Molekulargenetische Untersuchung zum Vorkommen der Rentierflechte *Cladonia stygia* in Hessen

Birgit Kanz, Wolfgang von Brackel, Rainer Cezanne, Marion Eichler, Marie-Luise Hohmann, Dietmar Teuber & Christian Printzen

Zusammenfassung: Die Flechte *Cladonia stygia* (Fr.) Ruoss wurde anlässlich einer Bestandsaufnahme der Rentierflechten 2009 erstmals aus Hessen gemeldet. Da die Unterscheidung von der ähnlichen *C. rangiferina* (L.) F. H. Wigg. anhand morphologischer Merkmale oft unsicher ist, wurden molekulargenetische Daten zur Identifizierung der hessischen Belege der Art herangezogen. Phylogenetische Stammbäume auf der Grundlage von sechs mitochondrialen und nuklearen Genloci untermauern die Abgrenzung beider Arten. Nur zwei von sieben gemeldeten hessischen Vorkommen gehören nach diesen Ergebnissen zu *C. stygia*, die übrigen zu *C. rangiferina*. Eine gezielte Suche nach *C. stygia* und eine durch molekulargenetische Daten untermauerte Bestimmung der Belege erscheint notwendig, um den Status der Art in Hessen zuverlässig beurteilen zu können.

Molecular genetic analysis on the occurrence of reindeer lichen *Cladonia stygia* in Hesse

Summary: A survey conducted in 2009 reported the reindeer lichen *Cladonia stygia* (Fr.) Ruoss for the first time in Hesse. This species is often difficult to distinguish from the morphologically similar *C. rangiferina* (L.) F. H. Wigg., and its identification remains uncertain. We therefore used molecular genetic data to identify the Hessian samples of this species. Phylogenetic pedigrees based on six mitochondrial and nuclear gene loci support the distinction of *C. stygia* from *C. rangiferina*. Only two out of seven populations reported in Hesse consist of *C. stygia*. The other populations are formed by *C. rangiferina*. A targetted search for *C. stygia* and verification of its identification using molecular genetics are necessary steps for reliably judging the conservational status of this species in Hesse.

Birgit Kanz, Senckenberg Forschungsinstitut und Naturmuseum, Senckenberganlage 25, 60325 Frankfurt am Main; birgit.kanz@senckenberg.de
Wolfgang von Brackel, IVL, Institut für Vegetationskunde und Landschaftsökologie, Georg-Eger-Str. 1b, 91334 Hemhofen; wolfgang.von.brackel@ivl-web.de
Rainer Cezanne, Institut für angewandte Vegetationskunde und Landschaftsökologie, Lagerstraße 14, 64297 Darmstadt; r.cezanne@iavl.de
Marion Eichler, Bürogemeinschaft Angewandte Ökologie, Kaupstraße 43, 64289 Darmstadt; m.eichler@bg-ang-oekologie.de
Marie-Luise Hohmann, Büro für Vegetationskunde und Landschaftsökologie, Liebigstraße 44, 64293 Darmstadt; BVL-Hohmann@arcor.de
Dietmar Teuber, Büro PLANTAGO, Kerkrader Str. 11, 35394 Gießen; dietmar.teuber@gmx.de
Christian Printzen, Senckenberg Forschungsinstitut und Naturmuseum, Senckenberganlage 25, 60325 Frankfurt am Main; christian.printzen@senckenberg.de

1. Einleitung

Flechten sind Symbiosen zwischen einem Pilz (dem sogenannten Mykobionten) und Grünalgen oder Cyanobakterien (sogenannte Photobionten), die nicht nur maßgeblich zum globalen Stickstoff- und Kohlenstoffkreislauf beitragen (Elbert & al. 2012), sondern auch seit langem als Indikatororganismen für Luftverunreinigungen durch Schwermetalle, Stickstoff- und Schwefelverbindungen verwendet werden (Conti & Cecchetti 2001). Daneben eignen sie sich zur Beurteilung der Kontinuität von Ökosystemen und, wie neuere Studien zeigen, auch des globalen Klimawandels (Rose 1976, van Herk & al. 2002). Ihre Bedeutung als Zeigerorganismen verdanken sie der Tatsache, dass viele Arten auf Umweltveränderungen sehr empfindlich reagieren. Luftverunreinigungen, Intensivierung der Land- und Forstwirtschaft und andere menschliche Einwirkungen auf die Natur haben vom 19. Jahrhundert an zu einem merklichen Bestandsrückgang der meisten Flechtenarten bis hin zum Aussterben einzelner Arten geführt (Schöller 1997, Wirth & al. 2011). Die wenigsten Flechtenarten sind ökonomisch allerdings so bedeutsam, dass sie durch eine direkte Entnahme aus der Natur gefährdet wären. Eine Ausnahme bilden hier die Rentierflechten, die zum Beispiel als Bestandteile von Blumengestecken und Grabkränzen Verwendung finden. Ihr Namen rührt von ihrer Rolle als Winternahrung für Rentiere und Karibus her. Die Arten gehören zu den auffälligsten Flechtenarten, die in borealen Wäldern den Boden auf riesigen Flächen bedecken können. Sie werden entweder als unabhängige Gattung *Cladina* Nyl. (Ahti 2000) oder als *Cladonia* P. Browne subg. *Cladina* (Nyl.) Vain. (Ahti & al. 2013, Wirth & al. 2013) behandelt. Während die meisten Arten der Gattung *Cladonia* Thalli mit einem schuppigen Grundlager bilden, über das sich verzweigte Stielchen, die sogenannten Podetien, erheben, fehlt den Arten der Untergattung *Cladina* dieser schuppige Grundthallus. Stattdessen bilden sie sehr regelmäßig verzweigte weißlich-, gelblich- oder grünlich-graue Polster (Abb. 1, 2).

