



República Federativa do Brasil
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Instituto de Biociências



Ciências Biológicas - Bacharelado

**Diversidade de fotobiontes avaliada por *metabarcoding* de genes ribossomais:
estudo de caso com *Dirinaria confluens* (Fr.) D.D. Awasthi (Caliciaceae,
Ascomycota liquenizados)**

Elmo dos Santos Pimenta Junior

Campo Grande - MS

2023

**Diversidade de fotobiontes avaliada por *metabarcoding* de genes ribossomais:
estudo de caso com *Dirinaria confluens* (Fr.) D.D. Awasthi (Caliciaceae,
Ascomycota liquenizados)**

**Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Instituto de
Biotecnologia - UFMS, como parte das
exigências para obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biológicas**

Orientadora: Aline Pedroso Lorenz

Campo Grande - MS

2023

Agradecimentos

Agradeço pela oportunidade de trabalhar no LEBio (Laboratório de Ecologia e Biologia Evolutiva), com a equipe de apoio Professora Gecele Matos Paggi e técnica Josiane Vogel Theodoro, que me auxiliaram com o acesso ao computador onde as análises foram feitas e o servidor Dourado da FACOM - UFMS.

Ao doutorando Daniel Guerra Franco pelos comentários sobre a delimitação das análises e suporte técnico no pipeline do QIIME 2.

À Professora Aline Pedroso Lorenz pela orientação, organização do servidor e discussões sobre o trabalho.

Ao Samuel Vilasboas e Ligia Pereira pelo companheirismo e apoio durante os últimos quatro anos.

Resumo

Em estudos que avaliam a diversidade genética a partir de análises metagenômica, as sequências amplificadas são representantes de uma parcela dos organismos que ali vivem. Contudo, devido à similaridade genética resultante da ancestralidade comum, o uso de primers universais muitas vezes leva à amplificação e sequenciamento de DNA de espécies filogeneticamente distantes que estão presentes em uma mesma amostra de DNA ambiental. Neste estudo, foram realizadas análises de bioinformática da região V4 do gene ribossomal 16S, usado em princípio, para analisar somente a comunidade de bactérias presentes em talos do fungo liquenizado *Dirinaria confluens* e *D. confluens* var. *coccinea* (Caliciaceae, Ascomycota). As análises de 38 amostras revelaram que uma porção significativa das sequências não pertenciam a região v4 de bactérias, mas ao gene ribossomal *rrs* do cpDNA de algas verdes do gênero *Trebouxia* sp., o principal fotobionte associado à *D. confluens*. As sequências de *Trebouxia* foram analisadas separadamente, sendo detectados 64 haplótipos diferentes. As análises filogenéticas corroboraram que se trata de sequências de cpDNA proximamente relacionadas, não sendo possível definir a princípio se todas pertencem a mesma espécie de *Trebouxia*. O presente trabalho demonstra o potencial do uso de análises de bioinformática do sequenciamento alto rendimento feito com *primers* da região v4 do gene ribossomal 16S de bactérias para o estudo de ficobiontes associados com fungos liquenizados.

Palavras-chave: Líquens, cpDNA, v4 16S, algas verdes, *Trebouxia* sp.

Abstract

In studies that evaluate genetic diversity based on metagenomic analyses, the amplified sequences represent a portion of the organisms that live there. However, due to the genetic similarity resulting from common ancestry, universal primers often lead to the amplification and sequencing of DNA from phylogenetically distant species present in the same environmental DNA sample. In this study, bioinformatics analyses were carried out on the v4 region of the 16S ribosomal gene, used in principle to analyze only the community of bacteria present in thalli of the lichenized fungus *Dirinaria confluens* and *D. confluens* var. *coccinea* (Caliciaceae, Ascomycota). Analysis of 38 samples revealed that a significant portion of the sequences did not belong to the v4 region of bacteria but to the ribosomal *rrs* gene of the cpDNA of green algae of the genus *Trebouxia* sp., the main photobiont associated with *D. confluens*. The *Trebouxia* sequences were analyzed separately, and 64 different haplotypes were detected. Phylogenetic analyses confirmed that these are closely related cpDNA sequences, and it is not possible to define at first whether they all belong to the same species of *Trebouxia*. The present work demonstrates the potential of using bioinformatics analyses of high-throughput sequencing made with bacterial v4 16S primers to study phycobionts associated with lichenized fungi.

Keywords: Lichens, cpDNA, v4 16S, green algae, *Trebouxia* sp.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	
1.1 Os líquens e suas características básicas	4
1.2 O fungo liquenizado <i>Dirinaria confluens</i> e seus fotobiontes	5
1.3 Análises genéticas	6
2. OBJETIVOS	9
3. MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1 Obtenção do material	10
3.2 Extração de DNA, Amplificação e Sequenciamento	10
3.3 Análises filogenéticas	11
4. RESULTADOS	13
5. DISCUSSÃO	24
6. CONCLUSÃO	25
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26

1. INTRODUÇÃO

1.1 Os líquens e suas características básicas

Líquens são em essência um organismo exclusivamente simbiote mutualista, constituído por um fungo heterotrófico e um fotobionte, essa associação é determinada holobionte. O talo, estrutura formada pelos fungos liquenizados e demais componentes associados, apresenta uma maior complexidade, caracterizada pela presença de outras linhagens de fungos (Jenkins & Richards 2019) e por inúmeras bactérias (Fernández-Brime et al. 2019).

A constituição básica da relação entre o micobionte e o fotobionte de um líquen envolve a captura de simbiontes fotossintéticos por um biofilme hidrofóbico secretado pelo fungo. Esse agente selante canaliza os carboidratos fotossintetizados para a zona de contato com o fungo (Honegger 1991), que realiza a sua absorção, além de fornecer proteção contra a dissecação e temperaturas extremas (Kranner et al. 2008; Kosugi et al. 2009; Sadowsky & Ott 2016; Gauslaa et al. 2017; Míguez et al. 2017; Beckett et al. 2019).

A formação do talo liquenizado é dependente da disponibilidade de fotobiontes do ambiente, bem como a especificidade do micobionte e a seletividade dentre as algas ou cianobactérias presentes (Vančurová et al. 2018). Fatores ecológicos determinam a disponibilidade de espécies no ambiente, já a especificidade define a compatibilidade de associação entre fungo e fotobionte, enquanto a seletividade caracteriza a frequência de associação entre linhagens de fotobiontes distintos (Leavitt et al. 2015).

Os líquens são identificados pela principal espécie de fungo que o forma (Grube & Wedin 2016), e a seletividade de fungos liquenizantes é mais restrita do que as de algas liquenizantes, conforme demonstrado por Piercey-Normore & DePriest (2001) em um estudo filogenético de troca de fotobiontes entre líquens da família *Cladoniceae*. Suas análises demonstraram uma disparidade entre os pares formados, que indica uma maior seleção de genótipos feita pelos por fungos em relação às algas que vão se associar.

1.2 O fungo liquenizado *Dirinaria confluens* e seus fotobiontes

O fungo liquenizado *Dirinaria confluens* (Fr.) D.D. Awasthi é caracterizado por talos adnatos, com lobos amplos, de superfície inferior escurecida, ausência de sorédios e isídios, com himênio espesso característico e ascósporos acentuados (Elix 2009). Possui hábito corticícola ou saxícola, e ocorre em regiões tropicais-subtropicais, em países como México, Nicarágua, Guatemala, Brasil, Quênia, Austrália, Taiwan e Equador (Lichen Portal 2023). *Dirinaria confluens* var. *coccinea* (Lyngé) D.D. Awasthi é uma variante de incidência exclusiva à região neotropical da América do Sul. É morfologicamente similar à *D. confluens* e se distingue pela presença de um pigmento vermelho concentrado na camada superior de sua medula (Dias-Barbosa 2019).

Os fotobiontes de *D. confluens* são algas verdes do gênero *Trebouxia* Puymaly (Trebouxiaceae). São organismos unicelulares, esféricos ou elipsóides, com cloroplasto axial e pirenóide proeminente (Guiry & Guiry 2018; Sanders & Matsumoto 2021). Quanto ao seu hábito, há poucos registros de *Trebouxia* de vida livre, mas já foram sequenciados em análises de metagenômica de solos e água (Darienko et al. 2013; Hallmann et al. 2013, 2016; Yung et al. 2014). No entanto, isso não é confirmatório da existência de indivíduos de *Trebouxia* de vida livre, apenas que existiram tais organismos nesses meios, uma vez que seu DNA pode ser detectado no ambiente.

Mais de uma linhagem de *Trebouxia* já foi observada no interior de um mesmo talo liquenizado (Piercey-Normore 2006). Supõe-se que seja vantajoso ao líquen manter a diversidade genética de fotobiontes para adaptar-se a mudanças de condições ambientais (Muggia et al. 2013). Essas diferentes linhagens de *Trebouxia* em um mesmo talo podem apresentar diferentes taxas de crescimento e de rendimento fotossintético (Casano et al. 2011), resposta ao estresse oxidativo (del Hoyo et al. 2011), e tolerância a metais pesados (Álvarez et al. 2015). Aparentemente, diferentes trebouxíóides não são necessariamente competitivos dentro do mesmo talo liquenizado e possivelmente ocupam nichos diferentes em seu interior.

1.3 Análises genéticas

A identificação das algas verdes é usualmente feita pela análise microscópica de sua morfologia (Sanders & Matsumoto 2021). Para estudos de diversidade genética, geralmente utiliza-se a amplificação e o sequenciamento da região ITS (espaçadores internos transcritos) do DNA ribossomal (Blaha et al 2006, Piercey-Normore 2006, Dal Grande et al. 2014, Nyati et al. 2014, Molins et al. 2020), e de regiões do DNA cloroplastidial (Catalá et al. 2015). Mais recentemente, para elucidar a diversidade de espécies e linhagens de fotobiontes presentes em um talo liquenizado tem-se utilizado uma combinação de análises metagenômicas e filogenômicas (Catalá et al. 2016). Nessas, o material genético é extraído de amostras ambientais e posteriormente as sequências são atribuídas a unidades taxonômicas operacionais (OTUs, do inglês *operational taxonomic units*), identificadas por meio de análises filogenéticas.

