



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL



O USO DE MARCADORES MOLECULARES NA DELIMITAÇÃO DE ESPÉCIES DO GÊNERO

***PUNCTELIA* (*PARMELIACEAE, ASCOMYCOTA LIQUENIZADOS*)**

LUCIANA VICENTE DA SILVA

ORIENTADORA: ALINE PEDROSO LORENZ LEMKE

COORIENTADORA: LUCIANA DA SILVA CANÊZ

CAMPO GRANDE, MARÇO DE 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

**O USO DE MARCADORES MOLECULARES NA DELIMITAÇÃO DE ESPÉCIES DO GÊNERO
PUNCTELIA (*PARMELIACEAE, ASCOMYCOTA LIQUENIZADOS*)**

“DISSERTAÇÃO APRESENTADA COMO UM DOS
REQUISITOS PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE
MESTRE EM BIOLOGIA VEGETAL JUNTO AO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA DO CENTRO DE
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE”

CAMPO GRANDE, MARÇO DE 2014

ÍNDICE

RESUMO.....	01
INTRODUÇÃO.....	02
FUNGOS LIQUENIZADOS.....	02
SISTEMÁTICA.....	05
GENÉTICA E EVOLUÇÃO.....	06
DISTRIBUIÇÃO	09
<i>PARMELIACEAE E PUNCTELIA</i>	11
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	15
NORMAS DA REVISTA	22
ARTIGO: O USO DE MARCADORES MOLECULARES NA DELIMITAÇÃO DE ESPÉCIES DO GÊNERO <i>PUNCTELIA</i> (<i>PARMELIACEAE</i> , ASCOMYCOTA LIQUENIZADOS)	26
RESUMO	26
INTRODUÇÃO	27
MATERIAL E MÉTODOS	29
AMOSTRAGEM E IDENTIFICAÇÃO	29
EXTRAÇÃO DE DNA, AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO	30
ANÁLISES FILOGENÉTICAS	31
ANÁLISES DE DISTÂNCIA	32
RESULTADOS	33
DISCUSSÃO	36
AGRADECIMENTOS	40

LITERATURA CITADA	41
CONSIDERAÇÕES FINAIS	60

*“As coisas são semelhantes: Isso torna a Ciência possível; as coisas
são diferentes: isto torna a Ciência necessária.”*

(Levins & Lewontin, 1985)

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao programa Reuni-CAPES pela bolsa de mestrado.

Ao Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxilio financeiro do, como parte do projeto “Levantamento florístico e filogenia molecular das espécies brasileiras de *Punctelia* (Parmeliaceae, *Ascomycota* Liqueñizados)”. Ao Programa de Pós- Graduação em Biologia Vegetal.

À minha orientadora, Dra. Aline Pedroso Lorenz Lemke, pela oportunidade de desenvolver este trabalho, por estimular meu crescimento profissional e pessoal além dos conselhos sobre a vida acadêmica. À minha coorientadora, Dra. Luciana da Silva Canêz, também pela oportunidade de desenvolver este trabalho, por compartilhar seus conhecimentos sobre o gênero *Punctelia* e pelas puxadas de orelhas nos detalhes mais minuciosos.

Ao Dr. Adriano Afonso Spielmann, pelas coletas realizadas, por compartilhar seu laboratório e pelas dicas sobre os liquens. À Dra. Neli Kika Honda, por compartilhar seus conhecimentos sobre a química dos liquens e por disponibilizar seu laboratório para nossas análises.

À Ana Letícia Simal Dourado e ao Pedro Henrique Ruppel de Medeiros, por terem participado do projeto e divido momentos de empolgação e incertezas. Aos Lebianos, pelos cafés, reuniões sobre os PCRs, discussões acadêmicas e auxílios laboratoriais. Principalmente ao Wellington Fava (Weg) por ter o caderno de laboratório mais prestativo de todos.

À minha mãe Vera Lúcia Vicente Silva e ao meu pai José Antonio da Silva Neto, por todo amor, confiança, apoio e longos telefonemas. Ao Gabriel Paganini Faggioni meu querido companheiro que tanto me ajudou durante todo o mestrado, por todos os conselhos, longas discussões filosóficas, pelas conversas sobre o trabalho, pela revisão do texto, por todo o amor e carinho. Aos meus amigos, que são como a minha família em Campo Grande.

A todos vocês, muito obrigada!!!!

Luciana Vicente da Silva

Resumo

A identificação do limite entre espécies diferentes é fundamental para descrever clados filogeneticamente relacionados e suas histórias evolutivas. O gênero *Punctelia* com cerca de 50 espécies, possui distribuição cosmopolita e centros de diversidade localizados na América do Sul e na África, para o Brasil são citadas 38 espécies. Com o objetivo de auxiliar na delimitação de espécies de *Punctelia* usamos marcadores moleculares para avaliar as relações filogenéticas e as distâncias genéticas intraespecíficas e interespecíficas. A maior parte dos clados detectados nas análises filogenéticas foi congruente com a delimitação baseada na morfologia/química dos espécimes. Entretanto, alguns clados foram compostos por espécimes geneticamente similares, mas descritos como espécies diferentes devido a variações nas características dos propágulos vegetativos e na composição química. As distâncias genéticas intraespecíficas e interespecíficas foram significativamente diferentes, apesar de apresentar sobreposição nas distribuições dos valores esta foi constituída de valores com baixa frequência. Neste trabalho podemos constatar que as distâncias genéticas podem ser usadas como ferramenta na delimitação das espécies de *Punctelia*, para identificar grupos e complexos de espécies a serem investigados, além de indicar quais caracteres morfológicos podem não refletir relações filogenéticas entre as espécies. Esta análise trata-se de uma primeira abordagem com um marcador, sendo que a distribuição, o número de espécies do gênero bem como as incertezas na delimitação em sua totalidade ainda é desconhecido.

Palavras-chaves: Brasil, distância genética, filogenia, ITS, liquens.

Introdução Geral

Fungos liquenizados

Os fungos que ocorrem na forma liquenizada são definidos como sendo uma associação simbiótica composta de um fungo (micobionte) e um organismo fotossintético (fotobionte) que pode ser uma alga e/ou cianobactéria (Nash, 2008). O talo ou corpo do líquen é formado quando as hifas do fungo envolvem os fotobiontes, formando o córtex e a medula. Na medula, as algas/bactérias encontram proteção contra dissecação e a luz excessiva, enquanto o fungo se alimenta dos açúcares produzidos pelo fotobionte durante a fotossíntese (Ahmadjian, 1993).

Os fungos liquenizados são usados muitas vezes como exemplos clássicos de mutualismo, em que os parceiros obtêm benefícios mútuos na associação. Porém, esta troca de benefícios parece ser desequilibrada, sendo considerada alternativamente como parasitismo controlado, em que o micobionte recebe a maior parte dos benefícios, enquanto que os indivíduos fotobiontes que ocorrem na forma liquenizada possuem desenvolvimento menor do que aqueles que ocorrem em vida livre (Ahmadjian, 1993).

Para que os fungos liquenizados possam expressar seu fenótipo simbótico é necessário que ocorra a associação do micobionte com o fotobionte específico (Honegger, 2001). Cerca de 40 gêneros de algas e cianobactérias apresentam associação simbiótica com fungos. Os três gêneros mais frequentemente encontrados como fotobiontes são: *Trebouxia* Puymaly (alga verde), *Trentepohlia* Martius (alga verde) e *Nostoc* Vaucher

ex Bornet & Flahault (cianobactéria) (Friedl & Büdel, 2008). Cerca de 98% dos fungos liquenizados pertencem ao filo Ascomycota e 2% ao filo Basidiomycota (Honegger, 2008).

A reprodução dos fungos liquenizados pode ocorrer através de propágulos vegetativos que contém uma pequena porção tanto do fotobionte como do micobionte, que podem ser isídios, sorédios e ou fragmentos do talo (Büdel & Scheidegger, 2008). Os propágulos vegetativos possuem a vantagem de dispersar ambos os parceiros da associação e o rápido estabelecimento do talo (Ott, 1987). Os ascomicetos liquenizados também possuem estruturas de frutificação para reprodução (sexuada e assexuada) de sua parte micobionte via esporulação, assim como nos fungos não liquenizados (Büdel & Scheidegger, 2008).

Os esporos possuem a vantagem de serem menores que os propágulos e, portanto mais suscetíveis a dispersarem por longas distâncias, estes também são produzidos em grandes quantidades com investimento metabólico menor do que os propágulos vegetativos (Seymour *et al.*, 2005). Os esporos sexuais podem ser preferidos durante a reprodução, pois são mais resistentes às condições ambientais, permanecem protegidos no apotécio até que as condições ambientais sejam favoráveis (Dyer *et al.*, 2001) e atuam na manutenção da diversidade genética das populações (Seymour *et al.*, 2005).

Na reprodução por esporulação ambos os parceiros (fotobionte e micobionte) específicos precisam se encontrar na natureza para formação do talo (Honegger, 2008). Ott (1987), partindo do pressuposto da escassez de fotobiontes em vida livre principalmente do gênero *Trebouxia*, descreveu estratégias usadas por *Xanthoria parietina* (L.) Th. Fr. para obtenção do fotobionte específico durante o desenvolvimento inicial do

talo, como a utilização de fotobiontes não específicos nos estágios iniciais até a obtenção do fotobionte específico, e o “roubo” do fotobionte específico de outros fungos liquenizados das proximidades. No entanto, Sanders e Lücking (2002) em estudo das estratégias reprodutivas e desenvolvimento de liquens folícolas, confirmaram a abundância de fotobiontes em vida livre, inclusive do gênero *Trebouxia*. Também foi observado que durante o início do crescimento, o fungo lança suas hifas até o encontro do fotobionte adequado e que um talo líquênico pode conter fotobiontes geneticamente diferentes (Sanders & Lücking, 2002).

As atividades fisiológicas dos liquens estão estritamente relacionadas à umidade, já que o período de atividade fotossintética ocorre quando o córtex superior do talo do líquen encontra-se úmido e delgado, permitindo a passagem da luz. Portanto, liquens que crescem em áreas úmidas apresentam taxa de crescimento maior e tempo de geração mais curto o que está associado a taxas evolucionárias aceleradas (Lumbsch *et al.*, 2008). As regiões tropicais favorecem o surgimento de novas espécies de liquens, através da radiação adaptativa, pois o clima tropical faz com que a taxa fotossintética seja maior e consequentemente suas taxas evolucionárias aceleradas, diferindo de liquens de regiões áridas, que possuem taxas mais lentas e menor número de espécies (Lumbsch *et al.*, 2008).

A dependência de umidade também é relatada por Crespo & al. (2004) em estudo com o gênero *Punctelia* Krog (Parmeliaceae), onde *Punctelia borreri* (Sm) Krog, espécie de ocorrência comum em regiões costeiras da Península Ibérica, foi relatada pela primeira vez no interior seco de Madri. A principal explicação encontrada foi que, a irrigação do

| Parque Del Oeste, que se iniciou em 1999, mantém um microclima capaz de sustentar a presença dessas espécies.

Sistemática

Somente na última década do século XX os esforços em superar a inconsistência filogenética da divisão artificial entre "liquens e fungos" foi bem sucedida, e os fungos liquenizados passaram a ser classificados junto com os fungos (Tehler & Wedin, 2008). Como o processo de liquenização ocorreu várias vezes durante o processo evolutivo dos fungos, estes organismos formam um grupo polifilético (Büdel & Scheidegger, 2008).

A coevolução de algas e fungos gerou variações morfológicas e metabólitos secundários que são utilizados em sua taxonomia. O exterior do corpo do líquen é constituído principalmente pelo micobionte. Sendo assim, as características fenotípicas usadas em sua classificação são referentes ao fungo (Büdel & Scheidegger, 2008). Da mesma forma, quando sua classificação é baseada em filogenias moleculares, esta se refere à análise das sequências de DNA do micobionte (Fahselt, 2008).

Muitos caracteres morfológicos são utilizados para demonstrar a relação natural que existe entre os grupos de fungos liquenizados. Hafellner (1984) descreveu o ápice do asco como sendo invariável dentro de categorias taxonômicas como famílias e gêneros. Consequentemente, o tipo de asco se tornou muito aceito para distinção de grandes grupos principalmente dentro da Ordem Lecanulares. Atualmente, um conjunto de características é utilizado na identificação das famílias, gêneros e espécies como: compostos químicos, morfologia do talo, forma e tamanho dos conídios, forma e tamanho dos ascos e marcadores moleculares.

O uso de análises químicas também é considerado um método eficaz de identificação de espécies de fungos liquenizados. Os metabólitos secundários produzidos por esses organismos são quase que exclusivos de determinado grupo, que aliados aos dados morfológicos, conduzem a uma identificação mais precisa (Honda & Vilegas, 1999). São conhecidos mais de 700 metabolitos secundários de fungos liquenizados (Huneck, 1999; Dembitsky & Tolsikov, 2005). Os metabólitos secundários são produzidos pelo fungo a partir dos compostos orgânicos fornecidos pelo fotobionte. Essas substâncias são empregadas pelo líquen na devesa contra predadores, radiação solar e agentes causadores de doenças. Os metabólitos secundários também são reconhecidos pela indústria farmacêutica devido ao seu valor medicinal, como por exemplo, o ácido úsnico que possui atividade antibiótica e antitumoral (Elix & Stocker-Wörgötter, 2008).

Genética e evolução

A diversidade genética entre os indivíduos se origina das mutações as quais se acumulam em taxas muito baixas através das gerações. As mutações, a seleção natural e a deriva genética são alguns dos processos microevolutivos que operam nos processos de especiação dos organismos (Avise *et al.*, 1987). Quando estas mutações ocorrem em uma região codificante do DNA, podem afetar caracteres de valor adaptativo que atuam para eliminar ou aumentar e dispersar novos alelos (Frankham *et al.*, 2008). As mutações que ocorrem em regiões não codificantes são importantes como marcadores moleculares neutros que fornecem informações sobre as diferenças genéticas históricas entre espécies, populações ou indivíduos (Frankham *et al.* 2008).

A delimitação de espécies pela taxonomia clássica utiliza características morfológicas que são comuns entre os espécimes de uma espécie e diferentes das espécies relacionadas (Ridley, 2004). Entretanto, em populações naturais, nem todos os caracteres estarão presentes em todos os indivíduos da espécie e nem totalmente ausentes em outras espécies (Ridley, 2004). A distinção das espécies de fungos liquenizados tradicionalmente é feita com base em caracteres morfológicos, origem geográfica e metabólitos secundários (Molina *et al.*, 2004). Com base nessas características, populações alopátricas de fungos liquenizados foram nomeadas como espécies distintas mesmo com pouca ou nenhuma diferença aparente (Molina *et al.*, 2004). O conceito químico de espécie também já foi amplamente aplicado na distinção de espécies de liquens, especialmente entre 1960 e 1970 (Culberson, 1986). Este conceito assume a falta de variação química em indivíduos de uma mesma espécie. Porém, em muitos grupos aceita-se considerável variação intraespecífica. Portanto, quando aplicada sozinha, a caracterização química não é eficiente para a identificação de espécies de fungos liquenizados, mas pode ser usada *a posteriori* na descrição de espécies (Lumbsch, 1998).

A delimitação das espécies de fungos liquenizados através de caracteres morfológicos, assim como na maioria dos organismos, apresenta dificuldade em encontrar caracteres adequados para estimar a variação intraespecífica e interespecífica (Lumbsch & Leavitt, 2011). Para a obtenção de avaliações mais robustas na delimitação de espécies e de suas relações filogenéticas, pesquisadores da área têm utilizado vários tipos de inferências, especialmente a análise de marcadores moleculares (Lumbsch & Leavitt, 2011).