Die Untergattung *Cladina* ist die einzige Flechtengruppe, die im Anhang V der FFH-Richtlinie der EU (Richtlinie 92/43/EWG 1992) gelistet ist. Ihre Bestandssituation muss deshalb von den Mitgliedsstaaten überwacht werden. In Deutschland obliegt diese Pflicht den Bundesländern. Aus Hessen sind die sechs Arten *Cladonia arbuscula* (Wallr.) Flot., *C. ciliata* Stirt., *C. portentosa* (Dufour) Coem., *C. rangiferina* (L.) F. H. Wigg., *C. stellaris* (Opiz) Pouzar & Vězda und *C. stygia* (Fr.) Ruoss gemeldet (Cezanne & al. 2009, 2013). Mit Ausnahme der in Hessen wohl ausgestorbenen *C. stellaris* und der seltenen *C. stygia* sind diese Arten ehemals und aktuell von etlichen Fundorten bekannt. *Cladonia stygia*, die aus benachbarten Regionen Deutschlands und der Tschechischen Republik bereits früher gemeldet worden war (Ahti 1984, Ahti & Hyvönen 1985, Ruoss 1985), wurde von Cezanne & al. (2009) erstmals in Hessen gefunden und von sieben Lokalitäten in der Hohen Rhön und am Hohen Meißner angegeben.

Viele Flechtenarten sind morphologisch sehr variabel. Das führt zum einen dazu, dass ihre Bestimmung häufiger mit Unsicherheit behaftet ist als die von Gefäßpflanzen. Zum anderen ist auch die Artabgrenzung zwischen nahe verwandten oder morphologisch ähnlichen Flechtenarten oft umstritten. Die Gattung *Cladonia* ist ein Musterbeispiel für innerartliche Variabilität bei Flechten (Ahti 2013). In Deutschland kommen circa 70 Arten und Unterarten der Gattung vor (Wirth & al. 2013), von denen einige mangels eindeutiger morphologischer Kriterien nur aufgrund chemischer Merkmale unterschieden

werden. Einige Arten zeichnet neben bestimmten Inhaltsstoffen auch eine schwarz gefärbte Podetienbasis aus. Dies wird als Merkmal unter anderem für *C. stygia*, *C. straminea*, *C. callosa* und *C. macroceras* genannt. Allerdings sind absterbende Lager anderer Flechtenarten häufig ebenfalls teilweise geschwärzt, so dass dieses Merkmal zu zweifelhaften Bestimmungsergebnissen führen kann.



Abb. 1: *Cladonia rangiferina*, Habitus, Hintertaunus, Riesenberg im Wispertal, 2007.

Cladonia stygia wächst an den meisten der von Cezanne & al. (2009) angegebenen Lokalitäten zusammen mit *Cladonia rangiferina*. Als wesentliches Unterscheidungsmerkmal der beiden Arten wird das Auftreten eines roten Pyknidienschleims bei *C. stygia* angegeben. Dieses Merkmal ist im Gelände allerdings kaum und selbst unter dem Mikroskop oft nicht klar zu erkennen. In der Praxis werden die Arten deshalb meistens anhand der vom Grund bis über die Podetienmitte reichenden schwarzen Färbung der inneren Podetienstiele bei *C. stygia* unterschieden. An den meisten der von Cezanne & al. (2009) für *C. stygia* angegebenen Lokalitäten fand sich auch *Cladonia rangiferina*. Angesichts der oben beschriebenen Bestimmungsunsicherheiten weckte dies Zweifel, ob tatsächlich alle gemeldeten Vorkommen von *C. stygia* in Hessen zu dieser Art gehören.

DNS-Sequenzdaten werden seit einiger Zeit nicht mehr nur dazu genutzt, stammesgeschichtliche Zusammenhänge zu rekonstruieren. Mittels DNS-Sequenzen lässt sich auch die Artzugehörigkeit eines Beleges in vielen Fällen eindeutig ermitteln. Das als „DNS-Barcoding“ bekannt gewordene Verfahren setzt dabei auf einzelne, kurze DNS-Abschnitte, die rasch genug evolvieren, um artspezifische Unterschiede aufzuweisen (Hebert & al. 2003). Schoch & al. (2012) schlugen für das DNS-Barcoding von Pilzen

die „internal transcribed spacer“ Region der ribosomalen RNS vor. Im Falle von *Cladonia* zeigt sich jedoch, dass nahe verwandte Arten nicht immer mit Hilfe einzelner Genabschnitte unterscheidbar sind. Pino-Bodas & al. (2013) schlagen deshalb zur Artabgrenzung innerhalb von *Cladonia* DNS-Sequenzdaten mehrerer Genloci vor.



Abb. 2: *Cladonia stygia*, Habitus, Hohe Rhön, Rotes Moor, 2009.

Unsere hier vorgestellten Untersuchungen sollten mittels DNS-Sequenzdaten klären, ob das hessische Material von *C. stygia* nicht nur eine standörtlich bedingte morphologische Variante von *C. rangiferina* darstellt. Mit Hilfe von phylogenetischen Stammbäumen sollten die hessischen Belege sodann einer der beiden Arten zugeordnet werden.

