

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 29/07/2017.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**POLIMORFISMOS NO nrDNA EM UMA PLANTA DE
GENOMA REDUZIDO *Utricularia gibba* L.
(LENTIBULARIACEAE): EVOLUÇÃO EM CONCERTO
INCOMPLETA E SUA IMPLICAÇÃO NA INFERÊNCIA
FILOGENÉTICA**

Néstor Darío Franco Marulanda
Engenheiro de produção biotecnológica

2016

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

**POLIMORFISMOS NO nrDNA EM UMA PLANTA DE
GENOMA REDUZIDO *Utricularia gibba* L.
(LENTIBULARIACEAE): EVOLUÇÃO EM CONCERTO
INCOMPLETA E SUA IMPLICAÇÃO NA INFERÊNCIA
FILOGENÉTICA**

Néstor Darío Franco Marulanda

Orientador: Prof. Dr. Vitor Fernandes Oliveira de Miranda

Coorientadora: Profa. Dra. Janete Aparecida Desidério

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do Campus de Jaboticabal – UNESP para obtenção do Título de Mestre em Agronomia – (Área de Concentração em Genética e Melhoramento de Plantas).

2016

Franco Marulanda, Néstor Darío

F825 Polimorfismos no nrDNA em uma planta de genoma reduzido
p *Utricularia gibba* L. (LENTIBULARIACEAE) : evolução em concerto
incompleta e sua implicação na inferência filogenética / Néstor
Darío Franco Marulanda. – – Jaboticabal, 2016

iv, 78 f. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016

Orientador: Vitor Fernandes Oliveira de Miranda

Coorientadora: Janete Aparecida Desidério

Banca examinadora: Marcos Túlio de Oliveira, Maurício Bacci
Junior

Bibliografia

1. Evolução em concerto. 2 ITS. 3. Polimorfismos. I. Título. II.
Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 631.52:581.137.2



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



DADOS CURRICULARES DO AUTOR

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO


TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: POLIMORFISMOS NO nrDNA EM UMA PLANTA DE GENOMA REDUZIDO *Utricularia gibba* L. (LENTIBULARIACEAE): EVOLUÇÃO EM CONCERTO INCOMPLETA E SUA IMPLICAÇÃO NA INFERÊNCIA FILOGENÉTICA

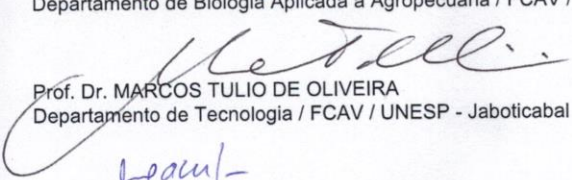
AUTOR: NESTOR DARIO FRANCO MARULANDA

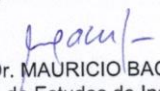
ORIENTADOR: VITOR FERNANDES OLIVEIRA DE MIRANDA

CO-ORIENTADORA: JANETE APPARECIDA DESIDERIO

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


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


Prof. Dr. MARCOS TULIO DE OLIVEIRA
Departamento de Tecnologia / FCAV / UNESP - Jaboticabal


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

Jaboticabal, 29 de julho de 2016

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Néstor Darío Franco Marulanda, nascido em 19 de novembro de 1982, natural de Pereira. Graduado no ano 2007 em Engenharia de Produção Biotecnológica da Universidade Francisco de Paula Santander, UFPS, Colômbia. Realizou estágio e projeto de Trabalho de conclusão de curso no laboratório de micro propagação de plantas do Programa de gestão e inovação tecnológica da Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria – COORPOICA (2005-2007) e Chefe do laboratório de micro propagação de plantas de GREENLEAF Colômbia (2007-2013).

AGRADECIMENTOS

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

Agradeço também o Dr. Manoel Victor Franco Lemos pela disponibilização do Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada e o pessoal desse laboratório que com sua ajuda e dicas facilitou o desenvolvimento do projeto, em especial a Eliane C.C Alves e Maria Laura Augusto Viola.

