustrações históricas como *Utricularia pusilla* (TAYLOR, 1989).

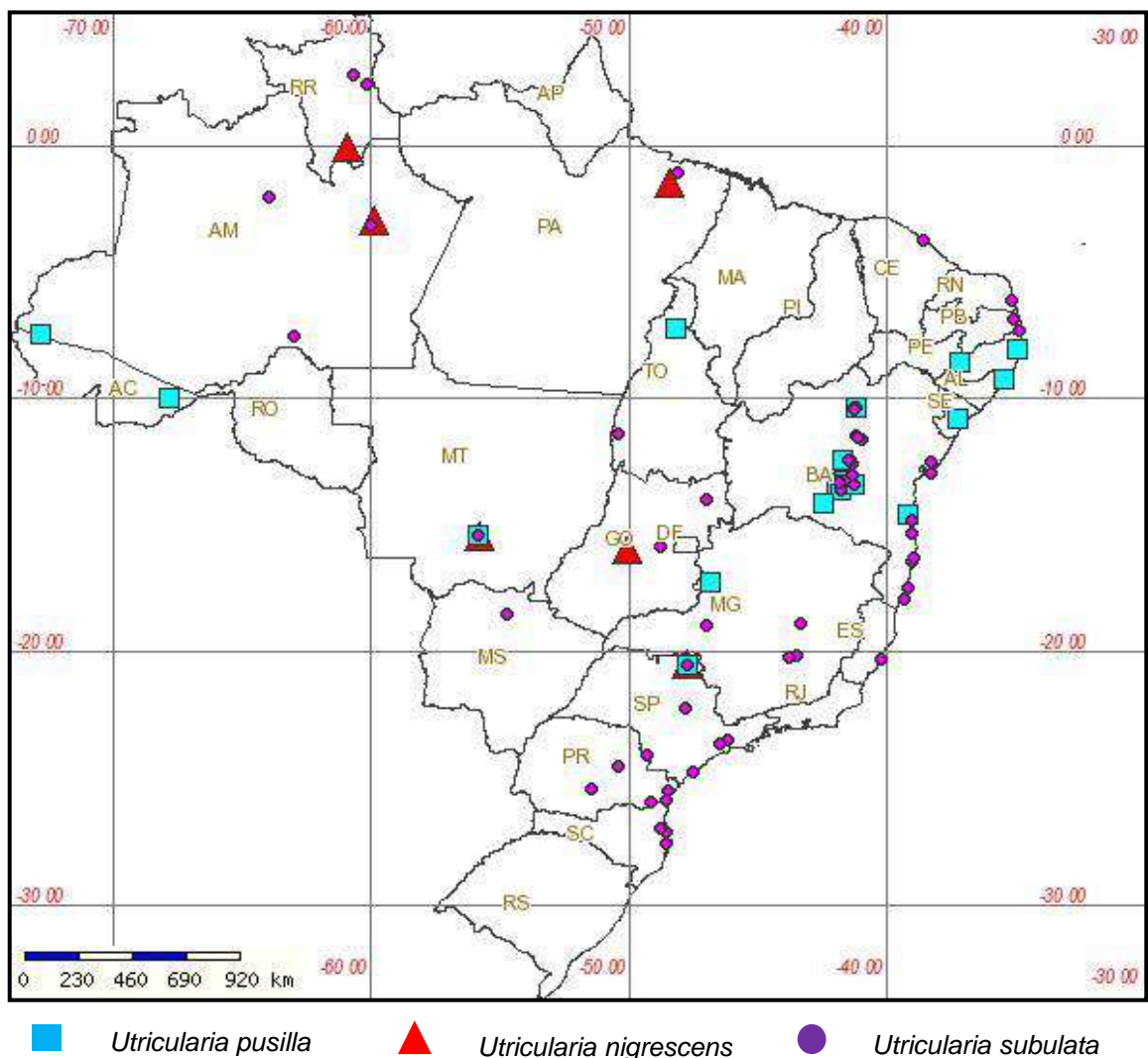


Figura 14. Mapa de distribuição no Brasil das espécies *Utricularia nigrescens*, *Utricularia pusilla* e *Utricularia subulata*. Mapa gerado a partir de registros de ocorrência no banco de dados do SpeciesLink com o emprego do aplicativo SpeciesMapper, (CRIA, 2010)

Além disso, Taylor (1989) examinou espécimes identificados por Sylvén como *Utricularia pusilla* e concluiu se tratarem de espécimes de *Utricularia subulata* e



*Utricularia nigrescens*. Segundo Taylor (1989) a ausência de brácteas estéreis e folhas mais estreitas são características importantes para a identificação de *Utricularia nigrescens*. Ambas – *Utricularia nigrescens* e *Utricularia pusilla* – são endêmicas e *Utricularia subulata* apresenta distribuição pantropical; no Brasil, a área de ocorrência delas se sobrepõe em algumas regiões, dentre elas o estado de Mato Grosso e São Paulo (Figura 14).

Durante expedição de coleta ao Mato Grosso foram encontradas ambas as espécies ocorrendo em simpatria e levadas ao laboratório para identificação através de chave dicotômica (TAYLOR, 1989) e também através de morfometria. As amostras foram separadas através de um caráter diagnóstico discreto: presença ou ausência de um botão floral abortado, característico de *Utricularia pusilla*. A preservação da corola das flores foi prejudicada durante a expedição de coleta, impedindo o uso destes caracteres para a distinção. O Quadro 6 resume e compara algumas características morfológicas importantes para as duas espécies.

Comparando as dimensões de estruturas entre os espécimes coletados com o intervalo de valores descrito por Taylor (1989) para ambas as espécies (Quadro 5) é possível observar que a amplitude de variação morfológica encontrada nas amostras da Chapada dos Guimarães (MT) foi maior à descrita por Taylor (1989), assim como a sobreposição de intervalos de valores para as duas espécies.

Considerando os tamanhos descritos por Taylor (1989), *Utricularia pusilla* teria flores menores (Quadro 5; Figura 15) comparada à *Utricularia nigrescens*, e o comprimento do cálcio em relação ao lábio inferior da corola menor, no entanto, existe grande variação nestes caracteres. Da mesma forma, os valores de comprimento e largura das folhas e utrículos apresentaram sobreposição, assim como a razão comprimento/ largura destes órgãos, que não diferiram estatisticamente na análise de variância. No entanto, o diâmetro do estolão, apesar de também apresentar sobreposição de medidas, diferiu significativamente entre as duas espécies (Quadro 6).

<b>Caráter</b>	<b><i>Utricularia nigrescens</i></b>	<b><i>Utricularia pusilla</i></b>
Flor	Cálcar duas vezes maior que o comprimento do lábio inferior da corola.	Cálcar duas vezes maior que o comprimento do lábio inferior; cálice desigual, sépala inferior com ápice obtuso e maior que a sépala superior
Ciclo de vida	Provavelmente anual	Anual
Folhas	Aproximadamente linear às vezes ramificada (irregularmente pinada), com pecíolo curto ou indiferenciado da lâmina, ápice arredondado.	Peciolada e amplamente obovada
Estolão	Filiforme	Filiforme
Inflorescência	Ereta, solitária simples, às vezes ramificada	Ereta, solitária simples,
Escamas	Numerosas, ovada a elíptica, com ápice agudo e base arredondada	Amplamente ovada, ápice superior agudo e inferior truncado.
Flores por inflorescência	2-6	2-15
Cálice	Desigual	Desigual
Corola	Lábio superior ovado a oblongo; palato reniforme, lábio inferior rômbo com ápice 3-lobado; cálcar subulado com ápice agudo.	Lábio superior ovado a; palato reniforme, lábio inferior rômbo com ápice 3-lobado; cálcar subulado com ápice agudo.

Quadro 5. Comparativo entre características morfológicas de *Utricularia nigrescens* e *Utricularia pusilla*. Fonte: Taylor (1989)

Caráter	<i>Utricularia nigrescens</i>		<i>Utricularia pusilla</i>	
	Descrição*	Observado	Descrição*	Observado
Diâmetro do estolão	0,2	0,1-0,4	0,1-0,15	0,11-0,34
Cp. Folha	10	2,12-14,51	4-10	2-10,39
Lg. Folha	0,2-1	0,25-1,6	0,5-2	0,36-1,54
Cp. Utrículo	3-5	3,7-13,1	4-8	4,6-12,1
Cp. Inflorescência	50-200	50-185	30-200	22-110
Lg. Inflorescência	0,5	0,23-0,79	0,25-0,5	0,19-0,4
Brácteas	0,7-1,2	-	1	0,79-1,66
Corola	10-17	6,6-12,63	5-8	-

Quadro 6. Dimensões descritas versus observadas de características morfológicas de *Utricularia nigrescens* e *Utricularia pusilla*. \*Fonte: Taylor (1989)

Caráter (mm)	<i>Utricularia nigrescens</i>	<i>Utricularia pusilla</i>	ANOVA
Diâmetro do estolão	0.19879mm ± 0.05336	0.21146 ± 0.086620	P < 0,05

Quadro 7. Médias, desvios-padrão e significância do diâmetro do estolão entre *Utricularia nigrescens* e *Utricularia pusilla*.

A razão entre comprimento/ largura de algumas estruturas vegetativas (folhas, estolões e utrículos) foram medidas apresentadas em gráficos de dispersão e *box-plot* (Gráfico 5), mas, não permitiram a identificação de agrupamentos ou classes de medidas coerentes entre as duas espécies – *Utricularia nigrescens* e *Utricularia pusilla*.

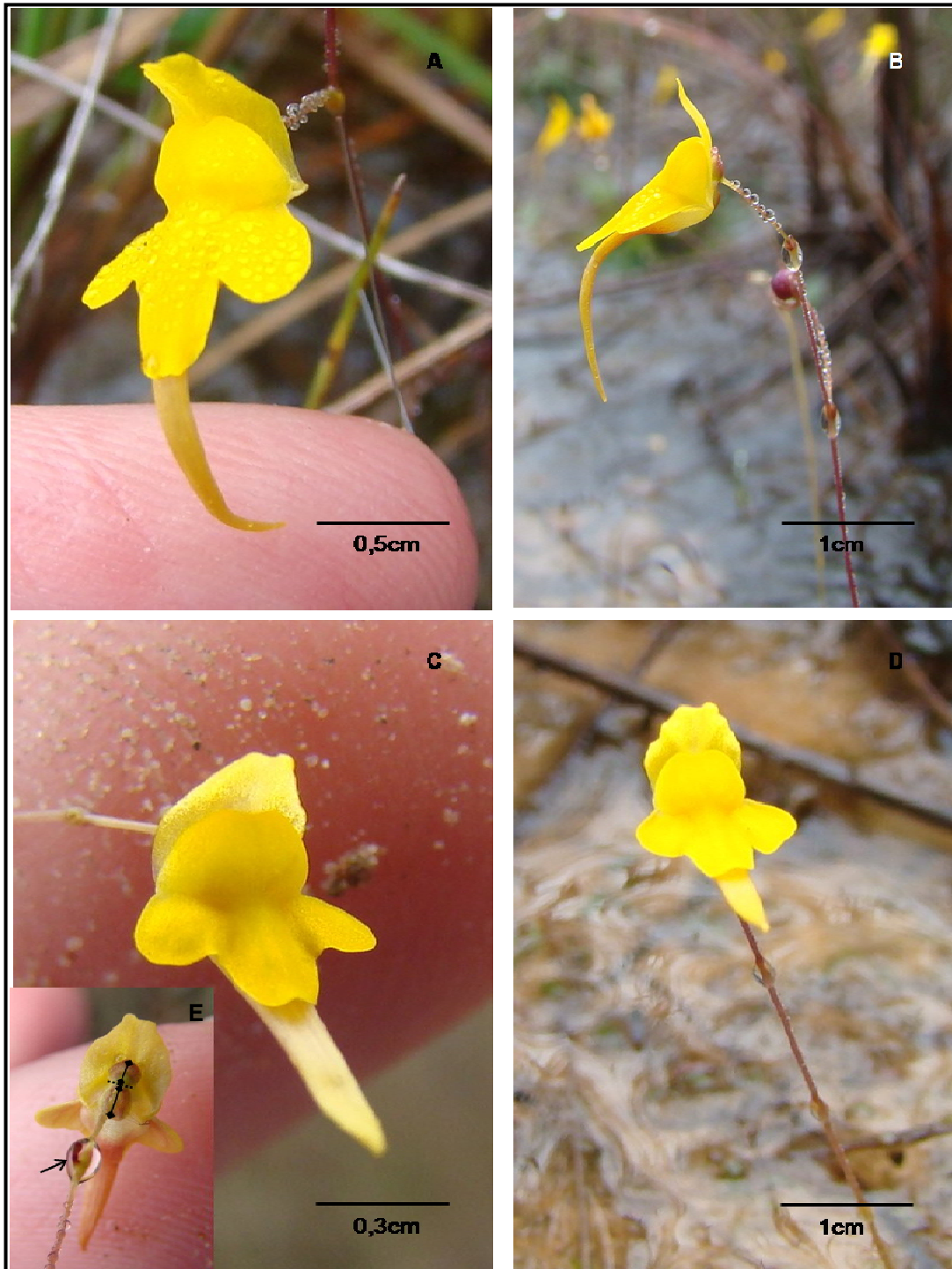


Figura 15. Flores de *Utricularia nigrescens* e *Utricularia pusilla*. A e B: Detalhes da flor de *Utricularia nigrescens*; C, D e E: Detalhes da flor de *Utricularia pusilla*; em D, esta indica botão floral abortado e tamanho desigual das sépalas, dois caracteres diagnósticos para esta espécie.