2. Material und Methoden

Herbarbelege

In dieser Studie wurden elf als *Cladonia stygia* bestimmte Belege aus den sieben bekannten hessischen Vorkommen der Art untersucht. Hinzu kamen Belege aus Bayern und der Tschechischen Republik, drei Aufsammlungen von *C. stygia* aus Finnland und Kanada sowie drei Exemplare von *C. rangiferina* aus Finnland, Kanada und Luxemburg als Referenzbelege. Eine Aufsammlung von *C. ciliata* aus Luxemburg diente als Außengruppe (Tab. 1).

Tab. 1: Taxonomische Zuordnung und geographische Herkunft der dieser Studie zu Grunde liegenden Belege sowie für die genetische Analyse verwendbare DNS-Sequenzen. X = Gensequenz vorhanden; - = Gensequenz fehlend, H = Herbarium der Universität Helsinki. – Taxonomic classification and geographic origin of the studied specimens and DNA sequences used for genetic analyses. X = gene sequence available; - = Gene sequence absent. H = Herbarium of the University of Helsinki.

Bestimmung	**Phylogenetische Zuordnung**	**Fundort**	**Sammler und Herbar**	**nuclear markers**			**mitochondrial markers**		
				EF 1a	**ITS**	**RPB1**	**cox 1**	**mtLSU**	**mtSSU**
C. ciliata	*C. ciliata*	Luxemburg. „Luxemburger Schweiz, Gutland, Aesbachtal westl. von Echternach, Felsen des Perekop“, 280 m, 16. Mai 2014	R. Cezanne & M. Eichler 9433 (hb. Cezanne-Eichler)	X	X	X	X	X	X
C. stygia	*C. mitis*	Deutschland. „Bayern, Schwaben, Oberallgäu. Laufbacher Eck ESE Oberstdorf“, 2155 m, 4. September 2012	W. v. Brackel 6034 (hb. v. Brackel)	X	X	X	X	X	X
C. rangiferina	*C. rangiferina*	Kanada. Yukon Territory, „S side of Alaska Hwy. (Yukon 1), E of Haines Junction, E of Pine Lake Campground“, 670 m, 7. Juni 2011	J. C. Lendemer 29130 (H)	X	-	X	X	X	X
C. rangiferina	*C. rangiferina*	Finnland. Etelä-Häme, „Heinola, Paistjärvi, Kärmevuori“, 8. Oktober 2009	V. Haikonen 27412 (H)	X	-	-	X	-	-
C. stygia	*C. rangiferina*	Deutschland. „Bayern, Oberbayern, Kreis Garmisch-Partenkirchen. Alpspitzgebiet, zwischen Osterfelderkopf und Hochalm“, 1875 m, 30. August 2011	W. v. Brackel 5569 (hb. v. Brackel)	X	X	X	X	-	X
C. stygia	*C. rangiferina*	Deutschland. „Bayern, Oberbayern. Kreis Berchtesgardener Land, Wimbachtal oberhalb Wimbachschloss“, 1105 m, 4. September 2011	W. v. Brackel 5573 (hb. v. Brackel)	X	X	X	X	X	X
C. stygia	*C. rangiferina*	Deutschland. „Bayern, Oberbayern. Kreis Garmisch-Partenkirchen, Wettersteingebirge, unter der Schachenalpe“, 1790 m, 25. September 2012	W. v. Brackel 6057 (hb. v. Brackel)	X	X	X	X	-	X
C. stygia	*C. cf. rangiferina*	Deutschland. „Bayern, Oberpfalz, Koppeler Bühl bei Schwarzenbach, Pressath“, 430 m, 12. Dezember 2004	W. v. Brackel 3228 (hb. v. Brackel)	-	-	-	-	-	-
C. stygia	*C. rangiferina*	Deutschland. „Hessen, Fulda-Werra-Bergland, Basaltblockhalde oberhalb Frau-Holle-Teich nahe der Kalbe“, 8. August 2007	R. Cezanne & M. Eichler 7404 (hb. Cezanne-Eichler)	-	-	-	-	X	X
C. rangiferina	*C. rangiferina*	Deutschland. „Hessen, Rhön, Basaltblockhalde Schafstein“, 790 m, 12. August 2009	M.-L. Hohmann 1164 (hb. Hohmann)	-	-	-	-	-	-
C. stygia	*C. rangiferina*	Deutschland. „Hessen, Hohe Rhön, Basaltblockhalde am Stirnberg SE Wüstensachsen“, 890 m, 12. August 2009	D. Teuber 2909 (hb. Teuber)	-	-	-	-	-	-
C. stygia	*C. rangiferina*	Deutschland. Hessen, „Blockhalde am Teufelskadrich NW Aulhausen, Hochtaunus“, 380 m, 28. August 2009	D. Teuber 3277 (hb. Teuber)	-	-	-	-	-	-
C. stygia	*C. rangiferina*	Deutschland. Hessen, „Schafstein S Reulbach“, 780 m, 12. August 2009	D. Teuber 2910 (hb. Teuber)	-	-	-	-	-	-
C. stygia	*C. rangiferina*	Deutschland. „Hessen, Hohe Rhön, Basaltblockhalde am Stirnberg“, 831 m, 12. August 2009	M.-L. Hohmann 1162 (hb. Hohmann)	-	-	-	-	-	-
C. stygia	*C. rangiferina*	Deutschland. „Hessen, Hohe Rhön, Basaltblockhalde Schafstein“, 790 m, 12. August 2009	M.-L. Hohmann 1163 (hb. Hohmann)	-	-	-	-	-	-
C. stygia	*C. rangiferina*	Deutschland. „Hessen, Rhön, Hohe Rhön, O-exp. Basaltblockhalde am Schafstein bei Wüstensachsen“, 800 m, 12. August 2009	R. Cezanne & M. Eichler 7735 (hb. Cezanne-Eichler)	X	X	X	-	-	-