Meus agradecimentos para Dasmiliá Cruz e Bruno García pelo material vegetal cedido gentilmente e que enriqueceu de maneira significativa os resultados do projeto. Também os amigos e colegas do Laboratório de Sistemática Vegetal, pela ajuda nas coletas, discussões e sugestões feitas no decorrer desses dois anos.

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

SUMARIO

	Página
RESUMO	3
ABSTRACT.....	4
LISTA DE FIGURAS.....	5
LISTA DE TABELAS.....	6
1.INTRODUÇÃO.....	8
2.REVISÃO DA LITERATURA.....	10
2.1 Família Lentibulariaceae Rich.....	10
2.2 <i>Utricularia gibba</i> L.....	10
2.3 DNA Ribossomal.....	12
2.4 Evolução em concerto e Pseudogenes no nrDNA.....	12
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1 Material vegetal, extração de DNA e amplificação da região ITS.....	14
3.2 Clonagem, amplificação dos insertos, purificação e sequenciamento.....	15
3.3 Análises dos dados.....	15
4. RESULTADOS.....	18
4.1 Comprimento e conteúdo GC da região ITS do nrDNA.....	18
4.2 Análises filogenéticas	23
4.3 Diversidade das sequências e testes de neutralidade	27
4.3.1 Diversidade intragenômica	27
4.3.2 Diversidade Intra e interpopulacional.....	32
4.3.3 Diversidade interespecífica.....	35
4.4 Conservação de motifs nas regiões ITS1 e 5,8S.....	36

	Página
4.5 Comparação da estrutura secundária da região ITS2.....	38
4.6 Frequências e redes dos haplótipos.....	43
5. DISCUSSÃO.....	52
5.1 Amplificação da região ITS1+5,8S+ITS2 em <i>Utricularia gibba</i>	52
5.2 Motifs conservados, polimorfismos e funcionalidade das cópias	53
5.3 Inferências filogenética e filogeográficas.....	54
5.4 Genoma reduzido e origem dos polimorfismos em <i>Utricularia gibba</i> L.....	56
6. CONCLUSÕES.....	58
7.REFERÊNCIAS.....	59
8. APÊNDICES.....	68

Polimorfismos no rDNA em uma planta de genoma reduzido *Utricularia gibba* L. (Lentibulariaceae): Evolução em concerto incompleta e sua implicação na inferência filogenética

RESUMO

A planta carnívora *Utricularia gibba* (Lentibulariaceae) apresenta um genoma reduzido de aproximadamente 82 Mpb e foi empregada no presente estudo para se investigar a diversidade de cópias da região ITS (nrDNA). Uma das características do nrDNA é que suas cópias em tandem apresentam alto grau de similaridade pela ação homogeneizadora da evolução em concerto. Porém, neste estudo foram encontradas variações intragenômicas, intra e interpopulacionais nas regiões ITS em *U. gibba*. Com o objetivo de elucidar o impacto dos polimorfismos nos espaçadores ITS1, ITS2 e no gene 5,8S nas análises filogenéticas e filogeográficas, foi clonada a região ITS completa de 25 indivíduos de 5 populações, assim obtidos 292 cópias as quais foram analisadas isoladamente cada região (ITS1, 5,8S e ITS2) e em conjunto. Desta forma foram avaliados o comprimento e o conteúdo das regiões, as variações nucleotídicas e haplotípicas e realizadas análises filogenéticas e filogeográficas. Para determinar a funcionalidade das sequências obtidas foram identificados motifs conservados das regiões ITS1 e 5,8S e para os haplótipos da região ITS2 foi confirmada a sua estrutura secundária por transferibilidade das hélices em estruturas secundárias conhecidas de espécies filogeneticamente relacionadas. Assim, as três regiões apresentaram polimorfismos representados em haplótipos para cada sequência. Os resultados sugerem que todos os diferentes haplótipos presentes em *U. gibba* são cópias funcionais que podem ser usadas como marcadores filogenéticos para o nível de espécie, seja de forma isolada ou a região completa (ITS1+5,8S+ITS2). Entretanto, em análises filogenéticas e filogeográficas podem ser gerados artefatos e histórias evolutivas errôneas quando comparadas populações dentro de uma mesma espécie, dada à presença de haplótipos compartilhados por indivíduos de diferentes populações.