Os avanços nas tecnologias de análises moleculares propiciaram a geração de uma grande quantidade de dados genéticos. Estas informações, quando em níveis populacionais, podem ser utilizadas para delimitar espécies através do conceito filogenético. Nixon e Wheeler (1990) definiram espécie como “a menor agregação de populações (reprodução sexuada) ou linhagens (reprodução assexuada) diagnosticada por única combinação de estados de caráter em indivíduos comparáveis”, considerando a monofilia entre os indivíduos com base em suas características genéticas. Cada vez mais, o conceito filogenético de espécie com base em caracteres moleculares está sendo empregado para delimitação específica em liquens. Esta abordagem permite identificar *a posteriori* quais características fenotípicas são melhores na delimitação das espécies, e rastrear o surgimento de diferentes características ao longo da história evolutiva dos liquens (Grube & Kroken, 2000).

A utilização de medidas de distância genética é um método objetivo que pode auxiliar na compreensão das fronteiras entre as espécies de fungos liquenizados. Nesta abordagem, a delimitação das espécies baseia-se na diferenciação entre variação intraespecífica e interespecífica, estabelecendo valores limites entre os grupos monofiléticos. Estes valores devem ser somados às características morfológicas e químicas para a melhor compreensão das relações filogenéticas entre as espécies (Del-Prado *et al.*, 2010).

Entre os marcadores moleculares mais utilizados em estudos filogenéticos de liquens, destacam-se o gene que codifica a subunidade menor do DNA ribossomal mitocondrial (SSU, do inglês *mitochondrial small subunit*) e os espaçadores internos

transcritos do DNA ribossomal nuclear (ITS, do inglês *internal transcribed spacer*). Estes marcadores têm sido amplamente explorados em estudos da família Parmeliaceae (Crespo *et al.*, 2001; Crespo *et al.*, 1999). Em trabalho realizado com sequencias de ITS de sete gêneros de Parmeliaceae como modelo, Del-Prado e cols. (2010) verificaram que as distâncias genéticas intraespecíficas e interespecíficas foram estatisticamente diferentes, com poucos casos de sobreposição. Portanto, como este marcador possui variação bem delimitada, ele é adequado para delimitação de espécies de fungos liquenizados parmelíoides.

O marcador ITS tem sido amplamente sequenciado e sugerido como DNA *barcode* para a identificação de fungos (Schoch, 2012). Esta abordagem pode auxiliar na compreensão de grupos complexos em que a identificação é baseada em diferenças morfológicas difíceis de discernir ou em casos que possa faltar características importantes na distinção das espécies, como em indivíduos muito jovens ou de coletas antigas (Kelly, 2011). O DNA *barcoding* é uma ferramenta taxonômica que possui um banco de dados disponibilizado, onde são depositadas sequências de referência de espécies identificadas a partir de caracteres morfológicos que se tornam referência para outros pesquisadores (Kelly, 2011).

Distribuição

Os fungos liquenizados são organismos que ocorrem em todos os ambientes terrestres. Seus táxons demonstram distintos padrões de distribuição, que podem variar desde espécies cosmopolitas até endêmicas de áreas restritas (Galloway, 2008). A

vicariância e a dispersão são fatores fundamentais que auxiliam no entendimento dos padrões de distribuição dos organismos e quais os mecanismos que geraram estes padrões (Galloway, 2008). Devido a sua ampla distribuição, as disjunções continentais são muito frequentes em fungos liquenizados e podem apresentar todos os tipos possíveis de disjunções continentais, como por exemplo, entre Europa - América do Norte, América do Norte - Japão e América do Sul – África (De Paz *et al.* 2011).

A distribuição global dos liquens foi discutida por De Paz & al. (2011), foram estimados os tempos de divergência entre os eventos de dispersão à longa distância, usando três regiões do DNA com taxas evolutivas diferentes para explicar a atual distribuição dos liquens parmelíoides. Os resultados mostraram que a radiação dos gêneros ocorreu durante o Paleogeno (65 - 53 milhões de anos atrás, Ma) e possivelmente está relacionada a mudanças climáticas globais. A separação dos continentes ocorreu a cerca de 100 Ma, ou seja, antes da origem dos principais clados, o que descarta a hipótese de vicariância para a maioria dos grupos (De Paz *et al.* 2011). Portanto, eventos de dispersão de longa distância (intercontinentais) podem ter gerado os padrões de distribuição biogeográfica dos liquens parmelíoides com ocorrência no hemisfério sul, África e Austrália. Porém, para aquelas espécies com ocorrência na América do Sul, Antártica e Austrália, eventos de vicariância não podem ser descartados, pois essas massas continentais se separaram ca. 52 - 35 Ma.

Parmeliaceae e Punctelia

Os fungos liquenizados ascomicetos são classificados em cerca de 60 ordens, sendo que a maioria pertence à Lecanorales, que compreende 20 famílias (Thell *et al.*, 2012). *Parmeliaceae* possui 88 gêneros e 2.489 espécies representando uma grande família dentro de Lecanorales (Kirk *et al.*, 2008). A descrição da família é baseada principalmente na ontogenia do ascoma e anatomia *copular exciple* (revestimento exterior do apotécio em forma de taça) (Henssen *et al.*, 1973), sendo o principal caráter utilizado para unir a família até hoje (Crespo *et al.*, 2007). Dentro da família, podem ser distinguidos seis principais grupos monofiléticos de acordo com morfologia do talo, sendo: alectorioide, cetrarioide, hipogimnioide, letarioide, parmelioide, psiloparmelioide (Crespo *et al.*, 2007).

O clado parmelioide é composto de fungos liquenizados foliosos, muitas vezes aderido ao substrato, que possuem apotécios laminais e picnídios (Thell *et al.*, 2012). É o grupo que contém o maior número de gêneros dentro de *Parmeliaceae* (Crespo *et al.*, 2007). A relação e a divisão dos gêneros desse grupo têm sido amplamente investigadas através de análises química, morfológica e molecular (Blanco et al. 2006; Crespo *et al.*, 2007; Lumbsch *et al.*, 2008; Crespo *et al.*, 2010; De Paz *et al.*, 2011). Entre os gêneros recentemente estudados podemos destacar *Punctelia* (Aptroot, 2003; Crespo *et al.*, 2004; Thell *et al.*, 2005; Lendemer & Hodkinson, 2010; Canêz & Marcelli, 2010) que possui distribuição cosmopolita e centros de diversificação na América do Sul e na África (Elix, 1993).

O gênero *Punctelia* (*Parmeliaceae*) compreende cerca de 50 espécies (Thell *et al.*, 2012). Dessas, 38 são citadas para o Brasil (Feuerer, 2007). As espécies do gênero são

caracterizadas por possuírem talo folioso de cor cinzenta, pseudocifelas puntiformes na superfície superior (Figura 1) e conídios unciformes e filiformes (Elix, 1993). Suas espécies se desenvolvem preferencialmente em substrato corticícola ou saxícola, e mais raramente muscícola. Recente foi realizada a revisão morfológica e florística do gênero *Punctelia*, com ênfase na região sul e sudeste do Brasil (Canêz, 2009). Além de revisar todas as espécies conhecidas para o gênero, neste trabalho foram descritas 20 espécies novas para a ciência. Não há um consenso entre os autores sobre o uso das características morfológicas de importância taxonômica em *Punctelia*, o que dificulta a compreensão das relações entre os táxons e a delimitação de espécies próximas (Canêz, 2009).

A análise química tem sido usada na identificação das espécies de *Punctelia*, sendo os testes mais usados, teste de coloração, a microcristalização e a cromatografia em camada delgada. Krog (1982) descreveu o gênero *Punctelia* com as seguintes características químicas: córtex apenas com atranorina e a medula com ácidos graxos, ácido lecanórico e/ou girofórico. A atranorina é facilmente identificada pela coloração esverdeada do talo e pela cor amarela com a aplicação de hidróxido de potássio no teste de coloração (Krog, 1982). Os ácidos lecanórico e girofórico apresentam a mesma coloração avermelhada com a aplicação de hipoclorito de sódio no teste de coloração (C+ e KC+ rosa), sendo necessário para identificá-los o uso da técnica de microcristalização (Huneck & Yoshimura, 1996). Na microcristalização, o ácido girofórico apresenta cristais de até 30 µm de tamanho, enquanto os cristais de ácido lecanórico variam de 200–300 µm (Canêz *et al.*, 2006).

Apesar da ampla distribuição de *Punctelia*, os estudos moleculares realizados com este gênero se concentram em espécimes coletados em regiões temperadas (Crespo *et al.*, 2004; Thell *et al.*, 2008; Lendemer & Hodkinson, 2010). O Brasil, recentemente apontado como um dos centros de diversidade do gênero oferece uma boa oportunidade para se estudar a história evolutiva de diferentes grupos de espécies de *Punctelia*. Neste trabalho, utilizamos sequências do DNA nuclear na delimitação de espécies de *Punctelia*, baseado em análises filogenéticas e de distância genética.

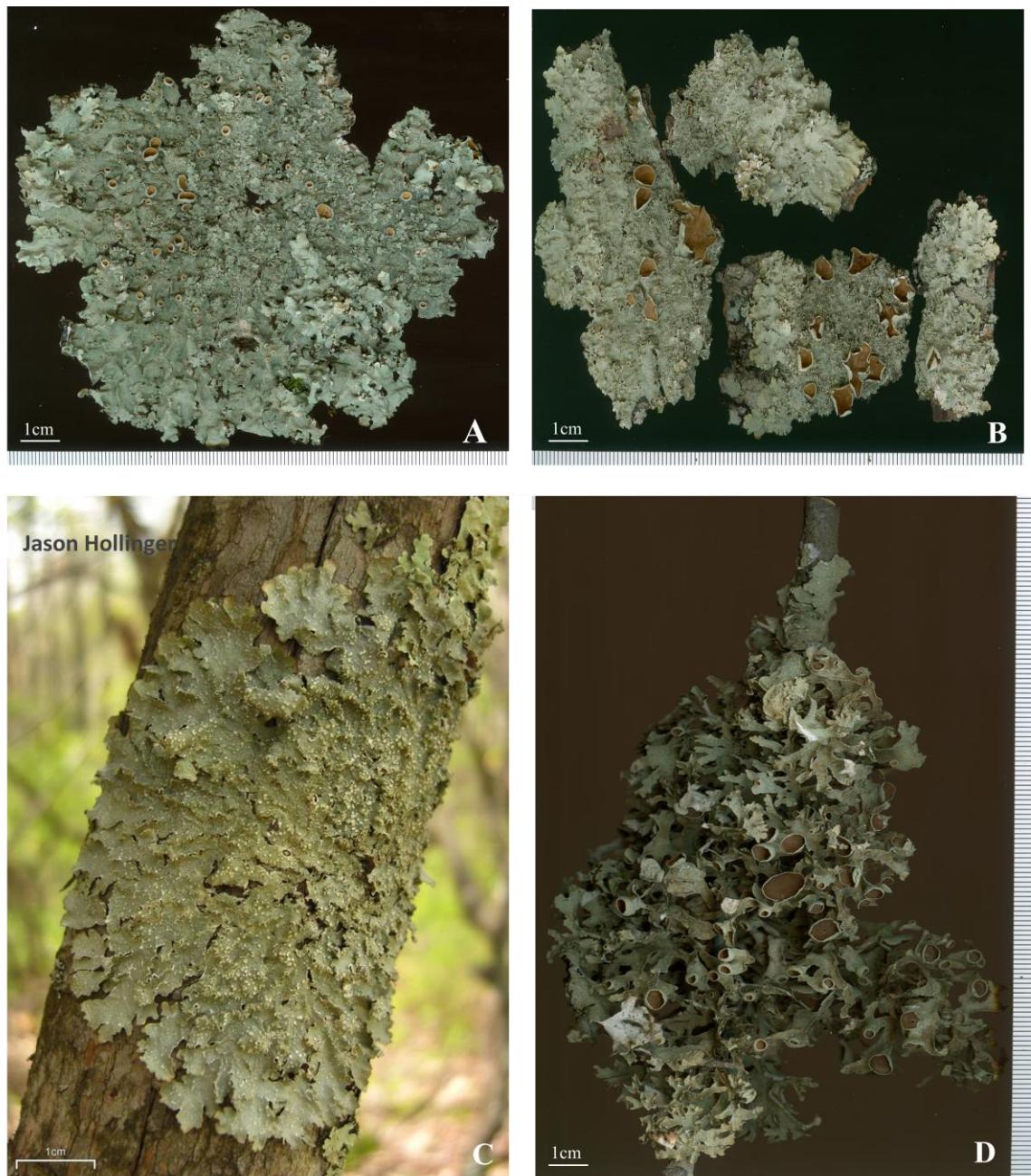


Figura 1- Exemplos da morfologia do talo de espécies de *Punctelia*. A – *P. subpraesignis*; B- *P. mirabilis*; C- *P. caseana* e D- *P. canaliculata*.

Referências Bibliográficas

- Ahmadjian, V. (1993). The lichen symbiosis. Wiley. EUA. 266p.
- Aptroot, A. (2003). A new perspective on the sorediate *Punctelia* (Parmeliaceae) species of North America. *Bryologist* 106: 317—319.
- Avise, J. C., Arnold, J., Ball, R. M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J. E., Reeb, C. A., Saunders, N. C. (1987). Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between populations genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: 489—522.
- Blanco, O., Crespo, A., Ree, R. H., Lumbsch, H. T. (2006). Major clades of parmelioid lichens (Parmeliaceae, Ascomycota) and the evolution of their morphological and chemical diversity. *Molecular phylogenetics and evolution* 39: 52—69.
- Büdel, B., Scheidegger, C. (2008). Thallus morphology and anatomy. Em: Lichen Biology, ed. T. H. Nash, pp. 40—68, Cambridge University Press, Cambridge.
- Canêz, L. S. (2009). Estudos taxonômicos em *Punctelia* (Parmeliaceae, Ascomycetes Liquenizados). Secretaria de Meio Ambiente do Estado de São Paulo, Instituto de Botânica.Tese de Doutorado, 274p.
- Canêz, L. S., Marcelli, M. (2010). The Punctelia microsticta-group (Parmeliaceae). *The Bryologist* 113: 728—738.
- Canêz, L. S., Marcelli, M. P. (2006). Gêneros de Parmeliaceae (Ascomycetes liquenizados) na localidade de Fazenda da Estrela, Vacaria, Rio Grande do Sul, Brasil. *Caderno de Pesquisa, Série Biologia* 18: 38—82.

Crespo, A., Blanco, O., Hawksworth, D. L. (2001). The potential of mitochondrial DNA for establishing phylogeny and stabilizing generic concepts in the parmelioid lichens. *Taxon* 50: 807—819.

Crespo, A., Divakar, P. K., Argueello, A., Gasca, C., Hawksworth, D. L. (2004). Molecular studies on *Punctelia* species of the Iberian Peninsula, with an emphasis on specimens newly colonizing Madrid. *The Lichenologist* 36: 299—308.

Crespo, A., Gavilán, R., Elix, J. A., Gutiérrez, G. (1999). A comparison of morphological, chemical and molecular characters in some parmelioid genera. *Lichenologist* 31: 451—460.

Crespo, A., Kauff, F., Divakar, P. K., Del-Prado, R., Pérez-Ortega, S., De Paz, G., Ferencova, Z., Blanco, O., Roca-Valiente, B., Núñes-Zapata, J., Cubas, P., Argüello, A., Elix, J. A., Esslinger, T. L., Hawksworth, D. L., Millanes, A., Molina, M. C., Wedin, M., Ahti, T., Aptroot, A., Barreno, E., Bungartz, L., Calvelo, S., Candan, M., Cole, M., Ertz, D., Goffinet, B., Lindblom, L., Lücking, R., Lutzoni, F., Mattsson, J-E., Messuti, M. I., Miadlikowska, J., Piercey-Normore, M., Rico, V. J., Sipman, H. J. M., Schmitt, I., Spribille, T., Thell, A., Thor, G., Upreti, D. K., Lumbsch, H. T. (2010). Phylogenetic generic classification of parmelioid lichens (Parmeliaceae, Ascomycota) based on molecular, morphological and chemical evidence. *Taxon* 59: 1735—1753.

Crespo, A., Lumbsch, H. T., Mattsson, J-E., Blanco, O., Divakar, P. K., Articus, K., Wiklund, E., Bawingan, P. A., Wedin, M. (2007). Testing morphology-based hypotheses of phylogenetic relationships in Parmeliaceae (Ascomycota) using three ribosomal markers and the nuclear *RPB1* gene. *Molecular phylogenetics and evolution* 44: 812—824.

