

A família *Graphidaceae* (Ascomycota liquenizados) no Sul do Brasil

Candidata: Shirley Cunha Feuerstein

Orientadora: Dra. Rosa Mara Borges da Silveira (UFRGS)

Co-orientador: PhD. Robert Lücking (BGBM, Berlin)

Colaboradores: Dra. Sionara Eliasaro (UFPR)

PhD. Aline Pedroso Lorenz Lemke (UFMS)

Resumo

Graphidaceae corresponde a maior família de fungos liquenizados crostosos, com cerca de 2500 espécies conhecidas. Atualmente, é subdividida em quatro subfamílias: Fissurinoideae, Gomphilloideae, Graphidoideae e Redonographoideae. *Graphidaceae* é uma das famílias menos estudadas de fungos liquenizados, e estima-se que aproximadamente 1.850 espécies aguardam ser descobertas, a maioria, cerca de 1.500, em áreas tropicais e subtropicais. Para o Brasil existem poucos estudos referentes a esta família. No que se refere à Região Sul, apenas dois trabalhos foram realizados, ambos no litoral do estado do Paraná. Demais referências para esta família são encontradas em levantamentos regionais e listagens de espécies. O presente projeto possui grande importância para o conhecimento dos líquens crostosos do sul do Brasil, visto que abordará a família de crostas mais diversificada e abundante em regiões tropicais e subtropicais. Além disto, representará o primeiro trabalho específico, seguindo a atual circunscrição da família para o país, baseado em conceitos taxonômicos modernos e utilizando caracteres moleculares. Esta abordagem auxiliará na compreensão de quais caracteres morfológicos, anatômicos e/ou químicos são úteis na delimitação de gêneros e espécies. Serão elaboradas descrições bem detalhadas e ilustrações desse grupo, bem como chaves dicotômicas que permitam a identificação e a comparação dos exemplares. Nesse sentido, ressalta-se a importância do trabalho para o conhecimento da micota liquenizada, possibilitando posteriores avanços no campo liquenológico, além de uma abordagem molecular para a circunscrição de espécies sulbrasileiras de *Graphidaceae*.

Palavras-chave: *Graphis*, lirela, microlíquens

1. Introdução

Graphidaceae corresponde a maior família de fungos liquenizados crostosos, com cerca de 2500 espécies conhecidas atualmente (Sohrabi, Lücking & Lumbsch, 2014). A circunscrição tradicional da família, delimitada pelo sistema artificial estabelecido por Müller Argoviensis, incluía apenas oito gêneros e se baseava principalmente na cor (hialino ou marrom) e septação dos ascósporos (muriformes ou transversalmente septados), bem como na organização dos ascomas (isolados ou agrupados em um estroma) (Wirth & Hale, 1978; Lücking & Rivas-Plata, 2008).

Staiger (2002), após realizar uma ampla revisão da família, analisando caracteres químicos, morfológicos, anatômicos e moleculares, aceitou 22 gêneros e contribuiu para uma compreensão mais natural de *Graphidaceae*. Estudos recentes, utilizando principalmente dados moleculares, vêm modificando progressivamente a classificação de *Graphidaceae*, com inclusão e sinonimização de alguns gêneros (p. ex. Kalb *et al.*, 2004; Archer, 2006, 2009; Aptroot & Sipman, 2007; Lücking, 2007; Lücking *et al.*, 2007; Lücking & Rivas Plata 2008; Rivas Plata *et al.*, 2008, 2012a, b, 2013; Parnmen *et al.*, 2012, 2013; Lücking *et al.*, 2013).

Com base em estudos filogenéticos recentes, *Graphidaceae* foi expandida e atualmente inclui as famílias *Gomphillaceae*, *Solorinellaceae* e *Thelotremaaceae* (Rivas Plata *et al.*, 2012a). Rivas-Plata *et al.* (2012a) e Lumbsch *et al.* (2014) dividiram a família em quatro subfamílias: *Fissurinoideae*, *Gomphilloideae*, *Graphidoideae* e *Redonographoideae*.

Com esta atual circunscrição, *Graphidaceae* é uma família extremamente variável morfológicamente. Os ascomas podem ser discoides ou alongados (lirelas) e estes podem se encontrar imersos ou não em um tecido estéril, denominado columela. O excípulo pode ser hialino a completamente carbonizado, e os ascósporos apresentam diferentes reações ao iodo podendo ser amiloides, hemialioides ou não amiloides (Rivas Plata & Lumbsch, 2011).

