

DNA barcodes for the distinction of reindeer lichens: a case study using *Cladonia rangiferina* and *C. stygia*

Birgit KANZ*, Wolfgang von BRACKEL, Rainer CEZANNE, Marion EICHLER, Marie-Luise HOHMANN, Dietmar TEUBER & Christian PRINTZEN

Abstract: KANZ, B., BRACKEL, W. v., CEZANNE, R., EICHLER, M., HOHMANN, M.-L., TEUBER, D. & PRINTZEN, C. 2015. DNA barcodes for the distinction of reindeer lichens: a case study using *Cladonia rangiferina* and *C. stygia*. – Herzogia 28: 445–464.

Many groups of lichens are difficult to identify due to their phenotypical plasticity. Molecular methods are therefore increasingly used not only to elucidate phylogenetic relationships among taxa, but also to assign individuals to species. Most members of the genus *Cladonia* are conspicuous and frequently collected, but notoriously variable. At the same time the genus comprises species that have to be regularly monitored under EU legislation. A “DNA barcoding” approach could thus be very helpful to correctly identify taxa. The internal transcribed spacer region of the ribosomal RNA repeat has been proposed as a universal barcoding marker for fungi. However, it has also been shown that data from this locus alone might be insufficient to reliably distinguish members of *Cladonia*. Taking the two similar species *C. rangiferina* and *C. stygia* as an example, we tested the suitability of ITS and five additional gene loci to distinguish species of *Cladonia* subgenus *Cladina*. Intraspecific variability was high in most of the investigated loci. Bayesian species delimitation using a multispecies coalescent approach based on multilocus DNA sequence data allowed us to separate the two species with high statistical support. The clustering of samples was also supported by phenotypic differences between the groups and a phylogenetic analysis. This allowed us to test the usefulness of single gene loci as barcoding markers on an objective basis. The only locus, for which minimum interspecific divergence exceeded maximum intraspecific variability in both species, was the small subunit of the mitochondrial ribosomal RNA repeat. Whether this locus should be suggested as an alternative or additional barcoding marker for the separation of *Cladonia* species needs to be tested with a broader taxonomic sample.

Zusammenfassung: KANZ, B., BRACKEL, W. v., CEZANNE, R., EICHLER, M., HOHMANN, M.-L., TEUBER, D. & PRINTZEN, C. 2015. DNA-Barcodes zur Unterscheidung von Rentierflechten: eine Fallstudie mit *Cladonia rangiferina* und *C. stygia*. – Herzogia 28: 445–464.

Viele Flechtengruppen sind wegen ihrer phänotypischen Plastizität schwer zu bestimmen. Molekulare Methoden werden deshalb zunehmend nicht nur verwendet, um Phylogenien zu rekonstruieren, sondern auch um Individuen einer Art zuzuordnen. Die meisten Arten der Gattung *Cladonia* sind auffällig und werden häufig gesammelt, sind aber berüchtigt für ihre Variabilität. Gleichzeitig enthält die Gattung Arten, deren Erhaltungszustand nach der FFH-Richtlinie der EU regelmäßig überwacht werden muss. Ein „DNA-Barcoding“ Ansatz könnte bei der sicheren Bestimmung dieser Arten sehr hilfreich sein. Als universeller Barcoding-Marker für Pilze ist die „Internal Transcribed Spacer“ (ITS) Region der ribosomalen RNA vorgeschlagen worden. Es wurde jedoch auch gezeigt, dass Daten alleine von diesem Genlocus nicht ausreichen, um *Cladonia*-Arten zuverlässig zu unterscheiden. Am Beispiel der beiden sehr ähnlichen Arten *Cladonia rangiferina* und *C. stygia* untersuchen wir, inwieweit ITS und fünf weitere Genloci sich zur Unterscheidung von Arten aus *Cladonia* subgenus *Cladina* eignen. Die meisten untersuchten Genloci zeigen hohe infraspezifische Variabilität. Bayes'sche Artabgrenzung mittels einer Multispecies-Koaleszenzanalyse erlaubt, die beiden Arten mit hoher statistischer Unterstützung zu unterscheiden. Die Zuordnung der Proben zu den beiden Taxa wird auch durch phänotypische Unterschiede und phylogenetische Analysen bestätigt. Dies ermöglicht es, die Nützlichkeit einzelner Genloci als Barcoding-Marker auf einer objektiven Grundlage zu überprüfen. Der einzige

* Corresponding author

Genlocus, bei dem die minimale interspezifische Divergenz die maximale infraspezifische Variabilität beider Arten überschritt, war die kleine Untereinheit der mitochondrialen ribosomalen RNA. Ob dieser Genlocus als alternativer oder zusätzlicher Barcoding-Marker zur Unterscheidung von *Cladonia*-Arten herangezogen werden kann, sollte auf der Grundlage einer größeren Stichprobe untersucht werden.

Keywords: *Cladonia* subgenus *Cladina*, DNA barcoding, *cox1*, *EF 1 α* , *ITS*, *mtLSU*, *mtSSU*, *RPB1*, multispecies coalescent, STACEY.