Bestimmung	Phylogenetische Zuordnung	Fundort	Sammler und Herbar	nuclear markers			mitochondrial markers		
				EF 1a	ITS	RPB1	cox 1	mtLSU	mtSSU
C. stygia	*C. rangiferina*	Deutschland. „Hessen, Rhön, Hohe Rhön, Basaltblockmeer am Buschschirmküppel bei Hilders“, 700 m, 11. August 2009	R. Cezanne & M. Eichler 7737 (hb. Cezanne-Eichler)	X	-	-	-	-	-
C. stygia	*C. rangiferina*	Deutschland. „Hessen, Rhön, Hohe Rhön, Basaltblockmeer am Buschschirmküppel bei Hilders“, 700 m, 11. August 2009	R. Cezanne & M. Eichler 7747 (hb. Cezanne-Eichler)	X	-	-	-	-	-
C. stygia	*C. rangiferina*	Deutschland. „Hessen, Rhön, Hohe Rhön, NSG Milseburg, Blockhalde am Osthang“, 770 m, 8. September 2009	R. Cezanne & M. Eichler 7798 (hb. Cezanne-Eichler)	X	X	X	X	-	X
C. rangiferina	*C. rangiferina*	Deutschland. Hesse, östlich Melperts, Röhlichsgraben; 2012	D. Teuber 3208 (hb. Teuber)	-	-	-	-	-	-
C. rangiferina	*C. rangiferina*	Luxemburg. „Luxemburger Schweiz, Gutland, Aesbachtal W von Echternach, Felsen des Perekop“, 280 m, 16. Mai 2014	R. Cezanne & M. Eichler 9402 (hb. Cezanne-Eichler)	X	X	X	X	X	X
C. stygia	*C. stygia*	Kanada. New Brunswick, „Charlotte County: Lepreau Parish, New River Beach Provincial Park, Barnaby Head Trail between Raspberry Cove and Chitticks beach“, 29. April 2011	J. C. Lendemer 27782 (H)	X	X	X	X	X	X
C. stygia	*C. stygia*	Finnland. Satakunta, „Ikaalinen: Teikangas NE, by Tei-Tupa“, 120 m, 15. Juni 2013	T. Ahti 72074 (H)	X	X	X	X	-	X
C. stygia	*C. stygia*	Finnland. Uusimaa, „Pornainen: Kupsenkylä, Lampisuo“, 8. Juli 2013	V. Haikonen 29325 (H)	X	X	X	X	X	X
C. stygia	*C. stygia*	Deutschland. „Bayern, Mittelfranken, Kreis Nürnberger Land, Wimmerslohe an der Fuchsenmühle S Leinburg“, 370 m, 12. Mai 2006	W. v. Brackel 4006 (hb. v. Brackel)	-	-	-	-	-	-
C. stygia	*C. stygia*	Deutschland. „Bayern, Oberpfalz, Kreis Schwandorf, Dürrenberg im Neubäuer Forst“, 415 m, 30. September 2007	W. v. Brackel 4184 (hb. v. Brackel)	-	-	-	-	-	-
C. stygia	*C. stygia*	Deutschland. „Bayern, Oberpfalz, Kreis Neustadt a. d. Waldnaab, Kreuzbirkenschlag S Weiherhammer, Manteler Forst“, 395 m, 12. September 2011	W. v. Brackel 5561 (hb. v. Brackel)	X	X	-	X	X	X
C. stygia	*C. stygia*	Deutschland. „Bayern, Oberpfalz, Kreis Schwandorf, Schuhbauernschlag NW Neubäu“, 395 m, 6. October 2011	W. v. Brackel 5578 (hb. v. Brackel)	X	-	X	X	-	-
C. stygia	*C. stygia*	Deutschland. „Bayern, Mittelfranken, Kreis Roth, Forst Lach zwischen Harrlad und Schwand, NW Punkt 373“, 375 m, 26. Januar 2012	W. v. Brackel 5599 (hb. v. Brackel)	X	X	X	X	-	X
C. stygia	*C. stygia*	Deutschland. „Bayern, Mittelfranken, Kreis Nürnberger Land, NWR Grenzweg S Leinburg“, 420 m, 12. März 2012	W. v. Brackel 6005 (hb. v. Brackel)	X	X	X	X	-	-
C. stygia	*C. stygia*	Deutschland. „Hessen, Fulda-Werra-Bergland, Hoher Meißner, große, O-exponierte Basaltblockhalde an der Kalbe“, 680 m, 8. August 2007	R. Cezanne & M. Eichler 7405 (hb. Cezanne-Eichler)	-	-	-	-	-	X
C. stygia	*C. stygia*	Deutschland. „Hessen, Rhön, Rotes Moor“, 800 m, 7. August 2007	M.-L. Hohmann 1159 (hb. Hohmann)	-	-	-	-	-	X
C. stygia	*C. stygia*	Deutschland. „Hessen, Rhön, Hohe Rhön, NSG Rotes Moor bei Gersfeld, Nordrand des Großen Moores“, 800 m, 7. August 2007	R. Cezanne & M. Eichler 7354 (hb. Cezanne-Eichler)	-	-	-	-	-	-