Outros marcadores moleculares também podem ser utilizados para sequenciamento e análises filogenéticas de *Trebouxia*, como a subunidade pequena do DNA ribossomal nuclear (nuSSU rDNA), a subunidade grande do DNA ribossomal nuclear (nuLSU rDNA), o primeiro íntron da subunidade pequena nuclear do DNA ribossomal (íntron do nuSSU rDNA) (Piercey-Normore and DePriest 2001), além dos éxons e íntrons da subunidade grande do DNA cloroplastidial (LSU cpDNA) (Del Campo et al. 2010).

O talo liquenizado em si é geneticamente diverso, comumente havendo até mais de um fungo liquenizante. Essas espécies ocultas foram descobertas por meio de sequenciamento genético de múltiplos locos (Spribille et al. 2022). Adicionalmente, também é possível observar a mesma linhagem de fungo principal formando talos liquênicos morfologicamente distintos, como *Ricasolia amplissima*, onde a associação com a alga *Dictyochloropsis* resulta em um líquen folhoso e a associação com uma cianobactéria forma um líquen fruticoso (Armaleo & Clerc 1991).

Dessa forma, uma amostra de líquen é composta por várias espécies, cujos materiais genéticos ficam misturados após a extração de DNA. No sequenciamento de DNA pelo método de Sanger, essa mistura pode não ser detectada devido à natureza do processo de amplificação utilizado. Porém, com o desenvolvimento de novos sequenciadores de alto rendimento foi possível obter sequências de diferentes

táxons de uma mesma amostra. A diversidade de espécies presentes em amostras de água, solo, entre outras, puderam ser avaliadas de forma mais eficiente. Entre as técnicas empregadas, o *metabarcoding* identifica diferentes táxons presentes em amostras ambientais complexas por meio do sequenciamento de regiões de DNA conhecidas como *barcodes*. DNA *barcodes* são regiões de 500 – 800 pb, amplificadas por primers universais, e com variação interespecífica adequada para a separação e identificação de espécies (Hebert et al. 2003).

Para a investigação das bactérias presentes em uma amostra por meio de *metabarcoding*, utiliza-se regiões hipervariáveis do gene ribossomal 16S. No caso dos líquens, é possível que os primers universais usados para amplificar o gene 16S de bactérias também amplifiquem regiões do DNA dos outros organismos presentes na amostra, como os fungos e as algas. Essa “contaminação” ocorre devido à similaridade genética entre o gene 16S de bactérias e os genes ribossomais das mitocôndrias e dos cloroplastos, resquícios da ancestralidade comum de eucariotos e bactérias (Fitzpatrick et al. 2018).

Quando o objetivo é analisar a composição do bacterioma por *metabarcoding*, (16S), pode-se usar algumas técnicas para a remoção de “contaminantes” eucariontes. Uma delas é o PCR *clamping* com PNAs (ácidos peptídico proteicos). Os PNAs possuem sequências complementares específicas que se ligam ao DNA dos possíveis contaminantes impedindo a sua amplificação (Lundberg et al. 2013). Em 2013, Sakai et al. utilizaram o PCR *clamping* com PNAs para investigar a diversidade de rizobactérias associadas às raízes de plantas, demonstrando uma supressão significativa da amplificação de DNA vegetal. Essa técnica foi usada por Aschenbrenner et al. (2017) no estudo das conexões entre o bacterioma de casca de árvores, musgos e líquens (*Lobaria pulmonaria*). Uma alternativa ao PCR *clamping* é o uso de primers que bloqueiem a amplificação do gene 12S do rRNA mitocondrial de fungos, como feito por Fernandez-Brime et al. (2019) no estudo das comunidades bacterianas associadas ao fungo *Schizoxylon albescens* (Stictidaceae, Ascomycota liquenizados). A vantagem do uso de técnicas que impedem o sequenciamento dos “contaminantes” (eucariotos), é que não se perdem leituras da região-alvo, ou seja, das regiões hipervariáveis do gene 16S.

Ferramentas de bioinformática podem filtrar as sequências “contaminantes” após o sequenciamento. A plataforma QIIME 2 (*Quantitative Insights Into Microbial Ecology*), por exemplo, permite análises modulares de microbioma usando uma arquitetura baseada em plug-ins (Pylro et al. 2014; Bolyen et al. 2019). A filtragem dos contaminantes pode ser feita após o controle de qualidade de sequências geradas e da atribuição taxonômica baseada em bancos de dados (Greengenes, SILVA, entre outros). A aplicação deste pipeline agrupa as sequências em OTUs com base na porcentagem de similaridade (geralmente igual ou acima de 97%) e as compara com a base de dados escolhida, permitindo sua identificação a nível de filo, ordem, família, e em alguns casos, até gênero. Com o lançamento do QIIME 2, em 2018, houve uma expansão significativa do uso do programa devido ao suporte de desenvolvimento e publicação de novos *plugins* por usuários, além de uma plataforma dedicada a visualização de resultados através de imagens e tabelas editáveis (<https://view.qiime2.org/>). Desta forma, é possível usar inclusive com dados de fungos liquenizados, para determinar a diversidade e abundância de bactérias, fungos e algas presentes nos talos (Anslan et al. 2018; Smith et al. 2020).

A diversidade de fotobiontes de *Dirinaria confluens* é pouco conhecida atualmente, e, se for como outras espécies de fungos liquenizados, é possível que existam mais de uma linhagem de fotobiontes associados. Sendo assim, a proposta desse trabalho é descrever a diversidade de fotobiontes encontrada em talos de *Dirinaria confluens* e *Dirinaria confluens* var. *coccinea* ocorrentes na região urbana de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, utilizando sequências geradas por sequenciamento de alto rendimento (Plataforma Ion Torrent) com primers de genes ribossomais.

2. OBJETIVOS

Avaliar a diversidade de fotobiontes de *Dirinaria confluens* coletados no Parque dos Poderes, Campo Grande – MS.

Objetivos Específicos:

- Analisar sequências de *Trebouxia* obtidas durante o sequenciamento de alto rendimento da região v4 do gene 16S;
- Descrever a diversidade de fotobiontes de *Dirinaria confluens* e *Dirinaria confluens* var. *coccinea*, em termos de número e divergência de haplótipos, e de seu relacionamento filogenético.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção do material

Vinte e seis amostras de *Dirinaria confluens* e *Dirinaria confluens* var. *coccinea* foram coletadas na região do Parque dos Poderes, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil (-20,449233/ -54,554962; 635 metros de altitude). A coleta do talo com seu substrato foi feita com sacos de papel e armazenada em isopor com gelo, transportada para o laboratório imediatamente após a coleta. Os talos foram separados do substrato e ambos foram lavados com água Mili-Q e armazenados em freezer -80° C.

Os talos foram coletados individualmente com distância mínima de 8 metros entre os forófitos. Para a padronização do substrato, todos os líquens eram epífitos, presentes no tronco de árvores da espécie *Pachira aquatica* Aubl. (Malvaceae). Foram realizadas duas coletas, ambas na estação seca. A primeira foi feita em 26/08/2021, com baixa umidade relativa do ar após 35 dias de escassez pluvial em Campo Grande. A segunda coleta foi feita no dia 30/08/2021, após 10 mm de chuva e elevação da umidade relativa do ar.

3.2 Extração de DNA, Amplificação e Sequenciamento

Como parte de um estudo de bacterioma de *Dirinaria*, o DNA foi extraído com o kit MagMax™ Microbiome Ultra Nucleic Acid Isolation (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), de acordo com as instruções do fabricante. Para a amplificação da região V4 do gene ribossomal 16S de bactérias, foram utilizados os primers 515F (5'-GTG CCA GCM GCC GCG GTA A-3') e 806R (5'-GGA CTA CHV GGG TWT CTA AT-3') (Caporaso et al. 2011). Os primers são fusionados com os Ion Xpress Barcode Adapters para o sequenciamento. Cada amostra foi amplificada em triplicada, e os produtos de PCR foram combinados após a verificação em gel de agarose 1%. Os amplicons foram purificados em duas etapas com o reagente AMPure XP beads (Beckman Coulter, CA, USA). Bibliotecas de amplicons de 30 pM foram carregadas no Ion Chef™ Instrument (Thermo Fisher Scientific) para PCR de emulsão,

enriquecimento e carregamento em chips Ion S5 520 e então sequenciadas usando o Ion GeneStudio™ S5 System (Thermo Fisher Scientific) com 850 flows.

3.3 Análises filogenéticas

As análises de bioinformática foram realizadas com QIIME 2 2022.2 (Bolyen et al. 2019). As sequências brutas foram filtradas quanto à sua qualidade usando o plugin q2-demux seguida pelo plugin DADA2 via “denoise-pyro” (Callahan et al. 2016; “via q2-dada2”). Todas as ASVs (*amplicon sequence variants*) com menos de 10 cópias foram removidas via comando “feature-table filter-features”. A análise atribuição taxonômica foi feita com o plugin “feature-classifier classify-sklearn” e o banco de dados SILVA (Glöckner et al. 2017).

Para as análises das sequências dos fotobiontes, foram selecionadas apenas as sequências classificadas como “Chloroplast” e “Chlorophyta” (“feature-table filter-seqs”). Estas foram tabuladas (“feature-table tabulate-seqs”) e exportadas no formato *tsv*. Todas as análises foram feitas no servidor da Faculdade de Computação da UFMS ou localmente.

O BLAST de cada uma das ASVs detectadas foi feito manualmente pelo site do NCBI, usando o *blastn* e a base de dados e parâmetros padrão. Foram contabilizando os 100 primeiros *hits* ordenados por menor *E-value*. A identificação como *Trebouxia* sp. foi confirmada com pelo menos uma sequência nomeada como *Trebouxia* entre os 100 hits, independente da similaridade. Caso não houvesse sequências de *Trebouxia*, usamos como critério de identificação as sequências dos 10 *hits* com menor *E-value* em relação a ASV comparada. Nestes casos, usamos apenas a identificação ao nível de filo.

