

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

GIOVANNA KETHELYN ROCHA BAETA

**BANCO DE DNA BARCODES: REPRESENTATIVIDADE DAS ESPÉCIES DE  
*RAMALINA* (RAMALINACEAE, ASCOMYCOTA LIQUENIZADOS) COM  
OCORRÊNCIA NO BRASIL.**

CAMPO GRANDE  
2024

GIOVANNA KETHELYN ROCHA BAETA

**BANCO DE DNA BARCODES: REPRESENTATIVIDADE DAS ESPÉCIES DE  
*RAMALINA* (*RAMALINACEAE*, ASCOMYCOTA LIQUENIZADOS) COM  
OCORRÊNCIA NO BRASIL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
como requisito parcial para a obtenção do título de  
Bacharel em Ciências Biológicas na Universidade  
Federal do Mato Grosso do Sul.

Orientadora: Profa. Dra. Aline Pedroso Lorenz.

CAMPO GRANDE  
2024

## **Agradecimentos**

Primeiramente, gostaria de agradecer à minha orientadora Dra. Aline Pedroso Lorenz. Obrigada por ter me aceitado e tido tanta paciência para ensinar, sou muito grata por ter alguém tão doce como orientadora.

Não poderia deixar de agradecer a minha família, principalmente a minha mãe e irmão que me apoiaram em todos os momentos dessa jornada e me incentivaram a sempre crescer mais e mais. Obrigada por formarem uma grande rede de apoio e carinho até nos períodos mais estressantes, amo vocês!

À minha avó materna que, mesmo que não esteja mais aqui, sempre se orgulhou das minhas conquistas acadêmicas e cuidou de mim.

Aos meus amigos e colegas, que passaram por esse longo período comigo e tornaram a graduação mais leve.

## RESUMO

Os líquens, associações simbióticas entre fungos (micobiontes) e algas ou cianobactérias (fotobiontes), apresentam ampla distribuição geográfica e são reconhecidos como bioindicadores ambientais. O gênero *Ramalina* (*Ramalinaceae*, *Ascomycota*) inclui cerca de 230 espécies que formam líquens fruticosos globalmente, sendo 29 delas registradas no Brasil, com maior concentração nas regiões Sudeste e Sul. Este trabalho investigou a representatividade das espécies de *Ramalina* do Brasil no banco de dados GenBank, especificamente da região ITS do DNA ribossomal, DNA *barcode* universal dos fungos. O levantamento identificou que apenas 41% das espécies registradas para o Brasil possuem sequências de ITS disponíveis no GenBank. Dessas, somente 28% possuem sequências de ITS produzidas a partir de espécimes coletados no Brasil, evidenciando uma lacuna significativa de representatividade. Os resultados indicaram que algumas espécies apresentam grande divergência entre sequências produzidas a partir de espécimes coletados no mesmo país e em países diferentes, indicando que entre as sequências homônimas (identificadas como a mesma espécie no GenBank), há provavelmente espécies diferentes.. Por exemplo, *Ramalina celastri* apresentou apenas 83,2% de identidade média (16,8% de divergência) entre sequências brasileiras e norte-americanas. Essa discrepância entre a espécie atribuída para o espécime e a identidade genética pode ser devida a erros de identificação, a presença de complexos de espécies, e até mesmo a existência de espécies crípticas (fenotipicamente indistinguíveis, porém evolutivamente independentes). Como conclusão, constatou-se uma representatividade insatisfatória de sequenciamentos de DNA barcodes de espécies do gênero *Ramalina* presentes no Brasil, o que praticamente inviabiliza o uso da técnica como ferramenta auxiliar para a identificação de espécimes brasileiros. Além disso, ficou claro que nem todos os dados registrados no GenBank correspondem, de fato, às espécies relatadas. Dessa forma, fica evidente a necessidade da criação de um banco de DNA *barcodes* local, feito com espécimes brasileiros identificados por especialistas, para que essas sequências sirvam de referência para não especialistas conseguirem identificar espécimes desse gênero por meio do DNA *barcoding*.