2. Justificativa

Graphidaceae é uma das famílias menos estudadas de fungos liquenizados (Lucking *et al.*, 2014). Em número de espécies só é menor que *Parmeliaceae*, que possui mais de 2.700 espécies (Kirk *et al.*, 2008). No entanto, de acordo com Lucking *et al.* (2014) o total de novas espécies descobertas nos últimos anos sugerem que *Graphidaceae* pode conter mais espécies que *Parmeliaceae*. Lucking *et al.* (2014) após uma análise estatística

estimam que aproximadamente 1.850 espécies aguardam serem descobertas nesta família, a maioria, cerca de 1.500, em áreas tropicais e subtropicais.

Os trabalhos que utilizam dados moleculares em *Graphidaceae* são recentes e incluem um número pequeno de espécies em relação ao tamanho da família. Diversos gêneros, como por exemplo, *Amazonotrema*, *Anomalographis*, *Anomomorpha*, *Diaphorographis*, *Gymnographopsis*, *Kalbographa*, e *Sarcographina*, ainda não apresentam sequências publicadas (Rivas Plata *et al.*, 2013). São também necessários mais estudos em grupos de gêneros que ainda não estão totalmente esclarecidos. Em *Phaeographis*, por exemplo, Feuerstein (dados não publicados) encontrou sete espécies, as quais representam prováveis espécies novas, no entanto, a escassez de dados moleculares bem como os diversos problemas nomenclaturais neste gênero, impossibilitam por hora, a publicação destas espécies.

Para o Brasil existem muito poucos estudos referentes a esta família. Os primeiros registros foram realizados por Martius (1827) e Eschweiler (1833) para o Pará e Bahia; Krempelhuber (1876) para o Rio de Janeiro; Vainio (1890) para o Rio de Janeiro e Minas Gerais. Redinger (1933a, 1933b, 1935), reconheceu 227 espécies para o Brasil apresentando ilustrações, descrições e chaves de identificação.

Cáceres e colaboradores vêm recentemente contribuindo para o conhecimento desta família no nordeste (Cáceres, 2007; Cáceres & Lücking, 2013) e norte (Cáceres *et al.*, 2012; Cáceres *et al.*, 2014) do Brasil.

Para o Rio Grande do Sul, citações para a família são encontradas em levantamentos regionais e em listas de espécies realizados por Osorio, Fleig e diversos colaboradores (p. ex: Osorio, 1981, 1985; Osorio & Fleig, 1982, 1990, 1994; Osorio *et al.*, 1982, 1997; Fleig, 1988, 1990; Fleig & Medeiros Filho, 1990) e por Martins e Käffer (p. ex: Käffer *et al.*, 2010; Käffer *et al.*, 2011; Käffer *et al.*, 2014; Martins-Mazzitelli, 2005).

Para o Paraná, Dal-Forno & Eliasaro (2009, 2010a, 2010b) publicaram oito novas espécies de *Graphidaceae*. Para este mesmo estado, Feuerstein & Eliasaro (2015) publicaram cinco novas espécies de *Graphis*. Feuerstein *et al.* (2014) publicaram novas espécies de *Diorygma*, incluindo exemplares deste estado e uma chave mundial para este gênero, e Cáceres *et al.* (2014) publicaram o novo gênero *Corticorygma*, baseado em parte, em exemplares coletados por Feuerstein no Paraná.

Além de dispormos de muito poucos estudos realizados com materiais brasileiros, basicamente inexistem trabalhos que forneçam descrições e ilustrações bem detalhadas e chaves de identificação. Ressaltamos também que apenas um estudo molecular desta

família, utilizando exemplares brasileiros foi realizado até o momento (Cáceres *et al.*, 2014).

No Brasil, contrastando com suas dimensões continentais, dentre os nove liquenólogos que trabalham com sistemática e taxonomia de fungos liquenizados, há apenas uma especialista em líquens crostosos, Dra. Marcela Cáceres (UFS) em Sergipe. Contudo, seus trabalhos são de uma contextualização mais geral, sem uma família específica. Portanto há, além da carência de estudos nesta família para o Brasil, a necessidade da formação de um especialista no país.