O alinhamento das ASVs foi feito com o plugin MAFFT v7 (Kato et al. 2002, via “q2-alignment”) pelo programa Geneious® 9.1.6 (Kearse et al. 2012). Os alinhamentos exploratórios identificaram uma ASV (f770dc46f43d2467e9c69ec1e6e5e87c) com 20% de divergência em relação às demais. Um valor discrepante se comparado com o máximo de 10% encontrado entre as demais ASVs, por esse motivo ela usada como grupo externo na filogenia. A análise filogenética pelo método de máxima verossimilhança foi feita com o programa

RAxML (Stamatakis 2014) dentro do servidor online CIPRES (Miller & Schwartz 2010). Além das ASVs obtidas neste trabalho, foram usadas duas sequências de *Trebouxia* sp. obtidas no GenBank (NC045839 de *Trebouxia* sp. e EU123993 de *Trebouxia aggregata*).

Por fim, foram feitas análises descritivas comparando-se o número de sequências (*reads*) geradas no sequenciamento para cada ASV em relação às amostras e suas respectivas características. Os dados analisados foram o forófito onde a amostra foi coletada; a cor da medula do líquen e a situação pluviométrica no dia da coleta.

4. RESULTADOS

Dentre as 52 amostras coletadas, 38 tiveram êxito na amplificação e sequenciamento. Foram detectadas 65 sequências distintas de 270pb (ASVs), sendo uma delas mais divergente e usada como grupo externo. O resultado do BLAST revelou que essas sequências não são da região 16S de bactérias, mas são uma porção do segundo éxon do gene *rrs*, subunidade menor do RNA ribossomal (small-subunit ribosomal RNA), do DNA de cloroplasto das algas. Com exceção da ASV usada como grupo externo (f770dc46f43d2467e9c69ec1e6e5e87c), o BLAST indicou que 57 são semelhantes a *Trebouxia* sp. (NC045839); três a *Trebouxia aggregata* (EU123993); três como cianobactérias não cultiváveis; uma como bactéria não cultivável; e, uma como *Fissidens protonematicula* Sakurai. Cabe ressaltar que, os *hits* de cianobactérias e bactérias não cultiváveis são de sequências obtidas por meio de estudos metagenômicos de amostras ambientais, como solo e água. As ASVs foram renomeadas como h01 a h64. A relação filogenética entre as ASVs pode ser visualizada na árvore construída pelo método de máxima verossimilhança (Figura 1).

O número total de sequências obtidas (*reads*) foi de 378.105. Em média, cada ASV apresentou 5.904 *reads*, sendo a ASV h01 a mais representada com 52.457 (Figura 2). A distribuição das ASVs nas amostras foi bastante heterogênea. As ASVs h10 e h61 tiveram a maior distribuição, presentes em 13 amostras cada (Figura 3). Além disso, 43 ASVs eram exclusivas de apenas uma amostra, sendo elas: h01; h04; h07; h09; h11; h16; h18; h19; h20; h22; h24; h25; h26; h27; h28; h30; h31; h33; h34; h36; h37; h38; h39; h40; h41; h42; h43; h44; h45; h46; h47; h48; h49; h50; h51; h53; h54; h58; h59; h60; h62; h63 e h64.

A amostra de maior número de *reads* foi D26, com 107.772 (Figura 4). Já a de maior ocorrência foi D13s, com 10 haplótipos identificados (Figura 5). A sequência h01 foi a mais frequente em amostras de líquen, sendo exclusiva do mesmo. Já o h02 foi o mais encontrado em amostras de substrato, com 1.598 *reads* totais, no entanto, é primariamente encontrado em amostras de líquen, com 48.182 de 49.780 *reads* entre as duas categorias amostrais (Figura 6).

Quanto ao tipo de medula, branca em *Dirinaria confluens* e vermelha em *Dirinaria confluens* var. *coccinea*, h01 é exclusivamente encontrado em amostras de medula branca. Destaca-se a heterogeneidade dos resultados, com haplótipos

exclusivos de medula branca, outros exclusivos de medula vermelha e outros presentes em ambas (Figura 7).

Em relação às condições pluviométricas, a coleta feita após a chuva teve um considerável número de *reads* geradas a mais, assim como de ASVs distintas em comparação com a coleta feita no auge de seca. Sendo h01 a ASV mais frequente e de ocorrência exclusiva de estação chuvosa, enquanto h61 é a de maior ocorrência em meses de seca (Figura 8). Os forófitos da coleta foram 11 árvores distintas da espécie *Pachira aquatica* Aubl. (Malvaceae), destaca-se o significativo número total de *reads* da árvore 10 (tree_10) em comparação com as demais (Figura 9).

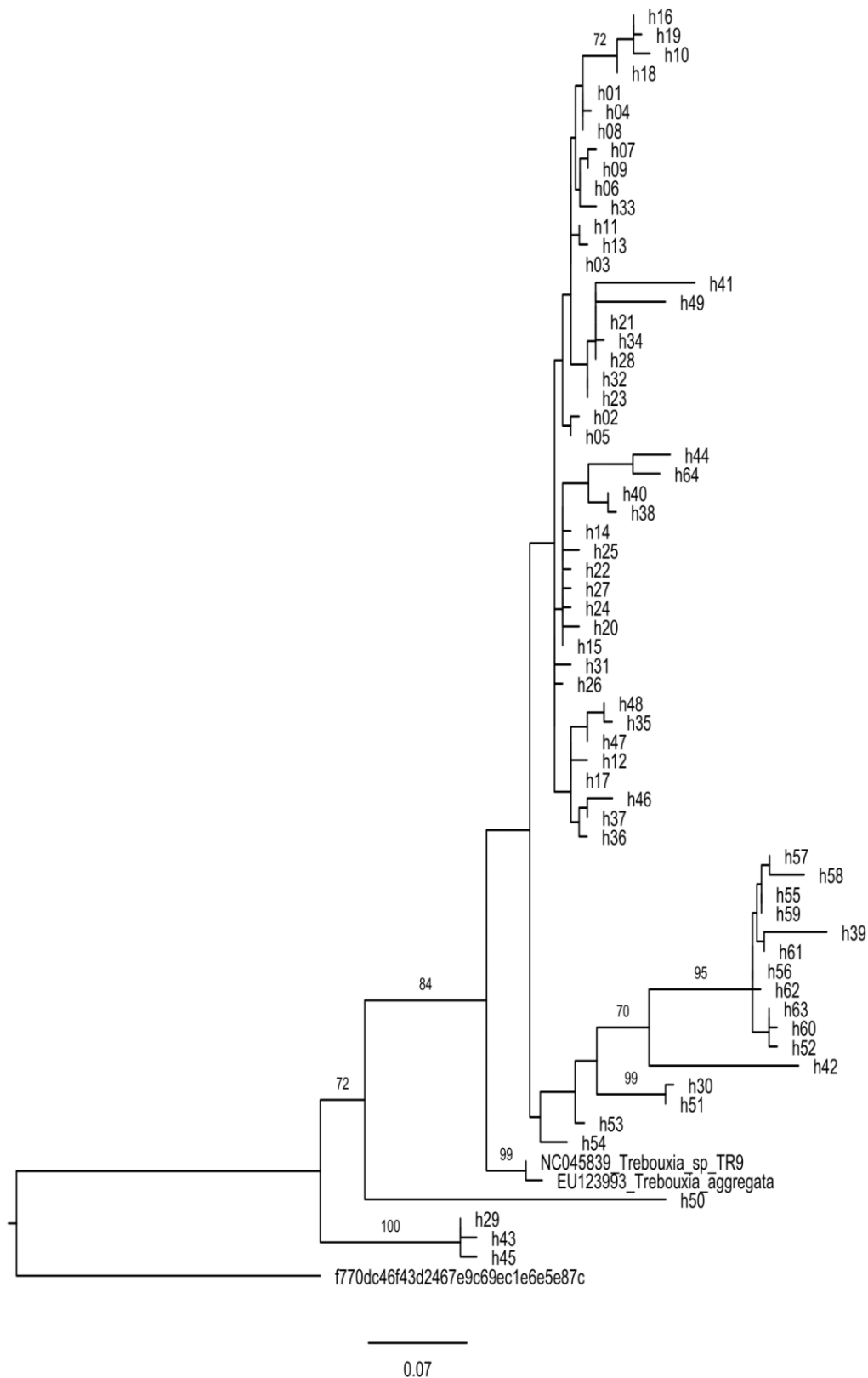


Figura 1. Árvore filogenética construída pelo método de máxima verossimilhança com as sequências parciais do gene *rrs* do DNA ribossômico plastidial. As ASVs foram obtidas de amostras de *Dirinaria confluens* e *D. confluens* var. *coccinea*. Os ramos com valores de bootstrap acima de 70 estão em destaque.