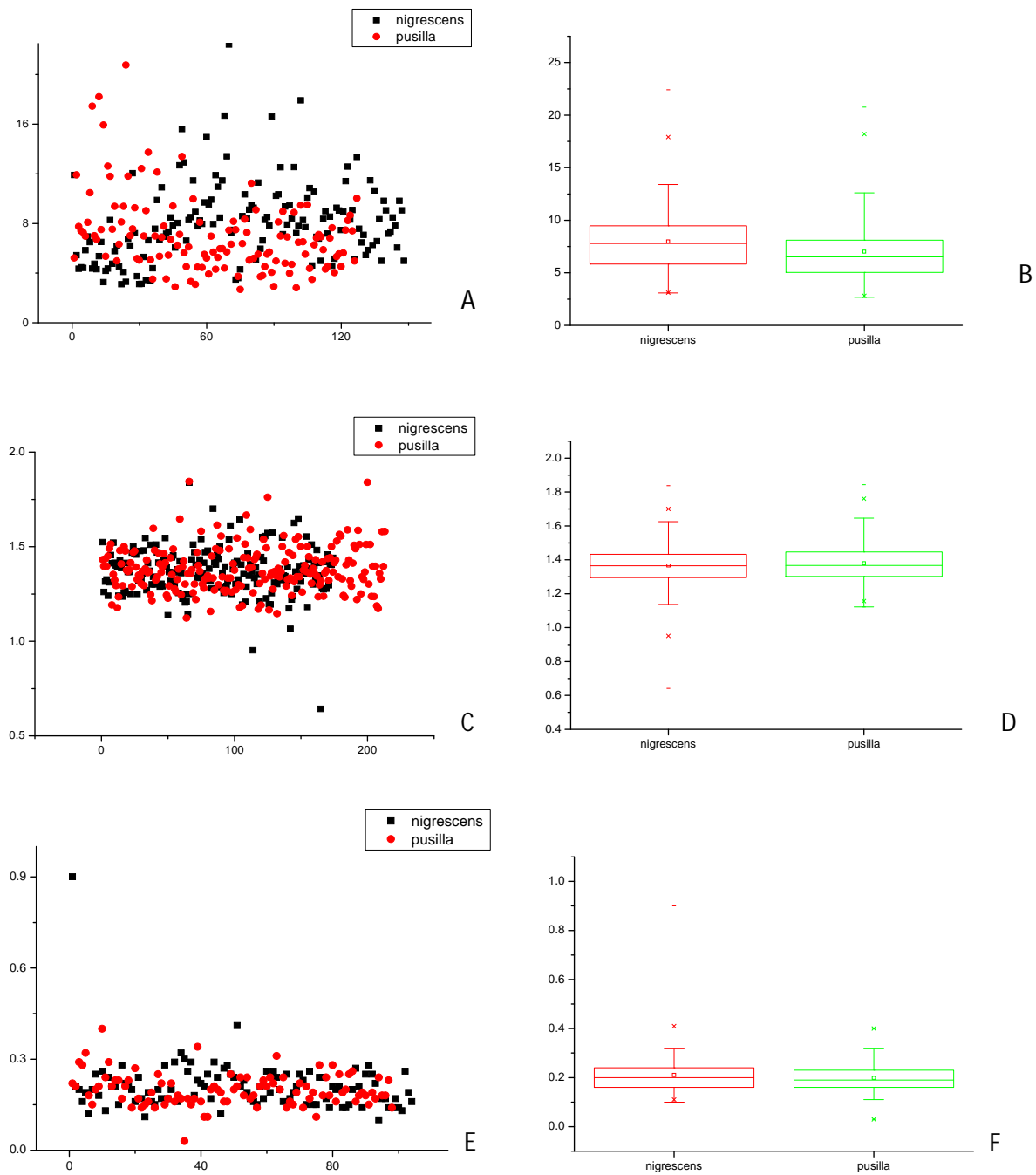


Gráfico 5. Diagramas de dispersão e *box-plot* da razão comprimento/ largura (C/L) de folha, utrículo e diâmetro do estolão de *Utricularia nigrescens* e *Utricularia pusilla*. A, C e E: gráficos de dispersão da razão entre comprimento/ largura de folha, utrículo e diâmetro do estolão, respectivamente. B, D e F: Gráficos *box-plot* da razão entre comprimento/ largura de folha, utrículo e diâmetro do estolão, respectivamente.

Os caracteres medidos foram subdivididos entre reprodutivos e vegetativos para a análise de agrupamentos (UPGMA com Distância Euclidiana). Embora os caracteres reprodutivos não tenham sido estatisticamente diferentes entre as duas espécies, eles formaram três agrupamentos: um com somente *Utricularia nigrescens*; um grupo com predominância de indivíduos de *U. nigrescens* e outro grupo misto entre *U. nigrescens* e *U. pusilla* (Figura 16). Dentre os caracteres vegetativos, conforme discutido anteriormente, apenas o diâmetro do estolão diferiu significativamente entre as duas espécies. No entanto, a análise de agrupamento não distinguiu grupos ou morfotipos coerentes com a separação entre duas espécies (Figura 17).

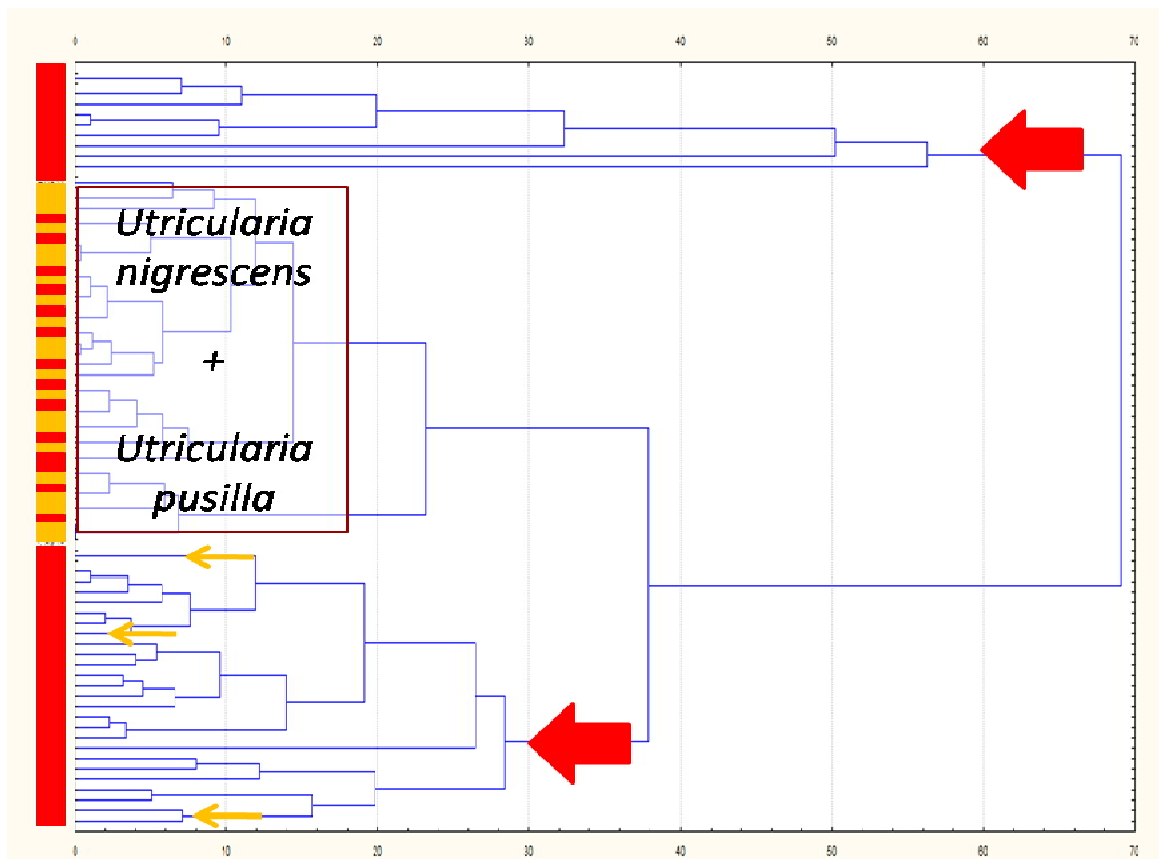


Figura 16. Fenograma baseado em 5 caracteres reprodutivos de *Utricularia nigrescens* (N=48) e *Utricularia pusilla* (N=27). As cores vermelho e amarelo referem-se, respectivamente, à *Utricularia nigrescens* e *Utricularia pusilla*. As setas indicam agrupamentos de cada espécie (identificada pela cor).

Considerando a alta amostragem destes caracteres e a importância dada por Taylor (1989) ao comprimento e largura foliar, além do caráter discreto de ausência ou presença de botão floral abortado, para a distinção entre estas espécies, podemos inferir que: os caracteres utilizados para a identificação dos espécimes (presença ou ausência de botão floral abortado) amostrados são incapazes de separar eficientemente *Utricularia nigrescens* e *Utricularia pusilla*, isso indica que a circunscrição destas espécies está mal resolvida.

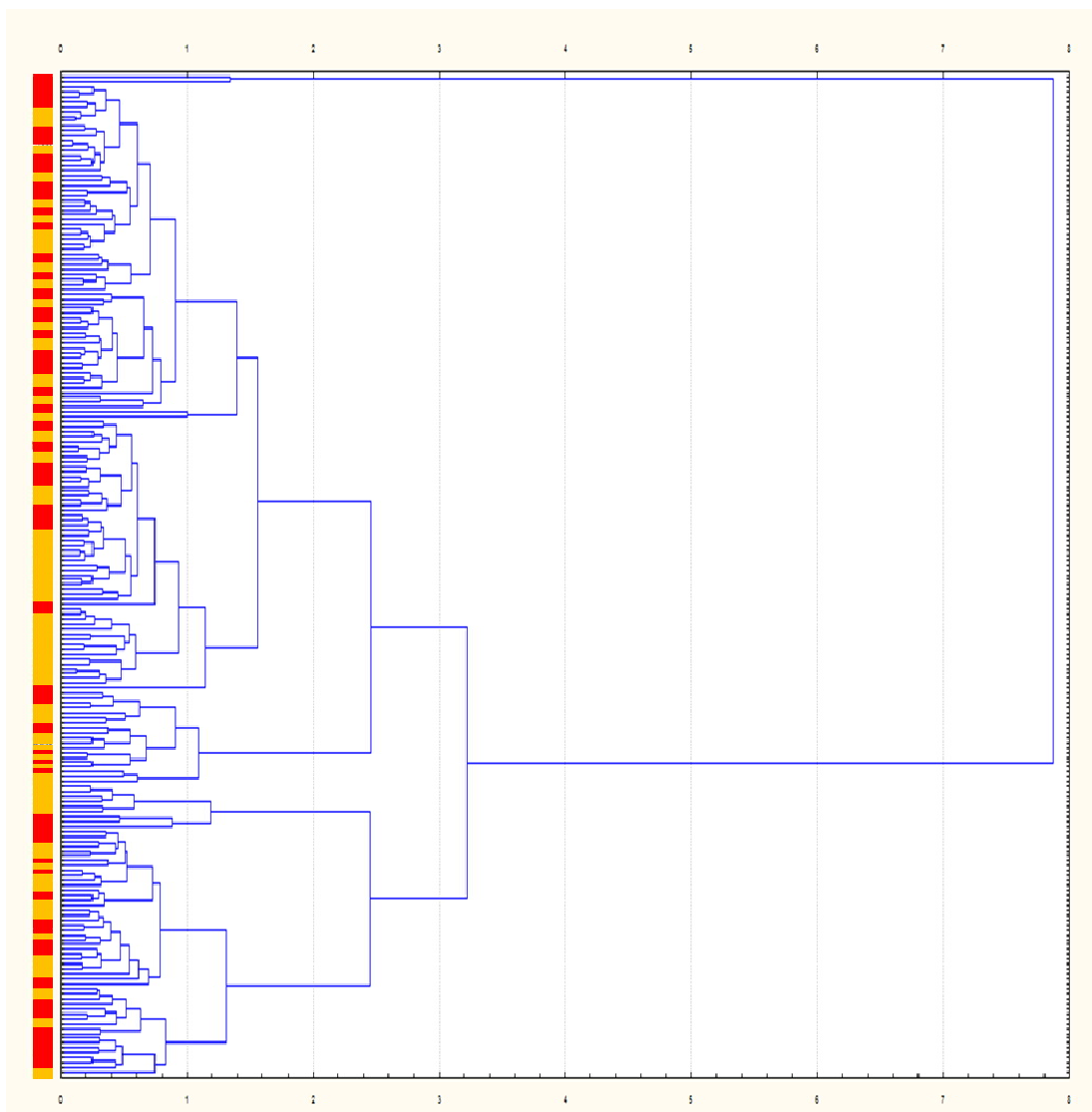


Figura 17. Fenograma baseado em 6 caracteres vegetativos de *Utricularia nigrescens* (N=104) e *Utricularia pusilla* (N=99). As cores vermelho e amarelo referem-se, respectivamente, à *Utricularia nigrescens* e *Utricularia pusilla*.

Contudo, o histórico de conflitos taxonômicos com as espécies da parafilética seção *Setiscapella*, especialmente entre *Utricularia nigrescens* e *Utricularia pusilla*, além da frequência com que materiais em herbários são identificados erroneamente, sugerem a necessidade de estudos mais abrangentes para um tratamento taxonômico adequado, com a revisão da circunscrição específica.

#### 4.2 ESTRUTURA E DIVERSIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *Utricularia longifolia* Gardner.

Na tabela 10 estão descritas as localidades de origem das amostras de *Utricularia longifolia* utilizadas, o *status* de ameaça nas localidades de coleta, bem como as sequências de cpDNA e rDNA obtidas.

Tabela 10. Caracterização das localidades de origem e seqüências obtidas de *Utricularia longifolia* Gardner (Lentibulariaceae).

Localidade	Coordenadas (long., lat.)	Classificação local de ameaça	ITS1	ITS2	<i>rp120- rps12</i>
Angra dos Reis , RJ (AG)	-44.485278, -23.011389	Não-ameaçada	12	8	15
Bananal , SP (BN)	-44.377778, -22.798611	Em Perigo*	3	6	12
Rio de Janeiro, Floresta da Tijuca, RJ (TJ)	-43.229167, -22.958611	Criticamente Ameaçada**	1	4	10
Total			<b>16</b>	<b>18</b>	<b>37</b>

\*Fonte: Lista de Espécies Vegetais Ameaçadas do Estado de São Paulo (MAMEDE *et al.*, 2007);

\*\*Secretaria Municipal de Meio Ambiente do Rio de Janeiro & Parque Nacional da Floresta da Tijuca.



#### 4.2.1 Variabilidade genética em *Utricularia longifolia* Gardner.

As sequências de ITS1 (rDNA) apresentaram 9 sítios variáveis em 417pb e 6 haplótipos identificados (tabela 11); as sequências alinhadas de ITS2 (rDNA; tabela 12) obtidas apresentaram 13 sítios variáveis e 6 haplótipos; e, finalmente, *rpl20-rps12* (cpDNA; tabela 13) apresentaram 27 sítios variáveis em 751pb de comprimento, que permitiram a identificação de 9 haplótipos.

Tabela 11 Haplótipos de rDNA (espaçador ITS1) obtido a partir de 16 indivíduos de *Utricularia longifolia*.

	Posição dos nucleotídeos									Frequência observada	Localidade
	16	98	190	201	219	251	268	272	273		
Hap1	A	T	C	C	T	A	G	C	G	1	AG
Hap2	*	*	*	G	*	*	*	*	*	11	AG+BN
Hap3	*	*	*	G	*	*	*	T	T	1	AG
Hap4	C	*	*	G	*	*	*	*	*	1	AG
Hap5	*	A	*	G	*	T	T	*	*	1	BN
Hap6	C	*	A	G	G	*	*	*	*	1	TJ

(\*) indica bases que não sofreram mutação em relação ao haplótipo 1. AG, BN e TJ se referem, respectivamente, aos municípios de Angra dos Reis (RJ), Bananal (SP) e Rio de Janeiro (RJ).

Tabela 12. Haplótipos de rDNA (espaçador ITS2) obtido de 18 indivíduos de *Utricularia longifolia*.