DNS-Isolation und Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Genomische DNS wurde aus getrocknetem *Cladonia*-Material mit Hilfe des DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) isoliert. Sechs Genloci wurden mit den folgenden Primern vermehrt: cox1-5959F und cox1-6711R (Printzen & Ekman 2003) für einen Teil der Untereinheit 1 der Cytochrom-Oxidase (cox1), CLEF-3F und CLEF-3R (Yahr & al. 2006) für einen Teil des Elongationsfaktors 1 alpha (EF-1α), ITS1F (Gardes & Bruns 1993) und ITS4 (White & al. 1990) für die Region des „internal transcribed spacer" der ribosomalen RNS (ITS) einschließlich benachbarter Teile der kleinen Untereinheit der ribosomalen RNS (nrSSU), ML3 and ML4A (Printzen 2002) für einen Teil der großen Untereinheit der mitochondrialen ribosomalen DNS (mrLSU), mrSSU1 (Zoller & al. 1999) und MSU7 (Zhou & Stanosz 2001) für einen Teil der kleinen Untereinheit der mitochondrialen ribosomalen DNS (mrSSU) sowie RPB1-Af (Stiller & Hall 1997) und RPB1-Cr (Matheny et al. 2002) für einen Teil der größten Untereinheit der RNS-Polymerase II (RPB1).

25 µL PCR-Reaktionen enthielten 5 µL DNS-Extrakt, PCR-PuReTaq Ready-to-Go Beads™ (GE Healthcare), und 0,4 µM (ITS, mrSSU, mrLSU, cox1,) bzw. 1,4 µM (RPB1, EF-1α) der beiden PCR-Primer. Die Temperaturbedingungen für die PCR waren wie folgt:

(1) ITS und mrSSU: Anfängliche Denaturierung bei 94 °C (5 min), danach 5 Zyklen von 94 °C (30 s), 54 °C (30 s), 72 °C (1 min), 33 Zyklen von 94 °C (30 s), 48 °C (30 s), 72 °C (1 min) und finale Elongation bei 72 °C (10 min);

(2) mrLSU: Anfängliche Denaturierung bei 95°C (30 s), danach 5 Zyklen von 95 °C (30 s), 63 °C (30 sec, -1 °C je Zyklus), 72 °C (1 min), 33 Zyklen von 95 °C (30 s), 58 °C (30 s), 72°C (1 min) und finale Elongation bei 72°C (10 min);

(3) cox1: Anfängliche Denaturierung bei 95 °C (5 min), danach 6 Zyklen von 95 °C (45s), 52 °C (45 s, -1 °C je Zyklus), 72°C (1 min, 45 s), 34 Zyklen von 95 °C (30 s), 46 °C (30 s), 72°C (1 min, 45 s) und finale Elongation bei 72°C (10 min);

(4) RPB1: Anfängliche Denaturierung bei 95 °C (5 min), danach 8 Zyklen von 95 °C (1 min), 58 °C (1 min), 72 °C (1 min 45 s), 34 Zyklen von 95 °C (1 min), 50 °C (1 min), 72 °C (1 min 45 s) und finale Elongation bei 72°C (10 min);

(5) EF-1α: Anfängliche Denaturierung bei 95 °C (5 min), danach 36 Zyklen von 95 °C (30 s), 55 °C (30 s), 72 °C (1 min) und finale Elongation bei 72 °C (10 min).

PCR-Produkte wurden auf Agarosegelen elektrophoretisch von überschüssigem Primer getrennt, die DNS-Banden ausgeschnitten und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) gereinigt. Die gereinigte DNS wurden mit dem BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) bei 94 °C (30 s), gefolgt von 29 Zyklen von 95 °C (15 s), 45 °C (15 s) und 60 °C (4 min), unter Verwendung der PCR-Primer markiert. DNS-Sequenzen wurden sodann auf einem ABI PRISM® 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems) ermittelt. In Geneious Pro, Version 6.1.3 (Biomatters Inc.), wurden die zueinander passenden Strang- und Gegenstrangsequenzen zusammengeführt und eventuelle Lesefehler manuell berichtigt.

Phylogenetische Analysen

Mit Hilfe des BLAST-Algorithmus (**B**asic **L**ocal **A**lignment **S**earch **T**ool, Altschul & al. 1990) wurde in GenBank nach ähnlichen Sequenzen gesucht, um sicherzustellen, dass die von uns erzeugten DNS-Sequenzen zu *Cladonia* gehören. Die Sequenzen für ein-

zelne Gene wurden in Geneious Pro, Version 6.1.3, mit Hilfe des MAFFT-Algorithmus (Katoh & al. 2002) unter Verwendung der Grundeinstellungen aligniert. Regionen unsicheren Alignments wurden mit GBlocks, Version 0.91b (Castresana 2000), ebenfalls unter Verwendung der Grundeinstellungen entfernt. Als einzige Ausnahme wurden beim ITS-Datensatz Insertionen und Deletionen in 50 % der Sequenzen erlaubt, weil GBlocks andernfalls zu viele Positionen des Alignments entfernt hätte.