Palavras chave: Evolução em concerto, ITS motifs, polimorfismos, nrDNA, *Utricularia gibba*.

nrDNA polymorphisms in a plant with minimal *Utricularia gibba* L. (Lentibulariaceae): incomplete concerted evolution and its implication in phylogenetic inference

ABSTRACT –

The aquatic carnivorous plant, *Utricularia gibba* (Lentibulariaceae) has a small genome of with approximately 82 Mpb and was used in this work for the variance analysis of the copies diversity of the ribosomal DNA ITS region (nrDNA). One of the nrDNA features is that its its copies in tandem ys have present a high degree of similarity in intra individual and interspecies genomes due the homogenizing action of concerted evolution. However, in this study intragenomic, intra, and inter-populational variations were found in ITS1 + 5.8S + ITS2 ITS regions in individuals and populations evaluated. *U. gibba*. With the main objectiveaim of to elucidate the impact of polymorphisms of their the intergenic spacers ITS1, ITS2, and gene 5.8S and ITS2 regions in phylogenetic and phylogeographic analyzes, we was cloned the complete ITS region of 25 individuals from 5 populations, thereby obtained 292 clones copies and internal spacers ITS1 and ITS2 and the 5.8S gene were identified, which were analyzed individually (ITS1, 5.8S, and ITS2) and togetherconcatenated. Thus we evaluate the length and GC concentration of the regions, the nucleotide and haplotype variations and achieved phylogenetic and phylogeographic analyzes were madedinferences. To determine test the functionality of the sequences obtained we were searched and compared conserved motifs in spacer ITS1 and 5.8S gene and the haplotypes of spacer ITS2 was evaluated the ITS2 its secondary structure by transferability of helices in known secondary structures known of closely phylogenetically related species. Thus, the three regions showed polymorphisms represented by generating haplotypes for each region. These results suggest that the all different haplotypes present in *U. gibba* are functional copies that can should be used as phylogenetic markers for species studies, either alone each isolated or the complete ITS region (ITS1 + 5.8S + ITS2). But in phylogenetic and phylogeographical analyzes artifacts and erroneous evolutionary histories can be generated when populations from the same species were compared, in population studies due the presence of haplotypes shared by individuals from different populations. Hence, the present results show the need to analyze the variability of the ITS region before its use as a molecular marker.

Keywords: Concerted evolution, ITS motifs, polymorphisms, nrDNA, *Utricularia gibba*.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. <i>Utricularia gibba</i>	11
Figura 2. Conteúdo GC das três regiões (ITS1, ITS2 e 5,8S) de <i>Utricularia gibba</i>	21
Figura 3. Cladograma de análise bayesiana para o espaçador ITS1 das populações de <i>Utricularia gibba</i> . As probabilidades posteriores (PP) de cada clado são indicadas junto aos nós.....	24
Figura 4. Cladograma de análise bayesiana para o gene 5,8S das populações de <i>Utricularia gibba</i> . As probabilidades posteriores (PP) de cada clado são indicadas junto aos nós.....	25
Figura 5. Cladograma de análise bayesiana para o espaçador ITS2 das populações de <i>Utricularia gibba</i> . As probabilidades posteriores de cada clado são indicadas junto aos nós.....	26
Figura 6. Cladograma de análise bayesiana para a região ITS1+5,8S+ITS2 das populações de <i>Utricularia gibba</i> . As probabilidades posteriores (PP) de cada clado são indicadas junto aos nós.....	28
Figura 7. Estrutura secundária do espaçador ITS2 usando como modelo espécies distintas da seção <i>Utricularia</i>	40
Figura 8. Rede de haplótipos para o espaçador ITS1 das populações de <i>Utricularia gibba</i>	44
Figura 9. Rede haplótipos para o gene 5,8S das populações de <i>Utricularia gibba</i>	45
Figura 10. Rede haplótipos para o espaçador ITS2 das populações de <i>Utricularia gibba</i>	47
Figura 11. Rede de haplótipos da região ITS1+5,8S+ITS2 das populações de <i>Utricularia gibba</i>	50