	Posição dos nucleotídeos												Frequência observada	Localidade	
	15	16	96	111	202	204	284	295	298	299	303	314			321
Hap1	G	A	G	G	T	G	C	C	G	C	T	G	C	1	AG
Hap2	*	*	*	*	*	*	*	T	*	*	*	*	*	9	AG+BN
Hap3	A	G	*	*	*	*	*	T	*	*	*	*	*	1	AG
Hap4	*	*	*	T	*	*	*	T	*	*	*	*	*	1	AG
Hap5	*	*	*	*	*	*	*	T	*	*	*	*	A	1	AG
Hap6	*	C	*	C	C	*	*	T	A	T	C	A	*	1	BN
Hap7	*	*	*	*	*	*	T	T	*	*	*	*	*	4	TJ

(\*) indica bases que não sofreram mutação em relação ao haplótipo 1. AG, BN e TJ se referem, respectivamente, aos municípios de Angra dos Reis (RJ), Bananal (SP) e Rio de Janeiro (RJ).

Tabela 13. Haplótipos de cpDNA (rpl20-rps12) obtido a partir de 37 indivíduos de *Utricularia longifolia*.

	Posição dos nucleotídeos																					Frequência observada	Localidade						
	1	4	6	7	8	17	39	47	238	320	321	322	348	360	400	404	428	453	470	531	534			535	536	537	538	543	687
Hap1	T	T	G	T	C	A	T	T	G	A	G	C	A	A	A	T	A	T	T	C	T	T	T	T	T	A	A	9	TJ
Hap2	*	*	*	*	*	*	*	C	T	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*	A	*	*	*	*	A	*	*	21	AG+BN+TJ
Hap3	C	G	A	*	*	C	*	C	T	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*	A	*	*	*	*	A	*	*	1	BN
Hap4	*	*	*	G	T	*	*	C	T	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*	A	*	*	*	*	A	*	G	1	AG
Hap5	*	*	*	G	T	*	*	C	T	*	*	*	*	G	G	*	*	*	*	A	*	*	*	*	A	*	G	1	AG
Hap6	*	*	*	*	*	*	*	C	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	1	AG
Hap7	*	*	*	*	*	*	*	C	T	*	*	*	G	*	G	*	*	*	*	A	*	*	*	*	A	*	*	1	AG
Hap8	*	*	*	*	*	*	C	C	T	G	A	G	*	*	G	C	G	G	*	A	A	A	A	A	A	G	*	1	AG
Hap9	*	*	*	*	*	*	*	C	T	*	*	*	G	*	G	C	*	*	G	A	*	*	*	*	A	*	*	1	AG

(\*) indica bases que não sofreram mutação em relação ao haplótipo 1. AG, BN e TJ se referem, respectivamente à Angra dos Reis (RJ), Bananal (SP) e Rio de Janeiro (RJ).

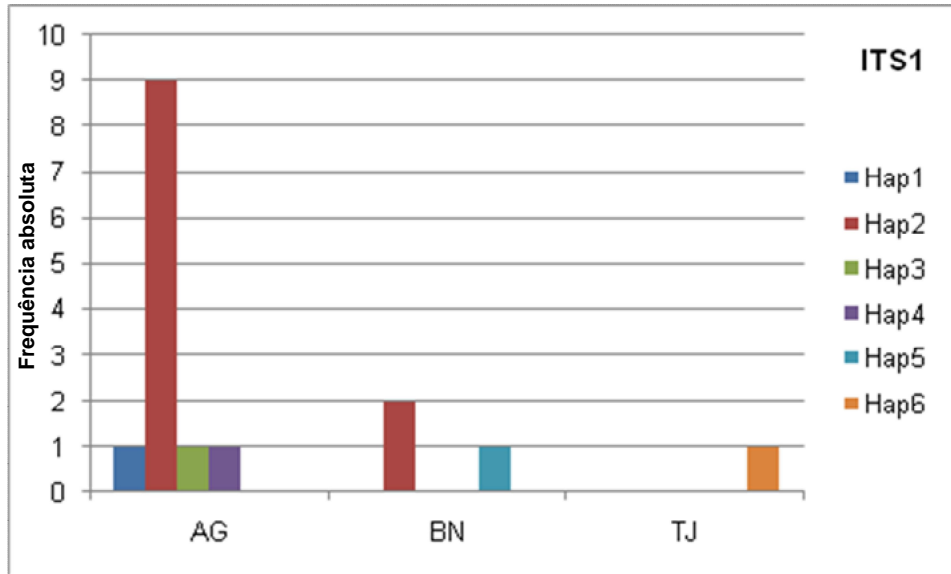


Gráfico 6. Frequência dos haplótipos identificados para ITS1 (rDNA) em amostras de *Utricularia longifolia* obtidas de três localidades: Angra dos Reis (AG; RJ), Bananal (BN; SP) e Rio de Janeiro (Floresta da Tijuca, TJ; RJ).

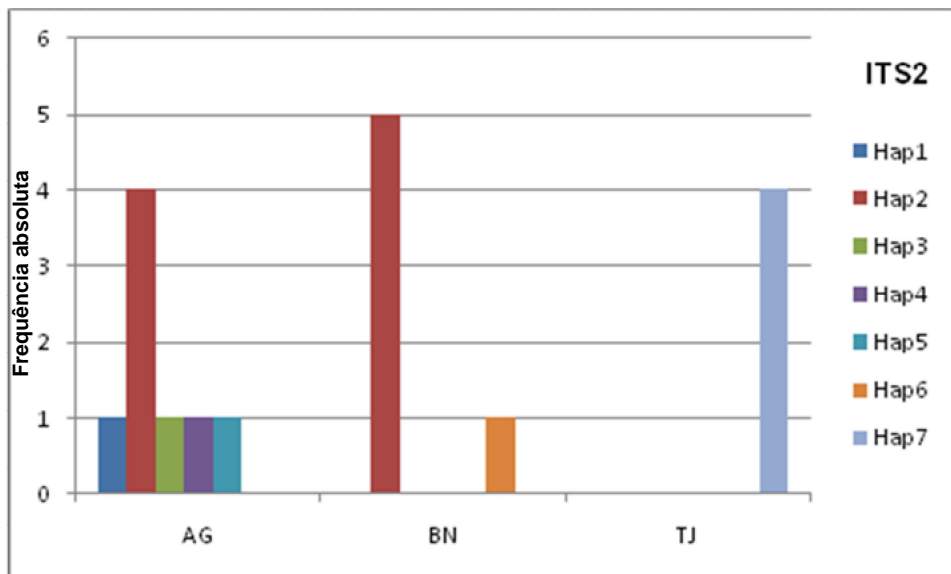


Gráfico 7. Frequência dos haplótipos identificados para ITS2 (rDNA) em amostras de *Utricularia longifolia* obtidas de três localidades: Angra dos Reis (AG; RJ), Bananal (BN; SP) e Rio de Janeiro (Floresta da Tijuca, TJ; RJ).

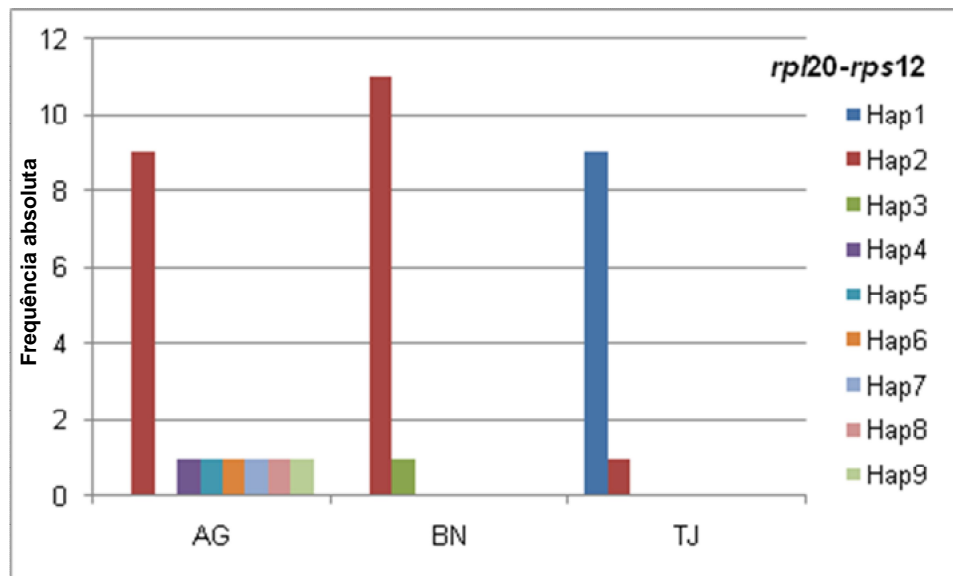


Gráfico 8. Frequência dos haplótipos identificados para *rpl20-rps12* (cpDNA) em amostras de *Utricularia longifolia* obtidas de três localidades: Angra dos Reis (AG; RJ), Bananal (BN; SP) e Rio de Janeiro (Floresta da Tijuca, TJ; RJ).

Tabela 14. Diversidade haplotípica e testes de neutralidade para cada população e região do nDNA e cpDNA utilizados.

	N	Hap	Hd	$\pi$	k	Fu & Li D	Fu & Li F	Tajima D
<b>ITS1</b>								
AG	12	5	0,727 ± 0,012	0,0046 ± 0,0012	1,212	-1,531	-1,577	-0,987
BN	3	2	#	0,0101 ± 0,0048	#	#	#	#
TJ	1	1	#	Zero	#	#	#	#
Total	16	6	0,542 ± 0,021		1,233	<b>-2,451*</b>	<b>-2,675*</b>	<b>-2,002*</b>
<b>ITS2</b>								
AG	8	5	0,768 ± 0,023	0,0039 ± 0,0012	1,250	-1,735	-1,876	-1,595
BN	6	2	0,333 ± 0,046	0,0075 ± 0,0048	2,333	-1,424	-1,520	-1,390
TJ	4	1	#	Zero	#	#	#	#
Total	18	7	0,725 ± 0,009		1,699	<b>-2,957**</b>	<b>-3,122**</b>	<b>-2,053*</b>
<b>rpl20-rps12</b>								
AG	15	7	0,657 ± 0,019	0,0049 ± 0,0019	3,505	-2,116	-2,394	<b>-1,989*</b>
BN	12	2	0,167 ± 0,018	0,0009 ± 0,0007	0,667	-2,113	-2,285	-1,747
TJ	10	2	0,200 ± 0,023	0,0014 ± 0,0011	1,000	-2,010	-2,179	<b>-1,741*</b>
Total	37	9	0,631 ± 0,005		3,444	<b>-2,715*</b>	<b>-2,775*</b>	-1,615

AG: Angra dos Reis; BN: Bananal; TJ: Rio de Janeiro; n: quantidade de sequências obtidas; Hap: quantidade de haplótipos identificados; Hd: diversidade haplotípica;  $\pi$ : diversidade nucleotídica; k: diferença entre pares de nucleotídeos; # valores não calculados por N inferior ao necessário; \* índices com P<0,05; \*\* índices com P<0,02.

Angra dos Reis (RJ) apresentou maior riqueza e diversidade haplotípica para as todas as regiões estudadas (rDNA e cpDNA), porém, também foi melhor representada (maior  $N$ ) dentre as sequências obtidas (Tabela 14). Por outro lado, Rio de Janeiro (RJ) não compartilhou haplótipos de ITS1 e ITS2 com as demais localidades, apenas haplótipos de cloroplasto (Gráficos 6, 7 e 8). Além disso, nas localidades onde *Utricularia longifolia* apresenta-se classificada sob algum nível de ameaça (Bananal e Rio de Janeiro) foi encontrada baixa diversidade haplotípica (Tabela 14), assim como os valores de  $D$  de Tajima significativamente negativos obtidos para as sequências de cloroplasto de Angra dos Reis e Rio de Janeiro sugerem redução drástica de tamanho seguida de expansão populacional recente (efeito gargalo).

Collevati *et al* (2003) encontraram 22 haplótipos de microssatélites de cpDNA e 12 haplótipos identificados a partir de sequências não-codificadoras do cpDNA; em ambos os casos foram estudadas 10 populações de *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae), apresentando também haplótipos exclusivos entre todas as populações. Zhang *et al.* (2005) encontraram 6 haplótipos de cpDNA a partir de dois espaçadores (*trnT-trnF* e *trnS-trnG*) distribuídos em 20 populações de *Juniperus przewalkii* (Cupressaceae), sendo que destas, 12 populações apresentaram um único haplótipo, porém, não-exclusivo. A variação intraespecífica do cpDNA também foi testada em *Draba aizoides* (Brassicaceae; WIDMER & BALTISBERGER, 1999) e identificados 9 haplótipos para a referida espécie.

Quanto à diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) para as sequências de ITS1 e ITS2, Bananal apresentou valores maiores comparado à Angra dos Reis, enquanto as amostras do Rio de Janeiro não apresentaram variação nucleotídica; para as sequências de cloroplasto, Angra dos Reis apresentou tanto maior diversidade haplotípica ( $H_d$ ) quanto nucleotídica ( $\pi$ ). A relação entre baixa diversidade haplotípica e alta diversidade nucleotídica observada para as sequências de ITS2 provenientes de Bananal pode sugerir um evento de *bottleneck* ancestral, assim como em Angra dos Reis a alta diversidade haplotípica associada à alta diversidade nucleotídica em todas as sequências utilizadas pode sugerir população estável.

Diversidade nucleotídica semelhantemente baixa foi encontrada em Cactaceae (*Pilisocereus* spp.), com identificação de apenas três haplótipos de cpDNA (*trnH-psbA*, *trnL-trnT* e *trnS-trnG*) a partir de 10 indivíduos amostrados por

local de coleta, em três localidades (BONATELLI & MORAES, 2009). Para a região ITS em espécies herbáceas de Passifloraceae (LORENZ-LEMKE *et al.*, 2006) foram obtidos valores semelhantes (Hd: 0,735-0,805;  $\pi$ : 0,0036-0,0044) aos encontrados, neste trabalho, para *Utricularia longifolia* em Angra dos Reis (Tabela 14).

Não existem outras estimativas de diversidade nucleotídica ou haplotípica para a família Lentibulariaceae, no entanto, com o emprego da técnica de ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) entre 10 espécies de *Utricularia* (RAHMAN & KONDO, 2003) o maior número de fragmentos foi detectado para *Utricularia longifolia* sugerindo que esta espécie apresenta alta variação ou diferenciação genética comparado às demais espécies investigadas. No entanto, os valores de diversidade genética não são apresentados tanto neste quanto em outro trabalho que empregou RAPD para estudar espécies de *Utricularia* (RAHMAN, 2006), porque ambos visavam à identificação das espécies e suas relações filogenéticas.