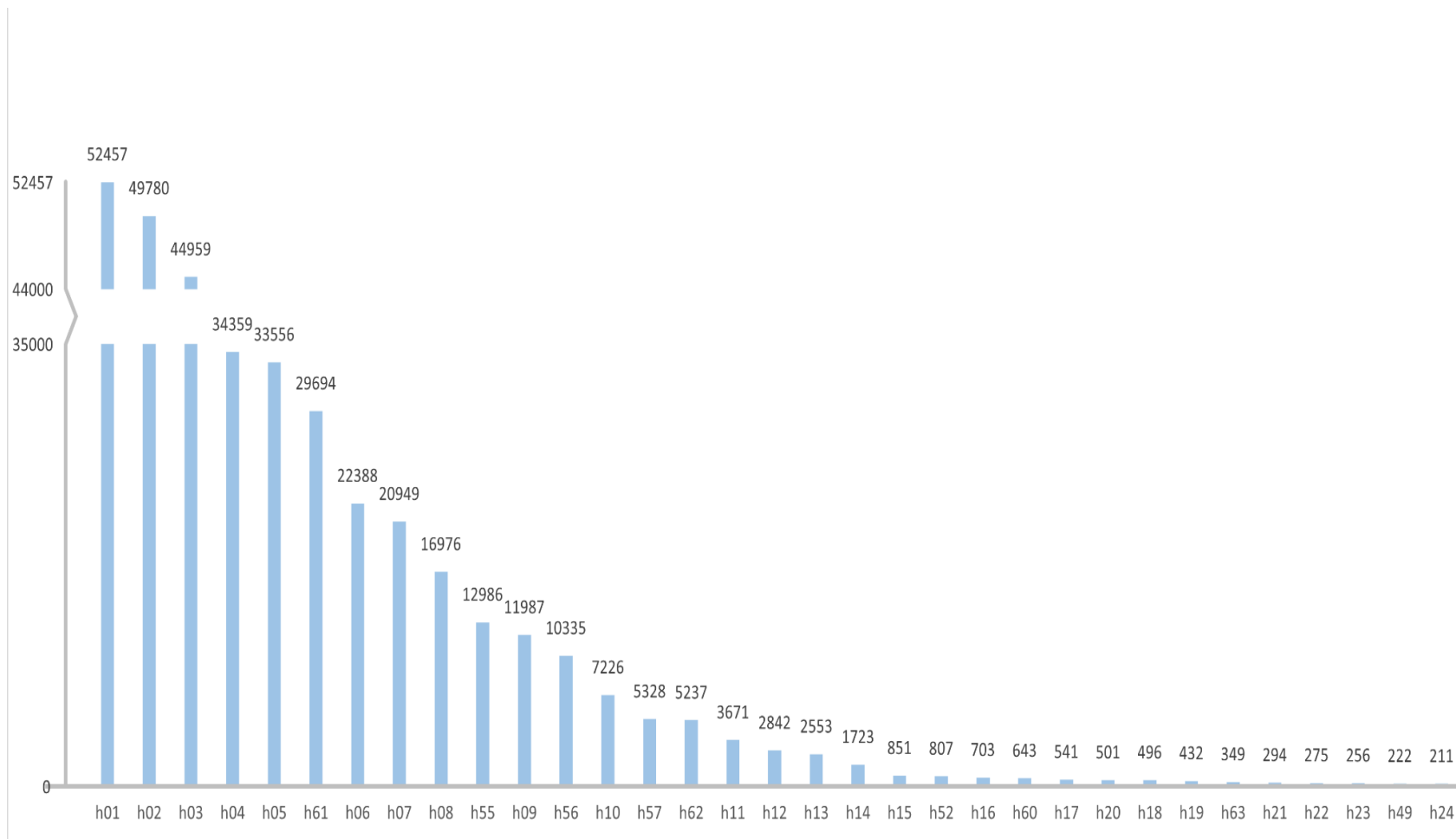


Figura 2. Número de *reads* por ASV. ASVs com menos de 200 *reads* não estão representadas neste gráfico.

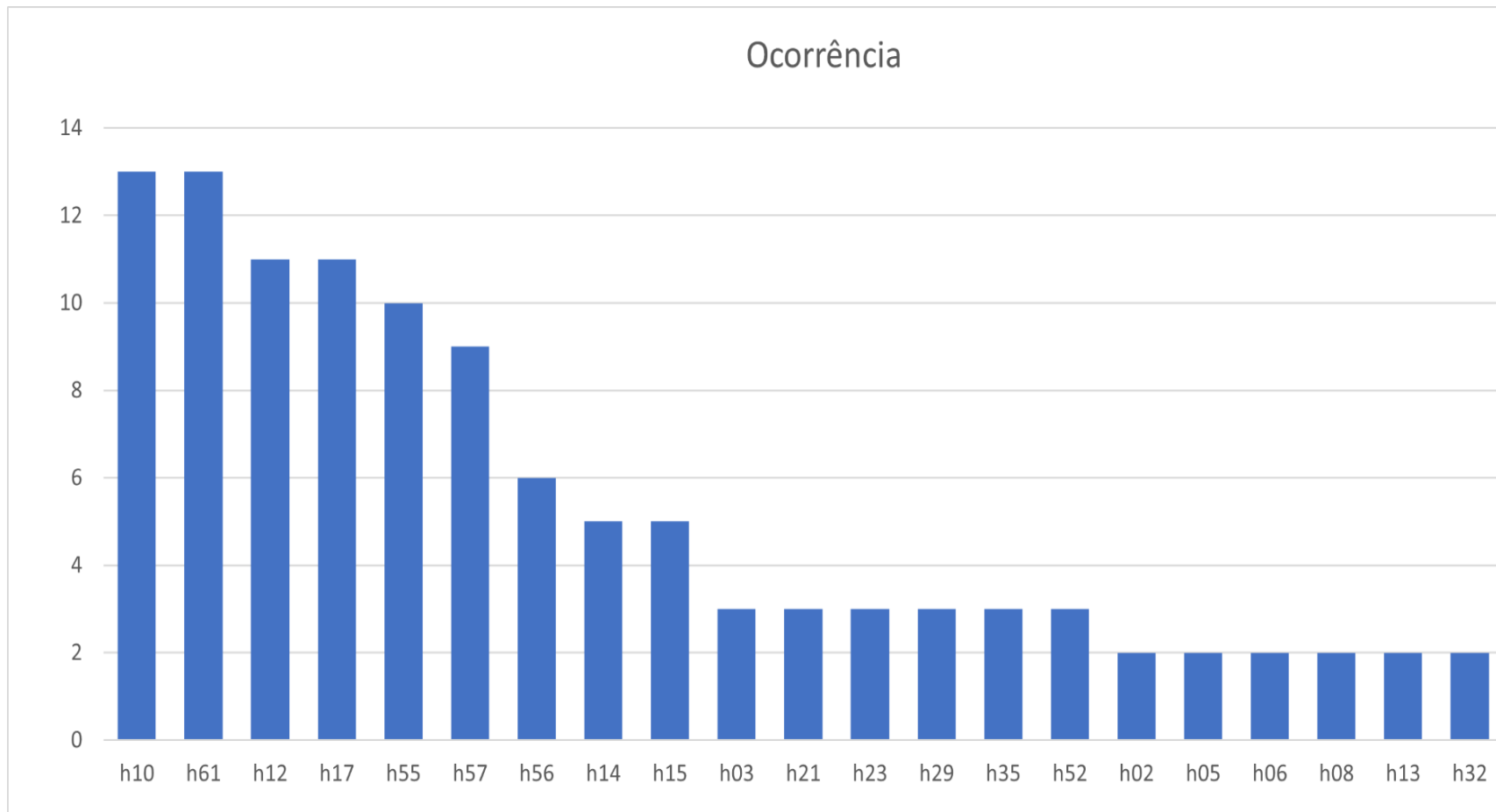


Figura 3. Número de amostras nas quais as ASVs estão presentes. As ASVs presentes em apenas uma amostra não estão representadas neste gráfico.

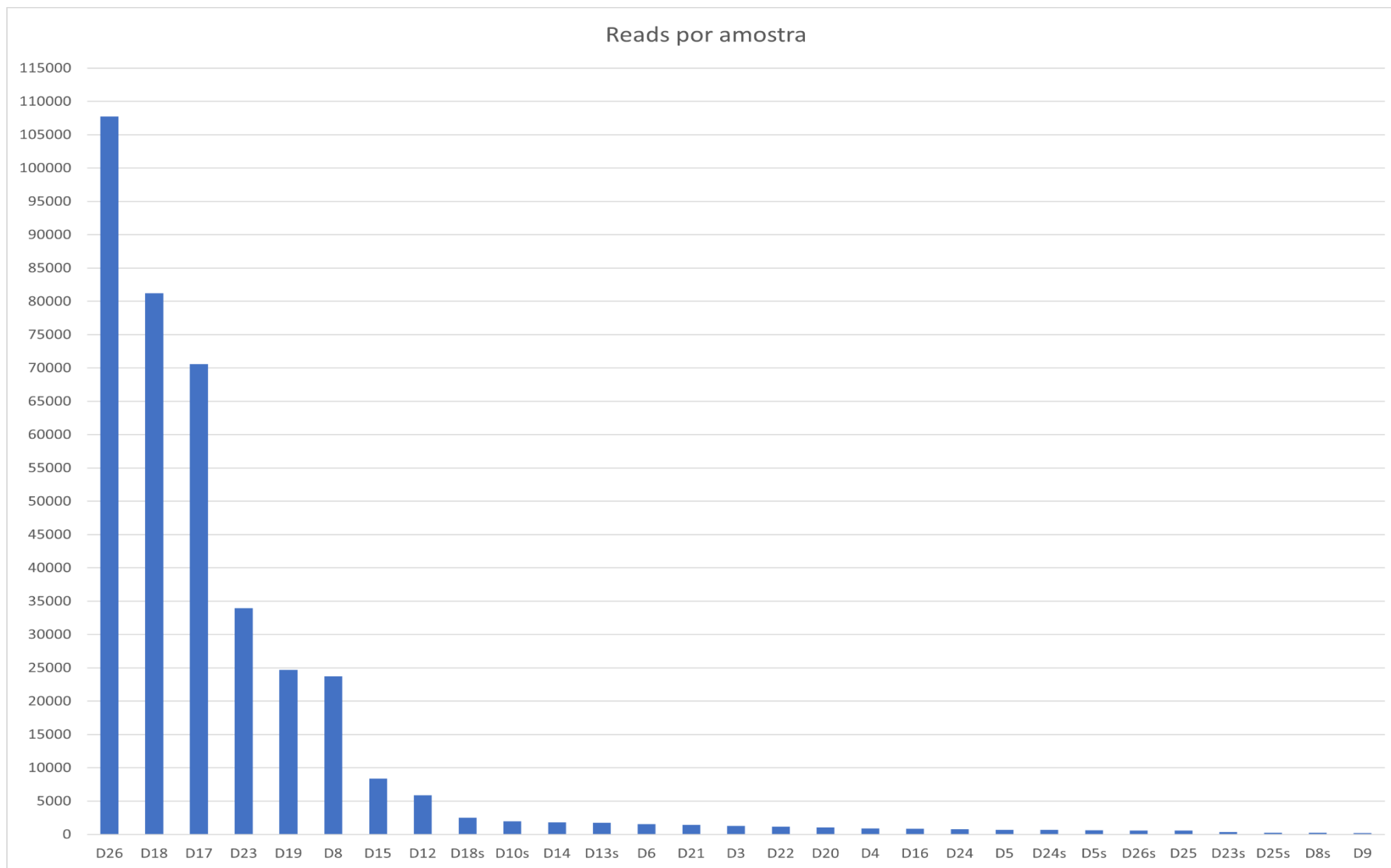


Figura 4. Número de *reads* por amostra.