- Culberson, W. L. (1986) Chemistry and sibling speciation in the lichen-forming fungi: ecological and biological considerations. *Bryologist* 89: 123–131.
- De Paz, G. A., Cubas, P., Divakar, P. K., Lumbsch, H. T., Crespo, A. (2011). Origin and diversification of major clades in parmelioid lichens (Parmeliaceae, Ascomycota) during the Paleogene inferred by Bayesian Analysis. *Plos One* 12: e28161.
- Del-Prado, R., Cubas, P., Lumbsch, H. T., Divakar P. K., Blanco, O., De Paz, G. A., Molina, M. C., Crespo, A. (2010) Genetic distances within and among species in monophyletic lineages of Parmeliaceae (*Ascomycota*) as a tool for taxon delimitation. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 56: 125—133.
- Dembitsky, V.M. and Tolstikov, G. A. (2005). Organic Metabolites of Lichens. Novosibirsk: Publishing House of SB RAS.
- Dyer, P. S., Murtagh, J., Crittenden, P. D. (2001). Use of RAPD-PCR DNA fingerprinting and vegetative incompatibility tests to investigate genetic variation within lichen-forming fungi. *Symbiosis* 31:213—229.
- Elix J. A., Stocker-wörgötter E. (2008). Biochemistry and secondary metabolites. Em: *Lichen Biology*, ed. T. H. Nash, pp.104—133. Cambridge University Press, Cambridge.
- Elix, J. A. (1993). Progress in the generic delimitation of *Parmelia sensu lato* lichens (Ascomycotina: Parmeliaceae) and a synoptic key to the Parmeliaceae. *The Bryologist* 96: 359—383.
- Fahselt, D. (2008) Individuals and populations of lichens. Em *Lichen Biology*, ed. T. H. Nash, pp.252—273. Cambridge University Press, Cambridge.

- Feuerer, T., Hawksworth, D. L. (2007). Biodiversity of lichens, including a world-wide analysis of checklist data based on Takhtajan's floristic regions. *Biodiversity and Conservation* 16: 85—98.
- Frankham, R., Ballou, J. D., Briscoe, D. A. (2008). Fundamentos da genética da conservação. Sociedade Brasileira de Genética, Estado de São Paulo. 280 p.
- Friedl, T., Büdel, B. (2008). Photobionts. Em: Lichen Biology, ed. T. H. Nash, pp.9—26. Cambridge University Press, Cambridge.
- Galloway, D. J. (2008). Lichen biogeography. Em: Lichen Biology, ed. T. H. Nash, pp.315—335. Cambridge University Press, Cambridge.
- Grube, M., Kroken, S. (2000). Molecular approaches and the concept of species and species complexes in lichenized fungi. *Mycological Research* 104: 1284—1294.
- Hafellner, J. (1984). Studien in Richtung einer natürlicheren Gliederung der Sammelfamilien Lecanoraceae und Lecideaceae. *Beihefte zur Nova Hedwigia* 79: 241—371.
- Henssen, A., Jahns, H. M., Santesson, J. (1973). Lichenes: eine Einführung in die Flechtenkunde. Georg Thieme Verlag Stuttgart. Alemanha. 467p.
- Honda, N. K., Vilegas, W. (1999). A química dos liquens. *Química Nova*, 21:110—125.
- Honegger, R. (2001). The symbiotic phenotype of lichen-forming ascomycetes. Em: Fungal Associations, Vol. IX: The Mycota, ed. B. Hock, pp.165—188. Springer, Berlin.
- Honegger, R. (2008). Mycobionts. Em: Lichen Biology, ed. T. H. Nash, pp.315—335. Cambridge University Press, Cambridge.
- Huneck, S. (1999). The significance of lichens and their metabolites. *Die Naturwissenschaften*, 86, 559—570.

- Huneck, S., Yoshimura, I. (1996). Identification of lichen substances. Springer. Alemania. 493p.
- Kelly, L. J., Hollingsworth, P. M., Coppins, B. J., Ellis, C. J., Harrold, P., Tosh, J., Yahr, R. (2011). DNA barcoding of lichenized fungi demonstrates high identification success in a floristic context. *New Phytologist* 191: 288—300.
- Kirk, P. M., Ainsworth, G. C. (2008). *Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi*. Cabi. Inglaterra. 771p.
- Krog, H. (1982). *Punctelia*, a new genus in the Parmeliaceae. *Nordic Journal of Botany* 2: 287—292.
- Lendemer, J. C., Hodkinson, B. P. (2010). A new perspective on *Punctelia subrudecta* (Parmeliaceae) in North America: previously rejected morphological characters corroborate molecular phylogenetic evidence and provide insight into an old problem. *The Lichenologist* 42: 405—412.
- Lumbsch, H. T. (1998). The use of metabolic data in lichenology at the species and subspecific levels. *The Lichenologist* 30: 357—367.
- Lumbsch, H. T., Hipp, A. L., Divakar, P. K., Blanco, O., Crespo, A. (2008). Accelerated evolutionary rates in tropical and oceanic parmeliod lichens (Ascomycota). *BMC evolutionary biology* 8: 257.
- Lumbsch, H. T., Leavitt, S. D. (2011). Goodbye morphology: a paradigm shift in the delimitation of species in lichenized fungi. *Fungal Diversity* 50: 59—72.
- Molina, M. D. C., Crespo, A., Blanco, O., Lumbsch, H. T., Hawksworth, D. L. (2004). Phylogenetic relationships and species concepts in *Parmelia s.str.* (Parmeliaceae) inferred from nuclear ITS rDNA and b-tubulin sequences. *Lichenologist* 36: 37—54.

- Nash, T. H. (2008). Lichen Biology. Cambridge University Press, Inglaterra. 498p.
- Nixon, K. C., Wheeler, Q. D. (1990). An amplification of the phylogenetic species concept. *Cladistics* 6: 211—223.
- Ott, S. (1987). Reproductive strategies in lichens. *Bibliotheca Lichenologica* 25: 81—93.
- Printzen, C. (2010). Lichen Systematics: The Role of Morphological and Molecular Data to Reconstruct Phylogenetic Relationships. *Progress in Botany* 71: 233—275.
- Ridley, M. (2004). Evolução. Artmed. Porto Alegre. 752p.
- Sanders, W. B., Lücking, R. (2002). Reproductive strategies, relichenization and thallus development observed in situ in leaf-dwelling lichen communities. *New Phytologist* 155: 425—435.
- Schoch, C.L., Seifert, K.A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J.L., Levesque, C.A., Chen, W.T., Consortium, F.B., 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 6241–6246.
- Seymour, F. A., Crittenden, P. D., Dickinson, M. J., Paoletti, M., Montiel, D., Cho, L., Dyer, P. S. (2005). Breeding systems in the lichen-forming fungal genus Cladonia. *Fungal Genetics and Biology*, 42: 554—563.
- Tehler, A., Wedin M. (2008). Systematics of lichenized fungi. Em: Lichen Biology, ed. T. H. Nash, pp.336—352. Cambridge University Press, Cambridge.
- Thell, A., Crespo, A., Divakar, P. K., Kärnefelt, I., Leavitt, S. D., Lumbsch H. T., Seaward, M. R. D. (2012). A review of the lichen family Parmeliaceae-history, phylogeny and current taxonomy. *Nordic Journal of Botany* 30: 641—664.

Thell, A., Herber, B., Aptroot, A., Adler, M. T., Feuerer, T., Kärnefelt, E. I. (2005). A preliminary phylogeographic study of *Flavopunctelia* and *Punctelia* inferred from rDNA ITS-sequences. *Folia Cryptogamica Estonica* 41: 115—121.

Normas da revista para onde o manuscrito deverá ser enviado

TAXON 63 (1) • February 2014: 231–234

Guidelines for authors

GUIDELINES FOR AUTHORS

Taxon publishes original papers and reviews dealing with the systematics in its widest sense of all groups of organisms covered by the *International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants*. Emphasis is on articles reporting new results with implications of general interest beyond the study group. *Taxon* also publishes papers on nomenclature, and on methodology, botanical history, biography, bibliography, and related subjects if these are of general interest.

Preference is given to integrative papers combining the results of modern analysis together with its consequences for classification. Authors are not encouraged to submit manuscripts including new classifications without underlying original (molecular, morphological, etc.) analyses. We discourage submission of monographs, revisions, and description of new species. Papers dealing with single species (e.g., phytogeographic or palaeobotanical studies) can only be published when they contain important new taxonomy or include aspects of particular evolutionary, biogeographic or biological interest. Sampling should be appropriate for the research questions and analytical methods in all cases. Phylogenetic studies should employ multiple, ideally independent, markers and adequately representative taxon sampling (e.g., avoiding unjustified geographic bias). Articles may be rejected without review.

Points of View

Two different types of contributions can be published:

(1) Challenging new ideas or comments on extant ones. Editorial requirements are the same as for Research articles, except that an abstract is not required. Tables, illustrations, and literature cited should be kept to a minimum, the ideal length of such contributions being 2–4 printed pages. Publication of dissenting or supporting views by others is encouraged.

(2) Short texts reflecting personal (or collective) opinions, which are not documented in detail and which would be inappropriate for a full article or the more newsy items in Plant Systematics World. There should be no tables and illustrations; literature cited should be kept to a minimum.

The decision about acceptance will be made by the Editor-in-Chief with or without review. Main criteria will be timeliness of the topic and interest to our readership.

Nomenclature

• **General nomenclature papers:** See *Taxon* 61: 245 (2012); http://www.iapt-taxon.org/downloads/evaluation_nomenclature.pdf for guidelines on the types of nomenclatural papers acceptable for *Taxon*.

• **Proposals to conserve or reject names:** See *Taxon* 61: 248–251 (2012); http://www.iapt-taxon.org/downloads/guidelines_proposals.pdf for guidelines on proposals to conserve or reject names.

• **Proposals to amend the International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants:** Proposals to amend the Code at the 2017 International Botanical Congress in Shenzhen, China will become acceptable for publication in *Taxon* from a date to be announced but probably in 2013. The timetable and regulations for such proposals along with points to note in making them will be published in *Taxon* and made available on the web around that time.

• **Requests for a binding decision** under the provisions of Art. 53.5 (whether names are sufficiently alike to be confused and are to be treated as homonyms) or of Art. 38.4 of the *Melbourne Code*

(whether a descriptive statement satisfies the requirement of the Code for a description or diagnosis) are now published in *Taxon*. The format is similar to that of proposals to conserve and reject names; fuller guidelines will be published in a later issue of *Taxon*.

• **Proposals to suppress works:** Format of such proposals conforms closely to the style for proposals to conserve or reject names. For example, see *Taxon* 60: 287–289, 2011.

Further questions should be directed to the editors for the respective types of nomenclature papers. General nomenclature: Gerry Moore (gerry.moore@gnb.usda.gov); proposals to conserve or reject names: John McNeill (j.mcneill@rbge.ac.uk), Scott Redhead (scott.redhead@agr.gc.ca) and John Wiersema (john.wiersema@ars.usda.gov); proposals to amend the *International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants*: Nick Turland (nicholas.turland@mobot.org); requests for a binding decision: John McNeill (see above); proposals to suppress works: John McNeill (see above).

All proposals will be checked by the nomenclature editors and may be modified to conform to the rules and requirements of the *International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants* in consultation with the author.

Submission and review process

All manuscripts intended for publication in *Taxon* are submitted online via <http://www.editorialmanager.com/taxon/> except for Proposals to Conserve or Reject Names, Proposals to Suppress Works and Requests for Binding Decisions on Application of the Code, which are to be sent directly to column editor John McNeill (TaxonNom@rbge.ac.uk); announcements to appear in the column “Plant Systematics World” are to be sent to column editor Vicki Funk (funkv@si.edu); materials for the IOPB column (chromosome counts) are to be sent to column editor Karol Marhold (karol.marhold@savba.sk); items for book reviews are to be sent directly to the column editor, Rudi Schmid, 16 Edwin Dr, Kensington, California 94707-1022, U.S.A. (schmid@berkeley.edu); and advertisements are to be sent to office@iapt-taxon.org.

Manuscripts must be written in correct English (either American or British spelling is acceptable, but this must be consistent within each manuscript) and be prepared carefully according to the style of the journal. We request that manuscripts written by non-native speakers be checked by a native English speaker who is also a specialist in systematics. Papers submitted in incorrect English or poor style will be returned to the authors for correction before being sent for review. For instructions concerning style see “Preparation of text”.

Text and tables must be in Microsoft Word-compatible formats (doc, or rtf-files), figures in separate pdf or jpg-files. Do not submit high-quality figure versions in file formats intended for printing (tif, ai, cdr). Pages must be numbered consecutively, lines must be numbered, and margins should be at least 3 cm wide on all sides of the page.

All original papers will be scrutinized by two or more referees. Articles for the nomenclature section and nomenclature proposals will be handled by the nomenclature editors, and chromosome lists, book reviews, and news items for Plant Systematics World are handled by the respective column editors.

By submitting a contribution for publication, authors tacitly agree to (1) not submit in parallel the same manuscript to another journal, and (2) to assign the copyright to the publishers of *Taxon*

(such assignment taking effect as soon as the author receives written confirmation of acceptance of the manuscript). Rejected manuscripts will be discarded, except for original art-work and photographs, which will be returned to the authors.

Tracking the manuscript review process online

Authors can track the status of their manuscript at: <http://www.editorialmanager.com/taxon/>.

Page charges

Non-IAPT members: 4 free printed pages, then EUR 50 per page (but see Open Access below). IAPT individual members: no page charges. For charges for colour plates see under Tables, Appendices, and Figures.

Preparation of text

Consult a recent issue of *Taxon* and carefully follow the following instructions.

Use Times New Roman font. This font contains most characters, signs, and symbols that might be needed (e.g., Greek and Cyrillic characters, diacritics, arrows, identity sign, primes, etc.). Use other fonts only if a character or symbol is not present in Times New Roman.

For original papers, provide an informative abstract and 5–6 keywords in alphabetical order (indicating taxa, methods, main topic, geographic region) and a short title to be used as running head. Try to structure the manuscript into Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, (Acknowledgements) and Literature Cited. Give the full addresses of all authors and the e-mail address of the author who will receive correspondence. Keep title and subheadings short and informative. Only two subheading categories are encouraged: the primary ones standing alone, the secondary ones being followed by a period and a long dash (or triple hyphen), with the subsequent text running on. Authors are requested to check correct spelling and authors of scientific names before submission, and abbreviate authors of scientific plant names in conformity with Brummitt & Powell, *Authors of Plant Names* [Kew, 1992; also incorporated in *International Plant Names Index* (IPNI), <http://www.ipni.org/> and *Index Fungorum*, <http://www.indexfungorum.org/>]. Author names of all taxa at the rank of genus or below must be provided at first mention in each of the text, the tables and the appendices.

A single blank must always follow after a period, colon, semicolon, or comma (except within numerals, standard abbreviations such as e.g., i.e., l.c., s.str., s.l., and authors initials: "Brown, A.J." not "Brown, A. J.", "32: 120--130" not "32:120-130"), and between numerals and units of measure: "2 mm" not "2mm", but "5%" not "5 %"; x = 5 not x=5. Use a double hyphen between page numbers and measurements, "120--130" not "120-130".

Tables, appendices, and figures

Tables are prepared using MS Word's Table function or by using single tabs between columns, but no additional tabs or spaces to adjust entries. Do not split lengthy tables into parts. Tables must have an appropriate heading and must bear consecutive Arabic numerals. They are cited "Table 1," etc. and are appended separately at the end of the manuscript. Long tables including plant materials or accessory materials are designed as an Appendix and run in paragraphs (order alphabetically by taxon name; see recent issue of *Taxon* for style). Lengthy Tables and Appendices are provided

as Electronic Supplement to the online version (<http://www.ingentaconnect.com/content/iapt/tax>) of the article, but not published in print. When there are several figures (e.g., several trees of individual and combined datasets), authors should indicate the ones they feel are most important and should be in the printed version, and those which should appear as Electronic Supplement.