Considerando a baixa taxa evolutiva característica do cpDNA (HAYWORTH *et al.*, 1998; SCHAAL *et al.*, 1998; BEHEREGARAY, 2008; AVISE, 2009), assim como a quantidade de haplótipos encontrados para outras espécies a partir do cpDNA é possível afirmar que 9 haplótipos de cpDNA se enquadram nos valores esperados para o tipo de sequência empregada. Da mesma forma, a variação encontrada na região ITS pode ter sido limitada por processos de evolução em concerto (BALDWIN *et al.*, 1995; HERSHKOVITZ & ZIMMER, 1996; ÁLVAREZ & WENDEL, 2003; PARRA-O *et al.*, 2007) que minimizam a variação nucleotídica nas sequências. Apesar disso, a diversidade encontrada também correspondeu ao encontrado entre outras angiospermas.

Contudo, é preciso considerar também o impacto da reprodução predominantemente vegetativa sobre a diversidade genética de *Utricularia*. Espécies vegetais que se utilizam de mecanismos de reprodução clonal apresentam características que podem interferir na dinâmica populacional – como a capacidade de fragmentação dos indivíduos e a distribuição espacial dos clones no ambiente – assim como na genética através da diminuição da diversidade genética, presença de mutações somáticas e persistência de um *genet* através do tempo (SÁNCHEZ, 2007).

Como exemplo disso, *Thalassia testudinum* (Hydrocharitaceae) uma angiosperma marinha que ocorre na costa do México (DIJK & TUSSENBROEK,

2009) e *Elliotia racemosa* (Ericaceae), um arbusto endêmico da Georgia (EUA; GODT & HAMRICK, 1999), ambos apresentaram baixíssima diversidade genética nos referidos estudos populacionais, coerente com a predominância da reprodução vegetativa nestas espécies. A persistência dos *genets* através do tempo é outra característica marcante em espécies clonais que pode afetar drasticamente a dinâmica populacional em casos extremos como em *Thalassia testudinum* (DIJK & TUSSENBROEK, 2009) que a idade de um *genet* foi estimada em 290-595 anos ou em *Larrea tridentata* (Zygophyllaceae; VASEK, 1980 *apud* SÁNCHEZ, 2007) com estimativas de 10.000 anos de idade.

Em *Utricularia australis*, com emprego de AFLP, foram encontraram 36 genótipos em 30 populações amostradas no Japão (1,2 genótipos em média por população estudada) indicando populações altamente clonais e ausência de evidências de mutações somáticas (KAMEYAMA & OHARA, 2006). O mesmo ocorreu na população do Rio de Janeiro para as sequências de ITS1 e ITS2: apenas um haplótipo foi identificado. Portanto, apesar da literatura não conter registros prévios de diversidade haplotípica para *Utricularia*, tanto a natureza das sequências utilizadas quanto o efeito da reprodução predominantemente clonal podem ter diminuído a diversidade genética nas populações investigadas.

#### 4.2.2 Estruturação populacional de *Utricularia longifolia* Gardner.

Uma análise bayesiana foi realizada para avaliar a diferenciação entre *K* populações ou *clusters*. Evanno *et al.* (2005) testou a capacidade do *Structure* 2.3.1. encontrar o *K* real entre diferentes tipos de marcadores moleculares (codominantes: microsatélites; e dominantes: AFLP) e sugere o uso de 5 *loci* de microsatélites ou 100 *loci* de AFLP, sendo que o uso de metade destes dados (50 *loci* de AFLP) garantiriam resultados próximos ao real. Para a análise das sequências de *Utricularia longifolia* os dados foram transformados em matriz numérica e tratados como marcador dominante. A quantidade de sítios polimórficos variou entre as regiões estudadas, sendo maior no cpDNA (ITS1: 9 sítios; ITS2: 13 sítios; e *rpl20-rps12*: 27 sítios), no entanto, não atingiram, independentemente, o número mínimo

indicado por Evanno *et al.* (2005) e por este motivo do foram agrupados em uma única matriz com 49 *loci* dominantes, polimórficos e independentes.

A matriz foi construída a partir dos polimorfismos observados nas três regiões estudadas (ITS1, ITS2 e *rpl20-rps12*) convertendo as sequências em uma matriz numérica (A=1, T=2, C=3, G=4 e N=-9). Todos os indivíduos foram incluídos na matriz, e na ausência de dados de qualquer das três regiões estudadas para um mesmo indivíduo o *loci* foi codificado como informação ausente (N=-9). A análise foi empregada utilizando *admixture* como modelo de ancestralidade, além de assumir cada posição nucleotídica com *locus* e frequência de alelos independentes entre as populações. Foram realizadas 20 réplicas para cada *K* e testados de dois a 7 agrupamentos. A média dos valores de  $L(K)$ , que é a probabilidade estimada para cada *cluster*, assim como o delta *K* ( $\Delta K$ ; Gráfico 9; EVANNO *et al.*, 2005) foram calculadas para cada *cluster*.

A determinação do número mais provável de populações, a partir dos resultados desta análise, pode ser feita através de dois métodos: selecionando o *K* com maior probabilidade média (maior valor médio de  $L(K)$ ) entre todos os agrupamentos e réplicas testados; ou selecionando o maior  $\Delta K$ , sendo que  $\Delta K = m(|L''(K)|)/s[L(K)]$  e os valores de  $L''(K)$  obtidos por meio do procedimento descrito pelos autores (EVANNO *et al.*, 2005). Para *Utricularia longifolia* os métodos divergiram quanto ao *K* ideal, uma vez que  $\Delta K$  indicou *K*=2, mas a maior média de  $L(K)$  foi encontrada em *K*=3 (Gráfico 9).

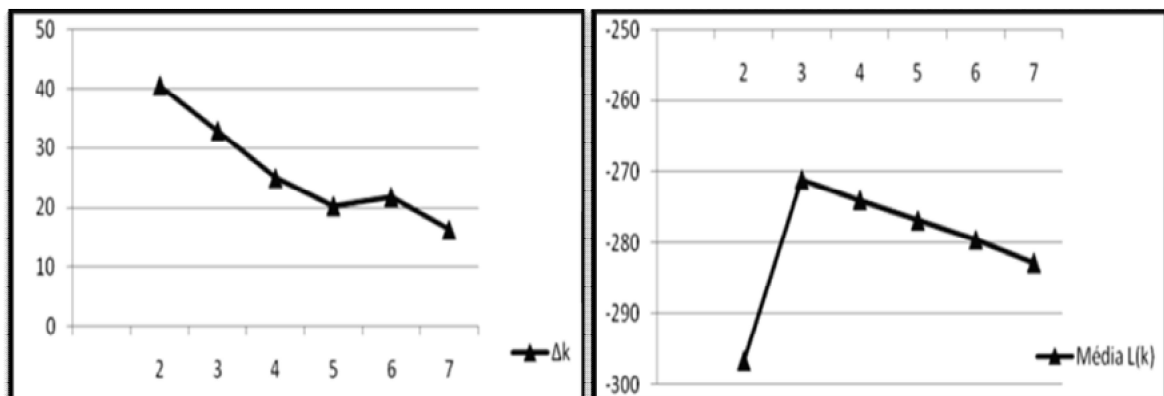


Gráfico 9. Probabilidade média de cada *k* calculada pelo programa Structure 2.3.1. (PRITCHARD *et al.*, 2000) e  $\Delta k$  (EVANNO *et al.* 2005) baseados em 20 réplicas/ *K* e testadas de 2 a 7 populações. Os polimorfismos encontrados entre as três regiões estudadas (ITS1, ITS2 e *rpl20-rps12*) foram agrupados em uma única matriz com 49 *loci* polimórficos e dominantes.



Na figura 18 estão representados graficamente os resultados da estrutura populacional para  $K=2$  e  $K=3$ , obtidos pela análise combinada de três regiões de DNA (ITS1, ITS2 e *rpl20-rps12*) de *Utricularia longifolia*. A divisão vertical de cores, que representam os *clusters* testados, indica a diferenciação entre as localidades amostradas. Analisando a figura 18 é possível perceber que, mesmo para  $K=3$ , existe uma clara divisão entre a população do Rio de Janeiro (TJ) e as demais. Não existe na literatura um consenso de qual o método seja mais adequado para a seleção do valor de  $K$ , apesar do método proposto por Evanno *et al* (2005) ter apresentado resultados robustos em simulações, seus autores recomendam que não seja utilizado exclusivamente.

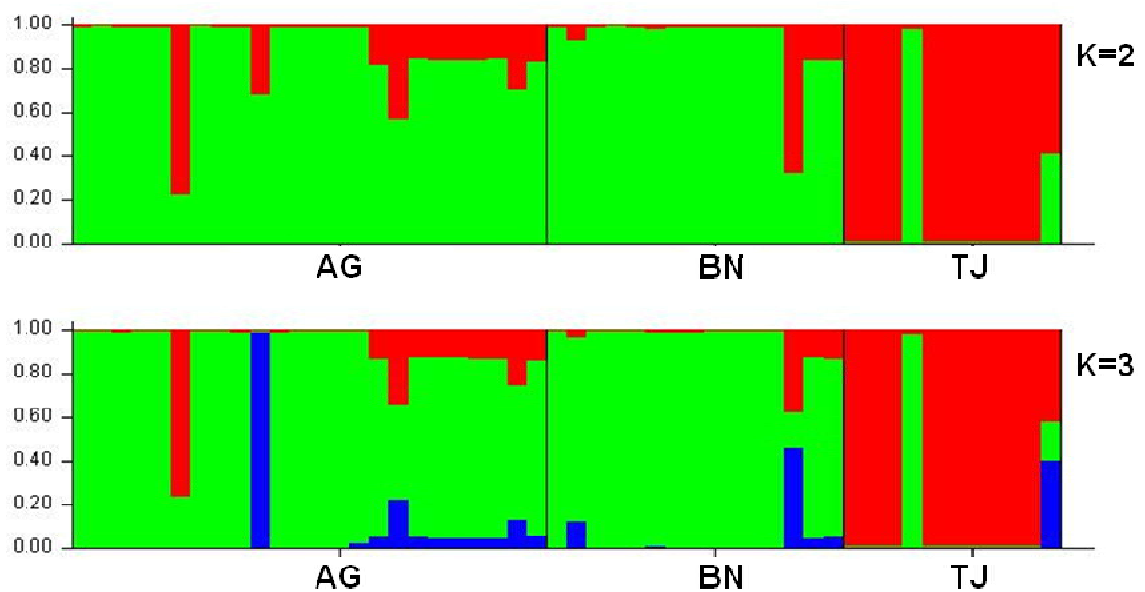


Figura 18. Representação gráfica dos resultados obtidos pela análise bayesiana combinada dos polimorfismos encontrados nas regiões ITS1, ITS2 e *rpl20-rps12* de indivíduos de *Utricularia longifolia* obtidos em três localidades (Angra dos Reis: AG; Bananal: BN; Rio de Janeiro: TJ).

#### 4.2.3 Análise filogeográfica de *Utricularia longifolia* Gardner

Eventos que resultam no crescimento ou declínio populacional, e podem produzir estruturação populacional, tendem a modificar a distribuição de pares de

indivíduos que diferem em um dado sítio (ROGERS & HARPENDING, 1992). Os padrões de “ondas” resultantes desta distribuição de diferenças (Gráfico 10) indicam desvios do esperado para populações em equilíbrio e permitem inferir sobre eventos populacionais. Esta distribuição de diferenças é utilizada para construção de *networks* ou redes de haplótipos (Figuras 19, 20 e 21) pelo método *Median-Joining*, empregando o critério de máxima-parcimônia para reduzir o comprimento dos ramos através da adição de haplótipos perdidos ou não-amostrados (BANDELT *et al*, 1999).

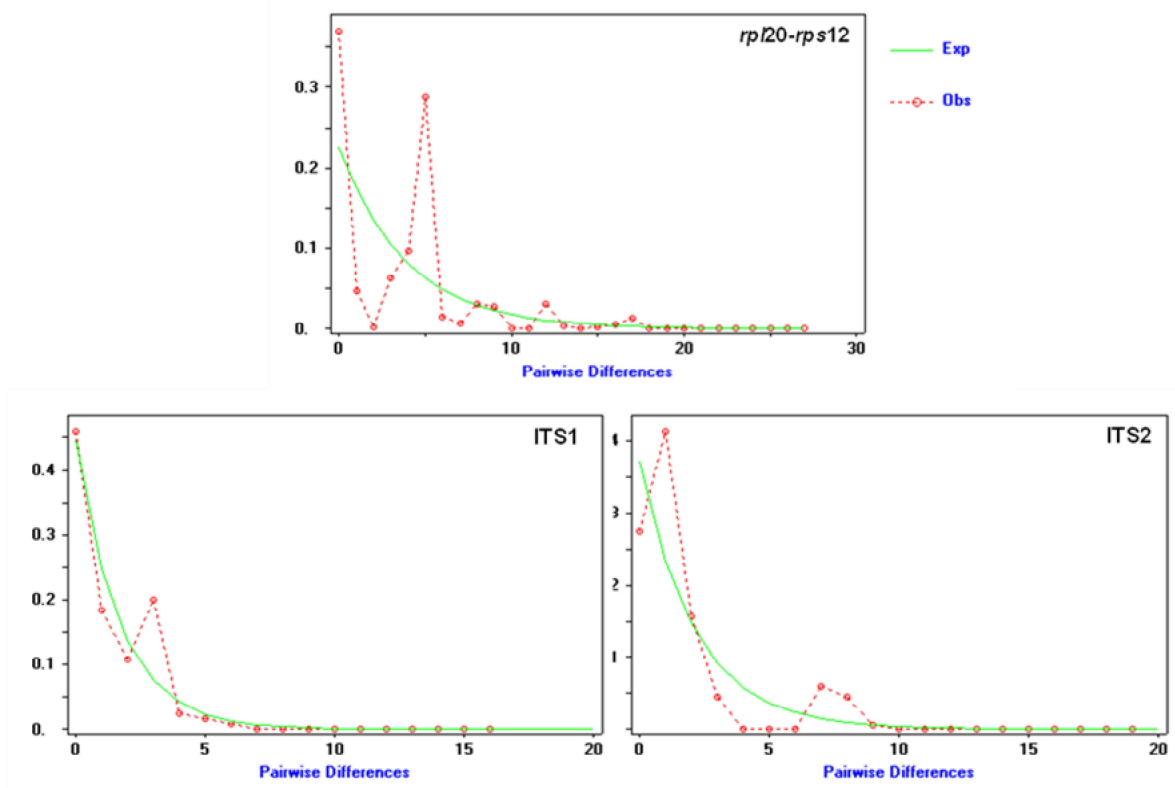


Gráfico 10. Distribuição de diferenças entre pares de nucleotídeos (*Mismatch distribution*) para as três regiões estudadas (*rp120-rps12*, ITS1 e ITS2). A linha verde indica a distribuição esperada; e a linha vermelha a distribuição observada. O desvio positivo e/ou negativo dos valores esperados são assinaturas genéticas de eventos populacionais como expansão ou retração, o que nos permite fazer inferências sobre eventos demográficos históricos.