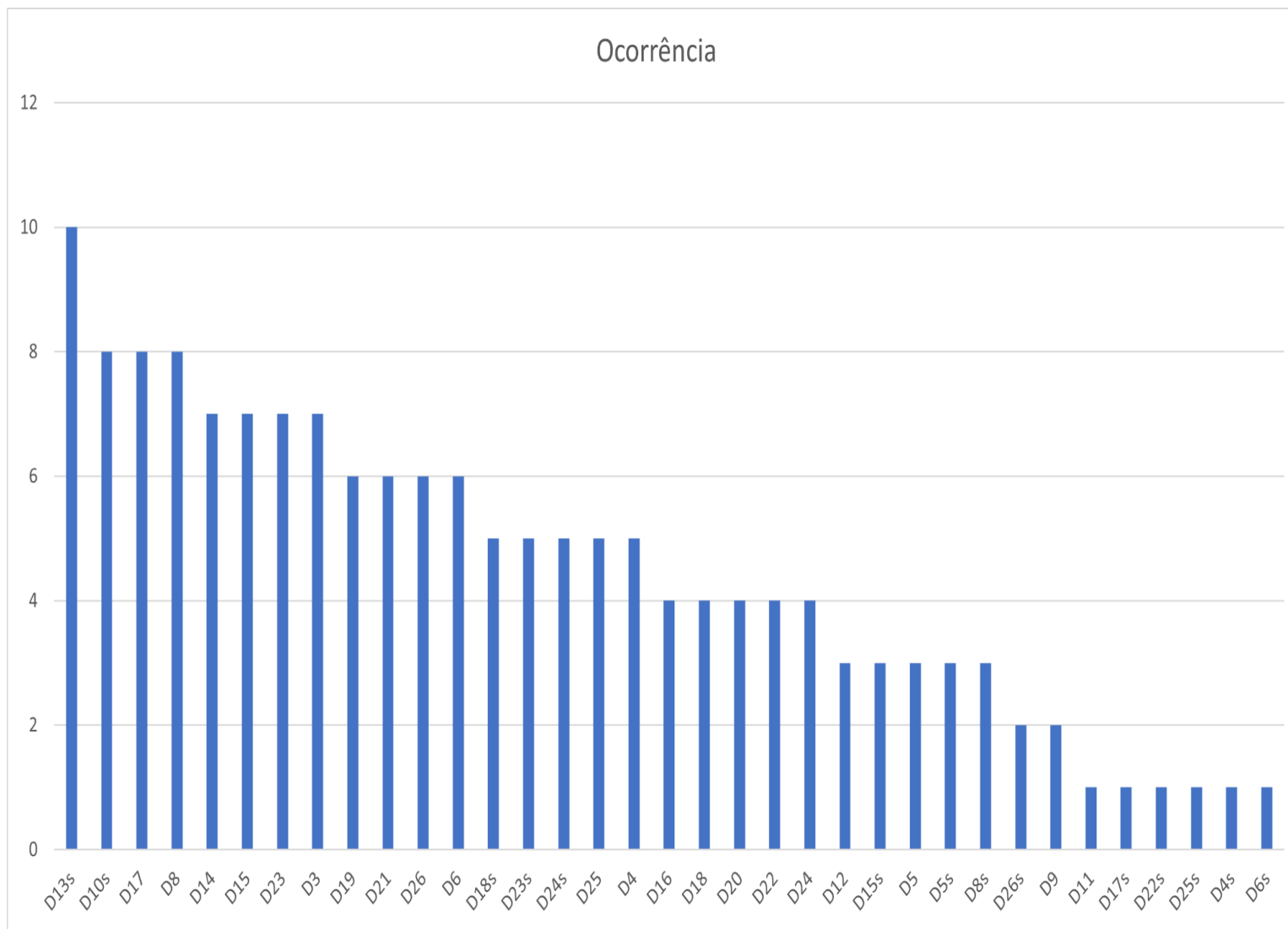


Figura 5. Número de ocorrências de haplótipos distintos em uma amostra.

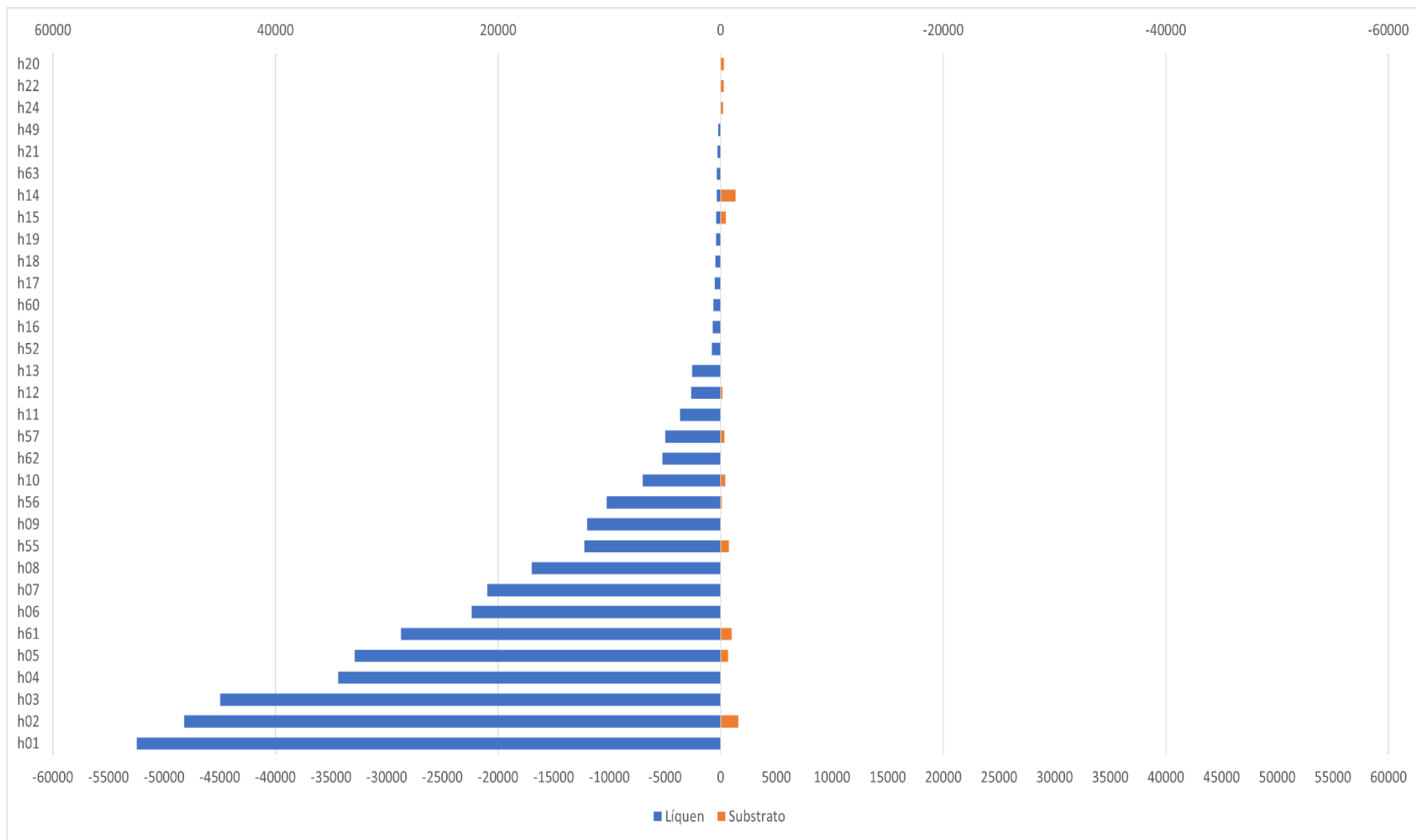


Figura 6. Número de reads dos 64 haplótipos divididos entre amostras de líquen e de substrato, amostras com menos de 200 reads de ambas as categorias não estão representadas.