A presente proposta de projeto possui grande importância para o conhecimento dos líquens crostosos do sul do Brasil, visto que abordará a família de crosta mais diversificada e abundante em regiões tropicais e subtropicais. Além disto, representará o primeiro trabalho específico, seguindo a atual circunscrição da família, para o país, baseado em conceitos taxonômicos modernos e utilizando caracteres moleculares. Esta abordagem auxiliará na compreensão de quais caracteres morfológicos, anatômicos e/ou químicos são úteis na delimitação de gêneros e espécies. Serão elaboradas descrições bem detalhadas e ilustrações desse grupo, bem como chaves de identificação que permitam a identificação e a comparação dos exemplares. Nesse sentido ressalta-se a importância desse trabalho para o conhecimento da micota liquenizada, possibilitando posteriores avanços no campo liquenológico, além do que, uma abordagem molecular para a circunscrição de espécies sul-brasileiras de *Graphidaceae*.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Realizar um levantamento da família *Graphidaceae* para o sul do Brasil por meio de uma abordagem integrativa, proporcionando descrições técnicas detalhadas, além de ilustrações e chave de identificação para os táxons encontrados.

3.2. Objetivos específicos

- Caracterizar morfológica, anatômica e quimicamente as espécies encontradas;
- Utilizar ferramentas moleculares na delimitação das espécies;
- Elaborar chaves de identificação para os gêneros e espécies identificadas;
- Disponibilizar ilustrações que facilitem a identificação das espécies;

4. Materiais e métodos

4.1. Coleta e herborização

As expedições a campo ocorrerão nos três estados da Região Sul do Brasil. Os locais serão definidos de acordo com o tipo vegetacional e após análise de exemplares depositados em herbário e de coleções pessoais de alguns liquenólogos. Em campo, as coletas serão realizadas por deslocamento ao acaso. Para a retirada do material do substrato será utilizado faca, martelo e cinzéis. Cada exemplar coletado será colocado em um saco de papel e serão anotados dados de coleta, tais como: data, local, número de coleta, tipo vegetacional e coordenadas geográficas. Em laboratório, os exemplares serão secos e acondicionados em caixinhas ou envelopes padronizados com etiqueta, e os dados de coleta transcritos. Depois de identificados, os exemplares serão incorporados ao Herbário ICN, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

4.2. Análises morfológicas e anatômicas

Serão feitas análises morfológicas em microscópio estereoscópico de estruturas com valor taxonômico, tais como cor do talo, tipo de ascoma, presença de propágulos, dentre outras. Em seguida, serão realizados cortes a mão livre do talo e dos ascomas para análises anatômicas em microscópio óptico. Todas as mensurações serão realizadas em meio aquoso, com uso de retículo acoplado a ocular.

4.3. Análises químicas

Para a identificação de metabólitos secundários de importância taxonômica, serão realizados testes de coloração (teste K: hidróxido de potássio a 10% e teste C: hipoclorito de sódio a 40%) feitos diretamente no talo e observados em microscópio estereoscópico e em secção transversal do ascoma e do talo para observação em microscópio óptico (Hale 1979). Também será feita observação do talo sob lâmpada UV e Cromatografia em Camada Delgada (CCD) de acordo com Culberson & Ammann (1979). Para a identificação das substâncias liquênicas serão utilizadas tabelas e dados de Elix (2014) e de Staiger (2002).

4.4. Revisão de herbário e estudos dos tipos

Serão revisados exemplares depositados no Herbário ICN e será solicitado o empréstimo de exemplares da família depositados em herbários do Brasil e do exterior, incluindo materiais-tipo para confirmação de espécies, quando necessário.

4.5. Isolamento, amplificação e sequenciamento de DNA

Após a coleta dos líquens, e devido processamento para secagem do material, fragmentos dos ascomas e talo frescos ou previamente congelados serão retirados com o auxílio de bisturi e pinça, previamente limpos com álcool 70%, recolhidos em tubos tipo Eppendorf de 1,5 ml e armazenados em freezer (-20°C) até a extração do DNA. Serão selecionados pelo menos um espécime de cada espécie.

O DNA será extraído utilizando o kit de extração de DNA e PCR para tecidos vegetais da marca Sigma (Sigma-Aldrich REDEExtract-N-Amp Plant PCR Kit – (St. Louis, Missouri, U.S.A.), seguindo instruções do fabricante. O sucesso da extração será verificado através de eletroforese em gel de agarose e a qualidade do DNA será avaliada por espectrofotometria. O DNA será armazenado em freezer (-20°C) até seu uso em reações de PCR.