As redes de haplótipos obtidas para as três regiões estudadas (ITS1, ITS2 e *rp120-rps12*; Figuras 19, 20 e 21 respectivamente) reconstroem um panorama histórico de eventos populacionais que podem alterar a estrutura genética e

frequência local dos haplótipos. Para essa perspectiva histórica, uma rede com topologia em “estrela” não permite muitas inferências sobre quais processos ocorreram, no entanto, sugere um evento de expansão populacional, sendo neste ponto congruente com a distribuição unimodal observada para as diferenças *pairwise* de ITS1, e bimodal em ITS2 (Gráfico 10; pontilhado vermelho).

Os haplótipos de *rpl20-rps12* apresentaram um padrão multimodal das diferenças *pairwise* (Gráfico 10) refletido na rede de haplótipos em ramos mais longos. No entanto, estudando isoladamente cada localidade, apenas Angra dos Reis apresenta um padrão multimodal para as diferenças *pairwise*, as demais localidades distribuem-se com padrão unimodal (dados não apresentados).

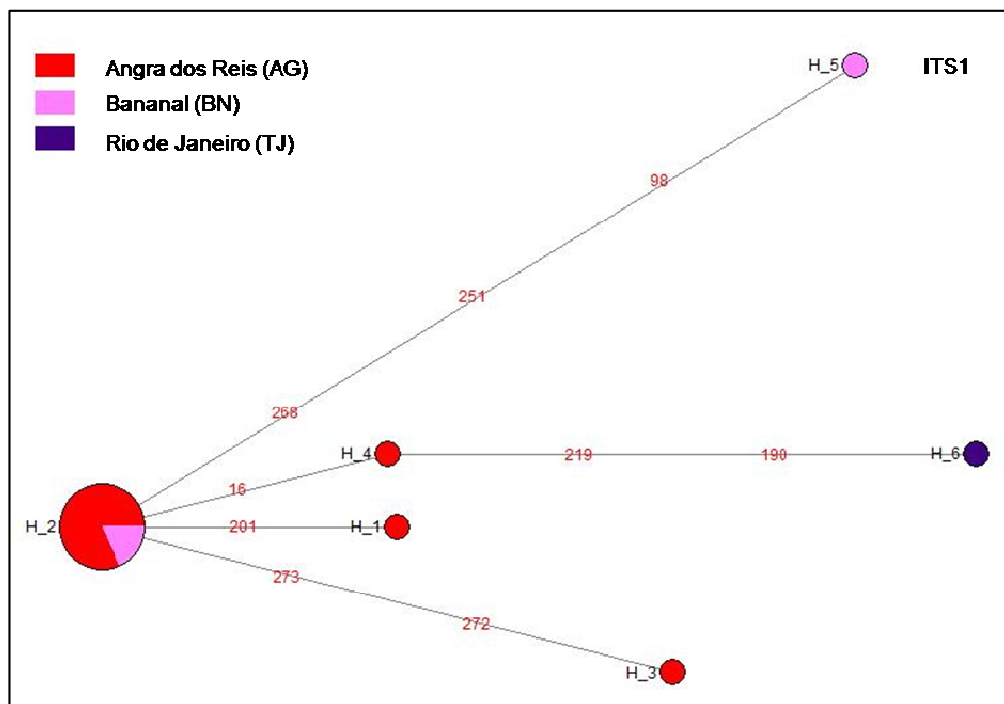


Figura 19. Rede de haplótipos do rDNA (ITS1; 6 haplótipos em 16 sequências) de *Utricularia longifolia* construída com o método *Median-Joining Network* ( $\epsilon=0$ ) e emprego do aplicativo *Network*. Os haplótipos estão representados por círculos com tamanho proporcional à frequência observada em cada localidade (conforme legenda); os valores sobre os ramos indicam os *loci* divergentes.

Dentre os 6 haplótipos identificados em ITS1, apenas um (H\_2; Figura 19) foi compartilhado entre Angra dos Reis e Bananal, sendo nestas localidades a linhagem mais frequente. As amostras coletadas no Rio de Janeiro pertencem a uma única

linhagem, mais derivada em relação ao haplótipo mais frequente nas outras duas populações investigadas.

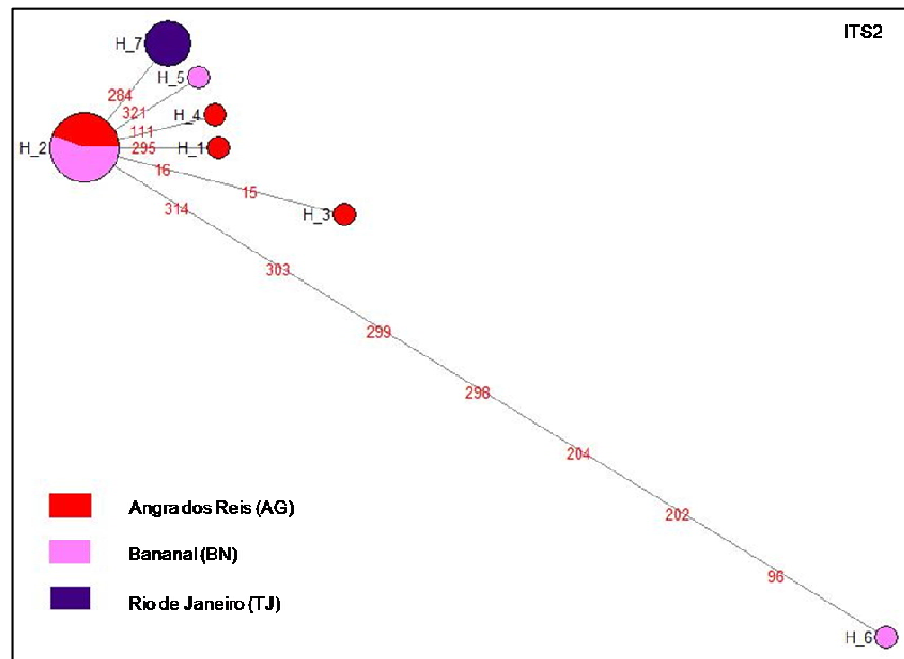


Figura 20. Rede de haplótipos do rDNA (ITS2; 7 haplótipos em 18 sequências) de *Utricularia longifolia* construída com o método *Median-Joining Network* ( $\epsilon=0$ ) e emprego do aplicativo *Network*. Os haplótipos estão representados por círculos com tamanho proporcional à frequência observada em cada localidade (conforme legenda); os valores sobre os ramos indicam os *loci* divergentes.

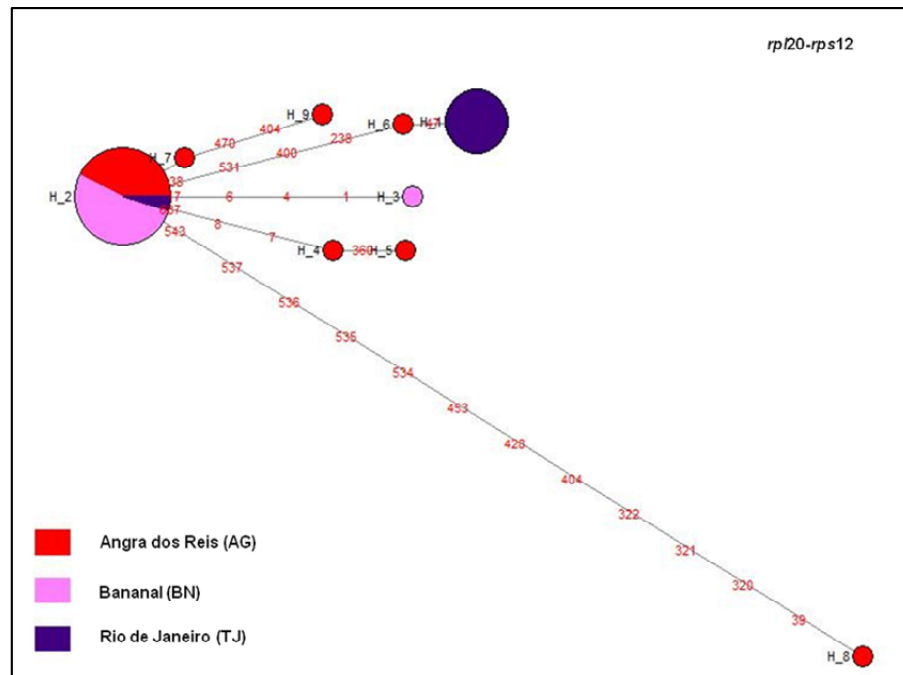


Figura 21. Rede de haplótipos do cpDNA (*rp120-rps12*; 9 haplótipos e 37 sequências) de *Utricularia longifolia* construída com o método *Median-Joining Network* ( $\epsilon=0$ ) e emprego do aplicativo *Network*. Os haplótipos estão representados por círculos com tamanho proporcional à frequência observada em cada localidade (conforme legenda); os valores sobre os ramos indicam os *loci* divergentes

Os haplótipos de ITS2 divergem da linhagem mais frequente (H\_2; Figura 20) por poucas mutações, a única exceção é o H\_6 exclusivo de Bananal. Assim como ITS1, os haplótipos mais frequentes de ITS2 são compartilhados apenas entre Angra dos Reis e Bananal, enquanto as linhagens raras, ou menos frequentes, se distribuem apenas localmente; Rio de Janeiro é constituído de uma única e exclusiva linhagem. Dentre os haplótipos de cpDNA (*rp120-rps12*) uma linhagem (H\_2; Figura 21) esteve presente em todas as populações estudadas, sendo pouco frequente apenas no Rio de Janeiro, onde uma linhagem endêmica (H\_1; Figura 21) é predominante. Além disso, um único haplótipo (H\_8; Figura 21), exclusivo de Angra dos Reis, acumulou muitas mutações em relação à linhagem mais frequente.

Embora as redes haplotípicas indiquem o isolamento da população do Rio de Janeiro em relação às demais, é preciso considerar algumas características inerentes aos dois genomas estudados (plastidial e nuclear vegetal) para uma adequada interpretação. Os espaçadores ITS1 e ITS2, embora não sejam transcritos, são responsáveis pela estrutura da família multigênica 18S-23S e podem estar sujeitos à mecanismos de evolução em concerto, que rapidamente eliminam

alterações quando surgem ou produzem homogeneização das cópias de ITS nas células vegetais (BALDWIN *et al.*, 1995; FELINER & ROSSELLÓ, 2006).

Como os haplótipos de ITS1 e ITS2 diferem entre si por poucas mutações, é possível que estes processos de evolução em concerto tenham eliminado a linhagem ancestral, compartilhada entre todas as populações, sendo mantida apenas a linhagem derivada (H\_6 para ITS1, Figura 19; e H\_7 para ITS2, Figura 20. Essa hipótese é corroborada pelo compartilhamento de haplótipos de cpDNA (*rpl20-rps12*; Figura 21) entre as três populações estudadas, uma vez que este genoma apresenta uma taxa evolutiva mais lenta em relação ao genoma nuclear (CHIES, 2003; AVISE, 2009). Sendo assim, a baixa frequência da linhagem H\_2 do cpDNA no Rio de Janeiro pode ser interpretada como vestigial, ou um cenário histórico anterior ao que os espaçadores ITS1 e ITS2 (Figuras 19 e 20) sugerem.

Além disso, a maior diversidade haplotípica e nucleotídica de *Utricularia longifolia* foi encontrada na população de Angra dos Reis, localizada fora de unidades de conservação à margem da movimentada rodovia BR-101, sendo esta também a maior população encontrada ( $\approx 2.000 \text{ m}^2$ ; Bananal  $\approx 7x$  menor e Rio de Janeiro  $\approx 10x$  menor). Esta alta diversidade genética de Angra dos Reis, que produziu tanto uma distribuição multimodal das diferenças *pairwise* assim como a topologia em “estrela” das redes de haplótipos, pode estar relacionada a um efeito de fundador relativamente recente ( $\approx 40$  anos; detalhes no Apêndice A). É possível datar aproximadamente o tempo máximo de fundação da população de Angra dos Reis porque a rocha onde ela se estabeleceu foi cortada para a construção da BR-101, criando um ambiente propício ao crescimento de *Utricularia longifolia* somente após a abertura da rodovia.

Desta forma, a hipótese de expansão populacional suportada pelos haplótipos identificados de ITS1, ITS2 e *rpl20-rps12* é congruente com as evidências de estabelecimento recente desta população e corroborada pela diversificação de haplótipos a partir de mutações pontuais. Por outro lado, o estabelecimento possivelmente ocorreu com a contribuição predominante de propágulos da região de Angra de Reis (existem em herbários registros de *Utricularia longifolia* anteriores à década de 1970) e Bananal que continham linhagens amplamente distribuídas, como a H\_2 de *rpl20-rps12* (Figura 21) que ocorre nas três populações estudadas,

além de outras linhagens ancestrais para ITS1 e ITS2 que foram posteriormente eliminadas no Rio de Janeiro (Figura 19 e 20) como sugerido anteriormente.

#### 4.2.4 Implicações para a conservação

Os dois locais onde *Utricularia longifolia* está incluída na lista regional de espécies ameaçadas – Bananal (SP) e Rio de Janeiro (RJ) – apresentaram a menor diversidade genética, sendo especialmente crítica a situação da população encontrada no Rio de Janeiro, dentro do Parque Nacional Floresta da Tijuca, uma vez que se mostrou clonal para a região ITS (ITS1 e ITS2) e foram identificados apenas dois haplótipos para a região plastidial estudada (cpDNA: *rpl20-rps12*), sendo que um deles seja possivelmente vestigial.

E embora, a população de Angra dos Reis não esteja localizada em uma região excepcionalmente favorável para conservação, foi observada maior diversidade haplotípica e nucleotídica. Portanto, é possível que a baixa diversidade encontrada nas demais populações seja efeito da reprodução vegetativa predominante, associada a um período de estabelecimento da população superior ao de Angra dos Reis ( $\approx 40$  anos), desta forma algumas linhagens já teriam sido ser eliminadas, seja por efeito de pressões ambientais seletivas ou deriva genética.

De qualquer forma, levando-se em conta que populações com baixa diversidade genética estão, em geral, mais propensas à extinção, especialmente porque o baixo compartilhamento de haplótipos e alto número de linhagens endêmicas indicam baixo fluxo gênico entre as três populações estudadas, aumentando os riscos de extinção. Portanto, é sugerida a proteção e gerenciamento das populações de Bananal (SP) e Rio de Janeiro (Floresta da Tijuca: RJ) visando manter a diversidade genética e a capacidade evolutiva da espécie *Utricularia longifolia*.

## 5 CONCLUSÕES

*Utricularia foliosa* não apresentou diferenças significativas, dentre os caracteres morfológicos estudados, somente para as localidades amostradas no Estado de Mato Grosso; entre as localidades amostradas no Estado de São Paulo, assim como entre as duas regiões (São Paulo e Mato Grosso) foram observadas diferenças significativas.

Não houve diferença significativa de caracteres morfológicos entre as três populações estudadas, porém, 5 caracteres reprodutivos e 7 caracteres vegetativos apresentaram correlação significativa com a variação de fatores ambientais associados ao gradiente altitudinal observado nas populações amostradas (Angra dos Reis: 44m; Rio de Janeiro: 953m; Bananal:1.242m).