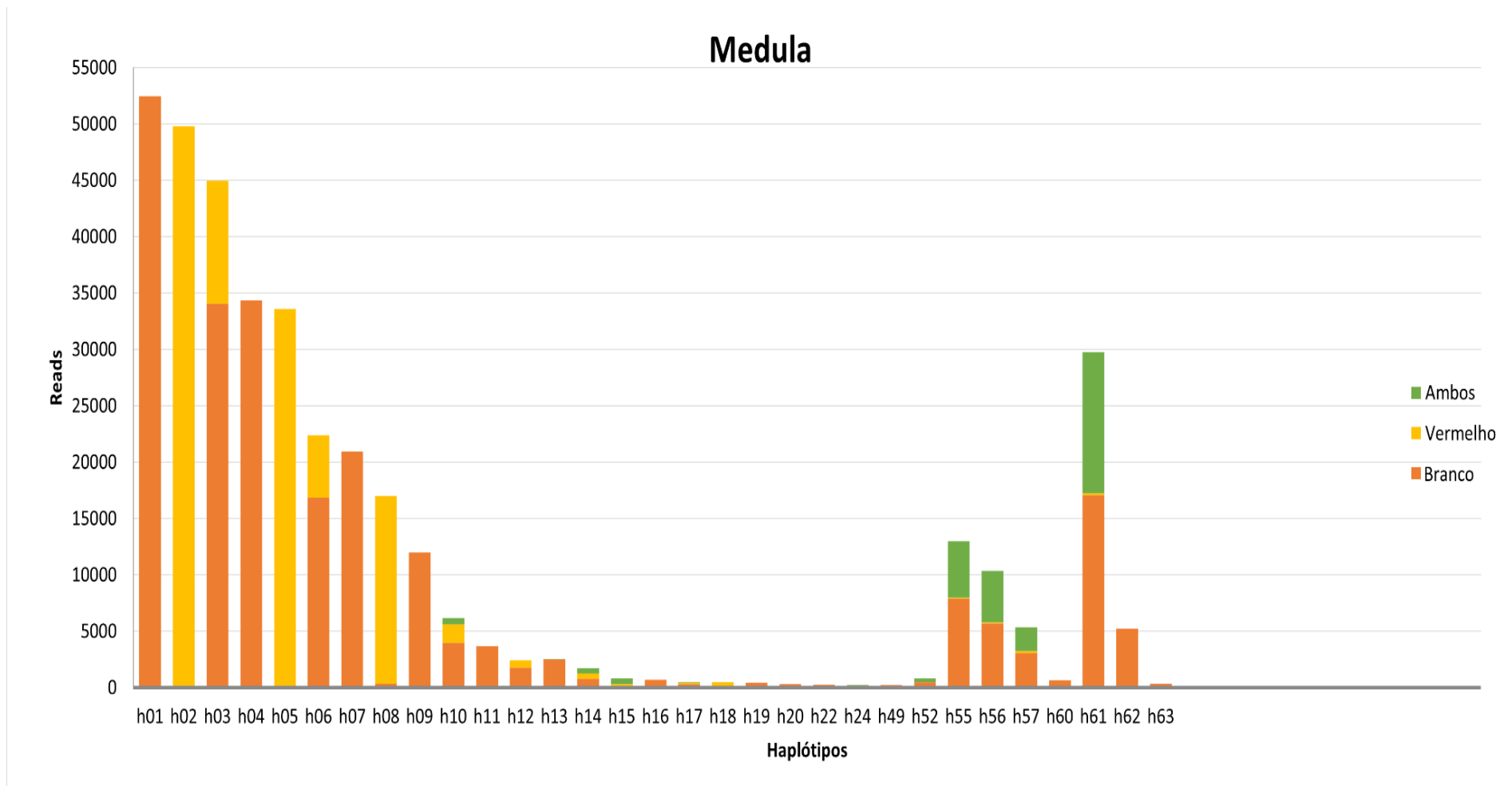


Figura 7. Distribuição do número de reads de cada ASV em relação ao tipo de medula. ASVs com menos de 200 reads não estão representadas neste gráfico.

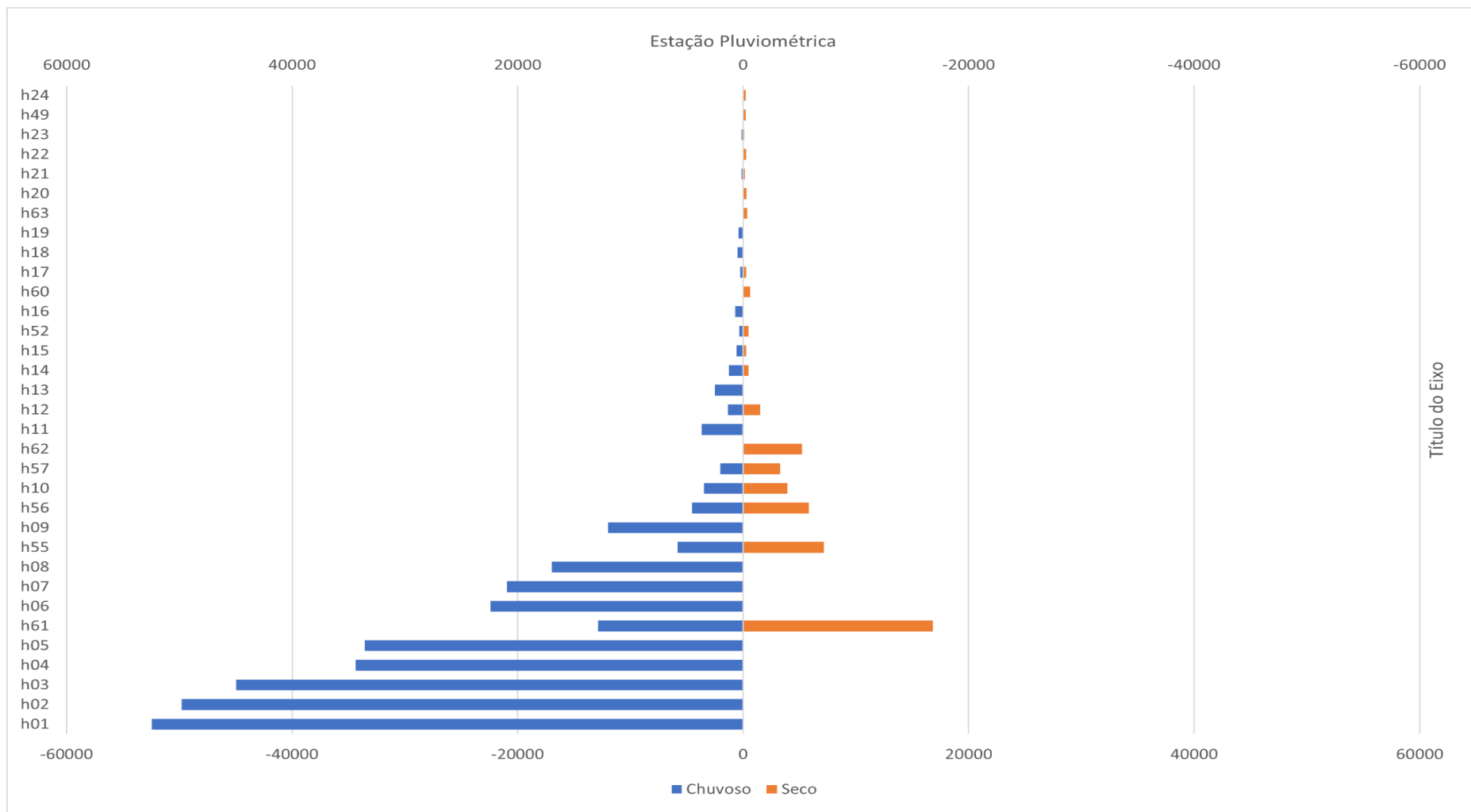


Figura 8. Número de *reads* geradas por ASV separados pelas condições pluviométricas. Amostras com menos de 200 *reads* não estão representadas neste gráfico.

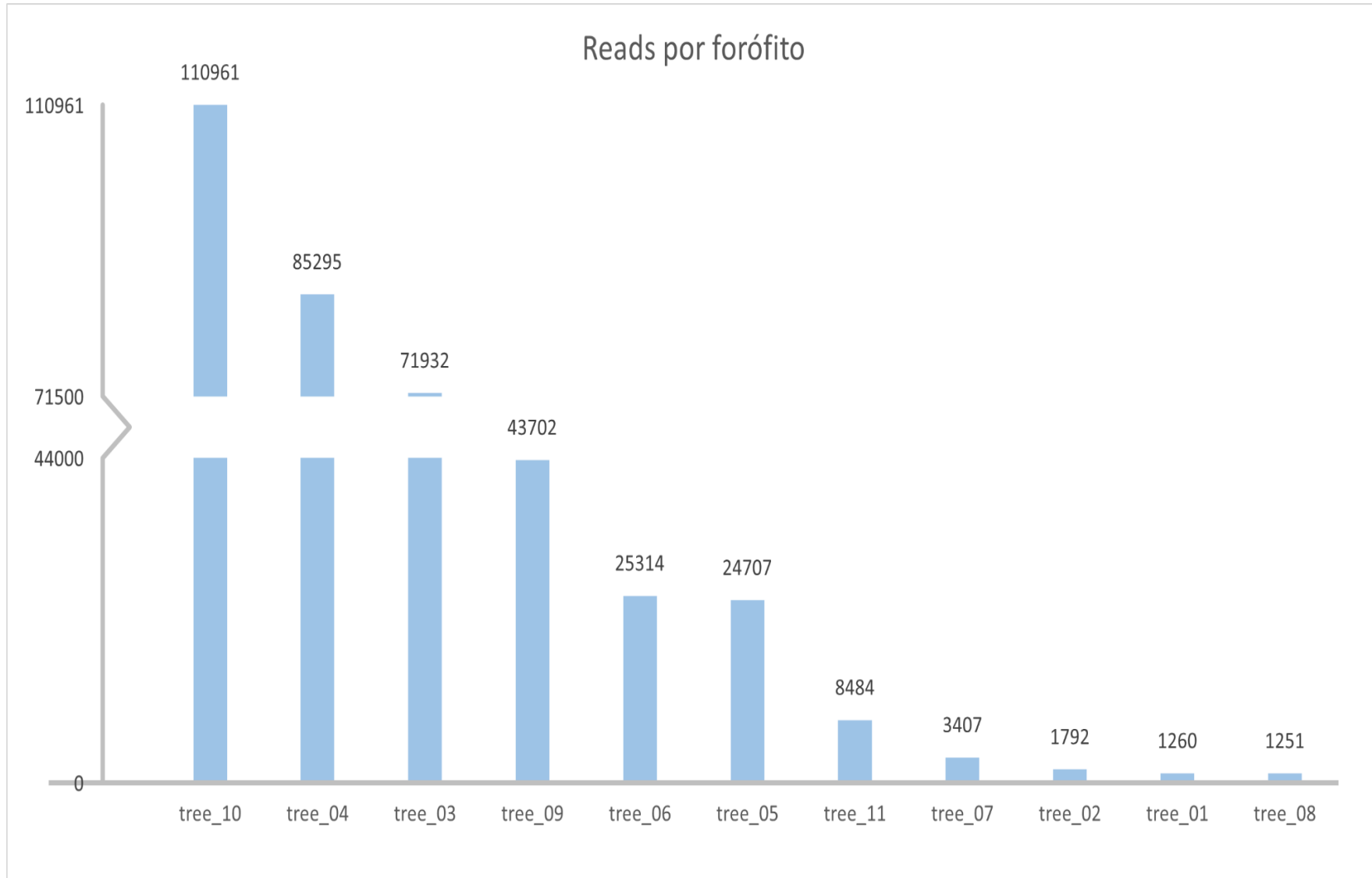


Figura 9. Total de reads por forófito.