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 Populações amostradas e localização dos locais de amostragem.....	14
Tabela 2. Identificação dos clones selecionados para cada indivíduo.....	19
Tabela 3. Comprimentos e conteúdo de GC das regiões por população.....	22
Tabela 4. Diversidade nucleotídica e testes de neutralidade do espaçador ITS1 para os indivíduos	29
Tabela 5. Diversidade nucleotídica e testes de neutralidade do gene 5,8S para os indivíduos	30
Tabela 6. Diversidade nucleotídica e testes de neutralidade do espaçador ITS2 para os indivíduos	31
Tabela 7. Diversidade nucleotídica e testes de neutralidade da região ITS1+5,8S+ITS2 para os indivíduos	32
Tabela 8. Diversidade nucleotídica e testes de neutralidade do espaçador ITS1 para as populações.....	33
Tabela 9. Diversidade nucleotídica e testes de neutralidade do gene 5,8S para as populações.....	34
Tabela 10. Diversidade nucleotídica e testes de neutralidade do espaçador ITS2 para as populações.....	34
Tabela 11. Diversidade nucleotídica e testes de neutralidade da região ITS1+5,8S+ITS2 para as populações.....	35
Tabela 12. Diversidade nucleotídica e testes de neutralidade de todos os clones para cada região.....	36
Tabela 13. Haplótipos identificados nos clones para o espaçador ITS1 de <i>Utricularia gibba</i>	37
Tabela 14. Haplótipos identificados nos clones para o gene 5,8S de <i>Utricularia gibba</i>	38
Tabela 15. Haplótipos identificados nos clones para o espaçador ITS2 de <i>Utricularia gibba</i>	41
Tabela 16. Porcentagens de transferibilidade das hélices na configuração da estrutura secundária do espaçador ITS2 de <i>Utricularia gibba</i>	42

Página

Tabela 17. Haplótipos identificados nos clones para a região ITS1+5,8S+ITS2 de <i>Utricularia gibba</i>	48
---	----

1. INTRODUÇÃO

A família de plantas carnívoras Lentibulariaceae agrupa cerca de 350 espécies arranjadas em três gêneros: *Pinguicula*, *Genlisea* e *Utricularia*. Nesta família encontram-se os menores genomas de plantas conhecidos, particularmente as espécies dos gêneros *Genlisea* e *Utricularia*, tendo espécies que podem apresentar genomas de 60 Mpb (ALBERT et al., 2010). A sua vez *Utricularia gibba* L., de hábito aquático, possui um genoma relativamente pequeno de 82 Mpb (IBARRA-LACLETTE et al., 2013), mesmo assim este acomoda um número típico de genes de uma planta. Os genes que codificam rRNAs estão presentes em conjunto e em grande número de cópias no genoma dos organismos eucariotos (HOFMAN et al., 1979; BROSIUS et al., 1981). Tais cópias são bastante similares entre si e estão arranjadas em tandem, constituindo o chamado DNA ribossomal nuclear (nrDNA). Uma das propriedades notáveis de nrDNA (incluindo ITS) é que seus genes parálogos nos indivíduos são bastante homogêneos, resultante da evolução concertada (ARNHEIM et al., 1980). Entretanto, há registro de casos em que o rDNA não evolui em concerto, não ocorrendo a homogenização entre as cópias. De acordo com Carreto-Paulet et al. (2015), o genoma de *U. gibba* evolui baixo uma forte pressão de seleção, levando à perda de genes ao longo do tempo. Assim duplicações gênicas completas (*Whole Genome duplications*) poderiam originar cópias adicionais dos genes, por meio da aquisição e expansão das famílias genicas, que podem servir como amortecedor contra o colapso e a extensão de linhagens (IBARRA-LACLETTE et al., 2011a, b; CARRETO-PAULET et al., 2015).