As diferenças morfométricas entre *Utricularia foliosa* e *Utricularia longifolia* foram comparadas quanto ao hábito, e os resultados obtidos foram congruentes com observações anteriores para o gênero.

Foi impossível identificar adequadamente, tanto através de chave dicotômica da seção *Setiscapella* quanto através da morfometria *Utricularia nigrescens* e *Utricularia pusilla*, sendo por este motivo, sugerida a revisão taxonômica da seção e circunscrição das espécies.

A diversidade haplotípica e nucleotídica observada em *Utricularia longifolia* para as regiões estudadas (ITS1, ITS2 do rDNA; e *rpl20-rps12* do cpDNA) apresentou valores dentro do esperado para angiospermas. A variabilidade genética foi proporcionalmente maior com o aumento do tamanho das populações amostradas. A distribuição dos haplótipos foi congruente com os agrupamentos observados nos dendrogramas construídos com base na morfometria de *Utricularia longifolia*.

Não foi possível comparar a diversidade e estrutura genética de *Utricularia longifolia* com outras espécies não-ameaçadas (*Utricularia foliosa* e *Utricularia breviscapa*) porque a amplificação e sequenciamento dessas espécies apresentaram maior dificuldade, resultando em sequências com baixa qualidade ou perda de *amplicons*. Da mesma forma, não foram obtidas sequências para *Utricularia nigrescens* uma vez que não foram localizadas populações desta espécie no Estado



de São Paulo, o que impediria a comparação com populações não-ameaçadas da mesma espécie. Adicionalmente, a escassez de tecido para extração de DNA, devido ao reduzido tamanho da espécie, exige a otimização dos métodos de extração. Contudo, será dado continuidade aos testes para obtenção destas sequências e utilização em estudos futuros.

## REFERÊNCIAS

ADAMEC, L. *et al.* Fluorescence labelling of phosphatase activity in digestive glands of carnivorous plants. **Plant biology** (*Stuttgart, Germany*), vol. 8, n. 6, p. 813-20, 2006.

ADAMEC, L. Respiration and photosynthesis of bladders and leaves of aquatic *Utricularia* species. **Plant biology** (*Stuttgart, Germany*), vol. 8, n. 6, p. 765-9, 2006.

ADAMEC, L. The influence of prey capture on photosynthetic rate in two aquatic carnivorous plant species. **Aquatic Botany**, vol. 89, n. 1, p. 66-70, 2008a.

ADAMEC, L. Mineral nutrient relations in the aquatic carnivorous plant *Utricularia australis* and its investment in carnivory. **Fundamental and Applied Limnology / Archiv für Hydrobiologie**, vol. 171, n. 3, p. 175-183, 2008.

ÁLVAREZ, I. & WENDEL, J. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, vol. 29, n. 3, p.417-434, 2003.

ANDERSON, B. & MIDGLEY, J.J. Food or sex pollinator-prey conflict in carnivorous plants. **Ecology Letters**, vol.4, p. 511-513, 2001.

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

ARAKI, S. Variation of sterility and fertility in *Utricularia australis* f. *australis* in Hokkaido, northern Japan. **Ecological Research**, vol. 15, p. 193-201, 2000.

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

BALDWIN, B.G. *et al.* The ITS Region of Nuclear Ribosomal DNA: A Valuable Source of Evidence on Angiosperm Phylogeny. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, vol. 82, n.2, p. 247-277, 1995.

BANDELT, H.J., FORSTER, P. & RÖHL, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular biology and evolution**, vol. 16, n.1, p. 37-48, 1999.

BARROSO, G.M. **Sistemática de Angiospermas do Brasil.**, Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. 1991.

BARTHLOTT, W. *et al.* First protozoa-trapping plant found. **Nature**, vol. 392, p. 447, 1998.

BEHEREGARAY, L.B. Twenty years of phylogeography: the state of the field and the challenges for the Southern Hemisphere. **Molecular ecology**, vol. 17, n. 17, p. 3754-74, 2008.

BONATELLI, I. & MORAES, E. Variação nucleotídica em segmentos do cloroplasto (cpDNA ) das cactáceas *Pilosocereus machrisii* e *Pilosocereus aurisetus*. **Resumos do 55º Congresso Brasileiro de Genética**. Sociedade Brasileira de Genética, p. 115, 2009.

BROWN, R. **Prodomus Florae Novae Hollandie**. London. 1810.

CRIA. Species Link. Disponível em: [www.splink.org.br](http://www.splink.org.br). Acessado em: 2009.

CAVERS, S., NAVARRO, C. & LOWE, A.J. A combination of molecular markers identifies evolutionarily significant units in *Cedrela odorata* L. (Meliaceae) in Costa Rica. **Conservation Genetics**, vol.4, p. 571-580, 2003.

CAVERS, S., NAVARRO, C. & LOWE, A.J. Chloroplast DNA phylogeography reveals colonization history of a Neotropical tree, *Cedrela odorata* L., in Mesoamerica. **Molecular Ecology**, vol. 12, p. 1451-1460, 2003.

CAVERS, S. Targeting genetic resource conservation in widespread species: a case study of *Cedrela odorata* L. **Forest Ecology and Management**, vol. 197, n. 1-3, p. 285-294, 2004.

CHIES, T.T., Genomas vegetais. In: L. B. FREITAS & F. BERED. **Genética & Evolução Vegetal**. Porto Alegre, UFRGS, p. 243-262, 2003.

CLEVERING, O.A., BRIX, H. & LUKAVSKÁ, J. Geographic variation in growth responses in *Phragmites australis*. **Aquatic Botany**, vol. 69, p. 89-108, 2001.

COLLEVATTI, R.G., GRATTAPAGLIA, D. & HAY, J.D. Evidences for multiple maternal lineages of *Caryocar brasiliense* populations in the Brazilian Cerrado based on the analysis of chloroplast DNA sequences and microsatellite haplotype variation. **Molecular Ecology**, vol. 12, p. 105-115, 2003.

CORDEIRO, A.L. & MIRANDA, V.F., **Estudos taxonômicos de Lentibulariaceae de áreas de várzea no município de Mogi das Cruzes (SP)**. (no prelo)

CORRÊA, M. & MAMEDE, M. Lentibulariaceae. In: M. Wanderley, G. Shepherd, & A. Giulietti. **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo**. São Paulo, Hucitec, p. 141-161, 2002.

CULLEY, T.M. & KLOOSTER, M.R. The Cleistogamous Breeding System: A Review of Its Frequency, Evolution, and Ecology in Angiosperms. **The Botanical Review**, vol. 73, p. 1-30, 2007.

DACUNHASANTINO, M. & BIANCHINIJR, I. Carbon cycling potential from *Utricularia breviscapa* decomposition in a tropical oxbow lake (São Paulo, Brazil). **Ecological Modelling**, vol. 218, n. 3-4, p. 375-382, 2008.

DARWIN, C. *Utricularia*. In **Insetivorous Plants**. New York: D. Appleton and Company, p. 320-368, 1899.

DIJK, J.K. & TUSSENBROEK, B.I. Clonal diversity and structure related to habitat of the marine angiosperm *Thalassia testudinum* along the Atlantic coast of Mexico. **Aquatic Botany**, vol. 92, p. 63-69, 2009.

DÍAZ-OLARTE, J. *et al.* Periphyton and phytoplankton associated with the tropical carnivorous plant *Utricularia foliosa*. **Aquatic Botany**, vol. 87, n.4, p. 285-291, 2007.

EIDASEN, P.B. et al. Nuclear vs. plastid data: complex Pleistocene history of a circumpolar key species. **Molecular Ecology**, vol. 16, p. 3902- 3925, 2007.

EIRADO, G. L. do. et al. Os terrenos tectônicos da faixa ribeira na Serra da Bocaina e na Baía da Ilha Grande, Sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Geociências**, vol. 36, n.3, p. 426, 2006.

ELLISON, A.M. et al. The evolutionary ecology of carnivorous plants. **Advances in Ecological Research**, vol. 33, p. 1-74, 2003.

ELLISON, A. & GOTELLI, N. Evolutionary ecology of carnivorous plants. **Trends in Ecology & Evolution**, vol. 16, n.11, p. 623-629, 2001.

EVANNO, G., REGNAUT, S. & GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular ecology**, vol. 14, n. 8, p. 2611-20, 2005.

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

FISHER, E. et al. Lentibulariaceae. In: KUBITZKI, K. **The Families and Genera of Vascular Plants**. Berlin: Springer, p. 276-282, 2004.

FRANKHAM, R. Quantitative genetics in conservation biology. **Genetical research**, vol. 74, n. 3, p. 237-44, 1999.

FU, Y. Statistical Tests of Neutrality of Mutations Against Population Growth, Hitchhiking and Background Selection. **Genetics**, vol. 147, p. 915-925, 1997.

GODT, M. & HAMRICK, J. Population genetic analysis of *Elliottia racemosa* (Ericaceae), a rare Georgia shrub. **Molecular Ecology**, vol. 8, p. 75-82, 1999.

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

HALL, T. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids. Symp. Ser.**, vol. 41, p. 95-98, 1999.

HAYWORTH, D.A. *et al.* Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. **Molecular Ecology**, vol. 7, p. 465-474, 1998.

HERSHKOVITZ, M.a. & ZIMMER, E.a. Conservation patterns in angiosperm rDNA ITS2 sequences. **Nucleic acids research**, vol. 24, n.15, p. 2857-67, 1996.

HOBBHANN, N., KÜCHMEISTER, H. & POREMBSKI, S. Pollination Biology of Mass Flowering Terrestrial Utricularia species (Lentibulariaceae) in the Indian Western Ghats. **Plant biology**, vol. 8, p. 791-804, 2006.

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

JUNNIPER, E.B., ROBINS, R. & JOEL, D. **The Carnivorous Plants**, San Diego: Academic Press. 1989.

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

KAMEYAMA, Y. & OHARA, M. Predominance of clonal reproduction, but recombinant origins of new genotypes in the free-floating aquatic bladderwort *Utricularia australis f. tenuicaulis* (Lentibulariaceae). **Journal of plant research**, vol. 119, n. 4, p. 357-62, 2006.

LE CONTE, J.E. Observations on North American species of the genus *Utricularia*. **Ann. Lyceum Nat. Hist.** New York, vol. 1, p. 72-79, 1824.

LIBRADO, P. & ROZAS, J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, vol. 25, p. 1451-1452, 2009.

LINNAEUS, C. **Species Plantarum - 1**, Stockholm. 1753.

LLOYD, F.E. **The Carnivorous Plants**, New York: The Ronald Press Company. 1942.

LOCATELLI, E. & Machado, I.C. Fenologia das Espécies Arbóreas de uma Mata Serrana (Brejo de Altitude) em Pernambuco, Nordeste do Brasil. **Dados**, p. 255-284. 2001.

LORENZ-LEMKE, A.P. *et al.* Molecular genetic variation in *Passiflora alata* (Passifloraceae), an invasive species in southern Brazil. **Biological Journal of the Linnean Society**, vol. 88, p. 611-630, 2006.

MAMEDE, M.C. *et al.* **Livro Vermelho das Espécies Vegetais Ameaçadas do Estado de São Paulo**, São Paulo: Instituto de Botânica, 2007.

MARTEL, E. *et al.* Chromosome evolution of *Pennisetum* species (Poaceae): implications of ITS phylogeny. **Plant Systematics and Evolution**, vol. 249, n. 3-4, p. 139-149, 2004.

MERXEM, D.G. *et al.* The importance of flower visitor not predicted by floral syndromes. **South African Journal of Botany**, vol. 75, n. 4, p. 660-667, 2009.

MIRANDA, V.F.O., RIVADAVIA, F. Lentibulariaceae *in* **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB008576>. Acessado em: 2010.

MITTELSTAEDT, C.A. & MIRANDA, V.F., **Fenologia de floração de espécies de *Utricularia* (Lentibulariaceae) do Brasil**. (*no prelo*)

MUSCHNER, V.C. *et al.* Differential organellar inheritance in *Passiflora*'s (Passifloraceae) subgenera. **Genetica**, vol. 128, n. 1-3, p. 449-53, 2006.

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

MÜLLER, K. *et al.* Evolution of carnivory in Lentibulariaceae and the Lamiales. **Plant biology (Stuttgart, Germany)**, vol. 6, n. 4, p. 477-90, 2004.

NIELSEN, R. & BEAUMONT, M.a. Statistical inferences in phylogeography. **Molecular ecology**, vol. 18, n. 6, p. 1034-47, 2009.

PALACIO, S. & MONTSERRAT-MARTI, G. Comparison of the bud morphology and shoot growth dynamics of four species of Mediterranean subshrub growing along an altitudinal gradient. **Botanical Journal of the Linnean Society**, vol. 151, n. 4, p. 527-539, 2006.

PLACHNO, B.J. & SWITEK, P. Unusual embryo structure in viviparous *Utricularia nelumbifolia*, with remarks on embryo evolution in genus *Utricularia*. **Protoplasma**. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19921393>>. Acessado em 2010.

PARRA-O, C. *et al.* Ribosomal DNA pseudogenes are widespread in the eucalypt group (Myrtaceae): implications for phylogenetic analysis. **Cladistics**, vol. 23, p. 1-16, 2007.

PEREIRA, R.M., ÁVILA, C.A. & MOURA, C.A. Geologia da região entre Resende e São José do Barreiro e idade 207 Pb / 206 Pb do granito do Funil , segmento central da faixa Ribeira (RJ-SP), Brasil. **Geociências**, vol. 3, n. 1, p. 37-48, 2001.

PEROUTKA, M. *et al.* *Utricularia*: a vegetarian carnivorous plant? **Plant Ecology**, vol. 199, p. 153-162, 2008.

PINENT, S.M. *et al.* *Thrips* (Thysanoptera: Thripidae, Phlaeothripidae) damaging peach in Paranapanema, São Paulo State, Brazil. **Neotropical entomology**, vol. 37, n. 4, p. 486-8, 2008.