**Palavras-chave:** Líquens, *Ramalina*, GenBank, ITS.

## ABSTRACT

Lichens, symbiotic associations between fungi (mycobionts) and algae or cyanobacteria (photobionts), have a wide geographic distribution and are recognized as environmental bioindicators. The genus *Ramalina* (Ramalinaceae, Ascomycota) includes approximately 230 species that form fruticose lichens worldwide, 29 of which are recorded in Brazil, with a higher concentration in the Southeast and South regions. This study investigated the representativeness of *Ramalina* species from Brazil in the GenBank database, specifically the ITS region of ribosomal DNA, the universal DNA barcode of fungi. The survey identified that only 41% of the species recorded for Brazil have ITS sequences available in GenBank. Of these, only 28% have ITS sequences produced from specimens collected in Brazil, evidencing a significant gap in representativeness. The results indicated that some species present significant divergence among sequences produced from specimens collected in the same country (and in different countries), suggesting that there are probably different species among the homonymous sequences (identified as the same species in GenBank). For example, *Ramalina celastri* presented only 83.2% average identity (16.8% divergence) between Brazilian and North American sequences. This discrepancy between the species attributed to the specimen and the genetic identity may be due to identification errors, species complexes, and even cryptic species (phenotypically indistinguishable but evolutionarily independent). In conclusion, an unsatisfactory representation of DNA barcode sequences of species of the genus *Ramalina* present in Brazil was found, which practically makes using the technique as an auxiliary tool for identifying Brazilian specimens unfeasible. In addition, it became clear that not all data registered in GenBank correspond to the reported species. Therefore, it is clear that there is a need to create a local DNA barcode database made with Brazilian specimens identified by experts so that these sequences can serve as a reference for non-experts to identify specimens of this genus through DNA barcoding.

**Keywords:** Lichens, *Ramalina*, GenBank, ITS.

## Sumário

Introdução .....	<b>1</b>
Objetivos .....	<b>2</b>
Material e métodos .....	<b>3</b>
Resultados e discussão .....	<b>6</b>
Conclusão .....	<b>10</b>
Referências bibliográficas .....	<b>11</b>

## Introdução

Os líquens são compostos por organismos simbióticos que incluem fungos, chamados micobiontes, associados às algas verdes e/ou cianobactérias, que possuem o papel de fotobiontes. Possuem uma relação mutualista que confere a esses simbiontes a capacidade de sobreviver em diferentes regiões geográficas ou substratos (Allen; Lendemer, 2022). O gênero *Ramalina* Ach., pertencente à família *Ramalinaceae* (Ascomycota), são líquens com hábito de crescimento fruticoso, são amplamente distribuídos, e possuem cerca de 230 espécies conhecidas (Lucking et al., 2017).

Espécies do gênero podem ser encontradas em diversos ambientes, variando dos polos frios aos desertos mais quentes do mundo, característica que confere a elas uma grande representação geográfica (Gumboski, 2016). Um atributo desses líquens é a alta percepção do ambiente ao seu redor, tornando-os ótimos bioindicadores, o que os leva a serem utilizados em estudos focados em alterações ambientais com certa frequência. No Brasil são conhecidas cerca de 29 espécies de *Ramalina*, distribuídas principalmente nas regiões Sul e Sudeste (21). Esse cenário reflete a desigualdade nas pesquisas e aponta a necessidade de explorar áreas pouco estudadas, tais como a região Centro-Oeste, a fim de melhorar o conhecimento sobre o gênero no país (Gumboski, 2016).

Uma forma de identificação molecular pode ser dada pela região ITS (*Internal Transcribed Spacer*) do DNA ribossomal é amplamente empregada em análises filogenéticas de fungos, incluindo os liquenizados. Essa região consiste em duas sequências espaçadoras, ITS1 e ITS2, localizadas entre os genes que codificam os RNAs ribossomais 18S, 5.8S e 28S (Leavitt et al., 2015; Schoch et al., 2012). Sua alta variabilidade entre algumas espécies a torna uma ferramenta valiosa para diferenciação taxonômica. Além disso, a região ITS apresenta facilidade de amplificação e sequenciamento com primers universais, características que a tornam amplamente utilizada na delimitação de espécies. Essas características tornam este o marcador de DNA mais utilizado em análises moleculares e taxonômicas de fungos liquenizados (Leavitt et al, 2015; Schoch et al., 2012).