Figures must be sharp, rich in contrast, and designed to fit either the full page width, one and a half column width or one column width after reduction (17.6, 13.0, or 8.5 cm respectively); with caption they may occupy the full page length (23.5 cm). Use Arial font for text included in the figures and be certain that after reduction all lettering and symbols are clear and easy to read. All illustrations must be numbered consecutively using Arabic numerals. They should be cited "Fig. 1" or "Figs. 1–4" in sequential order. Plates comprising several figures or photographs should have internal numbers or capital letters (A, B, C) for reference (use Arial font). Legends are appended separately at the end of the manuscript. Photographs, especially those of herbarium specimens, must be of exceptional quality and submitted as close to *Taxon* page size as possible, avoiding "landscape" (i.e., horizontal) orientation. Normally only previously unpublished illustrations are acceptable. If circumstances require the reproduction of copyright material, authors are responsible for obtaining written permission from the copyright holder (a signed permission to accompany the revised typescript).

Submission of high quality colour plates is encouraged. Costs of colour plates are EUR 300 for one plate (= one page with colour, regardless of image size), EUR 600 for two or more plates in the printed edition of *Taxon* and apply for both IAPT members and non-members (but see Open Access below); in the online edition colour plates are free of charge. When plates should be in colour in the online edition and black & white in the printed one, authors must provide both versions and make sure that all the essential information is retained in the black & white version.

Electronic versions of figures are prepared as follows:

1. For the initial submission upload each figure in a separate file in jpg or pdf-format at reduced resolution (less than 3 MB) to facilitate sending for review.

2. After review and acceptance the production editor will ask for final versions of figures for publication and give instructions how to provide these (do not submit or send before); prepare print-quality versions as follows:

Scan photographs (colour or greyscale) at 300 dpi and save as tif file. Monochrome line drawings are scanned at a resolution of at least 1200 dpi and saved in bitmap mode (black & white) as tif file. Colour line art is scanned at 600 dpi and saved as tif or psd file. Both tif and psd files may contain layers.

For images from a digital camera use the highest possible settings (300 dpi at least) and save as tif file.

Computer-generated line graphics (phylogenetic trees, diagrams, etc.) are saved in a standard vector graphic format (ai, cdr) or in encapsulated postscript (vector eps) format, regardless if in colour or black & white. Text must not be converted into paths.

All colour figures are saved in CMYK rather than RGB (i.e., optimize colour in CMYK mode and make sure that all necessary details are visible after conversion). If figures are to appear in black and white in print and in colour online, both sets of figures must be provided by the author. All details discussed in the text must be visible in both versions.

Do not submit any graphics generated or placed in Powerpoint or Word!

Literature citation

Verify that all citations in the text are also in the Literature Cited and vice versa.

References are cited in the text as follows: ... was studied by Miller (1993) and Miller & Smith (1994). Baker & al. (1996) showed that ... has frequently been observed (e.g., Miller, 1993, 1998; Miller & Smith, 1994; Baker & al., 1996 [note: sort chronologically, beginning with oldest; within the same year, sort alphabetically]. When there are three or more authors, the name of the first author is cited followed by “& al.”

If smaller parts of a work or chapter, or single pages shall be referenced, do this in the text: ... was given by Parker (2003: 152). Parker (2003: fig. 2) showed that ...

References should be listed in alphabetical order at the end of the paper, with single-author works preceding two-author works preceding multi-author works. Multi-author works (cited “[first author] & al.” in text) are to be sorted by first author and year of publication. Within the same year of publication sort alphabetically by co-authors. Journal titles and book titles must be italicized and journal titles abbreviated as explained further below. Give names of all authors and add a DOI number if available. Use the following standard forms:

Journal article:

Groppi, M., Pirani, J.R., Salatino, M.L.F., Blanco, S.R. & Kallunki, J.A. 2008. Phylogeny of Rutaceae based on two noncoding regions from cpDNA. *Amer. J. Bot.* 95: 985–1005. <http://dx.doi.org/10.3732/ajb.2007313>

Kato, M. & Akiyama, H. In press. Interpolation hypothesis for the origin of vegetative sporophyte of land plants. *Taxon* 54.

Article in online-only journal:

Drummond, A.J. & Rambaut, A. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analyses by sampling trees. *B. M. C. Evol. Biol.* 7: 214. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2148-7-214>

Book printed (or available online as scan):

Kitching, I., Forey, P., Humphries, C. & Williams, P. 1998. *Cladistics: The theory and practice of parsimony analysis*. Oxford: Oxford University Press.

Book electronic (not applicable to scanned materials):

Eggli, U. (ed.) 2001. *Illustrated handbook of succulent plants: Monocotyledons*. Berlin, Heidelberg: Springer. Kindle edition [or: pdf e-book; Microsoft Reader e-book; CD-ROM; ...]

Book online (not applicable to scanned materials):

Flora of North America Editorial Committee (ed.) 2007. *Flora of North America north of Mexico*, vol. 27, *Bryophyta*, pt. 1. New York, Oxford: Oxford University Press. http://www.efloras.org/volume_page.aspx?volume_id=1027&flora_id=1 [or DOI if available] (accessed 19 Jan. 2012).

Book chapter:

Gilmour, J.S.L. 1940. Taxonomy and philosophy. Pp. 461–475 in: Huxley, J. (ed.), *The new systematics*. Oxford: Oxford University Press.

Multivolume work:

Wright, S. 1968–1978. *Evolution and the genetics of populations*, 4 vols. Chicago: University of Chicago Press.

Wright, S. 1969. *Evolution and the genetics of populations*, vol. 2,

Theory of gene frequencies. Chicago: University of Chicago Press.

Book as part of series:

McNeill, J., Barrie, F.R., Burdet, H.M., Demoulin, V., Hawksworth, D.L., Marhold, K., Nicolson, D.H., Prado, J., Silva, P.C., Skog, J.E., Wiersema, J.H., & Turland, N.J. (eds.) 2006. *International Code of Botanical Nomenclature (Vienna Code): Adopted by the Seventeenth International Botanical Congress Vienna, Austria, July 2005*. Regnum Vegetabile 146. Ruggell: Gantner.

[If the series has a journal-like appearance, i.e., all volumes of same size and style, use “Journal article” reference style above.]

Thesis:

Ralston, B. 1993. *Phylogenetic systematics and the evolution of mating systems in Lithospermum (Boraginaceae)*. Dissertation, University of Northern Arizona.

Website—give (if available) author(s)/creator(s) of website; title; date of creation or of last modification or revision; URL; access date:

Stotler, R.E & Crandall-Stotler, B.J. Last updated 11 May 2011. Bryophytes: Mosses, Liverworts & Hornworts. <http://bryophytes.plant.siu.edu/> (accessed 19 Jan. 2012).

Databases

The International Plant Names Index (IPNI). [descriptive phrase or object identifier or locator ...]. <http://www.ipni.org/> (accessed 19 Jan. 2012).

Software/Programs (published):

Swofford, D.L. 2002. PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods), version 4.0 Beta. Sunderland, Massachusetts: Sinauer.

Software/Programs (unpublished):

Nylander, J.A.A. 2004. MrModeltest, version 2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University. <http://www.abo.se/~nylander/mrmodeltest2/mrmodeltest2.html>. [It is recommended to add a URL where the software or further information about the software can be obtained.]

If several articles by the same author[s] in the same year are cited, add letters to the year (e.g., 2006a, 2006b). This applies also to articles by the same first author but two or more various co-authors that have to be cited with “& al.” in the text.

Names of authors of more than one publication are repeated in the reference list. For books, titles are given in full with headline-style capitalization for English titles and publisher and place of publication cited. Journal titles, both in synonyms and in “Literature Cited” must be abbreviated to conform with Bridson, G.D.R., *BPH-2: Periodicals with Botanical Content* (Pittsburgh, 2004) (the second edition of *Botanico-Periodicum-Huntianum*, 1968), except for its Cyrillic transliteration system (see ISO standards below). Titles in foreign languages must be cited in original and may be accompanied by an English translation in square brackets; if they (and the authors) appear in non-Latin script they are to be transliterated.

erated following ISO standards (ISO-9 for Cyrillic script). Titles and standard abbreviations can be checked at <http://huntbot.andrew.cmu.edu/HIBD/Departments/Databases.shtml>. “Literature Cited” submitted in incorrect style will be returned to the authors until it conforms to *Taxon* style.

Double hyphens are given between page numbers. Papers “in preparation” or “submitted” are omitted from the reference list. Accepted papers in print should be cited as “in press” (without year), and the volume of the journal should be given in the full reference.

Taxonomic names, synonymy, and citation of specimens

The convention of only italicizing names at the rank of genus and below is followed, except for proposals to conserve or reject names in which all scientific names are italicized, regardless of rank.

In taxonomic citation abbreviate book titles according to Stafleu & Cowan, *Taxonomic Literature* (ed. 2 and supplements) but with capital initial letters, and journal titles according to *BPH-2: Periodicals with Botanical Content* (available free online at <http://huntbot.andrew.cmu.edu/HIBD/Departments/Databases.shtml>; for details see above). Names of new taxa are followed by the holotype citation, then by the (English or Latin) description or diagnosis in a separate paragraph. For type specimens examined by the author(s) an exclamation mark is given after the herbarium acronym, e.g., “(lectotype: WI)”, “(W No. 29867!)”, “(W barcode 00033277!)”, “(W [photo!])”. Homotypic names are cited in chronological order in a single paragraph with the identity sign (=), followed by the type. Heterotypic names should be listed in separate paragraphs, indicated by the equality sign (=). Nomenclatural guidelines with examples can be downloaded from: http://www.iapt-taxon.org/downloads/nomenclatural_guidelines.

Voucher specimens are to be cited and deposited in a public herbarium. Cite vouchers and order voucher data as follows: Taxon name including authority, country, largest political subdivision (where applicable; locality and date optional, depending on type of study), *collector(s)* and *collector number*, herbarium acronym (plus herbarium accession number or barcode if available). Names of collectors and collector numbers must be in italics, herbarium acronyms in parentheses. Use herbarium acronyms of Holmgren & al. (*Index Herbariorum*, Regnum Veg. 120, 1990 and <http://sciweb.nybg.org/science2/IndexHerbariorum.asp>) without citing this publication. This format applies also when the material is tabulated in Appendix format (see recent issue of *Taxon* for style). Lengthy specimen lists will be provided as Electronic Supplement to the online version, but not published in print due to space limitation. Useful conventions for citing Linnaean specimens can be found in Jarvis & al. (Regnum Veg. 127, 1993).

New names in Fungi

Following the acceptance of a paper with new scientific names of fungi (including lichens), authors must deposit the names in one of the repositories recognized by the Nomenclature Committee for Fungi and obtain an identifier for each new name (i.e., name of a new taxon, new combination, name at new rank, or replacement name). These are to be inserted in the final version and given im-

mediately after the name; alternatively, they can be added in proof if not already secured. This deposition is now a condition of publication of new fungal names in *Taxon*.

Sequence data

DNA or protein sequences must be deposited in public data bases (GenBank, EMBL, etc.), and accession numbers must be given either in the Materials and Methods, when a few, or in a separate Appendix. For newly generated sequences, voucher specimens must be made and deposited in a public herbarium. These vouchers are to be cited as follows: Taxon name including authority, country, largest political subdivision (where applicable; locality and date optional, depending on type of study), *collector(s)* and *collector number*, herbarium acronym. Names of collectors and collector numbers must be in italics, herbarium acronyms in parentheses. Use herbarium acronyms of Holmgren & al. (*Index Herbariorum*, Regnum Veg. 120, 1990 and <http://sciweb.nybg.org/science2/IndexHerbariorum.asp>) without citing this publication. Sequence numbers may be added to the Appendix after the manuscript is accepted. Indicate newly generated sequences with an asterisk behind the accession number. Consult a recent issue of *Taxon* for style of the Appendix. The alignments (.nex or .txt files) must be uploaded with the other manuscript files, either as a single file with all markers, each one in a marked data block, or individually. Alternatively, data matrices may be submitted to TreeBase with matrix numbers cited in the paper.

Proofs

Proofs will be sent to the corresponding author as a pdf file (together with the copyright form). They must be processed immediately and returned by e-mail, air mail or fax (+421 2 59426 150). Authors who anticipate being absent are urged to give forwarding orders or to give notice of temporary addresses (with dates). Corrections not returned within one week cannot usually be taken into consideration.

Open Access

Taxon provides the possibility to publish papers Open Access. Open Access articles are freely accessible and downloadable as soon as published. Reuse of such articles is subject to a Creative Commons licence model of the authors' choice (see <http://creativecommons.org/licenses/>). The publication fee for one Open Access article (to be paid by authors or funding organizations) is €1800 (this includes page charges for non-members and two pages with colour; fee for more than two color pages is €300).

Reprints

Reprints are available as free pdf files and sent to the corresponding author after appearance of the print issue. PDF files of nomenclature proposals and articles of general importance are free for all users and can be downloaded from <http://www.ingentaconnect.com/content/iapt/tax>. Hard-copy reprints can be ordered at cost from the printer. After the issue is printed, corresponding authors will receive a notification by e-mail with a personalized link where they can order hard-copy reprints online.

O uso de marcadores moleculares na delimitação de espécies do gênero *Punctelia*

(Parmeliaceae, Ascomycota liquenizados)

Running head: Silva & al. Distâncias genéticas em *Punctelia*

Luciana Vicente da Silva^{1,2}

Luciana da Silva Canêz¹

Aline Pedroso Lorenz Lemke¹

¹Universidade Federal de Mato grosso do Sul, Cidade Universitária, CEP: 79070-900, Tel.: 67 33457001

²Autor para correspondência: lucimariie@hotmail.com

10

11

Resumo

A identificação do limite entre espécies diferentes é fundamental para descrever clados filogeneticamente relacionados e suas histórias evolutivas. O gênero *Punctelia* com cerca de 50 espécies, possui distribuição cosmopolita e centros de diversidade localizados na América do Sul e na África, para o Brasil são citadas 38 espécies. Neste trabalho, utilizamos sequências do DNA nuclear na delimitação de espécies de *Punctelia*, baseado em análises filogenéticas e de distância genética. No total, foram analisadas 27 espécies de *Punctelia* e 109 sequências do marcador ITS. As distâncias genéticas intraespecíficas e interespecíficas foram significativamente diferentes, e apresentaram pouca sobreposição. As análises moleculares e as identificações morfológicas foram congruentes em nove dos 16 clados analisados, sendo consideradas espécies bem delimitadas. Nos demais sete clados, a identificação morfológica não foi congruente com a análise filogenética. Podemos constatar que as distâncias genéticas podem ser usadas como ferramenta na

25 delimitação das espécies de *Punctelia*, para identificar grupos e complexos de espécies a
26 serem investigados, além de indicar quais caracteres morfológicos podem não refletir
27 relações filogenéticas entre as espécies. Esta análise trata-se de uma primeira abordagem
28 com um marcador, sendo que a distribuição, o número de espécies do gênero, bem como as
29 incertezas na delimitação em sua totalidade, ainda é desconhecido.

30 Palavras-chaves: Brasil, distância genética, filogenia, ITS, liquens.

31

32 **Introdução**

33 A delimitação das espécies de fungos liquenizados, assim como na maioria dos
34 organismos, apresenta a dificuldade de encontrar caracteres adequados para estimar a
35 variação intraespecífica e interespecífica (Lumbsch & Leavitt, 2011). Para a obtenção de
36 avaliações mais robustas na delimitação de espécies e de suas relações filogenéticas,
37 pesquisadores da área têm utilizado vários tipos de inferências, especialmente análises com
38 marcadores moleculares (Lumbsch & Leavitt, 2011).