- PINHEIRO, F. & BARROS, F.D. *Epidendrum secundum* Jacq. e *E. denticulatum* Barb. Rodr. (Orchidaceae) caracteres úteis para sua delimitação. **Hoehnea**, vol. 34, n. 4, p. 563-570, 2007.
- POREMBSKI, S., THEISEN, I. & BARTHLOTT, W. Biomass allocation patterns in terrestrial, epiphytic and aquatic species of *Utricularia* (Lentibulariaceae). **Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, vol. 201, n. 6, p. 477-482, 2006.
- PRITCHARD, J.K., STEPHENS, M. & DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, vol. 155, n. 2, p. 945-59, 2000.
- RAHMAN, M.O. & KONDO, K. Genetic Diversity and Species Relationship of Some Terrestrial Bladderwort (*Utricularia* L.) as Revealed by Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers. **Acta Phytotax. Geobot**, vol. 54, n. 1, p. 49-57, 2003.
- RAHMAN, M.O. Evaluation of RAPD markers for taxonomic relationships in some aquatic species of *Utricularia* L. (Lentibulariaceae). **Bangladesch Journal Plant Taxon**, vol. 13, n.2, p. 73-82, 2006.
- REIFENRATH, K. *et al.* Trap architecture in carnivorous *Utricularia* (Lentibulariaceae). **Flora**, vol. 201, p. 597-605, 2006.
- ROGERS, A.R. & HARPENDING, H. Population-growth makes waves in the distribution of pairwise genetic-differences. **Molecular Biology and Evolution**, vol. 9, n. 3, p. 552-569, 1992.
- RUTISHAUSER, R. & ISLER, B. Developmental Genetics and Morphological Evolution of Flowering Plants, Especially Bladderworts (*Utricularia*): Fuzzy Arberian Morphology Complements Classical Morphology. **Annals of Botany**, vol. 88, p. 1173-1202, 2001.
- SÁNCHEZ, M.C. La Clonalidad y sus Efectos em la Biología de Poblaciones. In: L. E. EGUIARTE, V. SOUZA, & X. AGUIRRE. **Ecología Molecular**. Coyoacán: Universidad Nacional Autónoma de México, p. 215-244, 2007.

SCHAAL, B.A. *et al.* Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. **Molecular Ecology**, vol. 7, p. 465-474, 1998.

SMITH, J.E. *Utricularia*. In REES, **Cyclopedia** 37. London. 1819.

SIROVÁ, D. *et al.* Microbial community development in the traps of aquatic *Utricularia* species. **Aquatic Botany**, vol. 90, p. 129-136, 2009.

SOARES, P.V. *et al.* Mapa de infiltração do alto e médio Vale do Paraíba do Sul com base em elementos do meio físico e na precipitação. **Revista Ambiente e Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science**, vol. 3, n. 1, p. 36-42, 2008.

SOSNOVÁ, M., DIGGELEN, R.V. & KLIMEOVÁ, J. Distribution of clonal growth forms in wetlands. **Aquatic Botany**, vol. 92, p. 33-39, 2009.

TANNUS, J.L., ASSIS, M.A. & MORELLATO, L.C. Fenologia reprodutiva em campo sujo e campo úmido numa área de Cerrado no sudeste do Brasil, Itirapina - SP. **Biota Neotropica**, vol. 6, n. 3, p. 1-27, 2006.

TAJIMA, F. Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. **Genetics**, vol. 105, p. 437-460, 1983.

TAYLOR, P. **The Genus Utricularia** – a taxonomic monograph. 1 ed., London: Royal Botanical Gardens, Kew. 1989.

THOMPSON, J.D., HIGGINS, D.G. & GIBSON, T.J. ClustalW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic acids research**. 1994.

THURY, S. *et al.* Fenologia reprodutiva de *Euterpe edulis* Mart. na Mata Atlântica (Reserva Ecológica do Trabiju, Pindamonhangaba – SP). **Rev. Biociênc.**, vol. 6, n. 2, p. 31-37, 2000.

URIBE-SALAS, D. *et al.* Foliar morphological variation in the white oak *Quercus rugosa* Née (Fagaceae) along a latitudinal gradient in Mexico: Potential implications

for management and conservation. **Forest Ecology and Management**, vol. 256, p. 2121-2126, 2008.

VAHL, M. **A numerical list etc (Catalogue)**. London. 1804.

VEASEY, E.A. *et al.* Variabilidade intra-específica em cinco populações de cinco populações de *Oncidium varicosum* Lindl. (Orchidaceae - Oncidiinae) em Minas Gerais. **Revista Brasileira de Botânica**, vol. 24, n. 4, p. 553-560, 2001.

WALLICH, N. **Enumeratio Plantarum 1**. Copenhagen. 1828-1830.

WEN, C.S. & HSIAO, J.Y. Altitudinal Genetic Differentiation and Diversity of Taiwan Lily (*Lilium longiflorum* var *formosanum*; Liliaceae) Using RAPD Markers and Morphological Characters. **International Journal of Plants Sciences**, vol. 162, n. 2, p. 287-295, 2001.

WHITE, T.J. *et al.* Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In*: INNIS, M. *et al.* **PCR Protocols: a guide to methods and applications**. San Diego: Academic Press, p. 315-322. 1990.

WHITEHEAD, M.R. & PEAKALL, R. Integrating floral scent, pollination ecology and population genetics. **Functional Ecology**, vol. 23, n. 5, p. 863-874, 2009.

WIDMER, A. & BALTISBERGER, M. Extensive intraspecific chloroplast DNA (cpDNA) variation in the alpine *Draba aizoides* L. (Brassicaceae): haplotype relationships and population structure. **Molecular ecology**, vol. 8, p. 1405-1415. 1999.

WILLIAMS, S.E., ALBERT, V.A. & CHASE, M.W., Relationships of Droseraceae: A cladistic analysis of rbcL sequence and morphological data. **American Journal of Botany**, vol. 81, n. 8, p. 1027-1037, 1994.

ZHANG, Q. *et al.* Phylogeography of the Qinghai-Tibetan Plateau endemic *Juniperus przewalskii* (Cupressaceae) inferred from chloroplast DNA sequence variation. **Molecular Ecology**, vol. 14, p. 3513-3524, 2005.

**APÊNDICE A** – Descrição detalhada dos ambientes em que foram coletadas espécies de *Utricularia* (Lentibulariaceae)

*Mogi das Cruzes, Distrito de César de Souza, Bairro Rio Acima*

As amostras foram coletadas em trecho da APA Várzea do Rio Tietê localizado no Município de Mogi das Cruzes, distrito de César de Souza, bairro do Rio Acima (Figura 22). Esta área acompanha o curso do Rio Tietê e foi dividida entre as duas margens do rio, sendo um ponto de coleta situado na estrada do Afia Faca e outro à margem da Rodovia Mogi-Salesópolis. As diferenças entre as duas áreas são notórias uma vez que apenas uma está conectada ao rio Tietê (junto à estrada do Afia Faca), acompanhando o ciclo de suas águas e recebendo dele diásporos e matéria orgânica; na área próxima à rodovia Mogi-Salesópolis as lagoas são mantidas, provavelmente, apenas pelo regime de chuvas e possíveis afloramentos do lençol freático. Além disso, as lagoas das duas áreas diferem em tamanho e qualidade da água: na estrada do Afia Faca existem muitas lagoas maiores e com águas turvas, que se conectam durante os períodos de chuvas, embora a distribuição dos indivíduos de *Utricularia foliosa* não seja contínua, agregados em cada lagoa; enquanto na área isolada próximo à Rodovia Mogi-Salesópolis, *Utricularia foliosa* é encontrada em uma única lagoa, com dimensões menores e águas mais claras.

Ambas as áreas pertenceram à Cerâmica “Rio Acima”, que praticava a extração de argila e produção de tijolos no local; posteriormente a cerâmica abandonou a área e as cavas de extração formaram diversas lagoas permanentes alimentadas pelo Rio Tietê. A data da desativação da Cerâmica é incerta, no entanto, através de relatos de moradores de Mogi das Cruzes, estima-se que tenha sido em meados de 1970. Neste caso, a colonização das lagoas pelas macrófitas encontradas atualmente, incluindo *Utricularia foliosa*, teria ocorrido em aproximadamente 40 anos. Tendo em conta o recente processo de colonização de *Utricularia foliosa* nas inúmeras lagoas desta área, e também considerando seu rápido crescimento vegetativo e fragmentação dos estolões, pode-se supor que a estrutura populacional nesta área seja predominantemente clonal, com baixa diversidade genética.



Figura 22. Área onde foram coletadas amostras de *Utricularia foliosa*, em trecho da APA Várzea do Rio Tietê, no Município de Mogi das Cruzes, Distrito de César de Souza, Bairro do Rio Acima, próximo à Estrada do Afia Faca. No detalhe, inflorescência de *U. foliosa* (B), seguido de estolão e folhas com utrículos submersas na água (C), e detalhe do dimorfismo dos utrículos (D). Fotos cedidas por Miranda (2008).



Poconé (MT), Fazenda Ypiranga, Pousada Piuval, próximo ao mirante

Poconé localiza-se ao sul do estado do Mato Grosso integrando a área do Alto Pantanal. A área amostrada pertence à Fazenda Ypiranga – que nos autorizou a entrada e coleta das amostras; trata-se de uma área alagável por afluentes do rio Paraguai, próxima a um mirante construído para a observação dos ninhais durante o período de vazante do Pantanal (Figura 23). No local havia grande riqueza de macrófitas não-carnívoras e, apesar de ser um ponto de visitação turística, não apresentava detritos ao longo da trilha.

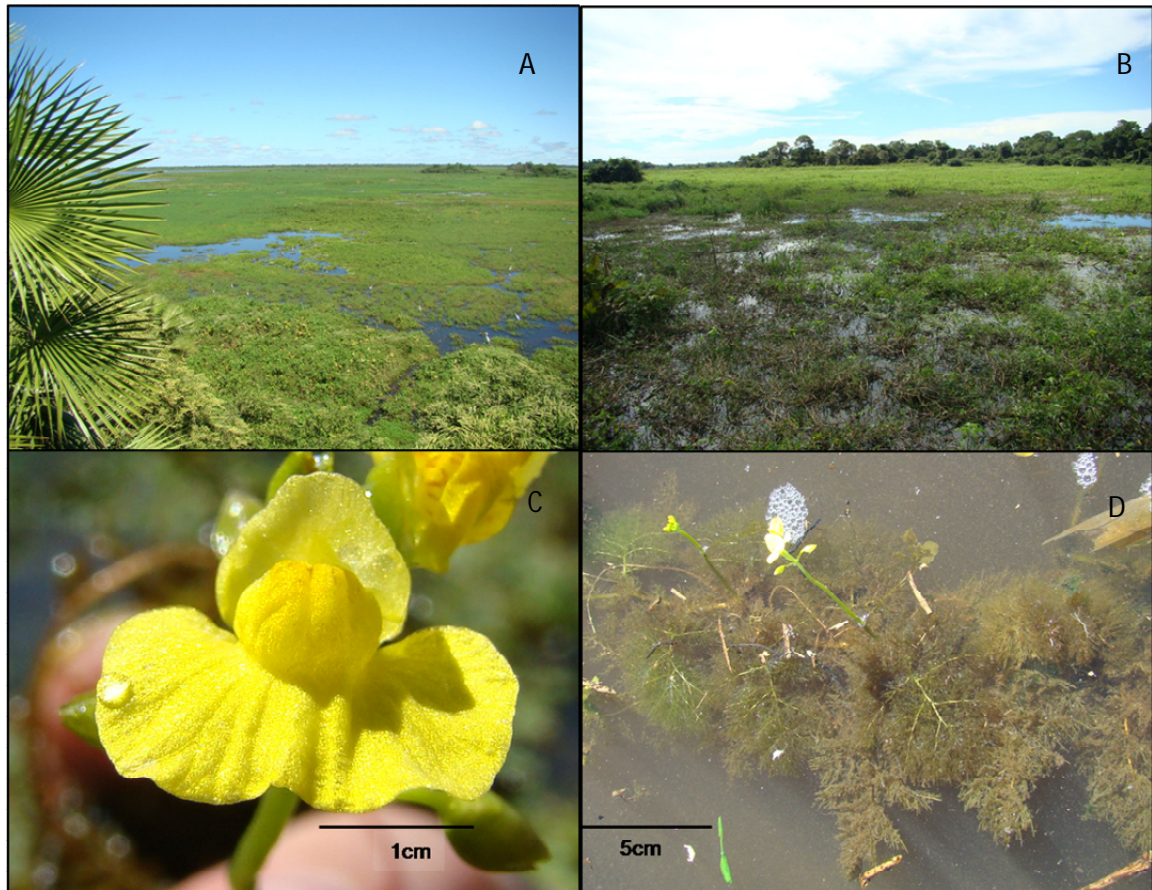


Figura 23: Ambiente de ocorrência de *Utricularia foliosa*.  rea de propriedade da fazenda Ypiranga, Pousada Piuval, Poconé, MT. A: Vista panorâmica do mirante para os ninhais no Pantanal mato-grossense; B:  rea onde foram coletadas amostras de *Utricularia foliosa*; C: Flor de *Utricularia foliosa*; D: indivíduo de *Utricularia foliosa* no ambiente.

Poconé (MT), Estrada Transpantaneira, aproximadamente km 12

Área alagada próxima à entrada da fazenda Ypiranga, aproximadamente 1 km antes do portal de entrada da estrada-parque Transpantaneira, à margem desta mesma estrada de ambos os lados havia áreas alagadas (Figura 24) onde foram coletadas amostras de *Utricularia foliosa*. Estas áreas alagadas são constantes à margem da estrada, que foi aterrada para poder existir o transporte terrestre durante os períodos de cheias do Pantanal.



Figura 24. Ambiente à margem da estrada Transpantaneira (Poconé: MT) onde foram coletadas amostras de *Utricularia foliosa*. Setas indicam a localização de alguns indivíduos entre as demais macrófitas.



*Santo Antonio do Leverger (MT)*

O local de amostragem apresenta sazonalidade marcada uma vez que permanece alagado durante o período de cheias do Pantanal e seca completamente durante a vazante (Figuras 25: D e E).



Figura 25. Ambiente em Santo Antônio do Leverger (MT: Chácaras do Aricá) onde foram encontradas, além de *Utricularia foliosa*, outras quatro espécies de *Utricularia*. A: Visão geral do Ambiente. B e C: Indivíduos de *Utricularia foliosa* muito menores do que normalmente é encontrado. D e E: Mesma área durante a vazante do Pantanal (setembro) indicando forte sazonalidade no ambiente. Crédito das imagens D e E: Ferramosca, 2008.

Muitas espécies de *Utricularia* ocorrem em simpatria nesta área, tais como *Utricularia foliosa*, *Utricularia breviscapa*, *Utricularia hydrocarpa*, *Utricularia gibba*, *Utricularia meyeri*, e *Utricularia biovularioides*, sendo que as duas últimas espécies são endêmicas do Brasil Central.

É notória diferença do tamanho dos indivíduos entre este ponto (Figura 25: B e C) e àqueles coletados em Mogi das Cruzes que chegam a apresentar estolões com 5m de comprimento.

#### *Mogi das Cruzes, Distrito de César de Souza, Bairro Rio Acima*

As amostras foram coletadas em trecho da APA Várzea do Rio Tietê localizado no Município de Mogi das Cruzes, Distrito de César de Souza, Bairro Rio Acima. No entanto, só foram encontradas populações de *Utricularia breviscapa* em duas lagoas interligadas (Figura 26), na área próxima à estrada do Afia Faca. Como descrito anteriormente, estas lagoas apresentam conexão com o Rio Tietê, recebendo deles água e detritos orgânicos, o que confere à água alta turbidez. Não foram observadas diferenças entre as populações das duas lagoas, tanto em tamanho da população quanto em caracteres morfológicos distinguíveis em campo; em ambas as lagoas os indivíduos se distribuem próximo à margem simpatricamente com *Utricularia foliosa* e outras macrófitas não-carnívoras.