Die Einzelgendaten wurden zu den folgenden drei Datensätzen verkettet: (1) die verfügbaren Daten aller sechs Gene, (2) die Daten aller Gene außer mrLSU, für die nur neun Sequenzen vorlagen, (3) vier Gene unter Auslassung von mrLSU und ITS (mit nur 14 Sequenzen). Stammbaumberechnungen unter „Maximum Likelihood“ und „Bayes'sche“ Berechnungen basieren auf Substitutionsmodellen. Das optimale Modell für alle Datensätze wurde auf Grundlage des 6-Gen-Datensatzes mit Hilfe von „PartitionFinder“, Version 1.0.1 (Lanfear & al. 2012) in den Grundeinstellungen (Bayes'sches Informationskriterium und „greedy“-Algorithmus") ermittelt, wobei neun Datenblöcke vorgeschlagen wurden (cox1, EF-1α, nrSSU, ITS1, 5.8S rDNA, ITS2, mrLSU, mrSSU, RPB1). Das ermittelte Partitionierungsschema und die ermittelten optimalen Substitutionsmodelle für die Partitionen (Tab. 2) wurden unter Auslassung der fehlenden Genabschnitte auch auf die Datensätze mit vier und fünf Genen angewandt.

Tab. 2: Optimales Partitionierungsschema und optimale Substitutionsmodelle für jede Datenpartition des 6-Gen-Datensatzes, ermittelt mit PartitionFinder, Version 1.0.1. Abkürzungen für Substitutionsmodelle: HKY: Hasegawa-Kishino-Yano-Modell (Hasegawa et al. 1985), K80: Kimuras 2-Parameter-Modell (Kimura 1980), G: positionsspezifische Substitutionsraten, I: Anteil invariabler Positionen. Abkürzungen für Genloci siehe Text. – Optimal partitioning scheme and optimal substitution models for each data partition of the 6 gene dataset, determined with Partition Finder, Version 1.0.1. Abbreviations for substitution models: HKY: Hasegawa-Kishino-Yano model (Hasegawa et al. 198h), K80: Kimura 2-parameter model (Kimura 1980), G: site-specific substitution rates, I: with invariable positions. Abbreviations for gene loci see text.

Partition	Modell	Genloci	Alignment-Positionen
1	HKY+G	cox1, mrLSU	1-658, 1775-2663
2	K80+G	RPB1, EF-1α	659-1200, 3398-4038
3	K80+I	nrSSU, 5.8S rDNA	1201-1221, 1466-1620
4	K80+I+G	ITS1, ITS2	1222-1465, 1621-1774
5	HKY+I	mrSSU	2664-3397

Maximum-Likelihood-Stammbäume (ML-Bäume) für die 4-, 5- und 6-Gen-Datensätze wurden mit „RAxMLGUI“ (Silvestro & Michalak 2011) und dem „GTRGAMMAI-Modell“ für alle zuvor ermittelten Datenblöcke berechnet. Die statistische Unterstützung für einzelne Äste der Bäume wurde mit der „rapid bootstrap“ Option berechnet. Weiterhin wurden phylogenetische Stammbäume auch mit der „Markovketten-Monte-Carlo-Methode“ (MCMC) in „MrBayes“, Version 3.2 (Ronquist & al. 2012) erstellt. Hierbei wurde das von PartitionFinder ermittelte Partitionierungsschema und die hiermit bestimmten optimalen Substitutionsmodelle für die Datenpartitionen verwendet. Modelle mit positionsspezifisch variablen Substitutionsraten wurden mit sechs diskreten Gammakategorien approximiert. Für die Substitutionsraten wurde eine variable A-priori-Verteilung, für Astlängen eine unbegrenzte, exponentielle A-priori-Verteilung verwendet. Der Mittelwert dieser A-priori-Verteilung wurde als der Mittelwert der Astlängen des entsprechenden ML-Baums festgelegt. Wo möglich, wurden die Parameter der Substitu-

tionsmodelle zwischen den Partitionen entkoppelt. Stammbäume wurden in drei parallelen Läufen mit jeweils vier „Markovketten“ gesammelt, wobei die vier Ketten jeweils um einen Faktor von 0,15 „erhitzt“ wurden. Die durchschnittliche Standardabweichung der A-posteriori-Wahrscheinlichkeit für einzelne Äste in diesen drei Läufen wurde alle 100000 Generationen überprüft, wobei die ersten 50 % der gesammelten Bäume verworfen und nur Äste berücksichtigt wurden, die in mindestens 10 % der Bäume auftraten. Sobald diese Standardabweichung unter 0,01 gesunken war, wurde angenommen, dass die Markovketten annähernde Zufallsstichproben der Bäume gesammelt hatten, und die Analysen angehalten. Aus den gesammelten Bäumen wurden anschließend Konsensusbäume für jeden Datensatz berechnet, wobei wiederum die ersten 50 % der gesammelten Bäume verworfen wurden.