Para amplificação, será usada a região ITS, que tem demonstrado bons resultados para delimitação de espécies e em testes de correlação entre a diversidade genética e morfológica em complexos de espécies, sendo considerado o *barcoding* universal para fungos liquenizados (Wirtz *et al.*, 2008; Kelly *et al.*, 2011; Schoch *et al.*, 2012). Serão usados os *primers* ITS1F (Gardes e Bruns, 1993) e ITS4 (White *et al.* 1990) seguindo o protocolo de Leavitt *et al.* (2011). O resultado da amplificação será verificado por eletroforese em gel de agarose 1% e os produtos de amplificação serão purificados e enviados para sequenciamento.

4.6. Análises das sequências

Para auxiliar na delimitação das espécies da família *Graphidaceae* coletadas no sul do Brasil, serão utilizadas duas abordagens de análise das sequências da região ITS: (1) inferências filogenéticas para verificar monofilia (comparar com outras sequências da espécie) e posicionar as espécies encontradas em relação as demais do gênero (as sequências obtidas neste trabalho serão alinhadas com outras recuperadas do GenBank, de acordo com o grupo taxonômico específico); (2) estimativas de distância genética serão utilizadas para calcular os intervalos de variação intra e interespecífica (*barcoding gap*, Del-Prado *et al.*, 2010), assim como serão comparadas a valores de divergência considerados universais para separar espécies de fungos (acima de 3%; Lindahl *et al.*, 2013).

O consensus das leituras será realizado no Geneious 9.1.2 (<http://www.geneious.com>; Kearse *et al.*, 2012). As sequências obtidas serão alinhadas

através do MAFFT em Geneious 9.1.2 (Função automática para a melhor escolha de algoritmo, penalidade de intervalo = 1,53, valor de deslocamento = 0,123 e matriz de pontuação = 200PAM / k=2) e manualmente ajustado. O melhor modelo para cada matriz será obtido utilizando o programa jModeltest2 (Guindon & Gascuel, 2003; Darriba *et al.*, 2012). As análises de Máxima Verossimilhança serão realizadas em PhyML (Guindon & Gascuel, 2003) com 1000 réplicas de *bootstrap* para o cálculo do suporte nodal. As análises bayesianas serão estimadas utilizando o software BEAST 1.8.2 (Drummond *et al.*, 2012). Uma árvore de Yule prévia e uma árvore de partida aleatória serão selecionadas e as corridas de MCMC serão realizadas utilizando quatro cadeias de 10 000 000 de gerações, amostrando árvores a cada 1000. No TreeAnnotator v1.8.2, os primeiros 20% das árvores serão descartados como *burn-in* e a árvore de máxima credibilidade gerada. Os resultados serão verificados no Tracer v1.6 (Rambaut *et al.*, 2014) para a convergência MCMC e os tamanhos de amostra eficaz (≥ 200).

Serão utilizadas ferramentas adicionais para a delimitação de espécies, como o cálculo das distâncias de máxima verossimilhança (número de substituição por sítio, s/s) no PAUP 4.0b10 (Swofford, 2003) e o uso do Automatic Barcode Gap Discovery (<http://wwwabi.snv.jussieu.fr/public/abgd/>; Puillandre *et al.*, 2011). As configurações padrão (Pmin = 0,001, Pmax = 0,1 e 20 números de distribuição) e quatro valores de largura de gap serão testados (0,5, 0,7, 1,0 e 1,2) usando as distâncias de Jukes-Cantor.

5. Cronograma

Ano	2016			2017				2018				2019				2020
Atividade/Trimestre	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1
Revisão bibliográfica																
Obtenção de créditos																
Coleta de material																
Análises moleculares																
Análises morfo-anatômicas																
Cromatografias																
Revisão de herbários e Tipos																
Produção de artigos																
Sanduíche BGBM																
Redação da Dissertação																
Qualificação																
Defesa																

6. Viabilidade do Projeto

As coletas serão financiadas pela aluna, que já dispõe de todos os materiais utilizados em campo e, quando possível, com a utilização de diárias disponibilizadas pelo

PPG Botânica. Os equipamentos necessários para as análises morfológicas e anatômicas (microscópio óptico e estereoscópico) assim como reagentes para os testes de coloração serão disponibilizados pelo laboratório de Micologia do Departamento de Botânica da UFRGS. As análises cromatográficas serão realizadas no laboratório de Lichenologia da UFPR, em Curitiba-PR, que disponibilizará todos os equipamentos e reagentes necessários. O isolamento e a amplificação do DNA serão realizados no Laboratório de Evolução e Biodiversidade da UFMS, em Campo Grande-MS. O sequenciamento será feito em empresas especializadas. Estima-se que cerca de 300 espécimes terão a região ITS sequenciada.