Considerando que *U. breviscapa* apresenta ciclo de vida anual, a sua permanência no local se deve à produção e manutenção de banco de sementes; o presente estudo pretende verificar se esta característica confere maior diversidade genética à população, porém, o resultado dependerá da ocorrência ou não de autogamia ou geitonogamia, que potencialmente reduziriam a variação genética na população entre as gerações, assim como a produção de sementes, como observado por (Kameyama & Ohara 2006; Kameyama *et al.* 2005) para *Utricularia australis f. tenuicaulis*.





Figura 26. Área onde foram coletadas amostras de *Utricularia breviscapa*, em trecho da APA Várzea do Rio Tietê, no Município de Mogi das Cruzes, Distrito de César de Souza, Bairro do Rio Acima, próximo à Estrada do Afia Faca. A: Imagem de uma das lagoas onde foram coletadas amostras de *Utricularia breviscapa*, em trecho da APA Várzea do Rio Tietê, no Município de Mogi das Cruzes, Distrito de César de Souza, Bairro do Rio Acima, próximo à Estrada do Afia Faca. B: Inflorescência de *U. breviscapa*; C: folha com utrículos submersos na água. Fotos cedidas por: Miranda (A; 2008) e Cordeiro (B e C; 2008).

### *Bananal (Serra da Bocaina: SP)*

No Estado de São Paulo a espécie *Utricularia longifolia* tem distribuição restrita à Serra da Bocaina, conhecida por uma única população localizada em Bananal, à margem da rodovia SP-247 – também conhecida como Estrada do Sertão – que dá acesso à Estação Ecológica de Bananal e no passado também fazia ligação com a Trilha do Ouro.

A Serra da Bocaina faz parte da história da colonização do Brasil. A região foi primeiramente explorada pela caça, depois, pelo ouro e diamantes (nas Entradas e Bandeiras), servindo com suas trilhas para o transporte de produtos aos portos de Paraty e Angra dos Reis. Estas trilhas mais tarde foram usadas para a entrada de cana-de-açúcar e café no Vale do Paraíba. Algumas delas foram alargadas e receberam calçamento feito pelos escravos, para permitir o escoamento da produção já em carretões de tração animal. Hoje estas trilhas constituem o grande atrativo deste Parque para o ecoturismo (IBAMA 2009). Em São Paulo, o Parque abrange os Municípios de Areias, Cunha, São José do Barreiro e Ubatuba, no entanto, a Serra da Bocaina se estende ainda pelos municípios vizinhos como Bananal e Silveiras (Figura 27).

A população amostrada (Figura 28 e 29) foi encontrada à margem da estrada de terra SP-247 em frente à cachoeira Sete Quedas, sobre uma rocha e associada uma espessa camada de musgo (*Sphagnum* sp.; aproximadamente 10cm de espessura). Os indivíduos apresentavam-se distribuídos de forma agregada e sempre associada ao musgo. A comunidade vegetal na qual estava inserida a população de *U. longifolia* era constituída predominantemente de Cyperaceae, Clusiaceae (*Clusia* sp.), Orchidaceae (*Epidendrum* cf. *secundum* Enum.) e Lycopodiaceae (*Lycopodium* sp.).

Considerando o histórico de uso e ocupação da região de Bananal e da estrada onde a população está localizada, é impossível estimar o período mínimo do estabelecimento de *Utricularia longifolia*. No entanto, é possível que se trate de um processo antigo, dado o histórico de abertura e uso da estrada, apesar do primeiro registro desta espécie em Bananal ser datado de 1996.

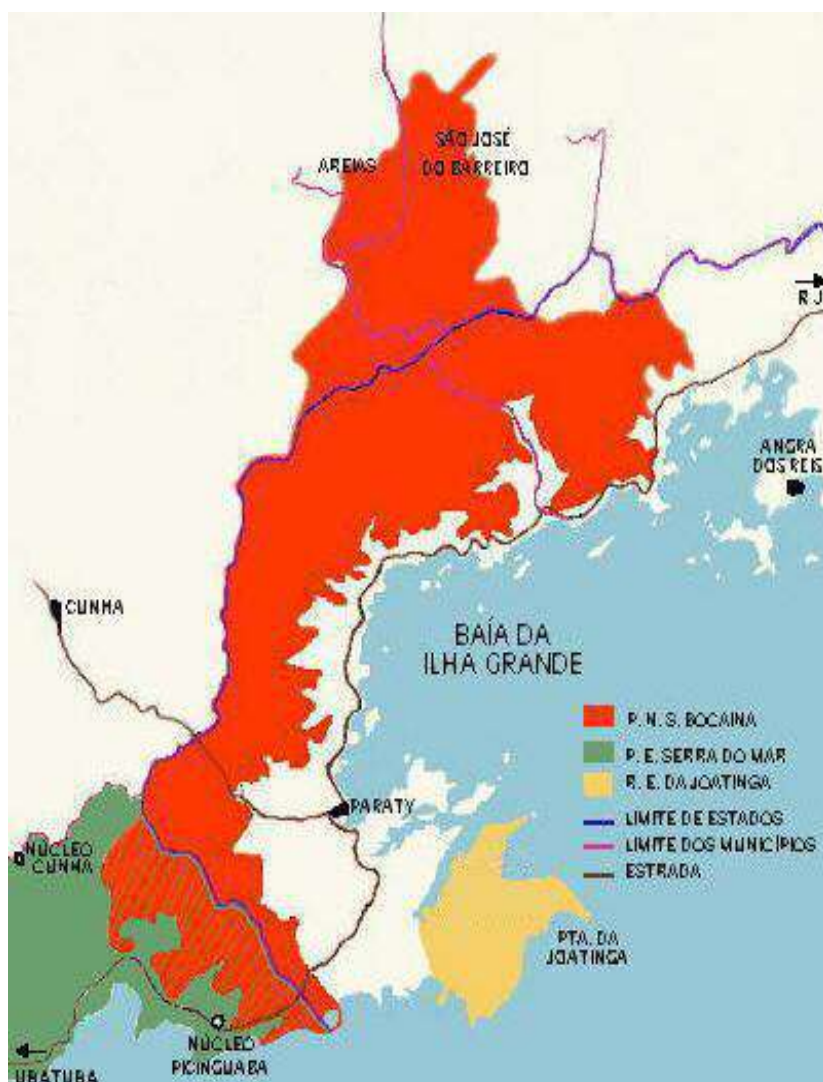


Figura 27. Localização do Parque Nacional Serra da Bocaina. Fonte: < [www.paraty.com.br/pnsb.htm](http://www.paraty.com.br/pnsb.htm) >





Figura 28. Ambiente no qual a população de *Utricularia longifolia* se estabeleceu em Bananal, SP. A: tamanho estimado da população. B: vista oposta da população.





Figura 29. Detalhes da população de *Utricularia longifolia* amostrada em Bananal, SP. A: visão geral do substrato. B: vista aproximada com setas sinalizando folhas e flores de *Utricularia longifolia*. C: inflorescência da mesma espécie.

*Angra dos Reis (BR-101: RJ)*

A população de *Utricularia longifolia* foi localizada à margem da rodovia BR-101, também conhecida como Rio-Santos, próxima (aproximadamente 100m) da Usina Nuclear de Angra dos Reis (Figura 30 e 31). A obra de construção da estrada BR-101 no trecho entre Ubatuba e Angra dos Reis foi realizada entre 1971-1973, sendo considerada na época como rota de fuga estratégica para os moradores da região em caso de acidentes na Usina Nuclear, então, recentemente instalada (Estradas 2009). Os indivíduos de *U. longifolia* se distribuíam de modo quase homogêneo sobre um paredão rochoso – que foi recortado, provavelmente, durante a construção da estrada – coberto por algas e raízes de outras plantas que cresciam no mesmo local. Dentre as populações observadas, esta foi a maior, com aproximadamente 200m de extensão e 10m de altura.

Apesar de haver registros de coleta de *Utricularia longifolia* em Angra dos Reis anteriores à construção da rodovia (e.g. Hoene, F.C., voucher n° IBt 17416: 1926; Brade, A.C., voucher n° JBRJ\_RB 72352: 1950) no local amostrado as condições para o estabelecimento da população, provavelmente, foram criadas somente após a abertura da estrada. Contudo, é possível que populações próximas tenham sido a origem de tais registros, assim como tenham contribuído com a migração de diásporos para o estabelecimento da população amostrada. De qualquer modo, é impossível afirmar com certeza quanto à história desta população já que as exsicatas antigas são, freqüentemente, vagas quanto ao local de coleta.





Figura 30. Angra dos Reis (RJ), Rodovia BR-101: local de estabelecimento da população de *Utricularia longifolia*, indivíduos indicados pelas setas. A: vista da drenagem constante de água. B: parte da população presa à rocha sobre substrato composto de algas e raízes. C e D: vista parcial da população.





Figura 31. Angra dos Reis, RJ, BR-101. Detalhes da população amostrada. A: vista lateral de uma flor de *Utricularia longifolia*; B: detalhe de um indivíduo preso ao substrato de algas e raízes. C: folha de *U. longifolia* crescendo na margem da rodovia.

*Rio de Janeiro (Parque Nacional Floresta da Tijuca, Paineiras: RJ)*

Os registros históricos de *Utricularia longifolia* no Rio de Janeiro são abundantes desde 1915 até a década de 1960, período em que era encontrada no Corcovado, Estrada do Redentor, Morro do Cabrito, Paineiras, Pedra das Flores e Estrada da Vista Chinesa; tais localidades integram o Parque Nacional Floresta da Tijuca. Registros recentes desta espécie são escassos no Rio de Janeiro, motivo pelo qual *Utricularia longifolia* foi incluída no guia de espécies ameaçadas de extinção da cidade do Rio de Janeiro como “ criticamente em Perigo” (SMMA/RJ 2009).



Figura 32. Rio de Janeiro, RJ, Floresta da Tijuca. Paredão rochoso onde foram coletadas amostras da população de *Utricularia longifolia*, estéril, simpátrica à *U. nephrophylla* (detalhe). (Crédito: Menezes & Clivati, 2008)

Foi realizada expedição à Floresta da Tijuca em duas localidades: Paineiras e Estrada da Vista Chinesa; apenas uma população foi encontrada em Paineiras sobre paredão rochoso muito úmido e com substrato semelhante ao encontrado em Angra dos Reis, no entanto, com vegetação mais densa; toda a população estava estéril. Sobre o mesmo paredão foi encontrada *U. nephrophylla*, crescendo simpatricamente à *U. longifolia* (Figura 32).

#### *Chapada dos Guimarães (MT)*

Em maio de 2009 foi realizada uma expedição de coleta no Mato Grosso sendo localizada uma população de *Utricularia nigrescens* crescendo sobre uma lage de arenito sobre substrato úmido e simpátrica à *Utricularia pusilla*, *U. tenuicaulis*, *U. triloba* e *Genlisea filiformis*. Esta área localiza-se à margem da estrada Cuiabá-Chapada dos Guimarães à altura do km 50, próximo à Cachoeira da Mata e ao Rio Congonhas, duas localidades utilizadas pelos moradores da região como áreas de recreação, sendo observado no local resíduos plásticos e outros deixados pelos freqüentadores.

A lage de arenito (Figura 33: A e B) apresentava uma extensão de aproximadamente 50m e as espécies citadas apresentavam-se distribuídas ao longo de toda extensão, porém com maior concentração nas duas extremidades, sendo que por este motivo foram coletados indivíduos nas extremidades da lage e anotadas suas coordenadas e altitude. Em campo observou-se *Utricularia nigrescens* e *Utricularia pusilla* crescendo simpatricamente (Figuras 33: C), porém, esta identificação foi posteriormente confirmada em laboratório, através de observação em microscópio estereoscópico, separando os através da presença (*U. pusilla*) ou ausência (*U. nigrescens*) de um botão floral abortado alternando-se aos botões e/ou flores desenvolvidas, sendo este um dos caracteres utilizados por Taylor (1988) para separar ambas espécies.





Figura 33. Chapada dos Guimarães, MT. Ambiente onde estabeleceram-se populações de *Genlisea filiformis* e *Utricularia*, incluindo *Utricularia nigrescens* e *Utricularia pusilla*. A e B: lage de arenito com substrato úmido colonizada por *Utricularia* spp. e *Genlisea filiformis*. C: Comparação entre *Utricularia nigrescens* (circulada em vermelho) e *Utricularia pusilla* (circulada em preto). D: Flor de *Utricularia nigrescens*. E: Flor de *Utricularia pusilla*.

Além de ser uma espécie herbácea de pequeno porte (5-15 cm) e muito delicada – fatores que provavelmente estejam relacionados ao seu registro pobre em herbários, bem como à preservação adequada dos espécimes – *Utricularia nigrescens* é comumente confundida com outras duas espécies: *Utricularia pusilla* e *U. triloba*, todas arrançadas na seção *Setiscapella* (Taylor, 1989). Dentre os registros recentes desta espécie em São Paulo estão duas coletas em Itararé (Rivadavia, F.L., voucher n° IBt 337167:1993 e SPF103819:1995) e apenas uma em Guará (Harley, R.M. *et al.*, voucher n° SPF 132393:1997).

Foi realizada uma expedição de coleta em dezembro de 2008 (início do período de floração de *U. nigrescens*) para Itararé, e localizada a população original das coletas de Rivadavia. No entanto, a identificação estava incorreta e a população encontrada, na verdade, tratava-se de *Utricularia pusilla* (Figura 34). A exsicata da coleta de Rivadavia em Itararé foi novamente observada e as características conferiam com *Utricularia pusilla* (Taylor, 1989), são elas: sépalas de tamanho desigual, escamas lanceoladas a triangulares e folhas espatuladas, com limbo obovado a elíptico. De fato, é provável que *Utricularia nigrescens* seja tanto negligenciada em coletas quanto identificada erroneamente, devido às dificuldades com a circunscrição da espécie e de observação em campo dos caracteres diagnósticos.

Na exsicata de Harley R.M. *et al.* está registrada as coordenadas geográficas do ponto de coleta de *Utricularia nigrescens*, sendo também este o registro mais recente – aproximadamente 10 anos – desta espécie no estado de São Paulo. Por estas razões, no mês de março de 2009 foi realizada uma expedição de coleta em busca da localidade registrada e, em três dias de busca, não foi possível localizar populações de *Utricularia nigrescens*. A área foi ocupada devido ao crescimento da cultura da cana-de-açúcar na região em torno de Ribeirão Preto. Foram percorridos aproximadamente 200km em torno do ponto registrado por Harley R.M. *et al.* em busca de ambiente propício ao crescimento de *Utricularia*, no entanto, não obteve-se êxito.



Figura 34. *Utricularia pusilla* encontrada em Itararé (SP), na localidade registrada na exsicata de Rivadavia (1993; 1995) para *U. nigrescens*. Fotos cedidas por Miranda (2008).



# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)



[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)