Considerando a funcionalidade das regiões cistrônicas, motifs conservados no ITS1 foram descritos por Liu e Schardl (1994) e também para o gene 5,8S de acordo com Harpke e Peterson (2008). Acredita-se que a configuração do espaçador ITS2 apresenta uma estrutura secundária muito conservada nas plantas com flores e compartilhada com algas verdes. (MAI & COLEMAN, 1997). Com o objetivo de se prever as estruturas secundárias das moléculas, a região ITS2 dos haplótipos pode ser comparada e modelada com estruturas da região de espécies conhecidas (WOLF et al., 2005). Assim no presente estudo foram obtidos 292 clones da região ITS (ITS1,

5,8S e ITS2) de diferentes indivíduos de diferentes populações de *Utricularia gibba* L. Nesse contexto, os principais objetivos foram: (i) testar se há variações intragenômicas (nos mesmos indivíduos), intrapopulacionais (em diferentes indivíduos das mesmas populações) e intraespecíficas (com a comparação de diferentes populações) na região ITS de *U. gibba*, assumindo como premissa a existência da evolução em concerto; (ii) inferir a funcionalidade das regiões ITS1, 5,8S e ITS2 e (iii) discutir sobre as implicações do emprego da região ITS nas análises filogenéticas e filogeográficas.

6. CONCLUSÕES

-Evidenciou-se evolução em concerto incompleta pelas variações intragenômicas, interpopulacionais e intraespecíficas no DNA ribossomal de *Utricularia gibba* com a presença de elevada proporção de cópias parálogas da região ITS.

-Inferiu-se que todas as cópias dos espaçadores ITS1 e ITS2 e do gene 5,8S encontradas nas diferentes cópias são funcionais, sejam intragenômicas, inter ou intrapopulacionais.

-Evidenciou-se que as cópias da região ITS do mesmo indivíduo são polifiléticas e há haplótipos compartilhados por indivíduos de populações diferentes.

-Os espaçadores ITS1 e ITS2, mesmo apresentando taxas mutacionais diferentes e regiões conservadas próprias, mantêm o caráter informativo nas análises de hipóteses filogenéticas e filogeográficas.

-Mostrou-se a necessidade da implementação de estratégias de prospecção, como a clonagem devido a possíveis erros na interpretação dos eletroferogramas produzido por sequenciamento direto.

7.REFERÊNCIAS

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

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

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W., MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of molecular biology**, v.215, n. 3, p. 403-410, 1990.

ALVAREZ, I.; WENDEL, J.F. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Mol. Phylogenet. Evol.* v.29, p. 417–434, 2003.

ARNHEIM, N.; KRYSTAL, M.; SCHMICKEL, R.; WILSON, G.; RYDER, O.; ZIMMER, E. Molecular evidence for genetic exchanges among ribosomal genes on nonhomologous chromosomes in man and apes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, V.77, n.12, p. 7323-7327,1980.

BAILEY, C. D.; CARR, T. G.; HARRIS, S. A.; HUGHES, C. E. Characterization of angiosperm nrDNA polymorphism, paralogy, and pseudogenes. **Molecular phylogenetics and evolution**, v.29, n.3, p.435-455,2003.

BALDWIN, B. G.; SANDERSON, M. J.; PORTER, J. M.; WOJCIECHOWSKI, M. F.; CAMPBELL, C. S.; DONOGHUE, M. J. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, 247-277,1995.