7. Orçamento e Financiamento

Material de consumo	Quantidade	Valor Unitário	Total
Análises moleculares: plásticos e reagentes	-	-	R\$ 6.000,00
Análises moleculares: serviço de sequenciamento de DNA	600	R\$ 10,00	R\$ 6.000,00
Excursões de coleta	15 diárias	R\$ 184,88*	R\$ 2.773,20
TOTAL			R\$ 14.773,20

* valor diário aproximado para gastos com combustível e, eventualmente, aluguel de veículo.

Este projeto contará parcialmente com recursos da bolsa de produtividade em pesquisa do CNPq (1D) obtida pela orientadora. Além deste recurso já disponível, o projeto será submetido a outros editais de agências de fomento (CNPq, CAPES, FAPERGS), durante o curso de doutorado da aluna.

8. Resultados Esperados

Entre os resultados esperados, o desenvolvimento deste projeto deverá:

- Descrever novas espécies;
- Encontrar novos registros de espécies para os estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul;
- Fornecer chaves de identificações para alguns gêneros;
- Publicar estes resultados em periódicos de alto impacto e grande circulação na área, como Mycologia (B1), Fungal Biology (B1), New Phytologist (A1) e Fungal Diversity (A1).

Referências

- Aptroot, A. & Sipman H. J. M. 2007. A new *Schistophoron* (Graphidaceae) from Costa Rica. **Bibliotheca Lichenologica** 96: 21-24.
- Archer, A. W. 2006. The lichen family Graphidaceae in Australia. **Bibliotheca Lichenologica** 94: 1-191.
- Archer, A. W. 2009. Graphidaceae. **Flora of Australia** 57: 84-194.
- Cáceres, M. E. S. 2007. **Corticolous crustose and microfoliose lichens of northeastern Brazil**. Libri Botanici, v. 22, p. 1-168.
- Cáceres, M. E. S. & Lücking, R. 2013. *Acanthothecis sarcographoides* (Ascomycota: Graphidaceae), a morphologically unique, new lichen species in the Atlantic Forest of northeastern Brazil. **Acta Botanica Brasilica** 27(3): 472-475.
- Cáceres, M. E. S.; Vieira, T. S.; De-Jesus, L. S.; Lücking, R. 2012. New and interesting lichens from the Caxiuanã National Forest in the Brazilian Amazon. **Lichenologist** 44: 807-812.
- Cáceres, M. E. S.; Aptroot, A.; Parmen, S. & Lücking, R. 2014. Remarkable diversity of the lichen family Graphidaceae in the Amazon rainforest of Rondônia, Brazil. **Phytotaxa** 189: 087-136.
- Culberson, C. F. & Ammann, K. 1979. Standard method zur Dünnschichtchromatographie von Flechtensubstanzen. **Herzogia** 5, p. 1-24.
- 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.
- Dal-Forno, M. & Eliasaro, S. 2009. Two new species of *Acanthothecis* (lichenized Ascomycota) from Brazil. **Mycotaxon** 109: 43-47.
- Dal-Forno, M. & Eliasaro, S. 2010a. Four new species of *Graphis* (Ostropales: Graphidaceae) from Brazil. **Lichenologist** 42: 77-81.
- Dal-Forno, M. & Eliasaro, S. 2010b. Two new species of Graphidaceae (lichenized Ascomycota) from Brazil. **Mycotaxon** 112: 15-20.
- Darriba, D.; Taboada, G. L.; Doallo R. & Posada, D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature Methods** 9(8): 772.
- Drummond, A.J.; Suchard, M.A.; Xie, D. & Rambaut, A. 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. **Mol. Biol. Evol.** 29: 1969–1973.
- Elix, J. A. 2014. **A Catalogue of Standardized Chromatographic Data and Biosynthetic Relationships for Lichen Substances**. 3rd ed. Canberra: Australian National University.
- Eschweiler, F. 1833. Lichenes. In: C.F. Ph. De Martius. **Flora Brasiliensis**. Vol. I. Pars Prior. Algae, Lichenes, Hepaticae. Stuttgartiae et Tubingae, p. 53-292.
- Feuerstein, S. C. & Eliasaro, S. 2015. Five new species of *Graphis* (Graphidaceae: Lichenized Ascomycota) from Brazil. **Brazilian Journal of Botany** 38(1):141–148.
- Feuerstein, S. C.; Cunha-Dias, I. P. R.; Aptroot, A.; Eliasaro, S. & Cáceres, M. E. S. 2014. Three new *Diorygma* (Graphidaceae) species from Brazil, with a revised world key. **The Lichenologist** 46(6): 753–761.
- Fleig, M. 1988. Líquens da Estação Ecológica do Taim, Rio Grande, RS, Brasil. **Napaea** 6: 9-16.