39 O conceito filogenético considera a monofilia entre os indivíduos e define espécie
40 como “a menor agregação de populações (reprodução sexuada) ou linhagens (reprodução
41 assexuada) diagnosticada por única combinação de estados de caráter em indivíduos
42 comparáveis” (Nixon & Wheeler, 1990). Cada vez mais este conceito, baseado em dados
43 moleculares, está sendo empregado para delimitar espécies de liquens (e.g., Leavitt & al.,
44 2011; Truong, 2013). Esta abordagem permite identificar *a posteriori* quais características
45 fenotípicas refletem a delimitação filogenética da espécie (Grube & Kroken, 2000).

46 Por outro lado, a utilização de medidas de distância genética é um método objetivo
47 que pode auxiliar na compreensão das fronteiras entre as espécies de fungos liquenizados.
48 Nesta abordagem, a delimitação das espécies baseia-se na diferenciação entre variação
49 intraespecífica e interespecífica, estabelecendo valores limites entre os grupos
50 monofiléticos. Estes valores devem ser somados as características morfológicas e químicas
51 para a melhor compreensão das relações filogenéticas entre as espécies (Del-Prado & al.,
52 2010). O marcador ITS foi utilizado por Del-Prado & al. (2010) para estimar o potencial
53 do uso das distâncias genéticas na delimitação taxonômica em linhagens monofiléticas de
54 Parmeliaceae. Seus resultados foram promissores e as distâncias intraespecíficas e
55 interespecíficas se mostraram bem delimitadas na maioria dos gêneros avaliados, com
56 exceção de poucos táxons cuja delimitação taxonômica precisa ser revisada.

57 O uso dos marcadores moleculares vem sendo amplamente utilizados para estimar
58 a fronteiras entre as espécies e complexo de espécies dos gêneros de Parmeliaceae (e.g.,
59 Thell & al., 2002; Molina & al., 2004; Blanco & al., 2005; Leavitt & al., 2011, Truong &
60 al., 2013). Entre os gêneros recentemente investigados com marcadores moleculares
61 podemos destacar *Punctelia* Krog (e.g., Crespo & al., 2004; Thell & al., 2005; Lendemer
62 & Hodkinson, 2010). Com cerca de 50 espécies, este gênero possui distribuição
63 cosmopolita e centros de diversidade localizados na América do Sul e na África (Thell &
64 al., 2012). Para o Brasil são citadas 38 espécies de *Punctelia* (Feuerer, 2007) e novas
65 espécies estão sendo descritas (Canêz, em prep).

66 O gênero *Punctelia* é caracterizado por possuir pseudocifelas punctiformes,
67 conídios filiformes ou unciformes e córtex com atranorina, ácido lecanórico e/ou girofórico

68 e ácidos graxos na medula (Krog, 1982). A monofilia do gênero já foi confirmada através
69 de estudos moleculares (De Paz & al., 2011; Crespo & al., 2010). Entretanto, não há um
70 consenso entre os autores sobre o uso das características morfológicas de importância
71 taxonômica em *Punctelia*, o que dificulta a compreensão das relações entre os táxons e a
72 delimitação de espécies próximas (Canêz, 2009). Diversas análises moleculares vêm sendo
73 utilizadas como uma ferramenta para estudos de delimitações taxonômicas no gênero
74 *Punctelia*, dividindo espécies (e.g., Crespo & al., 2004), revelando complexo de espécies e
75 características morfológicas relacionadas a variações filogenéticas (e.g., Lendemer &
76 Hodkinson, 2010).

77 Estudos com marcadores moleculares, agregados com informações morfológicas,
78 químicas e geográficas, podem contribuir para a delimitação taxonômica das espécies de
79 *Punctelia*. Neste trabalho, utilizamos sequências do DNA nuclear na delimitação de
80 espécies de *Punctelia*, baseado em análises filogenéticas e de distância genética.

81

82

83 **Material e Métodos**

84 Amostragem e identificação. — Amostras de *Punctelia* foram obtidas em campo nas
85 regiões sul, sudeste e centro-oeste do Brasil e a partir de material herborizado (Tabela 1).
86 Os *vouchers* foram depositados nos herbários FURG da Universidade Federal do Rio
87 Grande do Sul e CGMS da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Os espécimes
88 foram identificados a partir de características como: composição química, morfologia do
89 talo, forma e tamanho dos conídios, forma e tamanho dos ascósporos. O reconhecimento

90 das espécies foi baseado na revisão morfológica do gênero *Punctelia* realizado por Canêz
91 (2009).

92 Para a identificação dos compostos secundários produzido pelos liquens foram
93 utilizados três testes: o teste de coloração, a cromatografia em camada delgada e a
94 microcristalização. A presença de atranorina, indicada pela coloração esverdeada do talo
95 (Krog, 1982), foi confirmada pela cor amarela com a aplicação de hidróxido de potássio no
96 teste de teste de coloração. Na cromatografia em camada delgada a substância também foi
97 identificada através do uso de um padrão com atranorina em solvente C (Honda & Vilegas,
98 1999). Os ácidos lecanórico e girofórico foram identificados através da técnica de
99 microcristalização (Huneck & Yoshimura, 1996).

100 Extração de DNA, amplificação e sequenciamento — Para o isolamento de DNA, foi
101 utilizado o protocolo de Doyle & Doyle (1987) modificado, no qual as amostras de cerca
102 de 2 mg foram tratadas com acetona “overnight” para remoção de compostos liquênicos.
103 Foram amplificados os espaçadores internos transcritos do DNA ribossomal nuclear (ITS,
104 *internal transcribed spacers*) com os *primers* ITS1F (Gardes & Bruns, 1993) e ITS4
105 (White & al., 1990). As reações de PCR continham um volume total de 25 µL: 20 a 40 ng
106 de DNA molde, solução tampão 1x (Promega), 0,2 mM dNTPs, 1 U de Taq DNA
107 Polymerase (Promega), 0,2 µM de cada *primer* e 2 mM de cloreto de magnésio (MgCl₂).
108 As amplificações de ITS foram feitas em termociclador *Mastercycler Gradient*
109 (Eppendorf) com a seguinte programação: 94°C por 3 min, e 30 ciclos de 94°C por 1 min,
110 52–60°C por 1 min, 72°C por 1min, 72°C por 5 min. Os produtos de PCR foram
111 purificados com polietilenoglicol 20% conforme o protocolo de Dunn & Blattner (1987).

112 As amostras purificadas foram sequenciadas em sequenciador automático ABI-PRISM
113 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), de acordo com as especificações do
114 fabricante.

115 Análises filogenéticas. — Além das sequências produzidas neste estudo, foram analisadas
116 sequencias de ITS completas de *Punctelia* obtidas no *GenBank* (Tabela 2). As sequências
117 foram alinhadas de forma automática com o programa MAFFT (Katoh & Toh, 2005) e
118 corrigidas manualmente com o MEGA 5.05 (Tamura & al., 2011). Os sítios com
119 alinhamento ambíguo foram identificados com auxilio do servidor Guidance
120 (<http://guidance.tau.ac.il/>; Penn & al., 2010) e removidos da análise. Como grupo externo
121 foi utilizado uma sequencia de *Flavopunctelia flaventior* (Stirt.) Hale (nº de acesso no
122 *GenBank* AY586563), gênero irmão de *Punctelia*.

123 O modelo GTR+I+G (*General Time-Reversible*), incluindo a estimativa de sítios
124 invariantes e distribuição gamma foi selecionado pelo jModelTest v 2.1.3 (Darriba & al.,
125 2012) como o modelo de substituição nucleotídica mais apropriado para o marcador ITS
126 usando o critério AIC (*Akaike Information Criterion*). Para a reconstrução filogenética foi
127 utilizada uma abordagem bayesiana através do programa BEAST v1.6.1 (Drummond &
128 Rambaut, 2007), sendo usados como parâmetros o Yule *tree prior* e o *uncorrelated log-*
129 *normal relaxed clock*. A análise foi realizada com 25 milhões de gerações, com os valores
130 dos parâmetros amostrados para cada 1000 gerações. O equilíbrio estacionário foi
131 verificado com o Tracer v.1.4.1 (Drummond & Rambaut, 2007). Os primeiros 10% de
132 gerações foram descartados como *burn-in*. A *maximum clade credibility tree* foi estimada

através do TreeAnnotator v.1.6.1 (Drummond & Rambaut, 2007). O suporte estatístico dos clados foi determinado através dos valores de probabilidade posterior bayesiana.

Análises de distância. — A análise de distância genética foi realizada através da comparação pelo método de máxima verossimilhança. As distâncias entre as sequências foram calculadas par a par com o programa PAUP 4.0 (Swofford, 1998) usando parâmetros de máxima verossimilhança (*maximum likelihood estimator of distance*) e o modelo de substituição nucleotídica GTR, assumindo uma distribuição discreta gamma com seis categorias. Para as estimativas das distâncias genéticas intraespecíficas foi utilizado o critério da monofilia, sendo excluídas das análises as sequências obtidas no *GenBank* que não agruparam com as demais da mesma espécie (dados não mostrados). Esta medida foi adotada devido a impossibilidade de conferência da morfologia do material sequenciado e consequentemente de sua correta identificação.

Após a definição dos grupos monofiléticos, todos os valores das distâncias intraespecíficas foram compilados para obtenção da distância intraespecífica para o gênero *Punctelia*. As distâncias interespecíficas foram consideradas os valores de comparação das distâncias genéticas entre os espécimes de grupos monofiléticos diferentes. Todos os valores considerados intraespecíficos e interespecíficos foram testados em relação à normalidade pelo teste Shapiro-Wilk (Zar, 2010). As distâncias intraespecífica e interespecífica foram comparadas através do teste não paramétrico U de Mann-Whitney (Zar, 2010). As frequências dos valores das distâncias intraespecíficas e interespecíficas foram plotados em histograma e gráfico de densidade. Todas as análises estatísticas e figuras foram desenvolvidas através do software R (R Core Team, 2012).

156 **Resultados**

157 No total, foram analisadas 27 espécies de *Punctelia* e 109 sequências de ITS: 40
158 sequências (15 espécies) geradas neste estudo e 69 (12 espécies) obtidas no *Genbank*. O
159 alinhamento gerado teve 479 sítios, sendo 141 variáveis e 110 parcimoniosamente
160 informativos. Na árvore bayesiana obtida há uma clara divisão do gênero em dois clados
161 (Fig. 1). No grupo I encontram-se as espécies com a superfície inferior de coloração
162 castanho claro a marrom escuro e no grupo II a maior parte dos indivíduos possui a
163 superfície inferior negra, com exceção de *P. canaliculata* (Lynge) Krog e *P. pseudonigra*
164 Canêz & Marcelli.

165 Nove clados foram compostos por espécimes identificados morfologicamente como
166 a mesma espécie (Fig. 1): *P. rudenta* (Ach.) Krog (Clado I; Estados Unidos e Espanha); *P.*
167 *perreticulata* (Räsänen) G.Wilh. & Ladd (Clado III; Marrocos); *P. subrudenta* (Nyl.) Krog
168 (Clado IV; Espanha, China, Alemanha e Portugal); *P. lorenzii* (Kremp.) Krog (Clado V;
169 Brasil); *P. missouriensis* Wilhelm & Ladd (Clado VI; Brasil e Estados Unidos); *P. caseana*
170 Lendemer & Hodkinson (Clado VII; Estados Unidos); *P. jeckerii* (Roum.) Kalb (Clado
171 VIII; Estados Unidos, Bélgica, Suíça, Argentina e Alemanha); *P. borrerina* (Nyl.) Krog
172 (Clado XIII; Brasil); *P. boreri* (Turner ex Sm.) Krog (Clado XVI; Marrocos, Quênia,
173 Portugal, Espanha, Coréia, Itália e Holanda). Considerando estes grupos a distância
174 genética intraespecífica media estimada foi 0,0037 s/s (substituições por sítio) com desvio
175 padrão de \pm 0,0039 e intervalo de 0 à 0,0268 s/s (Tabela 3), o histograma e o gráfico de
176 densidade na Figs. 2—3. As distâncias genéticas interespecíficas e as específicas de cada

177 clado, bem como os parâmetros dos testes de normalidade também estão descritos na
178 Tabela 3.

179 Os clados (II, X, XI, XII, XIV e XV) são compostos por sequências de espécies
180 diferentes (Fig. 1). Em alguns deles, as espécies são muito similares, portanto, comparou-
181 se as distâncias genéticas encontradas com as estimadas para o gênero como um todo. Em
182 alguns deles, as distâncias genéticas entre as espécies ficou dentro do intervalo estimado
183 como intraespecífico para o gênero (Tabela 4). Abaixo estão as descritas as características
184 destes grupos.

185 Em alguns grupos as espécies que se diferenciam pelas características e/ou
186 presença dos propágulos vegetativos. No Clado X, *P. praesticta* Kalb & Canêz (sp. nova -
187 comunicação pessoal) e *P. stictica* (Delise ex Duby) Krog diferem pela presença de
188 sorédios na primeira.

189 O Clado XII é composto por *P. albida* Canêz & Marcelli (sp. nova - *in prep.*) que
190 apresenta sorais principalmente laminais e capitados, granulares e frequentemente
191 formando grânulos corticados; *P. puigarii* Canêz & Marcelli (sp. nova - *in prep.*) com
192 sorais laminais e, especialmente marginais, com a margens dos lobos levemente crispadas
193 e onduladas; e *P. isidiata* Canêz & Marcelli (sp. nova - *in prep.*) caracterizada pela
194 ausência de sorédios e presença de isídios que apresentam os ápices escurecidos.

195 O Clado XIV é composto por *P. elixii* Canêz & Marcelli (sp. nova - *in prep.*) que
196 apresenta sorédios granulares, que por “brotamento” formam pequenos arbúsculos,
197 originados das pseudocifelas; *P. ibiunensis* Canêz & Marcelli (sp. nova - *in prep.*)
198 caracterizada por sorédios granulares, que se empilham formando estruturas isidióides, que

199 por sua vez continuam a produzir sorédios nos ápices; e *P. reddenda* que possui sorédios
200 de farinosos a granulares, principalmente laminais.

201 O clado XV é composto por espécimes identificados como *P. subpraesignis* (Nyl.)
202 Krog, *P. pseudohypoleucites* Canêz (sp. nova - *in prep.*), *P. imbricata* Marcelli, Jungbluth
203 & Elix e *P. fimbriata* Marcelli & Canêz. *Punctelia pseudohypoleucites* apresenta
204 morfologia semelhante a descrição de *P. subpraesignis*, mas possui a superfície inferior
205 predominantemente branca com machas marrons, enquanto que *P. subpraesignis* possui
206 superfície inferior negra (Canêz & Marcelli, 2010). *Punctelia imbricata* e *P. fimbriata* são
207 morfológicamente semelhantes a *P. subpraesignis*. Sendo identificadas como espécies
208 diferentes por apresentarem propágulos vegetativos, estruturas ausentes em *P.*
209 *subpraesignis*. *Punctelia imbricata* apresenta lóbulos imbricados (Marcelli & al., 2009) e
210 *P. fimbriata* apresenta filídios como propágulos vegetativos (Canêz & Marcelli, 2007). Os
211 espécimes que foram identificados com nomes diferentes nesse clado tiveram as distâncias
212 genéticas comparadas com os de mais espécimes identificados como *P. subpraesignis* e
213 suas diferenças não foram significativas (Tabela 5).

214 Entre os grupos cujas espécies se diferem pela composição química está o Clado
215 II, composto por *P. purpurascens* Marcelli & Canêz e *P. osorioi* Canêz & Marcelli que
216 apresentaram sequências idênticas de ITS. A característica que separa as espécies é a
217 presença de medula pigmentada K+ púrpura em *P. purpurascens* que é ausente em *P.*
218 *osorioi* (Canêz & Marcelli, 2007; Canêz & Marcelli, 2010). No clado XI, também
219 composto por sequências idênticas, há dois espécimes de *P. microsticta* (Müll. Arg.)Krog e
220 um de *P. riograndensis* (Lynge) Krog cuja diferença está na reação química da medula.

221 Enquanto *P. riograndensis* apresenta reação KC+ rosa em *P. microstictica* a reação é
222 negativa (Canêz & Marcelli, 2010).

223 É possível que, alguns destes clados representem complexos de espécies com
224 origem recente ou até mesmo linhagens da mesma espécie com variação morfológica e
225 química ao longo de sua distribuição.