5. DISCUSSÃO

Devido ao pequeno número de pares de base da região sequenciada, não foi possível estimar se as 64 ASVs encontradas são de espécies ou subespécies distintas (falta resolução filogenética). No entanto, foi possível identificar que a maioria pertence a algas do gênero *Trebouxia* e que é resultado de amplificação cruzada do segundo éxon do gene *rns* do DNA plastidial da alga.

Nesse caso, o uso de primers específicos para algas verdes, como nr-SSU-178005'-Algal, ITS4-3 universal (Piercey-Normore e DePriest 2006) e 23S rRNA de *Escherichia coli* (Del Campo et al. 2010) devem ser utilizados para tal, conforme demonstrado por estudos prévios. Contudo, foi possível demonstrar o potencial do marcador V4 do gene ribossomal 16S utilizando os primers 515F e 806R para amplificar a região SSU rRNA de *Trebouxia sp.* e sua aplicação como indicador de diversidade genética em estudos de metagenômica.

Há uma grande disparidade na distribuição e frequência dos haplótipos descritos acima, a sequência h01 foi a de maior número de reads, encontrando-se exclusivamente em amostras coletadas em períodos chuvosos e de medula branca (*Dirinaria confluens*), além de não ser encontrada em amostras de substrato. Quanto às sequências h02 são originárias de holobiontes de medula vermelha e com reads majoritariamente em período chuvoso.

Destaca-se a dispersão e o volume de reads da rep seq h61, visto que estava presente no maior número de amostras em comparação com outras sequências, sendo 13 no total. Concomitantemente, a maioria de seus reads ocorreram em amostras em período de seca, no entanto, não é possível inferir se isso se dá por alguma adaptação de sua linhagem genética ou devido às condições mais favoráveis fornecidas pelo ambiente (sombreamento, exposição direta ao sol, índice de umidade, reservas energéticas do talo). Em geral, os haplótipos foram de distribuição heterogênea entre os líquens de medula branca (*Dirinaria confluens*) e de medula vermelha (*Dirinaria confluens* var. *coccinea*). As sequências h03; h06; h08; h10; h12; h13; h14; h15; h17; h24; h52; h55; h56; h57 e h61 estavam presentes em ambos os tipos de medula. Contudo, certas sequências foram exclusivamente encontradas em amostras de medula branca, sendo elas: h01; h04; h07; h09; h11; h16; h19; h20; h22;

h49; h60; h62 e h63. Enquanto h02; h05 e h18 são encontradas apenas em amostras de medula vermelha.

Não é possível determinar a causa da ocorrência exclusiva de certos haplótipos em líquens de *D. confluens* ou *D. confluens* var. *coccinea*, mas, fatores como a distância entre tais indivíduos, resistência a fatores climáticos e competição por recursos dentro do talo líquênico podem afetar a ocorrência e número de haplótipos disponíveis em líquens.

Entre os 11 forófitos das amostras, o “tree_10” foi o de maior número de reads, com 110.961 e o de menor número foi o “tree_08”, com apenas 1251 reads. Não é possível identificar uma causa exata para tanta disparidade, visto que foram feitas coletas em todos os 11 pontos em ambas as estações e não há outras informações sobre os pontos de coleta nos metadados das amostras.

Quanto ao tipo de coleta, houveram poucas sequências de *Trebouxia* sp. em substrato devido ao hábito de associação holobionte. Não sendo possível afirmar se os haplótipos encontrados em amostras de substrato são de fato de vida livre ou resquícios de algum líquen que esteve presente no local anteriormente.

6. CONCLUSÃO

O presente trabalho demonstra o potencial do uso de primers da região V4 do gene ribossomal 16S de bactérias, que amplifica a região do segundo éxon da SSU RRS rRNA em *Trebouxia* sp e suas aplicações em estudos de metagenômica.

Contudo, o uso de primers dessa região sem associação de outros primers não é suficiente para sustentar cálculos de variabilidade genética devido ao pequeno número de pares de base amplificados.

Futuramente será necessário o uso associado de tais primers para uma maior área de cobertura, garantindo árvores filogenéticas de maior confiança.

7. REFERÈNCIAS BIBLIOGRÀFICAS

- Álvarez, R., Del Hoyo, A., Díaz-Rodríguez, C., Coello, A. J., Del Campo, E. M., Barreno, E., et al. (2015). Lichen rehydration in heavy metal-polluted environments: Pb modulates the oxidative response of both *Ramalina farinacea* thalli and its isolated microalgae. *Microb. Ecol.* 69, 698–709. doi: 10.1007/s00248-014-0524-0
- Anslan, S., Nilsson, R. H., Wurzbacher, C., Baldrian, P., Tedersoo, L., & Bahram, M. (2018). Great differences in performance and outcome of high-throughput sequencing data analysis platforms for fungal metabarcoding. *MycKeys*, 39, 29–40. doi:10.3897/mycokeys.39.28109
- Aschenbrenner, I. A., Cernava, T., Erlacher, A., Berg, G., & Grube, M. (2017). Differential sharing and distinct co-occurrence networks among spatially close bacterial microbiota of bark, mosses and lichens. *Molecular Ecology*, 26(10), 2826-2838.
- Beckett RP, Solhaug KA, Gauslaa Y and Minibayeva F (2019) Improved photoprotection in melanized lichens is a result of fungal solar radiation screening rather than photobiont acclimation. *Lichenologist* 51, 483–491.
- Blaha, J., Baloch, E., & Grube, M. (2006). High photobiont diversity associated with the euryoecious lichen-forming ascomycete *Lecanora rupicola* (Lecanoraceae, Ascomycota). *Biological Journal of the Linnean Society*, 88(2), 283-293.
- Bolyen, E., Rideout, J.R., Dillon, M.R. et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat Biotechnol* 37, 852–857 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>
- Casano LM, del Campo E, García-Breijo FJ, Reig-Armiñana J, Gasulla F, del Hoyo A, Guéra A and Barreno E (2011) Two *Trebouxia* algae with different physiological performances are ever-present in lichen thalli of *Ramalina farinacea*. Coexistence versus competition? *Environmental Microbiology* 13, 806–818
- Catalá, S., Del Campo, E. M., Barreno, E., García-Breijo, F. J., Reig-Armiñana, J., & Casano, L. M. (2016). Coordinated ultrastructural and phylogenomic analyses shed light on the hidden phycobiont diversity of *Trebouxia* microalgae in *Ramalina fraxinea*. *Molecular phylogenetics and Evolution*, 94, 765-777.
- Creer, S., Deiner, K., Frey, S., Porazinska, D., Taberlet, P., Thomas, W. K., ... Bik, H. M. (2016). *The ecologist's field guide to sequence-based identification of biodiversity. Methods in Ecology and Evolution*, 7(9), 1008–1018. doi:10.1111/2041-210x.12574
- Dal Grande, F., Alors, D., Divakar, P. K., Bálint, M., Crespo, A., & Schmitt, I. (2014). Insights into intrathalline genetic diversity of the cosmopolitan lichen symbiotic green alga *Trebouxia decolorans* Ahmadjian using microsatellite markers. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 72, 54-60.
- Darienko, T., Gruber, M., Pröschold, T., & Schagerl, M. (2013). Terrestrial microalgae on Viennese buildings. Final report of project H-2081/2010 funded by Hochschuljubiläumsstiftung der Stadt Wien. Universität Wien, 1-20.
- Del Campo, E. M., Casano, L. M., Gasulla, F., & Barreno, E. (2010). Suitability of chloroplast LSU rDNA and its diverse group I introns for species recognition and phylogenetic analyses of lichen-forming *Trebouxia* algae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 54(2), 437–444. doi:10.1016/j.ympev.2009.10.024
- del Hoyo, A., Alvarez, R., del Campo, E. M., Gasulla, F., Barreno, E. & Casano, L. M. 2011. Oxidative stress induces distinct physiological responses in the two *Trebouxia* phycobionts of the lichen *Ramalina farinacea*. *Ann. Bot.* 107:109–18.