- Fleig, M. 1990. Líquens da Estação Ecológica de Aracuri. Novas ocorrências no Rio Grande do Sul. **Iheringia Série Botânica** 40: 121 - 125.
- Fleig, M. & Medeiros Filho, J. W. 1990. Gêneros dos líquens saxícolas, corticícolas e terrícolas do Morro Santana, Porto Alegre, RS. Brasil. **Acta bot. bras.** 4(2): 73-99.
- Gardes, M. & Bruns, T. D. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-Application to the identification of mycorrhizae and rusts. **Mol. Ecol.** 2: 113-118.
- Guindon, S. & Gascuel, O. 2003. A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood". **Systematic Biology** 52: 696-704.
- Hale Jr., M. 1979. **How to Know the Lichens**. 2 ed. Dubuque: Wm. C. Brown Co.
- Käffer, M. I.; Cáceres, M. E. S.; Vargas, V. M. F. & Martins, S. M. A. 2010. Novas ocorrências de líquens corticícolas crostosos para a região sul do Brasil. **Acta Botanica Brasilica** 24(4): 948-951.
- Käffer, M. I.; Alves, C.; Cáceres, M. E. S.; Martins, S. M. A. & Vargas, V. M. F. 2011. Caracterização da comunidade líquênica corticícola de Porto Alegre e áreas adjacentes, RS, Brasil. **Acta Botanica Brasilica** 25(4): 832-844.
- Käffer, M. I.; Martins-Mazzitelli, S. M. A.; Cáceres, M. E. S. & Aptroot, A. 2014. A new, locally common *Graphis* (*Graphidaceae*) species from southern Brazil. **Cryptogamie. Mycologie** 01811584: 233-237.
- Kalb, K.; Staiger, B. & Elix, J. A. 2004. A monograph of the lichen genus *Diorygma* -a first attempt. **Symbolae Botanicae Upsalienses** 34 (1): 133-181.
- Kearse, M.; Moir, R.; Wilson, A.; Stones-Havas, S.; Cheung, M.; Sturrock, S.; Buxton, S.; Cooper, A.; Markowitz, S.; Duran, C.; Thierer, T.; Ashton, B.; Mentjies, P. & Drummond, A. 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, 28(12), 1647-1649.
- 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.; Cannon, P. F.; Minter, D. W. & Stalpers, J. A. 2008. **Dictionary of the Fungi**, 10th ed. CABI, Wallingford, UK.
- Krempelhuber, A. 1876. Lichenes Brasilienses, collecti a D. A. Glaziou in província brasiliensi Rio Janeiro. **Flora**, Regensburg, v. 59, 1-529.
- Leavitt, S. D.; Fankhauser, J. D.; Leavitt, D. H.; Porter, L. D.; Johnson, L. A. & St. Clair, L. L. 2011. Complex patterns of speciation in cosmopolitan “rock posy” lichens – Discovering and delimiting cryptic fungal species in the lichen-forming *Rhizoplaca melanophthalma* species-complex (Lecanoraceae, Ascomycota). **Molecular Phylogenetics and Evolution** 59: 587–602.
- Lindahl, B. D.; Nilsson, R. H.; Tedersoo, L.; Abarenkov, K.; Carlsen, T.; Kjølner, R.; Kõljalg, U.; Pennanen, T.; Rosendahl, S.; Stenlid, J. & Kauterud, H. 2013. Fungal community analysis by high-throughput sequencing of amplified markers – a user's guide. **New Phytologist** 199(1): 288–299.
- Lücking, R. 2007. *Kalbographa*: Monografie einer unerkannten Flechtengattung. **Bibliotheca Lichenologica** 96: 185-192.
- Lücking, R.; Rivas-Plata, E. 2008. Clave y Guía Ilustrada Para Géneros de *Graphidaceae*. **Glalia**, [S.l.], v. 1, p. 1-39.