226

227 Discussão

228 A análise filogenética com 27 espécies de *Punctelia* apresentou uma divisão do
229 gênero em dois grupos bem suportados cuja principal diferença está na coloração da
230 superfície inferior do talo. A importância desta característica para o agrupamento de
231 espécies já havia sido proposta por Canêz (2009) durante revisão morfológica e florística
232 do gênero. Entre as exceções podemos citar *P. canaliculata* que possui tipo de talo
233 laciado com superfície inferior clara e se agrupa com espécies com talo lobulado de
234 superfície inferior negra e *P. pseudonigra* com talo castanho claro manchado de marrom,
235 que se agruparam com espécies com talo de superfície inferior negra.

236 As distâncias genéticas intraespecíficas e interespecíficas de *Punctelia* foram
237 avaliadas por Del-Prado & al. (2010) juntamente com outras espécies de Parmeliaceae
238 pertencentes a linhagens monofiléticas. Neste trabalho, foram incluídos 56 espécimes de
239 10 espécies para as distâncias interespecíficas de *Punctelia* e 42 espécimes de duas
240 espécies para as distâncias intraespecíficas. Os valores encontrados foram bem
241 delimitados, o que apoia o uso das distâncias como uma ferramenta para auxiliar a
242 identificação de suas espécies. No entanto, em nosso trabalho com número maior de

243 espécies relacionadas, foi possível notar sobreposição das distâncias intraespecíficas e
244 interespécificas. Apesar do intervalo de sobreposição ser relativamente grande, é
245 constituído de valores de distância com baixa frequência de ocorrência. Táxons pouco
246 compreendidos também podem aumentar a sobreposição (Meyer & Paulay, 2005).

247 A sobreposição em análises de distância é consideravelmente maior quanto maior
248 for a proporção de táxons relacionados incluídos na amostra (Moritz & Cícero, 2004). A
249 sobreposição das distâncias intraespecífica e interespécifica pode ser um problema para a
250 utilização de sequências de DNA para a identificação de espécies, o chamado DNA
251 *Barcodeing* (Moritz & Cícero, 2004). Como esta abordagem é também baseada nas
252 distâncias genéticas, a sobreposição torna esse limite impreciso (Meyer & Paulay, 2005).
253 Nesses casos, reforça-se a necessidade do uso das características morfológicas, químicas e
254 geográficas para a melhor compreensão da delimitação entre as espécies (Del-Prado & al.,
255 2010).

256 Na maioria dos clados encontrados, o relacionamento filogenético foi congruente
257 com a descrição morfológica e química dos espécimes. Alguns destes clados, como o de *P.*
258 *missouriensis*, foi composto por sequências de espécimes provenientes de áreas
259 geográficas bem distantes indicando os caracteres morfológicos possuem valor sistemático
260 central na determinação das espécies de *Punctelia*.

261 As análises também revelaram seis clados onde a caracterização morfológica foi
262 incongruente com a caracterização genética, o que já foi descrito para diversos grupos
263 taxonômicos de fungos liquenizados (Printzen, 2010).

264 Com a análise filogenética e das distâncias genéticas realizadas foi possível
265 identificar espécimes de *Punctelia* estreitamente relacionados, mas com características
266 morfológicas diversificadas, especialmente em relação a presença/ausência e ao tipo de
267 propágulo vegetativo. O conceito de espécies pares parte da existência de duas espécies
268 idênticas que diferem apenas pela presença ou ausência de sorédios (Tehler, 1982). A
269 origem da diferenciação seria eco-fenotípica, provavelmente impulsionada por
270 modificações do ambiente ou condições desfavoráveis (Tehler, 1982). Com o avanço das
271 técnicas moleculares, foi possível identificar a existência de espécies pares em Parmeliaceae
272 (Crespo & Pérez-Ortega, 2009), por exemplo, nos gêneros *Letharia* (Kroken & Taylor,
273 2001), *Usnea* (Truong & al., 2013). Em nossas análises, o clado X composto por *P.*
274 *praestictica* (com sorédio) e *P. stictica* (sem sorédio), poderia ser explicado a partir do
275 conceito de espécies pares. No entanto, somente com o aumento do número amostral e com
276 distribuição mais ampla dos espécimes analisados, será possível uma avaliação mais
277 segura sobre o status destas espécies.

278 O Clado XII, com *P. albida*, *P. borrhieri* (Quênia), *P. puigarii* e *P. isidiata* são
279 espécies estritamente relacionadas que diferem principalmente no tipo de arranjo dos
280 sorédios. *Punctelia borrhieri* não foi registrada no sul e sudeste brasileiro (Canêz, 2009), no
281 entanto foram descritas para estas regiões *P. albida* (PR), *P. puigarii* (SP) e *P. isidiata*
282 (MG). A distância genética encontrada para os espécimes sugeridos com os nomes *P.*
283 *albida*, *P. borrhieri*, *P. puigarii* e *P. isidiata*, indica que se tratam da mesma espécie do
284 ponto de vista molecular, sendo que essas diferenças no arranjo dos sorédios e a presença

285 de isídios podem estar ligados a distribuição geográfica de populações ou linhagens
286 diferentes.

287 As diferentes formas no arranjo dos sorédios em espécies estritamente relacionadas
288 demonstrou não ser um caráter homólogo no Clado XIV. Este grupo, composto por *P.*
289 *elixii*, *P. ibiunensis* e *P. reddenda*, que também diferem no perfil cromatográfico (Canêz,
290 2009), apresentaram distância genéticas de 0,009 à 0,0114 s/s e são consideradas a mesma
291 espécie do ponto de vista molecular. Durante revisão morfológica e florística do gênero
292 *Punctelia* com ênfase nas espécies com ocorrência na região sul e sudeste do Brasil (Canêz
293 & Marcelli 2010), os espécimes identificados como *P. reddenda* possuíam arranjo dos
294 sorédios e perfil cromatográfico diferente e foram posteriormente identificados como: *P.*
295 *elixii*, *P. dispersa*, *P. ibiunensis* e *P. erosa*.

296 Outro grupo com variação morfológica foi o Clado XV, onde a comparação das
297 distâncias genéticas entre os espécimes identificados como *P. subpraesignis* e os
298 espécimes identificados como *P. pseudohypoleucites*, *P. imbricata* e *P. fimbriata* também
299 não foi significativa. Assim como no Clado XIV, as análises genéticas (relacionamento
300 filogenético e distâncias genéticas) não sustentaram a divisão dessas espécies, mas
301 sugerem que as diferenças morfológicas e químicas encontradas representam uma ampla
302 variação intraespecífica dentro da mesma linhagem evolutiva. Estes padrões já foram
303 relatados para outros gêneros de Parmeliaceae como *Letharia* (Taylor, 2001),
304 *Xanthoparmelia* (Leavitt & al., 2011) e *Usnea* (Writz & al., 2012).

305 Além de incongruências entre a caracterização genética e morfológica, detectamos
306 clados com sequências extremamente similares ou até mesmo idênticas, mas pertencentes a

307 espécies com características químicas diversificadas. Nos clados II (*P. purpurascens* e *P.*
308 *osorioi*) e XI (*P. microsticta* e *P. riograndensis*), as espécies apresentaram sequências
309 idênticas de ITS, mas são diferenciadas apenas pela reação química da medula. A análise
310 dos metabólitos secundários na identificação de liquens é especialmente útil na distinção
311 das espécies de grupos estéreis (Fehrer & al., 2008). Esta abordagem assume a falta de
312 variação química no nível de espécie, porém, em diversos trabalhos já foi demonstrado que
313 a caracterização química quando aplicada sozinha não possui valor na delimitação de
314 espécies, pois pode haver ampla variação intraespecífica nos compostos líquenícios
315 (Lumbsch, 1998; Wirtz & al., 2008; Leavitt & al., 2011). Nestes casos, a química é melhor
316 usada na caracterização de espécies de liquens *a posteriori* do que *a priori* (Lumbsch,
317 1998).

318 Neste trabalho podemos constatar que as distâncias genéticas podem ser usadas como
319 ferramenta na delimitação das espécies de *Punctelia*, para identificar grupos e complexos
320 de espécies a serem investigados, além de indicar quais caracteres morfológicos podem
321 não refletir relações filogenéticas entre as espécies.

322

323 **Agradecimentos**

324 L.V. Silva é bolsista do programa Reuni-CAPES. Este projeto foi financiado pelo
325 Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), como parte
326 do projeto “Levantamento florístico e filogenia molecular das espécies brasileiras de
327 *Punctelia* (Parmeliaceae, Ascomycota Liquenizados)”.

328

329

Literatura citada

- 330 **Blanco, O., Crespo, A., Divakar, P.K., Elix, J.A. & Lumbsch, H.T.** 2005. Molecular
331 phylogeny of parmotreiod lichens (Ascomycota, Parmeliaceae). *Mycologia* 97:
332 150—159.
- 333 **Canêz, L.S.** 2009. *Estudos taxonômicos em Punctelia* (Parmeliaceae, Ascomycetes
334 Liqueñizados). Dissertation, Instituto de Botânica, SP.
- 335 **Canêz, L.S. & Marcelli, M.P.** 2007. Two new species of *Punctelia* (Parmeliaceae) from
336 southern Brazil. *Mycotaxon* 99: 211—216.
- 337 **Canêz, L.S. & Marcelli, M.P.** 2010. The *Punctelia* microsticta-group
338 (Parmeliaceae). *Bryologist* 113: 728—738.
- 339 **Crespo, A. & Pérez-Ortega, S.** 2009. Cryptic species and species pairs in lichens: a
340 discussion on the relationship between molecular phylogenies and morphological
341 characters. *An. Jard. Bot. Madr.* 66: 71—81.
- 342 **Crespo, A., Divakar, P.K., Argueello, A., Gasca, C. & Hawksworth, D.L.** 2004.
343 Molecular studies on *Punctelia* species of the Iberian Peninsula, with an emphasis
344 on specimens newly colonizing Madrid. *Lichenologist* 36: 299—308.
- 345 **Crespo, A., Kauff, F., Divakar, P.K., Del-Prado, R., Pérez-Ortega, S., De Paz, G.,**
346 **Ferencova, Z., Blanco, O., Roca-Valiente, B., Núñes-Zapata, J., Cubas, P.,**
347 **Argüello, A., Elix, J.A., Esslinger, T.L., Hawksworth, D.L., Millanes, A.,**
348 **Molina, M.C., Wedin, M., Ahti, T., Aptroot, A., Barreno, E., Bungartz, L.,**
349 **Calvelo, S., Candan, M., Cole, M., Ertz, D., Goffinet, B., Lindblom, L.,**
350 **Lücking, R., Lutzoni, F., Mattsson, J-E., Messuti, M.I., Miadlikowska, J.,**

- 351 **Piercey-Normore, M., Rico, V.J., Sipman, H.J. M., Schmitt, I., Spribille, T.,**
352 **Thell, A., Thor, G., Upreti, D.K. & Lumbsch, H. T.** 2010. Phylogenetic generic
353 classification of parmelioid lichens (Parmeliaceae, Ascomycota) based on
354 molecular, morphological and chemical evidence. *Taxon* 59:1735—1753.
- 355 **Darriba D., Taboada G.L., Doallo R., Posada D.** 2012. jModelTest 2: more models, new
356 heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9: 772.
357 <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.2109>.
- 358 **De Paz, G.A., Cubas, P., Divakar, P.K., Lumbsch, H.T. & Crespo A.** 2011. Origin and
359 diversification of major clades in parmelioid lichens (Parmeliaceae, Ascomycota)
360 during the Paleogene inferred by Bayesian Analysis. *Plos One* 12: e28161.
361 <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0028161>.
- 362 **Del-Prado, R., Cubas, P., Lumbsch, H.T., Divakar P.K., Blanco, O., De Paz, G.A.,**
363 **Molina, M.C. & Crespo, A.** 2010. Genetic distances within and among species in
364 monophyletic lineages of Parmeliaceae (Ascomycota) as a tool for taxon
365 delimitation. *Mol. Phylogenet. Evol.* 56: 125—133.
- 366 **Doyle, J.J. & Doyle, J.L.** 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of
367 fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19: 11—15.
- 368 **Drummond, A.J. & Rambaut, A.** 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by
369 sampling trees. Version 1.6.1. *B. M. C. Evol. Biol.* 7: 214.
370 <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2148-7-214>.

- 371 **Dunn, I.S. & Blattner F.R.** 1987. Sharons 36 to 40: Multi-enzyme, high capacity,
372 recombination deficient replacement vectors with polylinkers and polystuffers.
373 *Nucleic Acids Res.* 15: 2677—2698.
- 374 **Fehrer, J., Slavíková-Bayerová, Š. & Orange, A.** 2008. Large genetic divergence of
375 new, morphologically similar species of sterile lichens from Europe (*Lepraria*,
376 Stereocaulaceae, Ascomycota): concordance of DNA sequence data with secondary
377 metabolites. *Cladistics* 24: 443—458.
- 378 **Feuerer, T. & Hawksworth, D.L.** 2007. Biodiversity of lichens, including a world-wide
379 analysis of checklist data based on Takhtajan's floristic regions. *Biodivers.*
380 *Conserv.* 16: 85—98.
- 381 **Gardes, M. & Bruns, T.D.** 1993. ITS primers with enhanced specificity for
382 basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol.*
383 *Ecol.* 2: 113—118.
- 384 **Grube, M. & Kroken, S.** 2000. Molecular approaches and the concept of species and
385 species complexes in lichenized fungi. *Mycol. Res.* 104: 1284—1294.
- 386 **Honda, N.K. & Vilegas, W.** 1999. A química dos liquens. *Química Nova* 21: 110—125.
- 387 **Huneck, S., Yoshimura, I.** 1996. Identification of lichen substances. Springer. Alemania.
388 493p.
- 389 **Katoh, K., Kuma, K.I., Toh, H. & Miyata, T.** 2005. MAFFT version 5: improvement in
390 accuracy of multiple sequence alignment. *Nucleic Acids Res.* 33: 511—518.
- 391 **Krog, H.** 1982. *Punctelia*, a new genus in the Parmeliaceae. *Nordic Journal of Botany* 2:
392 287—292.

- 393 **Kroken, S. & Taylor, J.W.** 2001. A gene genealogical approach to recognize phylogenetic
394 species boundaries in the lichenized fungus *Letharia*. *Mycologia* 93: 38—53.
- 395 **Leavitt, S.D., Johnson, L.A., Goward, T. & St-Clair, L.L.** 2011. Species delimitation in
396 taxonomically difficult lichen-forming fungi: An example from morphologically
397 and chemically diverse Xanthoparmelia (Parmeliaceae) in North America. *Mol.*
398 *Phylogenet. Evol.* 60: 317—332.
- 399 **Lendemer, J.C. & Hodkinson, B.P.** 2010. A new perspective on *Punctelia subrudecta*
400 (Parmeliaceae) in North America: previously rejected morphological characters
401 corroborate molecular phylogenetic evidence and provide insight into an old
402 problem. *Lichenologist* 42: 405—421.
- 403 **Lumbsch, H. T.** (1998). The use of metabolic data in lichenology at the species and
404 subspecific levels. *The Lichenologist* 30: 357—367.
- 405 **Lumbsch H.T. & Leavitt S.D.** 2011. Goodbye morphology: a paradigm shift in the
406 delimitation of species in lichenized fungi. *Fungal Divers.* 50: 59—72.
- 407 **Marcelli, M.P., Jungbluth, P. & Elix, J.A.** 2009. Four new species of *Punctelia* from São
408 Paulo State, Brazil. *Mycotaxon* 109: 49—61.
- 409 **Meyer, C.P. & Paulay, G.** 2005. DNA barcoding: error rates based on comprehensive
410 sampling. *PLoS Biol.* 3: e422. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.0030422>.
- 411 **Molina, M.D.C., Crespo, A., Blanco, O., Lumbsch, H.T. & Hawksworth, D.L.** 2004.
412 Phylogenetic relationships and species concepts in *Parmelia s.str.* (Parmeliaceae)
413 inferred from nuclear ITS rDNA and b-tubulin sequences. *Lichenologist* 36: 37—
414 54.