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

BIRNBOIM, H; DOLY, J.. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucl. Acids Res.** v.7, p. 1513-1523, 1979

BROSIUS, J.; DULL,T; SLEETER, D; NOLLER, H.. Gene organization and primary structure of ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. **J. Mol. Biol.**, v.148, p.107-127, 1981.

BUCKLER, E.S.; HOLTSFORD, T.P. Zea ribosomal repeat evolution and mutation patterns. **Mol. Biol. Evol.** v.13, p.623–632,1996a

BUCKLER, E.S.; HOLTSFORD, T.P. Zea systematics: ribosomal ITS evidence. **Mol. Biol. Evol.** v.13, p.612–622, 1996b.

BUCKLER, E.S.; IPPOLITO, A.; HOLTSFORD, T.P.The evolution of ribosomal DNA: divergent paralogues and phylogenetic implications. **Genetics** v.145, p.821–832, 1997.

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

CHILDS, G.; MAXSON, R.; COHN, R. H.; KEDES, L. Orphans: dispersed genetic elements derived from tandem repetitive genes of eucaryotes. **Cell** v.23, n.3, p.651-663,1981.

CÔTÉ, C. A.; GREER, C. L.; PECULIS, B. A. Dynamic conformational model for the role of ITS2 in pre-rRNA processing in yeast. **Rna**, v.8, n.6, p.786-797,2002.

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

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

DUBCOVSKY, J.; DVORÁK, J. Ribosomal RNA multigene loci: nomads of the Triticeae genomes. **Genetics**, v.140, n.4, p.1367-1377, 1995.

FU, Y.; LI, W.. Statistical tests of neutrality of mutations. **Genetics**, v. 133, n. 3, p. 693–709. 1993.

LYONS, E; FREELING, M. How to usefully compare homologous plant genes and chromosomes as DNA sequences. **The Plant Journal**, v.53, n.4, p. 661-673, 2008

GOEL, S.; RAINA, S; OGIHARA, Y. Molecular evolution and phylogenetic implications of internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA in the Phaseolus-Vigna Complex. **Mol. Phyl. Evol.** v.22, p.1-19. 2002.

GREILHUBER, J.; BORSCH, T.; MÜLLER, K.; WORBERG, A.; POREMBSKI, S.; BARTHLOTT, W. Smallest angiosperm genomes found in Lentibulariaceae, with chromosomes of bacterial size. **Plant Biology**, v.8, n.06, p.770-777,2006.

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

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

HARPKE, D.; PETERSON, A. Non-concerted ITS evolution in Mammillaria (Cactaceae). **Mol. Phylogenet. Evol.** 41, 579–593, 2006.

HERSHKOVITZ, M. A.; ZIMMER, E. A. Conservation patterns in angiosperm rDNA ITS2 sequences. **Nucleic acids research**,v.24, n.15, p.2857-2867,1996.

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

HODAČ, L.; SCHEBEN, A. P.; HOJSGAARD, D.; PAUN, O.; HÖRANDL, E. ITS polymorphisms shed light on hybrid evolution in apomictic plants: A case study on the *Ranunculus auricomus* complex. **PloS one**, v. 9, n.7, p. e103003, 2014.

HOFMAN, J.; LAU, R.; DOOLITTLE, W. The number, physical organization and transcription of ribosomal RNA cistrons in an archaebacterium: *Halobacterium halobium*. **Nucleic acids res.**, v.7, p.1321-1333, 1979.

HŘIBOVÁ, E.; ČÍŽKOVÁ, J.; CHRISTELOVÁ, P.; TAUDIEN, S.; DE LANGHE, E.; DOLEŽEL, J. The ITS1-5.8 S-ITS2 sequence region in the Musaceae: structure, diversity and use in molecular phylogeny. **PLoS One**, v.6, n.3, p.e17863, 2011.