- Lücking, R.; Kalb K.; Staiger, B. & McNeill, J. 2007. Proposal to conserve the name *Phaeographis*, with a conserved type, against *Creographa*, *Ectographis*, *Flegographa*, *Hymenodecton*, *Platygramma*, *Pyrochroa*, and *Pyrographa* (Ascomycota: Ostropales: Graphidaceae), along with notes on the names *Graphina* and *Phaeographina*. **Taxon** 56: 1296-1299.
- Lücking, R.; Tehler, A.; Bungartz, F.; Rivas Plata, E. & Lumbsch, H.T. 2013. Journey from the West: Did tropical *Graphidaceae* (lichenized Ascomycota: Ostropales) evolve from a saxicolous ancestor along the American Pacific coast? **American Journal of Botany** 100: 844–856.
- Lücking, R.; Johnston, M. K.; Aptroot, A.; Kraichak, E.; Lendemer, J. C.; Boonpragob, K.; Cáceres, M. E. S.; Ertz, D.; Ferraro, L. I.; Jia, Z.; Kalb, K.; Mangold, A.; Manoch, L.; Mercado-Díaz, J. A.; Moncada, B.; Mongkolsuk, P.; Papong, K. B.; Parnmen, S.; Peláez, R. N.; Poengsungnoen, V.; Rivas-Plata, E.; Saipunkaew, W.; Sipman, H. J. M.; Sutjaritturakan, J.; Broeck, D. V. D.; Konrat, M. V.; Weerakoon, G. & Lumbsch, H. T. 2014. One hundred and sixty five new species of *Graphidaceae*: closing the gap or a drop in the bucket?. **Phytotaxa** 189: 7–38.
- Lumbsch, H.T.; Kraichak, E.; Parnmen, S.; Rivas Plata, E.; Aptroot, A.; Cáceres, M.E.S.; Ertz, D.; Feuerstein, S.C.; Mercado-Díaz, J.A.; Staiger, B.; Van den Broeck, D. & Lücking, R. 2014. New higher taxa in the lichen family *Graphidaceae* (lichenized Ascomycota: Ostropales) based on a three-gene skeleton phylogeny. **Phytotaxa** 189(1):39–51.
- Martins-Mazzitelli, S. M. A. 2005. Fungos liquenizados corticícolas e terrícolasda área da sub-bacia do Sinos e Taquari-Antas, RS, Brasil. **Acta Botanica Brasilica** 19: 181-187.
- Martius, C.F.P. de. 1827. **Icones Selectae Plantarum Cryptogamicarum**. Monachii.
- Osorio, H. 1981. Contribution to the lichen flora of Brazil VII. Lichens from Morro do Côco, Viamão, Rio Grande do Sul State. **Internation Journal of Mycology and Lichenology**, v. 2, n. 1, p. 43-50.
- Osorio, H.S. 1985. Contribution to the lichen flora of Brazil XIV. Lichens from Gramado, Rio Grande do Sul State. **International Journal of Mycology and Lichenology** 2 (1): 43-50.
- Osorio, H.S. & Fleig, M. 1982. Contribution to the lichen flora of Brazil. IX. Lichens from the municipality of Torres, Rio Grande do Sul State. **Mycotaxon** 14 (1): 347-350.
- Osorio, H.S. & Fleig, M. 1990. Contribution to the lichen flora of Brazil. XXIV. Lichens from Nova Petrópolis, Rio Grande do Sul State. **Mycotaxon** 36 (2): 325-327.
- Osorio, H.S. & Fleig, M. 1994. Contribution to the lichen flora of Brazil. XXXI. Lichens from Julio de Castilhos, Rio Grande do Sul State. **Comunicaciones Botánicas del Museo de Historia Natural de Montevideo** 5 (101): 1-7.
- Osorio, H.S., Aguiar, L.W. & Martau, L. 1997. Contribuição à flora liquênica do Brasil XXXIII. Liquens do Estado do Rio Grande do Sul: Depressão Central. **Iheringia Série Botânica** 49: 11-20.
- Osorio, H.S., Homrich, M.H. & Fleig, M. 1982. Contribution to the Lichen Flora of Brazil X. Lichens from Guaíba, Rio Grande do Sul State. **Phytologia** 51 (7): 479-483.
- Parnmen, S.; Lücking, R. & Lumbsch, H.T. 2012. Phylogenetic classification at generic level in the absence of distinct phylogenetic patterns of phenotypical variation: A case study in *Graphidaceae* (Ascomycota). **PLOS One** 7(12): 1–13.
- Parnmen, S.; Cáceres, M.E.S.; Lücking, R. & Lumbsch, H.T. 2013. *Myriochapsa* and *Nitidochapsa*, two new genera in *Graphidaceae* (Ascomycota: Ostropales) for chroodiscoid species in the *Ocellularia* clade. **The Bryologist** 116: 127–133.