3. Ergebnisse

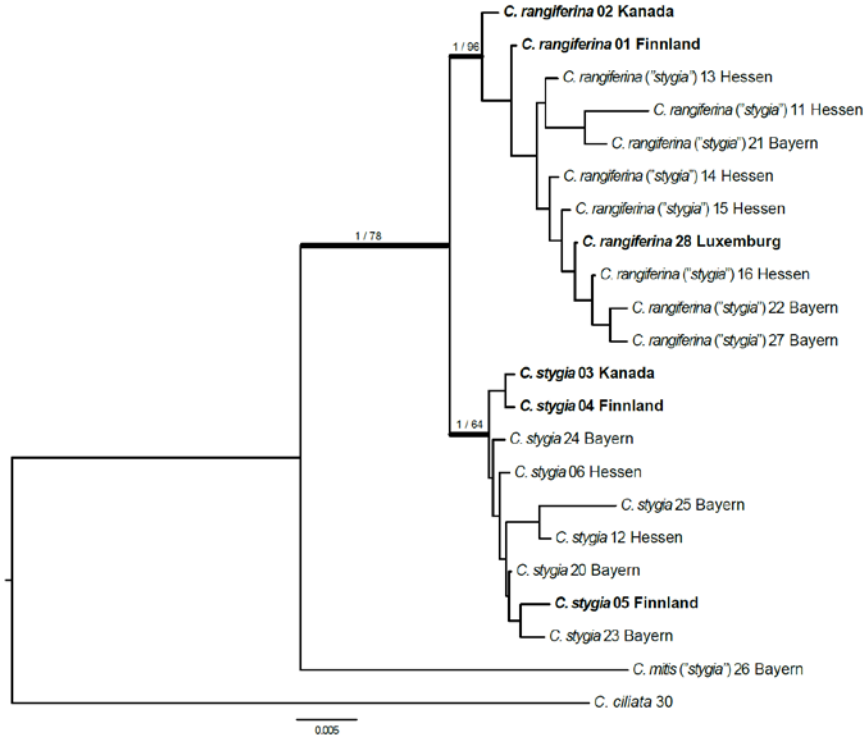


Abb. 3: Konsensus-Stammbaum der Bayes’schen Analyse mit Maximum Likelihood Bootstrapwerten > 60 % und A-posteriori-Wahrscheinlichkeiten > 0.95 oberhalb der Äste. Fett gedruckte Äste werden durch zumindest eine der beiden Analysen gut unterstützt. Referenzmaterial von *Cladonia rangiferina* und *C. stygia* jeweils fett. Ursprüngliche Bestimmung der Belege in Klammern falls abweichend von der phylogenetischen Zuordnung. – Consensus tree of Bayesian analysis with maximum likelihood bootstrap values of > 60% and a-posteriori probabilities of > 0.95 above the branches. Bold branches are at least well supported by one of the two analyzes. Reference material of *Cladonia rangiferina* and *C. stygia* in bold. Original determinations in brackets if from the phylogenetic analyses deviating.

Die Einzelgen-Datensätze bestanden aus:

- 15 Sequenzen und 658 Basenpaare (bp) für cox1,
- 19 Sequenzen und 542 bp für EF-1α,
- 14 Sequenzen und 574 bp für ITS,
- 9 Sequenzen und 889 bp für mrLSU,
- 16 Sequenzen und 734 bp für mrSSU sowie
- 15 Sequenzen und 641 bp für RPB1.

Die 4-, 5- und 6-Gen-Datensätze umfassten jeweils 22 Sequenzen und 2575, 3149 oder 4038 Basenpaare.

Die auf Grundlage der 4-, 5- und 6-Gen-Datensätze errechneten Stammbäume hatten annähernd identische Topologien. Abb. 3 zeigt den 6-Locus-Baum, bei dem sich die Referenzaufsammlungen von *C. rangiferina* und *C. stygia* in zwei verschiedenen, gut unterstützten Gruppen finden. Acht der hessischen Belege, die ursprünglich als *C. stygia* bestimmt worden waren, erscheinen mit einer A-posteriori-Wahrscheinlichkeit von 1,0 und einer Bootstrap-Unterstützung von 96 % in der *C.-rangiferina*-Gruppe. Sechs der untersuchten Exemplare gehören mit ebenfalls hoher Unterstützung zu *C. stygia*. Ein Beleg aus Bayern (*C. stygia* 26) erscheint an einem relativ langen Ast zwischen der Außengruppe und dem Ast, der *C. rangiferina* und *C. stygia* verbindet. Eine BLAST-Suche mit Hilfe der ITS-Sequenz dieses Belegs zeigt, dass die ähnlichste in GenBank befindliche DNS-Sequenz zu *C. mitis* gehört. Eine anschließende mikroskopische Untersuchung der sequenzierten Thalli zeigte, dass die phylogenetisch getrennten Belege sich auch in morphologischen Details unterscheiden.



Abb. 4: Basale Podetien von *C. stygia* (A) und *C. rangiferina* (B). A: Ahti 72074 (H), B: Cezanne-Eichler 7747 (hb. Cezanne-Eichler). – Basal podetias of *C. stygia* (A) and *C. rangiferina* (B).

Basale Teile der Podetien von *C. stygia* besitzen den typischen aschgrauen bis schwarzen Zentralteil (Abb. 4A). Auf diesem dunklen Hintergrund liegen verteilt grünlichweiße Areolen der Rinde, die das Podetium basal gescheckt erscheinen lassen. In dem von uns untersuchten Material waren diese Areolen unregelmäßig geformt und zum Teil fast schuppig. Diese gescheckte Zone kann die gesamte untere Hälfte des Podetiums ausmachen, ist aber gelegentlich auf die untersten Partien beschränkt. Die Basis von *C. rangiferina* (Abb. 4B) erscheint dagegen regelmäßiger dunkel und eher bräunlich als grauschwarz. Allerdings können abgestorbene Teile des Podetiums durchaus auch gescheckt erscheinen.