Para fungos de uma maneira geral, o banco de dados online UNITE (*User-friendly Nordic ITS Ectomycorrhiza database*, <https://unite.ut.ee/index.php>) desempenha um papel essencial no estudo de espécies utilizando a região ITS como marcador genético para identificar organismos (atualmente sua abrangência inclui sequências de fungos de diferentes regiões do mundo). As sequências no UNITE são frequentemente revisadas e agrupadas em unidades taxonômicas operacionais (OTUs) ou espécies hipotéticas (SHs) com base na similaridade genética. Este sistema é projetado para propor "hipóteses de espécies", que incluem tanto espécies já conhecidas e formalmente descritas quanto espécies ainda não reconhecidas pela ciência. Por meio de ferramentas moleculares

avançadas, o UNITE facilita a identificação e a classificação de espécies. (Abarenkov et al., 2023).

O uso da região ITS do DNA ribossomal tem se mostrado fundamental em estudos sobre o gênero *Ramalina*, abrangendo desde a descrição de novas espécies até a análise de complexos filogenéticos. Estudos recentes destacam sua utilidade na delimitação de espécies como *Ramalina fleigiae*, descrita com base em uma abordagem integrativa que inclui dados moleculares, sugerindo relações próximas com *R. laevigata* e distinções de outras espécies semelhantes morfológicamente (Gumboski et al., 2018). Além disso, filogenias baseadas em ITS têm sido empregadas para diferenciar linhagens evolutivas, como observado em *R. ovalis* e *R. siliquosa* (Hayward et. al, 2014). Embora eficaz no diagnóstico de espécies, a região ITS apresenta limitações na resolução de ramos internos mais profundos, refletindo a complexidade evolutiva do gênero, como evidenciado em estudos do grupo de espécies *R. farinacea* (Moya et. al 2023). Dessa forma, a combinação de ITS com outros marcadores moleculares e dados morfológicos, químicos e ecológicos tem se mostrado uma boa estratégia para aprimorar a delimitação e compreensão filogenética dentro de *Ramalina* (Moya et. al 2023).

## **Objetivos**

### **Geral**

Avaliar a disponibilidade e a representatividade de sequências de DNA barcodes das espécies de *Ramalina* com ocorrência no Brasil no GenBank.

### **Específicos**

Avaliar a existência de mais de uma linhagem (possivelmente, mais de uma espécie) entre as sequências homônimas;

Analisar a variação na % de identidade (%ID): (I) entre sequências homônimas produzidas a partir de espécimes coletados no mesmo país; (II) entre sequências homônimas produzidas a partir de espécimes coletados em países diferentes.



## Material e Métodos

### Levantamentos florísticos e molecular

Primeiro, foi realizado o levantamento da diversidade de espécies do gênero *Ramalina* presentes no Brasil (Tabela 1) por meio da revisão da tese de doutorado de Gumboski, 2016, intitulada “Estudos taxonômicos em espécies de *Ramalina* Ach. (Ascomycota liquenizados, Ramalinaceae)” e da lista de espécies de Aptroot et al., 2024 “*The Brazilian lichen checklist: 4,830 accepted taxa constitute a country-level world record*” (submetido na revista *The Bryologist*).