- 415 **Moritz, C. & Cicero, C.** 2004. DNA barcoding: Promise and pitfalls. *PLoS Biol.* 2: e354.
416 <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.0020354>.
- 417 **Nixon, K.C., Wheeler, Q.D.** 1990. An amplification of the phylogenetic species concept.
418 *Cladistics* 6: 211—223.
- 419 **Penn, O., Privman, E., Ashkenazy, H., Landan, G., Graur, D. & Pupko, T.**
420 2010. GUIDANCE: a web server for assessing alignment confidence
421 scores. *Nucleic Acids Res.* 38: W23-W28. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkq443>.
- 422 **Printzen, C.** 2010. Lichen Systematics: The Role of Morphological and Molecular Data to
423 Reconstruct Phylogenetic Relationships. *Prog. Bot.* 71: 233—275.
- 424 **R Core Team**. 2012. R: A language and environment for statistical computing. Vienna,
425 Vienna: R Foundation for Statistical Computing.
- 426 **Swofford, D. L.** 1998. PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and others
427 methods) Version 4. Sunderland, Massachussets: Sinauer Associates.
- 428 **Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S.** 2011.
429 MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood,
430 evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28:
431 2731—2739.
- 432 **Taylor, K.S.** 2001. A gene genealogical approach to recognize phylgenetic species
433 boundaries in the lichenized fungus *Letharia*. *Mycologia* 93: 38—53.
- 434 **Tehler, A.** 1982. The species pair concept in lichenology. *Taxon* 31: 708—717.

- 435 **Thell, A., Crespo, A., Divakar, P.K., Kärnefelt, I., Leavitt, S.D., Lumbsch H.T. &**
436 **Seaward, M.R.D.** 2012. A review of the lichen family Parmeliaceae-history,
437 phylogeny and current taxonomy. *Nord. J. Bot.* 30: 641—664.
- 438 **Thell, A., Herber, B., Aptroot, A., Adler, M.T., Feuerer, T. & Kärnefelt, E.I.** 2005. A
439 preliminary phylogeographic study of *Flavopunctelia* and *Punctelia* inferred from
440 rDNA ITS-sequences. *Folia Cryptogam. Eston.* 41: 115—121.
- 441 **Thell, A., Stenroos, S., Feuerer, T., Kärnefelt, I., Myllys, L. & Hyvönen, J.** 2002.
442 Phylogeny of cetrarioid lichens (Parmeliaceae) inferred from ITS and b-tubulin
443 sequences, morphology, anatomy and secondary chemistry. *Mycol. Prog.* 1: 335—
444 354.
- 445 **Truong, C., Divakar, P.K., Yahr, R., Crespo, A., & Clerc, P.** 2013. Testing the use of
446 ITS rDNA and protein-coding genes in the generic and species delimitation of the
447 lichen genus *Usnea* (Parmeliaceae, Ascomycota). *Mol. Phylogenet. Evol.* 68: 357—
448 372.
- 449 **White, T.J., Bruns, T.D., Lee, S. & Taylor, J.** 1990. Amplification and direct sequencing
450 of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315—322 in: Innis, M.A.,
451 Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. & White, T.J. (eds.), *PCR protocols*. San Diego:
452 Academic Press.
- 453 **Wirtz, N., Printzen, C., & Lumbsch, H.T.** 2012. Using haplotype networks, estimation
454 of gene flow and phenotypic characters to understand species delimitation in fungi
455 of a predominantly Antarctic *Usnea* group (Ascomycota, Parmeliaceae). *Org.*
456 *Divers. Evol.* 12: 17—37.

457 **ZAR, J.H.** 2010. *Biostatistical Analysis.* New Jersey: Prentice-Hall.

458 Lista de Legendas

459 Fig.1- Árvore filogenética inferida por análise Bayesiana do gênero *Punctelia*. Os círculos
460 representam a origem dos espécimes analisados. ● Estados Unidos, ● Espanha, ●
461 Brasil, ● Portugal, ● Alemanha, ● China, ● Suíça, ● Itália, ● Bélgica, ● Argentina, ●
462 Austrália, ● Peru, ● Chile, ● Coréia, ● Holanda, ● Quênia.

463

464 Fig.2- Histograma de frequência das distâncias genéticas intraespecíficas e interespecíficas
465 do gênero *Punctelia*.

466

467 Fig.3- Gráfico de Densidade de Kernel para as distâncias genéticas intraespecíficas e
468 interespecíficas do gênero *Punctelia*.

469

470

471

472

473

474

475

476

477

478

479

Tabela 1 – Espécimes de *Punctelia* analisados neste trabalho coletados no Brasil.

Espécie	Código	Local de coleta	Coordenadas Geográficas	Nº coletor
<i>Punctelia albida</i> (Zahlbr.) Canêz & Marcelli	albi 1	Brasil, PR, Prudentópolis	25°04'07"S, 51°06'42"W, 785 m	Spielmann 10285
<i>Punctelia borerina</i> (Nyl.) Krog	borr 2	Brasil, SP, Piquete	22°31'30.1"S, 45°08'59"	Canêz 4167
	borr 3	Brasil, RS, São José dos Ausentes	28°34'23.2"S, 49°54'21"W, 1285 m	Spielmann 10222
	borr 4	Brasil, RS, São José dos Ausentes	28°34'23.2"S, 49°54'21"W, 1285 m	Spielmann 10223
	borr 5	Brasil, SC, Urubici	28°08'30.9"S, 49°38'07"W, 1355 m	Spielmann 9905
	borr 6	Brasil, PR, Guarapuava	25°18'01.4"S, 51°13'30"	Spielmann 10284
	borr 14	Brasil, PR, Guarapuava	"W, 1105 m 25°18'01.4"S, 51°13'30"W, 1105 m	Canêz 4146
	borr 15	Brasil, PR, Guarapuava	25°18'01.4"S, 51°13'30"W, 1105 m	Canêz 4149
<i>Punctelia canaliculata</i> (Lynge) Krog	cana 2	Brasil, RS, Rio Pardo		Canêz 3996
<i>Punctelia constantimontium</i> Sérusiaux	cons 1	Brasil, SC, Abelardo Luz	26°33'06"S, 52°19'31"W, 720 m	Spielmann 10169
<i>Punctelia crispa</i> Marcelli, Jungbluth & Elix	cris 1b	Brasil, RS, Formosa		Dal Forno 1286
<i>Punctelia digitata</i> Jungbluth, Marcelli & Elix	digi 1	Brasil, SP, Santo André		Marcelli 40143
<i>Punctelia dispersa</i> Marcelli & Canêz	disp 3	Brasil, ES, Ibitirama	20°25'17"S, 41°48'14"W, 2.525 m	Spielmann 10066
<i>Punctelia elixii</i> Marcelli & Canêz	elix 6	Brasil, ES, Ibitirama	20°25'17"S, 41°48'15"W, 2.525 m	Spielmann 10064
<i>Punctelia fimbriata</i> Marcelli & Canêz	fimb	Brasil, RS, Piratini		Spielmann 9366
<i>Punctelia hypoleucites</i> (Nyl.) Krog	hypo 1	Brasil, RS, Formosa		Dal Forno 1288
	hypo 2	Brasil, RS, Sinimbu	29°27'40.7"S, 52°31'10".4"W, 490m	Spielmann 9886
<i>Punctelia ibiunensis</i> Canêz & Marcelli	ibio 1	Brasil, ES, Ibitirama	20°25'17"S, 41°48'14"W, 2.525 m	Spielmann 10064
<i>Punctelia imbricata</i> Marcelli, Jungbluth & Elix	imb 1	Brasil, SC, Fragosos	26°10'12"S, 49°23'35"W, 860 m	Spielmann 10261
<i>Punctelia isidiata</i> Canêz & Marcelli	cf. isid 1	Brasil, MG, Catas Altas	20°05'51"S, 43°29'19"W, 1.280 m	Canêz 3118
<i>Punctelia krogiae</i> Marcelli & Canêz	krog 6 cf.	Brasil, SC, Rio Negrinho	26°17'57"S, 49°37'26"W, 825m	Spielmann 10259
<i>Punctelia lorentzii</i> (Kremp.) Krog	lore 1	Brasil, SC, Urubici	28°07'14.3"S, 49°29'25.2"W, 1720m	Spielmann 9946
	lore 2	Brasil, SC, Urubici	28°07'14.3"S, 49°29'25".2"W, 1720m	Spielmann 9947
	lore 3	Brasil, SC, Urubici	28°07'14.3"S, 49°29'25".2"W, 1720m	Spielmann 9948
<i>Punctelia microstictia</i> (Müll. Arg.) Krog	micr 10	Brasil, RS, Cambará do Sul, Parque Nacional da Serra Geral, Cânion Fortaleza	29°04'04.3"S, 49°57'50.8"W, 1030 m	Spielmann 10203
	micr 7	Brasil, RS, Cambará do Sul	29°04'04.3"S, 49°57'50.8"W, 1030 m	Spielmann 10212
<i>Punctelia mirabilis</i> Canêz & Marcelli	mira 4	Brasil, SC, Rio Negrinho	26°17'56.8"S, 49°37'26.0"W, 825 m	Spielmann 10251

<i>Punctelia missouriensis</i> Wilhelm & Ladd	miss 1	Brasil, MS, Campo Grande	Spielmann 5488
	miss4	Brasil, MS, Porto Murtinho	Simal 114
	miss 6	Brasil, MS, Porto Murtinho	Simal 118
<i>Punctelia osorioi</i> Canêz & Marcelli	osor 5	Brasil, RS, Piratininga	Canêz 3816
<i>Punctelia lauropalui</i> Canêz & Marcelli	laurop alu 1 .	Brasil, RS, Sinimbu, Cava Funda	Spielmann 9854
<i>Punctelia praestictica</i> (?)	prae 1	Brasil, RJ, Itatiaia	Canêz 4269
<i>Punctelia puigarii</i> Canêz & Marcelli	puig 1	Brasil, SP	Jungbluth 2104
<i>Punctelia purpurascens</i> Marcelli & Canêz	purp 2	Brasil, RS, Piratini	Canêz 3836
<i>Punctelia riograndensis</i> (Lynge) Krog	riog 12	Brasil, SC, Cambará do Sul	Spielmann 10205
<i>Punctelia ruderata</i> (Vainio) Canêz & Marcelli	rude 5	Brasil, PR, Prudentópolis	Spielmann 10283
<i>Punctelia subpraesignis</i> (Nyl.) Krog	subp 14	Brasil, RS, Sinimbu, Cava Funda	Spielmann 9857
	subp 16	Brasil, RS, Sinimbu	Spielmann 9871
	subp 17	Brasil, RS, Sinimbu	Spielmann 9872
	subp 18	Brasil, RS, Caxias do Sul	Spielmann 9875
	subp 19	Brasil, RS, Sinimbu, Cava Funda	Spielmann 9866
	sub 20	Brasil, SP, Piquete	Spielmann 10027
	subp 22	Brasil, SP, Piquete	Spielmann 9995
	subp 23	Brasil, SP, Piquete	Spielmann 9997
	subp 24	Brasil, RS, SãoSepé	Spielmann 9613
<i>Punctelia subrudecta</i> (Nyl.) Krog	subr 2	Brasil, RS, Sinimbu, Cava Funda	Spielmann 9864
<i>Punctelia toxodes</i> (Stirt.) Kalb & Götz	toxo 8	Brasil, RJ, Teresópolis	Spielmann 10074

Tabela 2 - Número de acesso no *GenBank* das sequências de ITS utilizadas neste estudo.

Espécie	Local de coleta	Voucher	Nº Acesso
			GenBank ITS
<i>Flavopunctelia flaventior</i> (Stirt.) Hale	China	DCH-19	AY586563
<i>Punctelia borreri</i> (Turner ex Sm.) Krog	Itália	T. Feuerer & A. Thell s. n. (HBG) DNA945	AY773113
<i>Punctelia borreri</i>	China	A. Aptroot no. 56028 (ABL) DNA1506	AY773115
<i>Punctelia borreri</i>	Itália	A. Gambera 34126 (dupl. HBG) DNA960	AY773114
<i>Punctelia borreri</i>	Itália	DNA-AT959 (LD, HBG)	AF451769
<i>Punctelia borreri</i>	Portugal	MAF 9919	AY581088
<i>Punctelia borreri</i>	Coreia	Hur 030736	DQ394373
<i>Punctelia borreri</i>	Espanha	MAF-Lich 10240	AY613409
<i>Punctelia borreri</i>	Espanha	MAF-Lich 10255	AY613405
<i>Punctelia borreri</i>	Espanha	MAF-Lich 10254	AY613404
<i>Punctelia borreri</i>	Portugal	MAF-Lich 10237	AY613401
<i>Punctelia borreri</i>	Quênia	Dorothee Killmann, s.n. (Herb.Killmann)	AY773110
<i>Punctelia borreri</i>	Quênia	Dorothee Killmann, s.n. (Herb.Killmann)	AY773112
<i>Punctelia caseana</i> Lendemer & Hodkinson	Estados Unidos	NY:Lendemer 13805	GU384885
<i>Punctelia caseana</i>	Estados Unidos	NY:Lendemer 15041	GU384881
<i>Punctelia caseana</i>	Estados Unidos	NY:Lendemer 12733	GU384879
<i>Punctelia caseana</i>	Estados Unidos	NY:Lendemer 13428	GU384886
<i>Punctelia caseana</i>	Estados Unidos	NY:Harris 54826	GU384884
<i>Punctelia caseana</i>	Estados Unidos	NY:Lendemer 9896	GU384882
<i>Punctelia caseana</i>	Estados Unidos	NY:Lendemer 13604	GU384880
<i>Punctelia jeckeri</i> (Roum.) Kalb	Holanda	Sipman & Aptroot 44450-DNA956	AY773120
<i>Punctelia jeckeri</i>	Estados Unidos	NY:Knudsen 7687	GU384887
<i>Punctelia jeckeri</i>	Estados Unidos	NY:Lendemer 14739	GU384890
<i>Punctelia jeckeri</i>	Estados Unidos	NY:Lendemer 14695	GU384888
<i>Punctelia jeckeri</i>	Estados Unidos	NY:Lendemer 14701	GU384889
<i>Punctelia jeckeri</i>	Suécia	Sweden et al. (LD-1188067)	EF611288
<i>Punctelia missouriensis</i> Wilhelm & Ladd	Estados Unidos	NY:Lendemer 15006	GU384892
<i>Punctelia perreticulata</i> (Räsänen) G.Wilh. & Ladd	China	A. Aptroot 56005 (ABL) DNA1331	AY773124
<i>Punctelia perreticulata</i>	USA	D. Ladd 23798 (HBG) DNA1286	AY773123