- Dias Barbosa, T. Caliciaceae foliosas em Mato Grosso do Sul, Brasil. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Instituto de Biociências da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Campo Grande, Mato Grosso do Sul. 2019.
- Ertz D, Guzow-Krzeminska B, Thor G, Łubek A, Kukwa M. 2018. Photobiont switching causes changes in the reproduction strategy and phenotypic dimorphism in the Arthoniomycetes. *Scientific Reports* 8: 4952.
- Fernandez-Brime, S., Muggia, L., Maier, S., Grube, M., & Wedin, M. (2019). Bacterial communities in an optional lichen symbiosis are determined by substrate, not algal photobionts. *FEMS microbiology ecology*, 95(3), fiz012.
- Fernández-Brime, S., Muggia, L., Maier, S., Grube, M., & Wedin, M. (2019). Bacterial communities in an optional lichen symbiosis are determined by substrate, not algal photobionts. *FEMS microbiology ecology*, 95(3), fiz012.
- Fernández-Marín B, López-Pozo M, Perera-Castro AV, Irati Arzac M, Sáenz-Ceniceros A, Colesie C, de los Ríos A, Sancho LG, Pintado A, Laza JM, et al. (2019) Symbiosis at its limits: ecophysiological consequences of lichenization in the genus *Prasiola* in Antarctica. *Annals of Botany* 124, 1211–1226.
- Fitzpatrick, C. R., Lu-Irving, P., Copeland, J., Guttman, D. S., Wang, P. W., Baltrus, D. A., ... Johnson, M. T. J. (2018). *Chloroplast sequence variation and the efficacy of peptide nucleic acids for blocking host amplification in plant microbiome studies. Microbiome*, 6(1). doi:10.1186/s40168-018-0534-0
- Gauslaa, Y., Solhaug, K. A., & Longinotti, S. (2017). Functional traits prolonging photosynthetically active periods in epiphytic cephalolichens during desiccation. *Environmental and Experimental Botany*, 141, 83-91.
- Glöckner, F. O., Yilmaz, P., Quast, C., Gerken, J., Beccati, A., Ciuprina, A., ... & Ludwig, W. (2017). 25 years of serving the community with ribosomal RNA gene reference databases and tools. *Journal of biotechnology*, 261, 169-176.
- Grube, M., & Wedin, M. (2016). Lichenized fungi and the evolution of symbiotic organization. *Microbiology spectrum*, 4(6), 4-6.
- Hallmann C, Hoppert M, Mudimu O and Friedl T (2016) Biodiversity of green algae covering artificial hard substrate surfaces in a suburban environment: a case study using molecular approaches. *Journal of Phycology* 52, 732–744.
- Hallmann C, Stannek L, Fritzlar D, Hause-Reitner D, Friedl T and Hoppert M (2013) Molecular diversity of phototrophic biofilms on building stone. *FEMS Microbiology Ecology* 84, 355–372.
- He, Y., & Zhang, Z. (2012). Diversity of organism in the *Usnea longissima* lichen. *African Journal of Microbiology Research*, 6(22), 4797-4804.
- Honegger, R. (1991). *Functional Aspects of the Lichen Symbiosis. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 42(1), 553–578. doi:10.1146/annurev.pp.42.060191
- J.A.Elix, Dirinaria, Fl. Australia 57: 509–517 (2009).
- Jenkins, B., & Richards, T. A. (2019). Symbiosis: wolf lichens harbour a choir of fungi. *Current Biology*, 29(3), R88-R90.
- Kosugi M, Arita M, Shizuma R, Moriyama Y, Kashino Y, Koike H, Satoh K. 2009. Responses to desiccation stress in lichens are different from those in their photobionts. *Plant Cell Physiol* 50:879–888 <http://dx.doi.org/10.1093/pcp/pcp043>.
- Kranner I, Beckett R, Hochman A, Nash TH III. 2008. Desiccation-tolerance in lichens: a review. *Bryologist* 111: 576–593.
- Leavitt SD, Kraichak E, Nelsen MP, Altermann S, Divakar PK, Alors D, Esslinger TL, Crespo A, Lumbsch T. 2015. Fungal specificity and selectivity for algae play a major role in determining lichen partnerships across diverse ecogeographic

- regions in the lichen-forming family Parmeliaceae (Ascomycota). *Molecular Ecology* 24: 3779–3797
- Lichen Portal. 2023. <http://lichenportal.org/portal/index.php>. Accessed on February 13 2023.
- Lundberg, D. S., Yourstone, S., Mieczkowski, P., Jones, C. D., & Dangl, J. L. (2013). Practical innovations for high-throughput amplicon sequencing. *Nature methods*, 10(10), 999-1002.
- Magain N, Miadlikowska J, Goffinet B, Serusiaux E, Lutzoni F. 2016. Macroevolution of specificity in cyanolichens of the genus *Peltigera* section *Polydactylon* (Lecanoromycetes, Ascomycota). *Systematic Biology* 66: 74–99.
- Marshall WA, Chalmers MO. 1997. Airborne dispersal of Antarctic terrestrial algae and cyanobacteria. *Ecography* 20: 585–594.
- Míguez F, Schiefelbein U, Karsten U, García-Plazaola JI and Gustavs L (2017) Unraveling the photoprotective response of lichenized and freeliving green algae (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) to photochilling stress. *Frontiers in Plant Science* 8, 1144.
- Miller, M.A., Pfeiffer, W., and Schwartz, T. (2010) "Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees" in *Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)*, 14 Nov. 2010, New Orleans, LA pp 1 - 8. DOI: 10.1109/GCE.2010.5676129
- Molins, A., Chiva, S., Calatayud, Á. et al. Multidisciplinary approach to describe *Trebouxia* diversity within lichenized fungi *Buellia zoharyi* from the Canary Islands. *Symbiosis* 82, 19–34 (2020). <https://doi.org/10.1007/s13199-020-00722-8>
- Muggia L, Vancurova L, Skaloud P, Peksa O, Wedin M, Grube M. 2013. The symbiotic playground of lichen thalli—a highly flexible photobiont association in rock-inhabiting lichens. *FEMS Microbiology Ecology* 85: 313– 323.
- Nyati, S., Scherrer, S., Werth, S., & Honegger, R. (2014). Green-algal photobiont diversity (*Trebouxia* spp.) in representatives of Teloschistaceae (Lecanoromycetes, lichen-forming ascomycetes). *The Lichenologist*, 46(2), 189-212.
- O'Brien HE, Miadlikowska J, Lutzoni F. 2013. Assessing population structure and host specialization in lichenized cyanobacteria. *New Phytologist* 198: 557– 566.
- Pardo-De la Hoz CJ, Magain N, Lutzoni F, Goward T, Restrepo S, Miadlikowska J. 2018. Contrasting symbiotic patterns in two closely related lineages of trimembered lichens of the genus *Peltigera*. *Frontiers in Microbiology* 9: 2770–2770.
- Piercey-Normore MD, DePriest PT. 2001. Algal switching among lichen symbioses. *American Journal of Botany* 88: 1490–1498.
- Piercey-Normore, M. D. (2006). The lichen-forming ascomycete *Evernia mesomorpha* associates with multiple genotypes of *Trebouxia jamesii*. *New phytologist*, 169(2), 331-344.
- Printzen C, Domaschke S, Fernandez-Mendoza F, Perez-Ortega S. 2013. Biogeography and ecology of *Cetraria aculeata*, a widely distributed lichen with a bipolar distribution. *MycoKeys* 6: 33.
- Pyro, V. S., Roesch, L. F. W., Morais, D. K., Clark, I. M., Hirsch, P. R., & Tótola, M. R. (2014). *Data analysis for 16S microbial profiling from different benchtop sequencing platforms. Journal of Microbiological Methods*, 107, 30–37. doi:10.1016/j.mimet.2014.08.018
- Sadowska-Des AD, Dal Grande F, Lumbsch HT, Beck A, Otte J, Hur J-S, Kim JA, Schmitt I. 2014. Integrating coalescent and phylogenetic approaches to delimit

- species in the lichen photobiont *Trebouxia*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 76: 202–210.
- Sadowsky A and Ott S (2016) Symbiosis as a successful strategy in continental Antarctica: performance and protection of *Trebouxia* photosystem II in relation to lichen pigmentation. *Polar Biology* 39, 139–151.
- Sakai, M., & Ikenaga, M. (2013). *Application of peptide nucleic acid (PNA)-PCR clamping technique to investigate the community structures of rhizobacteria associated with plant roots*. *Journal of Microbiological Methods*, 92(3), 281–288. doi:10.1016/j.mimet.2012.09.036
- Sanders, W. B., & Masumoto, H. (2021). Lichen algae: the photosynthetic partners in lichen symbioses. *The Lichenologist*, 53(5), 347-393.
- Scheidegger C. 1985. Systematische Studien zur Krustenflechte *Anzina carneonivea* (Trapeliaceae, Lecanorales). *Nova Hedwigia: Zeitschrift für Kryptogamienkunde* 41: 191–218.
- Singh G, Dal Grande F, Divakar PK, Otte J, Crespo A, Schmitt I. 2017. Fungal–algal association patterns in lichen symbiosis linked to macroclimate. *New Phytologist* 214: 317–329.
- Smith, H. B., Dal Grande, F., Muggia, L., Keuler, R., Divakar, P. K., Grewe, F., ... Leavitt, S. D. (2020). Metagenomic data reveal diverse fungal and algal communities associated with the lichen symbiosis. *Symbiosis*, 82(1-2), 133–147. doi:10.1007/s13199-020-00699-4
- Spribile, T. (2019). Lichen symbionts outside of symbiosis: how do they find their match? A commentary on: 'A case study on the re-establishment of the cyanolichen symbiosis: where do the compatible photobionts come from?'. *Annals of Botany*, 124(3), vi-vii.
- Spribile, T., Resl, P., Stanton, D.E. and Tagirdzhanova, G. (2022), Evolutionary biology of lichen symbioses. *New Phytol*, 234: 1566-1582. <https://doi.org/10.1111/nph.18048>
- Stamatakis, A. (2014) RAxML Version 8: A tool for Phylogenetic Analysis and Post-Analysis of Large Phylogenies. *Bioinformatics* 10.1093/bioinformatics/btu033 <http://bioinformatics.oxfordjournals.org/content/early/2014/01/21/bioinformatics.btu033.abstract>
- Trembley, M. L., Ringli, C., & Honegger, R. (2002). Morphological and molecular analysis of early stages in the resynthesis of the lichen *Baeomyces rufus*. *Mycological Research*, 106(7), 768-776.
- Vančurová, L., Muggia, L., Peksa, O., Řídká, T., & Škaloud, P. (2018). *The complexity of symbiotic interactions influences the ecological amplitude of the host: A case study in *Stereocaulon* (lichenized Ascomycota)*. *Molecular Ecology*, 27(14), 3016–3033. doi:10.1111/mec.14764
- Wendy Guiry in Guiry, M.D. & Guiry, G.M. 11 April 2018. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <https://www.algaebase.org>; searched on 13 February 2023
- Wirtz N, Lumbsch HT, Green TA, Turk R, Pintado A, Sancho L, Schroeter B. € 2003. Lichen fungi have low cyanobiont selectivity in maritime Antarctica. *New Phytologist* 160: 177–183.
- Yahr R, Vilgalys R, DePriest PT. 2006. Geographic variation in algal partners of *Cladonia subtenuis* (Cladoniaceae) highlights the dynamic nature of a lichen symbiosis. *New Phytologist* 171: 847–860.

Yung CCM, Chan Y, Lacap DC, Pérez-Ortega S, de los Ríos A, Lee CK, Cary SC and Pointing S (2014) Characterization of chasmoendolithic community in Miers Valley, McMurdo Dry Valleys, Antarctica. *Microbial Ecology* 68, 351–359.