**Tabela 1.** Lista de espécies de *Ramalina* encontradas no Brasil e seus respectivos estados de ocorrência.

Espécies	Estado
<i>Ramalina anceps</i> Nyl.	RS, SC e SP
<i>Ramalina asahinae</i> W.L. Culb. & C.F. Culb.	SC e SP
<i>Ramalina aspera</i> Räsänen	MG, MS, PE, RS, SC e SP
<i>Ramalina calcarata</i> Krog & Swinscow	ES, MG e SP
<i>Ramalina camptospora</i> Nyl.	ES, MG, PR, RS e SC
<i>Ramalina canicularis</i> (Nyl.) Kashiw.	PR
<i>Ramalina celastri</i> (Spreng.) Krog & Swinscow	ES, MG, PR, RJ, RS, SC e SP
<i>Ramalina cochlearis</i> Zahlbr.	ES, MG e RS
<i>Ramalina complanata</i> (Sw.) Ach.	BA, ES, PE, PR, RS, SC e SE
<i>Ramalina continentalis</i> Malme	MS e MT
<i>Ramalina dendriscooides</i> Nyl.	PR, RS e SC
<i>Ramalina dendroides</i> (Nyl.) Nyl.	MG, PR e SC
<i>Ramalina exiguella</i> Stirt.	RS e SC
<i>Ramalina fleigiae</i> Gumboski, Eliasaro & L.M. Silveira	RS
<i>Ramalina gallowayi</i> Kashiw., T.H. Nash & K.H. Moon	MG
<i>Ramalina gracilis</i> (Pers.) Nyl.	ES, PR, RJ, SC e SP
<i>Ramalina grumosa</i> Kashiw.	MG, SP e RS
<i>Ramalina kashiwadanii</i> Gumboski, Eliasaro & R. M. Silveira	RS
<i>Ramalina lacera</i> (With.) J.R. Laundon	RS
<i>Ramalina laevigata</i> Fr.	RS

**Tabela 1.** Continuação

<b>Espécies</b>	<b>Estado</b>
<i>Ramalina peruviana</i> Ach.	PE, PR, RJ, RS, SC, SE e SP
<i>Ramalina prolifera</i> Taylor	RS e SC
<i>Ramalina puiggarii</i> Müll. Arg.	MG, RS, SC e SP
<i>Ramalina pusiola</i> Müll. Arg.	PR, RS e SC
<i>Ramalina rectangularis</i> Nyl.	BA
<i>Ramalina solediosa</i> (B. de Lesd.) Landrón	PE, PR, SC, SE e SP
<i>Ramalina sprengelii</i> Krog & Swinscow	PR, RS, SC e SP
<i>Ramalina subpollinaria</i> Nyl.	PE, SC, SE e SP
<i>Ramalina usnea</i> (L.) Howe	ES, PE, PR, RS e SC

A busca de sequências genéticas de espécies brasileiras levantadas foi feita no GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>) usando como palavras-chave o nome de espécie seguida pelo termo “Internal transcribed” (em referência ao nome da região ITS em inglês, *internal transcribed spacer*). Além das sequências, também foram obtidas informações (metadados) associadas a publicação dessas sequências, como autor(es), país de origem, identificação da submissão e ano. Em cada busca, dois formatos de arquivos foram baixados do GenBank, sendo eles: TinySeq.XML e INSDSeq.XML. O formato TinySeq foi modificado em uma planilha e transformado em um arquivo .FASTA para posterior alinhamento das sequências.

### **Identificação molecular**

Os alinhamentos foram feitos por espécie, utilizando o plugin MAFFT v7.017 (Kato et al., 2002) do aplicativo Geneious® 7.1.3., onde foram usados os seguintes parâmetros: Scoring matrix 200PAM / k=2, Gap open penalty 1.53, Offset value 0.123. Além disso, os termos “preserve original sequence order” e “automatically determine sequences direction” foram selecionados. Foi gerada a matriz de identidade no Geneious, onde, para as espécies com mais de uma sequência disponível no GenBank, foi usado um limiar de até 3% de divergência para assumir que pertencem à mesma espécie ou, pelo menos, ao mesmo complexo de espécies. Seguindo Lücking et al. (2020), Moncada et al. (2020) e Leavitt et al. (2021), as sequências foram classificadas como “mesma espécie” quando os valores de ID foram  $\geq 99\%$ ; como “complexo de espécies” quando os valores de ID variaram de 97 a 98%; e como “incompatível” quando os valores de ID foram  $< 97\%$ . Os valores foram

considerados para estimar a diversidade de espécies entre sequências homônimas. Foram estimadas a variação da identidade (valores máximos e mínimos), além da identidade média, entre as sequências homônimas e, quando possível, entre sequências de espécimes do mesmo país.