<i>Punctelia perreticulata</i>	Espanha	MAF-Lich 10239	AY613391
<i>Punctelia perreticulata</i>	China	A. Aptroot no. 56094	AY773122
<i>Punctelia pseudocoralloidea (Gyeln.) Elix & Kantvilas</i>	Austrália	MAF 6922	AY586572
<i>Punctelia rudenta (Ach.) Krog</i>	Estados Unidos	MAF 10162	AY586574
<i>Punctelia rudenta</i>	Estados Unidos	MAF 7661	AY586573
<i>Punctelia rudenta</i>	Espanha	MAF-Lich 10256	AY613403
<i>Punctelia stictica (Delise ex Duby) Krog</i>	Peru	Thell & Feuerer s. n. (HBG) DNA1609	AY773119
<i>Punctelia stictica</i>	Venezuela	T. Feuerer s. n. (HBG) DNA1020	AY773125
<i>Punctelia subflava (Taylor) Elix & J. Johnston</i>	Austrália	Elix 42705 (CNB)	AY586575
<i>Punctelia subpraesignis (Nyl.) Krog</i>	Argentina	DNA1310 (HBG, LD)	AY267010
<i>Punctelia subrudecta (Nyl.) Krog</i>	Alemanha	T. Feuerer & A. Thell s. n. (HBG)	AY773116
<i>Punctelia subrudecta</i>	Portugal	MAF 9918	AY581089
<i>Punctelia subrudecta</i>	Suécia	Sweden, Skane, Lund, Westberg (LD-1193242)	EF611287
<i>Punctelia subrudecta</i>	Espanha	MAF-Lich 16158	HM016968
<i>Punctelia subrudecta</i>	Espanha	MAF-Lich 16165	HM016969
<i>Punctelia subrudecta</i>	Espanha	MAF-Lich 16164	HM016970
<i>Punctelia subrudecta</i>	Espanha	MAF-Lich 16161	HM016971
<i>Punctelia subrudecta</i>	Espanha	MAF-Lich 16157	HM016972
<i>Punctelia subrudecta</i>	Espanha	MAF-Lich 16160	HM016973
<i>Punctelia subrudecta</i>	Espanha	MAF-Lich 16167	HM016974
<i>Punctelia subrudecta</i>	Espanha	MAF-Lich 16156	HM016975
<i>Punctelia subrudecta</i>	Espanha	MAF-Lich 16159	HM016976
<i>Punctelia subrudecta</i>	Espanha	MAF-Lich 16155	HM016978
<i>Punctelia subrudecta</i>	Espanha	MAF-Lich 16139	HM016979
<i>Punctelia subrudecta</i>	Espanha	MAF-Lich 16163	HM016980
<i>Punctelia subrudecta</i>	Itália	A. Gambera 34128 (dupl. HBG) DNA958	AY773117
<i>Punctelia subrudecta</i>	Espanha	MAF-Lich 10241	AY613392
<i>Punctelia subrudecta</i>	Alemanha	MAF-Lich 10243	AY613393
<i>Punctelia subrudecta</i>	Alemanha	MAF-Lich 10250	AY613394
<i>Punctelia subrudecta</i>	China	MAF-Lich 10244	AY613395
<i>Punctelia subrudecta</i>	Espanha	MAF-Lich 10245	AY613396
<i>Punctelia subrudecta</i>	Espanha	MAF-Lich 10242	AY613397
<i>Punctelia subrudecta</i>	Espanha	MAF-Lich 10248	AY613398
<i>Punctelia subrudecta</i>	Espanha	MAF-Lich 10238	AY613399

<i>Punctelia ulophylla</i> (=jeckeri)	Alemanha	MAF-Lich 10249	AY613407
<i>Punctelia ulophylla</i>	Alemanha	MAF-Lich 10251	AY613406

483

484

485

486 **Tabela 3-** Parâmetros das distâncias genéticas intraespecíficas e interespecíficas e teste de normalidade de Shapiro–Wilks (w).

Distâncias	Espécie	número amostra	median a	varianci a	média ± desvio padrão	intervalo	p	w
Intraespecífica	<i>P. borreri</i>	16	0,0068	9,9 E-6	0,0065 ± 0,0031	0 à 0,0126	<0,0001	0,949
	<i>P. rudecta</i>	3	0	0,000175	0,0085 ± 0,0132	0 à 0,0268	0,0023	0,662
	<i>P. subrudecta</i>	24	0,0022	5,30E-06	0,0023 ± 0,0023	0 à 0,0091	<0,0001	0,818
	<i>P. borrerina</i>	7	0,0056	1,40E-05	0,0057 ± 0,0037	0 à 0,0114	0,0227	0,089
	<i>P. missouriensis</i>	4	0,0046	2,5 E-5	0,0046 ± 0,0050	0 à 0,0091	0,004	0,683
	<i>P. jeckeri</i>	10	0	8,4 E-7	0,0004 ± 0,0009	0 à 0,0023	<0,0001	0,48
	<i>P. perreticulata</i>	3	0,0035	9,4 E-5	0,0075±0,0097	0 à 0,0233	0,102	0,827
	<i>P. caseana</i>	9	0,0045	2,50E-05	0,0061 ± 0,0050	0 à 0,0166	0,0014	0,854
	Clados agrupados	76	0,0022	1,50E-05	0,0037 ± 0,0039	0 à 0,0268 0,007 à	<0,0001	0,832
Interespecífica	27 espécies	103	0,0824	0,0005	0,0786 ± 0,0223	0,1461	<0,0001	0,955

487

488

489

490 **Tabela 4-** Distâncias genéticas entre os grupos com espécies diferentes.

Clado	Comparações	Distâncias
II	<i>P. purpurascens</i> x <i>P. osorioi</i>	0
X	<i>P. praesticta</i> (Brasil) x <i>P. stictica</i> (Peru)	0,0113
XI	<i>P. microsticta</i> x <i>P. riograndensis</i>	0
XII	<i>P. albida</i> x <i>P. isidiata</i>	0,0067
XII	<i>P. puigarii</i> x <i>P. isidiata</i>	0
XII	<i>P. puigarii</i> x <i>P. albida</i>	0,0067
XIV	<i>P. elixii</i> x <i>P. ibiunensis</i>	0,009
XIV	<i>P. elixii</i> x <i>P. reddenda</i>	0,0114
XIV	<i>P. ibiunensis</i> e <i>P. reddenda</i> .	0,0022

491

492

493

494

495

496

497

498

499

500

501

502

503

504

505

506

507

508

509 **Tabela 5-** Parâmetros das análises de comparação, entre as distâncias intraespecífica e
 510 interespecífica para o gênero e entre os espécimes de *P. subpraesignis* e *P.*
 511 *pseudohypoleucites*, *P. fimbriata* e *P. imbricata*.

512

Comparações	p	u	Distâncias entre espécimes
Intraespecífica X interespecífica	<0,000	70808,	
<i>P. subpraesignis</i> X <i>P. pseudohypoleucites</i>	1	5	
<i>P. subpraesignis</i> X <i>P. fimbriata</i>	0,06	97,5	0,0044 à 0,0208
<i>P. subpraesignis</i> X <i>P. imbricata</i>	0,8611	682	0,0067 à 0,0138
	0,7908	690	0,0067 à 0,0138

513

514

515

516

517

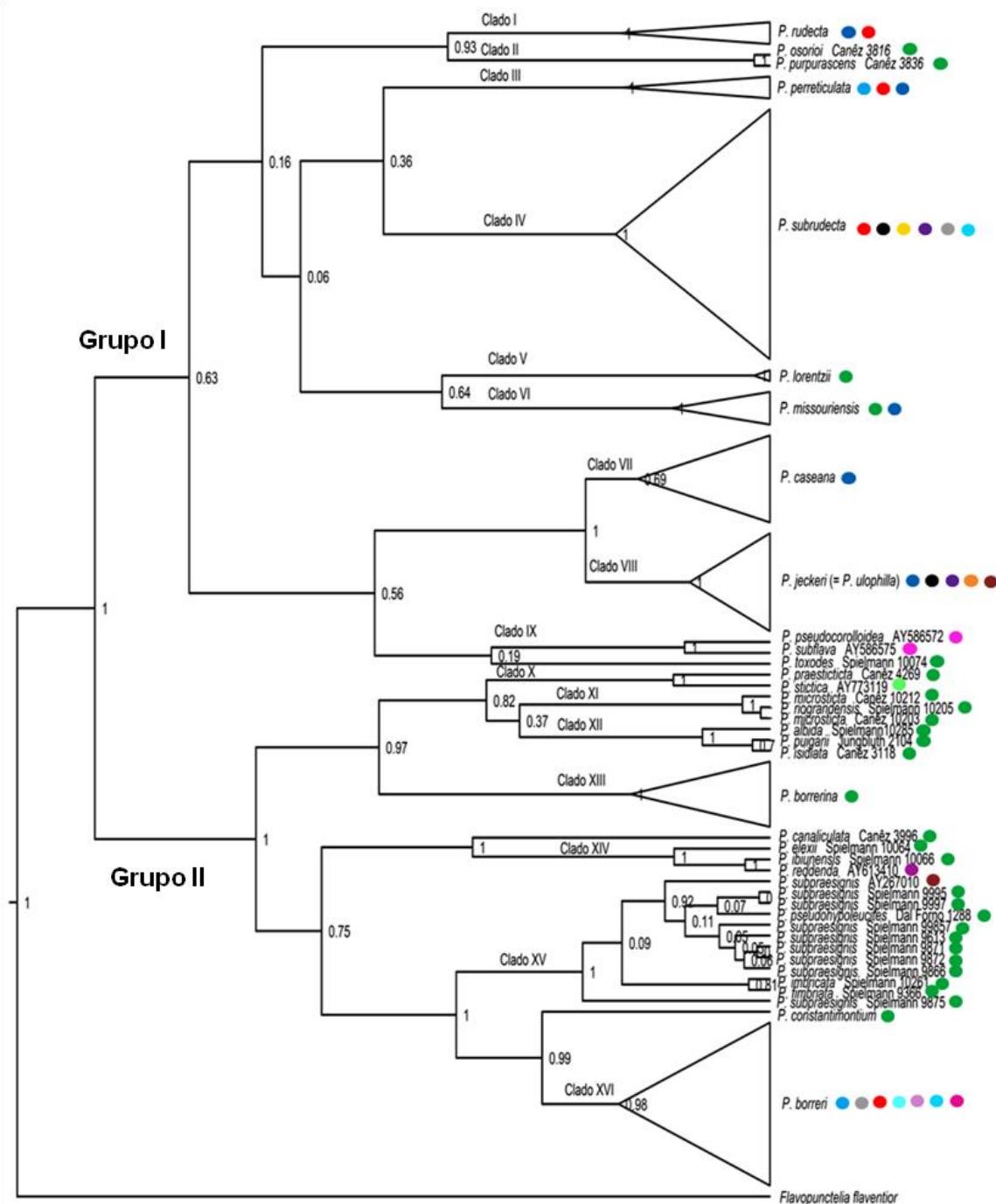
518

519

520

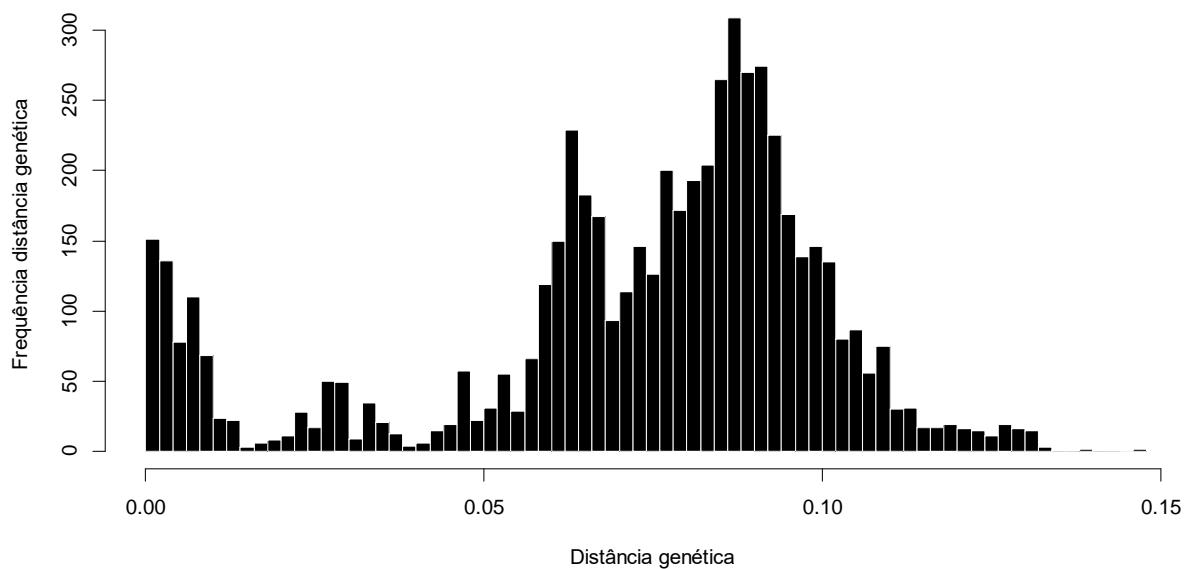
521

522



523

524 Fig. 1



525

526 Fig. 2

527

528

529

530

531

532

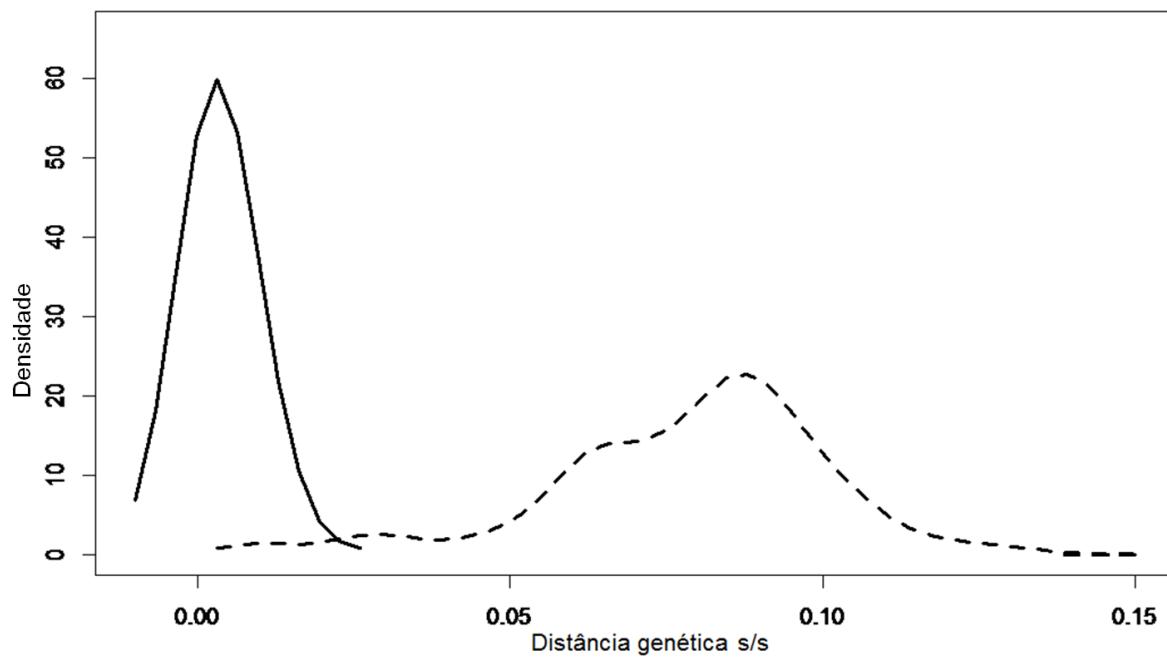
533

534

535

536

537



538

539 Fig. 3

540

541

542

543

544

545

546

547

548

549 **Considerações Finais**

550 Com a análise filogenética de *Punctelia* foi possível identificar a divisão do gênero
551 em dois grupos bem suportados. Evidências morfológicas na cor da superfície inferior
552 apoiam a divisão do gênero. No entanto, a presença de exceções sinaliza que a cor da
553 superfície inferior não se trata de um caráter homólogo.

554 As distâncias genéticas intraespecíficas e interespecíficas apesar de
555 significativamente diferentes, apresentaram sobreposição nas distribuições dos valores
556 constituída de valores com baixa frequência. A sobreposição pode dificultar a identificação
557 precisa de espécies como na abordagem do DNA barcode.

558 As análises moleculares e as identificações morfológicas foram congruentes em
559 nove dos 16 clados analisados, sendo consideradas espécies bem demilitadas, mesmo
560 quando os espécimes estavam distribuídos em continentes diferentes se mantiveram como
561 um grupo monofilético. Nos demais sete clados a identificação morfológica não foi
562 congruente com a análise filogenética e as distâncias genéticas. Podemos constatar que as
563 distâncias genéticas podem ser usadas como ferramenta na delimitação das espécies de
564 *Punctelia*, para identificar grupos e complexos de espécies a serem investigados, além de
565 indicar quais caracteres morfológicos podem não refletir relações filogenéticas entre as
566 espécies. Esta análise trata-se de uma primeira abordagem com apenas um marcador, sendo
567 que a distribuição, o número de espécies do gênero bem como as incertezas na delimitação
568 em sua totalidade ainda é desconhecido.

569

570