HUELSENBECK, J. P.; RONQUIST, F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. **Bioinformatics**, v. 17, p. 754–755, 2001.

IBARRA-LACLETTE, E.; ALBERT, V. A.; HERRERA-ESTRELLA, A.; HERRERA-ESTRELLA, L. Is GC bias in the nuclear genome of the carnivorous plant *Utricularia* driven by ROS-based mutation and biased gene conversion?. **Plant signaling & behavior**, v.6, n.11, p.1631-1634, 2011a.

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

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

JOBSON, R.W.; ALBERT, V.A. Molecular rates parallel diversification contrasts between carnivorous plant sister lineages¹. **Cladistics**, v. 18, n. 2, p. 127-136, 2002

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

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**, Tokyo, v. 119, p. 357-362, 2006.

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

KONDO, K. Chromosome numbers of some angiosperms in the United States. **Fyton**, v.29, n.1-2, p.55-58, 1972.

KRÓL, E.; PŁACHNO, B. J.; ADAMEC, L.; STOLARZ, M.; DZIUBIŃSKA, H.; TRĘBACZ, K. Quite a few reasons for calling carnivores 'the most wonderful plants in the world'. **Annals of Botany**, v.109, n.1, 47-64, 2012.

LIAO, D. Concerted evolution: molecular mechanisms and biological implications. *Am. J. Hum. Genet.* v.64, p.24-30, 1999.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v. 5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, v. 25, p. 1451–1452. 2009.

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

LIU, J. S.; SCHARDL, C. L. A conserved sequence in internal transcribed spacer 1 of plant nuclear rRNA genes. **Plant molecular biology**, v.26, n.2, p.775-778, 1994.

MAI, J.C.; COLEMAN, A.W. The internal transcribed spacer 2 exhibits a common secondary structure in green algae and flowering plants. **J. Mol. Evol.** v.44, p.258–271. 1997.

MAYOL, M.; ROSSELLÓ, J.A. Why nuclear ribosomal DNA spacers (ITS) tell different stories in *Quercus*. **Mol. Phylogenet. Evol.** v.19, p.167–176, 2001.

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

MICHAEL, T.; JACKSON, S. The first 50 plant genomes. **The Plant Genome**, v.6, n.2, 2013.

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

MUIR, G.; FLEMING, C.; SCHLÖTTERER, C. Three divergent rDNA clusters predate the species divergence in *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. and *Quercus robur* L. **Molecular Biology and Evolution**, v.18, n.2, p.112-119, 2001.

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

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

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

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

MUSTERS, W.; BOON, K.; VAN DER SANDE, C. A.; VAN HEERIKHUIZEN, H.; PLANTA, R. J. Functional analysis of transcribed spacers of yeast ribosomal DNA. **The EMBO journal**, v.9, n.12, p.3989, 1990.

NAGYLAKI, T. The evolution of multigene families under intrachromosomal gene conversion. **Genetics**, v.106, p.529–548, 1984.

NAWROCKI, E. P.; BURGE, S. W.; BATEMAN, A.; DAUB, J.; EBERHARDT, R. Y.; EDDY, S. R.; FINN, R. D.. Rfam 12.0: updates to the RNA families database. **Nucleic acids research**, gku1063, 2014.

OCHIENG, J. W.; HENRY, R. J.; BAVERSTOCK, P. R.; STEANE, D. A.; SHEPHERD, M. Nuclear ribosomal pseudogenes resolve a corroborated monophyly of the eucalypt genus *Corymbia* despite misleading hypotheses at functional ITS paralogs. **Molecular phylogenetics and evolution**, v.44, n.2, p.752-764, 2007.

RAZAFIMANDIMBISON, S. G.; KELLOGG, E. A.; BREMER, B. Recent origin and phylogenetic utility of divergent ITS putative pseudogenes: a case study from Naucleaeae (Rubiaceae). **Systematic Biology**, v.53, n.2, p.177-192, 2004.