Os metadados de cada sequência foram obtidos a partir do arquivo INSDSeq, o qual foi usado para gerar uma tabela dinâmica (no Excel). Os dados obtidos foram: número de acesso único, a sequência completa e o comprimento, o nome científico do organismo de origem, país de coleta e realização de sequenciamento. Além disso, o arquivo contém informações bibliográficas, como publicações associadas à sequência, autores responsáveis pela submissão e instituições ou projetos relacionados.

## Resultados e discussão

Das 29 espécies do gênero *Ramalina* registradas no Brasil, somente 12 (41%) possuíam sequências da região ITS disponíveis no GenBank (Tabela 2). Essas sequências foram associadas a espécimes coletados em 15 diferentes países, e que apenas 8 espécies registradas no Brasil (28%) possuem sequências de espécimes brasileiros disponíveis.

A distribuição da origem dos espécimes sequenciados foi: Brasil (32 sequências de 8 espécies), Espanha (30 sequências de 1 espécie), China (12 sequências de 3 espécies), Estados Unidos (11 sequências de 3 espécies), Nova Zelândia (19 sequências de 1 espécie), Coreia do Sul (5 sequências de 1 espécie), África do Sul (5 sequências de 2 espécies), Japão (3 sequências de 1 espécie), México (3 sequências de 2 espécies), Rússia (1 sequência de 1 espécie), Cabo Verde (1 sequência de 1 espécie), Itália (1 sequência de 1 espécie).

**Tabela. 2.** Espécies de *Ramalina* registradas no Brasil que possuem sequências da região ITS disponíveis no GenBank.

Espécie	País(es) de origem do(s) espécime(s) sequenciados e nº de sequências
<i>Ramalina anceps</i>	Brasil (2)
<i>Ramalina asahinae</i>	México (1)
<i>Ramalina aspera</i>	China (9)
<i>Ramalina celsa</i>	Nova Zelândia (19), Estados Unidos (1), África do Sul (2), Ruanda (1)
<i>Ramalina complanata</i>	Brasil (1), Estados Unidos (2), México (2)
<i>Ramalina exiguella</i>	Brasil (3)
<i>Ramalina fleigiae</i>	Brasil (10)
<i>Ramalina lacera</i>	Espanha (30), Rússia (1), África do Sul (1), Itália (1)
<i>Ramalina laevigata</i>	Brasil (3)
<i>Ramalina peruviana</i>	Brasil (3), Peru (1), Portugal (2), China (3), Coreia do Sul (5), Japão (3), Cabo Verde (1)
<i>Ramalina sprengelii</i>	Brasil (5)
<i>Ramalina usnea</i>	Brasil (7), Estados Unidos (1)

Em espécies como *Ramalina fleigiae* e *Ramalina aspera*, foram encontradas várias sequências diferentes em um único país, enquanto as espécies *Ramalina celsa* e *Ramalina peruviana* apresentaram diversos sequenciamentos em diferentes países.

As análises da identidade entre sequências homônimas de espécimes coletados no mesmo país revelaram que algumas espécies apresentaram um percentual de identidade menor que o esperado entre sequências intraespecíficas (menor que 97%), indicando que devem haver mais de uma espécie nesses locais. Isso ocorreu em *Ramalina celsastri* (África do Sul), *Ramalina peruviana* (China) e *Ramalina complanata* (Estados Unidos) (Tabela 3).

**Tabela 3.** Variação na identidade (ID) entre sequências homônimas produzidas a partir de espécimes coletados no mesmo país.