- Puillandre, N.; Lambert, A.; Brouillet, S. & Achaz, G. 2011. ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. **Molecular Ecology** 21: 1864-1877.
- Rambaut, A.; Suchard, M. A.; Xie, D. & Drummond, A. J. 2014. Tracer v1.6. Available from <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>
- Redinger, K. 1933a. Die Graphidineen der ersten Regnell'schen Expedition nach Brasilien 1892-94. I *Glyphis, Medusulina und Sarcographa*. **Arkiv for Botanik**, v. 25A, n. 13.
- Redinger, K. 1933b. Die Graphidineen der ersten Regnell'schen Expedition nach Brasilien 1892-94. II *Graphina und Phaeographina*. **Arkiv for Botanik**, v. 26A, n. 1.
- Redinger, K. 1935. Die Graphidineen der ersten Regnell'schen Expedition nach Brasilien 1892-94. III. *Graphis und Phaeographis*, nebst einem Nachtrage zu Graphina. **Arkiv for Botanik**, v. 27A, n. 3.
- Rivas-Plata, E. & H. T. Lumbsch. 2011. Parallel evolution and phenotypic disparity in lichenized fungi: a case study in the lichen-forming fungal family *Graphidaceae* (Ascomycota: *Lecanoromycetes*: *Ostropales*). **Molecular Phylogenetics and Evolution** 61: 45–63.
- Rivas Plata, E.; Lücking, R. & Lumbsch H.T. 2008. When family matters: an analysis of *Thelotrema* (Lichenized Ascomycota: *Ostropales*) as bioindicators of ecological continuity in tropical forests. **Biodiversity and Conservation** 17: 1319–1351.
- Rivas-Plata, E.; Lumbsch, H.T. & Lücking, R. 2012a. A new classification for the lichen family *Graphidaceae* s.lat. (Ascomycota: *Lecanoromycetes*: *Ostropales*). **Fungal Diversity** 52: 107–121.
- Rivas Plata, E.; Lücking, R. & Lumbsch, H.T. 2012b. Molecular phylogeny and systematics of the *Ocellularia*-clade (Ascomycota: *Ostropales*: *Graphidaceae*). **Taxon** 61: 1161–1179.
- Rivas Plata, E.; Parnmen, S.; Staiger, B.; Mangold, A.; Frisch, A.; Weerakoon, G.; Hernández M., J.E.; Cáceres, M.E.S.; Kalb, K.; Sipman, H.J.M.; Common, R.S.; Nelsen, M.P.; Lücking, R. & Lumbsch, H. T. 2013. A molecular phylogeny of *Graphidaceae* (Ascomycota, *Lecanoromycetes*, *Ostropales*) including 428 species. **MycoKeys** 6: 55–94.
- Schoch, C. L.; Seifert, K. A.; Huhndorf, S.; Robert, V.; Spouge, J. L.; Levesque, C. A.; Chen, W. & Fungal Barcoding Consortium. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. **PNAS** 109 (16): 6241–6246.
- Sohrabi, M.; Lücking, R. & Lumbsch, H. T. 2014. One hundred and seventy five new species of *Graphidaceae*. **Phytotaxa** 189 (1): 005–006.
- Staiger, B. 2002. Die Flechtenfamilie *Graphidaceae*. **Bibliotheca Lichenologica**, Berlin- Stuttgart, v. 85, p. 1-526.
- Swofford, D. L. 2003. **PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods)**. Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Vainio, E.A. 1890. **Étude Sur La Classification Naturelle Et La Morphologie Des Lichens Du Brésil**. Université de Helsingfors, Heritiers e Simelius.
- White, T. J.; Bruns, T. D.; Lee, S. & Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315-322. In: Innis, M. A.; Gelfand, D. H.; Sninsky, J. J. & White T. J. eds. PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications. Academic Press. New York
- Wirth, M.; Hale, M. E. 1978. Morden-Smithsonian Expedition to Dominica: The Lichens (*Graphidaceae*). **Smithsonian Contributions To Botany**, v. 40.

Wirtz, N.; Printzen, C. & Lumbsch, H. T. 2008. The delimitation of Antarctic and biolar species of neuropogonoid *Usnea* (Ascomycota, Lecanorales): a cohesion approach of species recognition for the *Usnea perpusilla* complex. **Mycological Research** 112: 472–484.