ROSSELLO, J. A.; LAZARO, A., COSÍN, R.; MOLINS, A. A phylogeographic split in *Buxus balearica* (Buxaceae) as evidenced by nuclear ribosomal markers: when ITS paralogues are welcome. **Journal of Molecular Evolution**, v.64, n.2, p.143-157, 2007.

SAMBROOK, J; RUSSELL, D.,Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd ed. **New York: Cold Spring Harbor**.250p, 2001.

SONE, T.; FUJISAWA, M.; TAKENAKA, M.; NAKAGAWA, S.; YAMAOKA, S.; SAKAIDA, M.; FUKUZAWA, H. Bryophyte 5S rDNA was inserted into 45S rDNA repeat units after the divergence from higher land plants. **Plant molecular biology**, v.41, n.5, p.679-685,1999.

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

SUGIURA, N. Further analysis of the data by Akaike's Information Criterion and the finite corrections. **Communications in Statistics, Theory and Methods** v.7, p13–26, 1978

SUH, Y.; THIEN, L. B.; REEVE, H. E.; ZIMMER, E. A. Molecular evolution and phylogenetic implications of internal transcribed spacer sequences of ribosomal DNA in Winteraceae. **American Journal of Botany**, p.1042-1055,1993.

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

TAJIMA, F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics**, v. 123, n. 3, p. 585–95, 1989.

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

VAN NUES, R. W.; RIENTJES, J. M.; VAN DER SANDE, C. A.; ZERP, S. F.; SLUITER, C.; VENEMA, J.; RAUÉ, H. A. Separate structural elements within internal transcribed spacer 1 of *Saccharomyces cerevisiae* precursor ribosomal RNA direct the formation of 17S and 26S rRNA. **Nucleic Acids Research**, v.22, n.6, p.912-919, 1994.

VAN DER SANDE, C. A.; KWA, M.; VAN NUES, R. W.; VAN HEERIKHUIZEN, H.; RAUÉ, H. A.; PLANTA, R. J. Functional analysis of internal transcribed spacer 2 of *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal DNA. **Journal of molecular biology**, v.223, n.4, p.899-910,1992.

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

WEI, X., WANG, Q, Recolonization and radiation in *Larix* (Pinaceae), evidence from nuclear ribosomal DNA paralogs. **Mol. Ecol.**, v.13, p. 3115–3123, 2004.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S. J. W. T.; TAYLOR, J. W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. **PCR protocols: a guide to methods and applications**, v.18, n.1, p.315-322,1990.

WOLF, M.; ACHTZIGER, M.; SCHULTZ, J.; DANDEKAR, T.; MÜLLER, T. Homology modeling revealed more than 20,000 rRNA internal transcribed spacer 2 (ITS2) secondary structures. **RNA** v.11, p.1616-1623, 2005:

XIAO, L.; MÖLLER, M.; ZHU, H. High nrDNA ITS polymorphism in the ancient extant seed plant *Cycas*: Incomplete concerted evolution and the origin of pseudogenes. **Mol Phylogenet Evol**, v.55, p.168–177, 2010.

XU, J., XU, Y.; YONEZAWA, T.; LI, L.; HASEGAWA, M.; LU, F.; ZHANG, W. Polymorphism and evolution of ribosomal DNA in tea (*Camellia sinensis*, Theaceae). **Molecular phylogenetics and evolution**, v.89, p.63-72, 2015.

ZHENG, X.Y.; CAI, D.Y.; YAO, L.H.; TENG, Y.W. Non-concerted ITS evolution, early origin and phylogenetic utility of ITS pseudogenes in *Pyrus*. **Mol. Phylogenet. Evol.** v.48, p.892–903, 2008.

ZIMMER, E.; MARTIN, S.; BEVERLEY, S.; KAN, Y.; WILSON, A. Rapid duplication and loss of genes coding for the alphachains of hemoglobin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.77, p.2158–2162, 1980.