Espécies	Países	% média de ID	% Mínima	% Máxima
<i>Ramalina anceps</i>	Brasil (2)	99,6	-	-
<i>Ramalina aspera</i>	China (9)	99,5	99	100
<i>Ramalina celsastri</i>	Nova Zelândia (19)	99,5	98,7	100
	África do Sul (2)	92,6	-	-
<i>Ramalina complanata</i>	México (2)	100	-	-
	Estados Unidos (2)	84,6	-	-
<i>Ramalina exiguella</i>	Brasil (3)	100	100	100
<i>Ramalina fleigiae</i>	Brasil (10)	99,1	98,5	100
<i>Ramalina lacera</i>	Espanha (30)	99,8	90,7	99,4
<i>Ramalina laevigata</i>	Brasil (3)	99,3	99,2	99,4
<i>Ramalina peruviana</i>	Brasil (3)	100	100	100
	Portugal (2)	100	-	-
	China (3)	91,3	87,2	99,4
	Coreia do Sul (5)	99,8	99,6	100
	Japão (3)	100	100	100
<i>Ramalina sprengelii</i>	Brasil (5)	99,6	99,3	100
<i>Ramalina usnea</i>	Brasil (7)	99,8	99,6	100

### **Varição entre sequências homônimas de países diferentes**

Avaliamos a variação no percentual de identidade entre sequências homônimas, que, teoricamente, representam a mesma espécie. Essas análises foram conduzidas em dois níveis: comparações entre sequências do mesmo país e entre sequências de países diferentes.

Os resultados indicaram casos em que pode haver mais de uma espécie distinta sob o mesmo nome registrado no GenBank. Isso pode ocorrer devido a erros na identificação morfológica ou pela presença de espécies crípticas - espécies que são geneticamente distintas, mas apresentam características morfológicas semelhantes.

Por exemplo, em *R. usnea*, a comparação entre sequências do Brasil e dos Estados Unidos apresentou uma média de identidade de 83,2% e um valor mínimo de 82,1%, sugerindo maior variação genética. Em contrapartida, análises envolvendo *R. lacera* mostraram percentuais de identidade superiores a 97%, embora o valor mínimo tenha atingido 92,3%. Já em outros casos, como em *R. peruviana*, houve total compatibilidade (100%) entre sequências de Portugal, Brasil e Peru (Tabela 4).

**Tabela. 4.** Variação na identidade (ID) entre sequências homônimas produzidas a partir de espécimes coletados em países diferentes.

<b>Espécies</b>	<b>Países</b>	<b>% média de ID</b>	<b>% Mínima</b>	<b>% Máxima</b>
<i>Ramalina celsa</i>	Nova Zelândia x EUA	83,2	82,8	85,3
	Nova Zelândia x África do Sul	94,2	91,7	96,6
	Nova Zelândia x Ruanda	98,7	98,3	99,1
	EUA x África do Sul	82,8	81,8	83,8
	EUA x Ruanda	83,4	83,4	83,4
	Ruanda x África do Sul	94	92,1	95,9
<i>Ramalina complanata</i>	Brasil x USA	89,6	88,5	90,4
	Brasil x México	96,4	96,4	96,4
	México x USA	90,3	89	91,6
<i>Ramalina lacera</i>	Espanha x Rússia	99,3	92,7	100
	Espanha x África do Sul	99,4	92,3	99,6
	Espanha x Itália	99,3	92,4	100
<i>Ramalina peruviana</i>	Brasil x Peru	100	100	100
	Brasil x Portugal	100	100	100
	Brasil x China	94,3	87,2	97,8
	Brasil x Coreia do Sul	97,6	97,8	97,4
	Brasil x Cabo Verde	93,3	93,3	93,3
	Brasil x Japão	97,4	97,4	97,4
	China x Coreia do Sul	95,3	87	100
	China x Cabo Verde	91,6	91,5	91,7
	China x Japão	95,2	87	99,6
	Coreia do Sul x Japão	99,8	99,6	100
	Coreia do Sul x Cabo Verde	91,6	91,5	91,7

**Tabela 4.** Continuação

<b>Espécies</b>	<b>Países</b>	<b>% média de ID</b>	<b>% Mínima</b>	<b>% Máxima</b>
<i>Ramalina peruviana</i>	Portugal x Peru	100	100	100
	Portugal x China	94,3	87,2	97,8
	Portugal x Coreia do Sul	97,6	97,8	97,4
	Portugal x Cabo Verde	93,3	93,3	93,3
	Portugal x Japão	97,4	97,4	97,4
	Peru x Cabo Verde	93,3	93,3	93,3
	Peru x Japão	97,4	97,4	97,4
	Peru x Coreia do Sul	97,6	97,8	97,4
	Peru x China	94,3	87,2	97,8
<i>Ramalina usnea</i>	Brasil x EUA	83,2	83,1	83,3

Com base nos percentuais encontrados em *R. celastri*, é possível considerar que somente os países Nova Zelândia e Ruanda possuem, de fato, a mesma espécie em ambos. O percentual registrado na África do Sul, no entanto, demonstra que os dois sequenciamentos do país registrados como *R. celastri* podem, na verdade, se tratar de duas diferentes espécies. Ademais, todas as outras comparações entre dois países nessa espécie não apresentam um resultado positivo para ela.

Apesar do percentual máximo atingido para as sequências do México em *R. celastri*, não houve resultado positivo entre as sequências cruzadas, demonstrando que as espécies que ocorrem em cada um dos três países são diferentes umas das outras. O mesmo ocorre com as sequências de Brasil e Estados Unidos em *R. usnea*, as sequências brasileiras são da espécie, mas a sequência norte-americana devido a média de 83,2%, trata de uma outra espécie.

Outras espécies também podem estar presentes mesmo quando há um percentual médio dentro dos parâmetros. Temos como exemplo as comparações em *R. lacera*, onde todas as médias ultrapassam os 99% enquanto os valores mínimos podem variar de 92,3 a 92,7%. Esses números indicam que, entre as sequências espanholas, há pelo menos um sequenciamento de uma espécie diferente da analisada.

Mesmo com sequenciamentos em sete diferentes países, a espécie *R. peruviana* demonstra resultados sólidos em ambas as médias e percentuais mínimos, como apresentado anteriormente.

Uma possível justificativa para a baixa porcentagem de identidade em sequenciamentos classificados como da mesma espécie é a existência de espécies crípticas que são caracterizadas por sua similaridade morfológica que dificulta a distinção por métodos visuais (Sipman and Ramirez, 2023). Um exemplo claro é o estudo sobre *Ramalina peruviana*, inicialmente identificado com base em características físicas limitadas. A



pesquisa revelou que amostras de diferentes regiões, como Europa e América do Sul, compartilham sequências de DNA idênticas, confirmando sua classificação como a mesma espécie (Sipman and Ramirez, 2023). Contudo, exemplares morfológicamente semelhantes da Ásia Oriental apresentaram divergência genética significativa, resultando na reclassificação como *Ramalina intermediella*. Esse caso ressalta como a genética é crucial para desvendar diversidade oculta em organismos aparentemente idênticos, melhorando a compreensão taxonômica (Sipman and Ramirez, 2023).

## **Conclusão**

O estudo revela que há uma representação insatisfatória de sequenciamentos de espécies do gênero *Ramalina* presentes no Brasil no atual banco de dados. Foi observado que somente 41% das 29 espécies possuem dados, onde nem todos se tratam, de fato, dessas espécies. Esse fator demonstra que há uma falha na identificação de certos indivíduos do gênero, mesmo que haja a utilização de DNA barcode no processo. Além disso, o Brasil possui apenas 28% de participação em sequenciamentos, mesmo que as espécies ocorram no país, demonstrando a carência de pesquisas e publicações envolvendo o gênero.

## Referências bibliográficas

1. Allen, J. D., & Lendemer, J. C. (2022). A call to conceptualize lichen symbioses. *Cell Press*. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2022.03.004>
2. Lücking, R., Voigt, M., Nilsson, R. H., and others. (2017). The 2016 classification of lichenized fungi in the Ascomycota and Basidiomycota – Approaching one thousand genera. *The Bryologist*, 119(4), 361-416. <https://doi.org/10.1639/0007-2745-119.4.361>.
3. Gumboski, E. L. (2016). *Estudos taxonômicos em espécies de Ramalina Ach. (Ascomycota liquenizados, Ramalinaceae)* (Tese de doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul). Porto Alegre, RS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
4. Leavitt, S. D., Schmit, J. P., Lücking, R., and others. (2015). The dynamic discipline of species delimitation: Progress toward effectively recognizing species boundaries in natural populations. Chicago, USA.
5. Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., and others. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(16), 6241–6246. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>.
6. Abarenkov, K., Nilsson, R. H., and others (2023). The UNITE database for molecular identification and taxonomic communication of fungi and other eukaryotes: Sequences, taxa and classifications reconsidered. *Nucleic Acids Research*, 1-7. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad1039>.
7. Gumboski, E. L.; Eliasaro, S.; Scur, M. C.; Lorenz-Lemke, A. P.; Borges da Silveira, R. M. (2018). A New Riparian Species of *Ramalina* (Ramalinaceae) from Brazil, with a Key to Neotropical Saxicolous Species. *The Lichenologist* 50 (5), 541–553. <https://doi.org/10.1017/S0024282918000361>.
8. Hayward, G. C., Blanchon, D. J., Lumbsch, H. T. (2014). Molecular Data Support *Ramalina ovalis* as a Distinct Lineage (Ramalinaceae, Ascomycota). *The Lichenologist* 46 (4), 553–561. <https://doi.org/10.1017/S0024282913000947>.
9. Moya, P., Garrido-Benavent, I., Chiva, S., Pérez-Ortega, S., Blázquez, M., Pazos, T., Hamel, T., Myllys, L., Tønsberg, T., Esseen, P.-A., Carrasco P. & Barreno, E. (2023). Phylogeography of *Ramalina farinacea* (Lichenized Fungi, Ascomycota) in the Mediterranean Basin, Europe, and Macaronesia. *Diversity* 15 (3), 310. <https://doi.org/10.3390/d15030310>.

10. Aptroot, A., Cáceres, M.E.S., Alves dos Santos, L., Benatti, M.N., and others (2024). The Brazilian lichen checklist: 4,830 accepted taxa constitute a country-level world record. *The Bryologist*. Submitted.
11. Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K.-I., & Miyata, T. (2002). MAFFT: A novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research*, 30(14), 3059–3066. <https://doi.org/10.1093/nar/gkf436>
12. Lücking, R., Nadel, M. R. A., Araujo, E. & Gerlach, A. (2020). Two decades of DNA barcoding in the genus *Usnea* (*Parmeliaceae*): how useful and reliable is the ITS?. *Plant and Fungal Systematics* 65: 303–357. <https://doi.org/10.35535/pfsyst-2020-0025>
13. Moncada, B., Sipman, H. & Lücking, R. (2020). Testing DNA barcoding in *Usnea* (*Parmeliaceae*) in Colombia using the internal transcribed spacer (ITS). *Plant and Fungal Systematics* 65: 358–385. <https://doi.org/10.35535/pfsyst-2020-0026>
14. Leavitt, S. D., Hollinger, J., Summerhays, S., Munger, I., Allen, J. & Smith, B. 2021. Alpine lichen diversity in an isolated sky island in the Colorado Plateau, USA - Insight from an integrative biodiversity inventory. *Ecology and Evolution* 11: 11090–11101. <https://doi.org/10.1002/ece3.7896>
15. Sipman, H. and Ramírez, A (2023). An ITS sequence of a specimen from the probable locus classicus of *Ramalina peruviana* and its consequences. *The Lichenologist*, 55, 437–440. <https://doi.org/10.1017/S0024282923000324>

A formatação das citações e referências bibliográficas seguiu as regras de formatação da revista *Journal of Biogeography*.  
< <https://onlinelibrary.wiley.com/page/journal/13652699/homepage/forauthors.html>>.