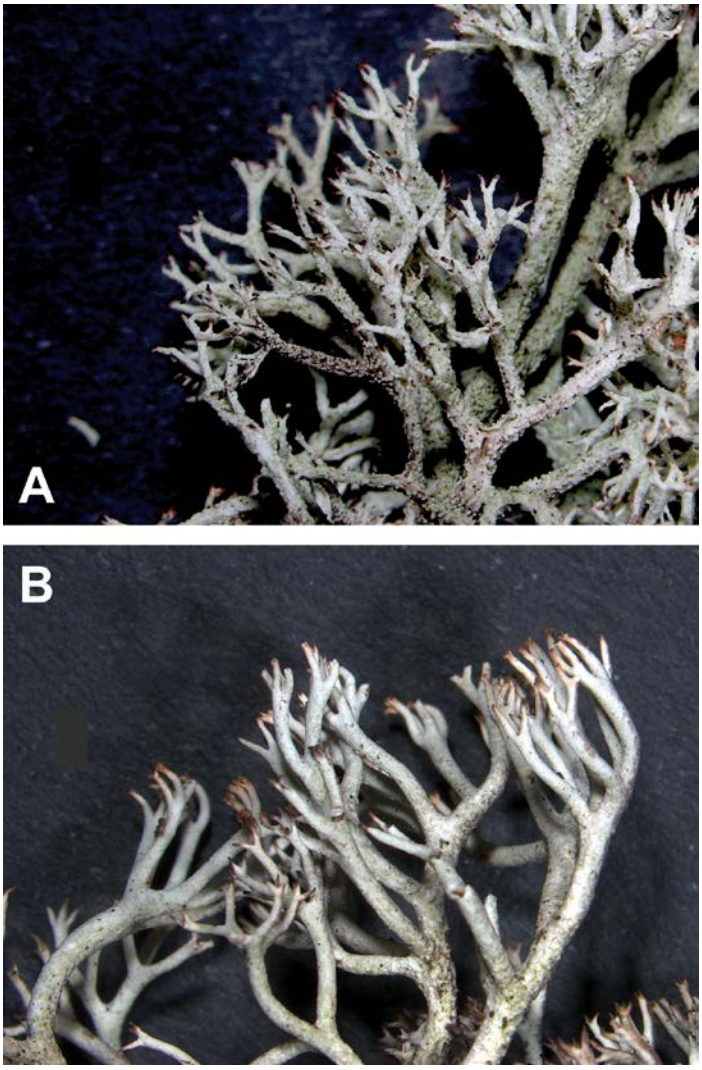


Abb. 5: Terminale Äste der Podetien von *C. stygia* (A) und *C. rangiferina* (B). A: Brackel 6005 (hb. Brackel), B: Cezanne-Eichler 7747 (hb. Cezanne-Eichler). – Podetias' terminal branches of *C. stygia* (A) und *C. rangiferina* (B).

Neben diesen die Basis betreffenden Merkmalen finden sich auch subtile Unterschiede in apikalen Teilen des Podetiums. Die terminalen und subterminalen Verzweigungen von *C. stygia* (Abb. 5A) haben eine relativ raue Oberfläche und erscheinen oft unregelmäßiger gebogen oder verdreht. Die terminalen Ästchen sind meist langgezogen zugespitzt. Die Podetienenden von *C. rangiferina* (Abb. 5B) haben dagegen eine glattere Oberfläche und kürzere, stumpf zugespitzte terminale Äste.

Der phylogenetische Stammbaum und die morphologische Nachuntersuchung zeigen, dass sowohl *C. rangiferina* als auch *C. stygia* in Hessen vorkommen. Für die phylogenetische Analyse stand Material von allen sieben hessischen Lokalitäten zur Verfügung. An zwei der sieben Standorte wurde das Vorkommen der Art bestätigt (Abb. 6), Belege der übrigen fünf Standorte gehören zu *C. rangiferina*.

4. Diskussion

Arten der Flechtengattung *Cladonia* sind berüchtigt für ihre morphologische Variabilität und entsprechend schwer zu bestimmen (Ahti & al. 2013). Morphologische Unterschiede erscheinen in vielen Fällen eher ökologisch als genetisch bedingt zu sein. Dies hat Autoren gerade im 19. und frühen 20. Jahrhundert nicht davon abgehalten, zahlreiche Unterarten, Varietäten und Formen zu beschreiben, was wiederum zu einer fast unentwirrbaren Synonymie geführt hat (siehe beispielsweise Vainio 1887, 1894). Die Unsicherheiten bei der Umschreibung und Bestimmung vieler Sippen sind auch durch molekulargenetische Daten nicht unbedingt geringer geworden. In einigen Fällen erscheinen morphologisch unterschiedene Arten genetisch nicht getrennt zu sein, was die Synonymisierung der entsprechenden Namen nahelegt (Kotelko & Piercey-Normore 2010, Piercey-Normore & al. 2010, Pino-Bodas & al. 2011, 2012b). Andere Studien unterstützen die Unterscheidung phänotypisch ähnlicher Arten (Dolnik & al. 2010, Pino-Bodas & al. 2011). Wieder andere legen nahe, dass es weitere, zurzeit nicht erkannte Sippen gibt (Pino-Bodas & al. 2012a). So fanden Pino-Bodas & al. (2013) in einer molekulargenetischen Analyse der *Cladonia-humilis*-Gruppe monophyletische Linien, die sich weder durch morphologische noch sekundärstoffchemische Merkmale klar abgrenzen ließen und schlugen vor, zur Artabgrenzung innerhalb der Gattung *Cladonia* zukünftig immer auch DNS-Sequenzdaten unterschiedlicher Loci heranzuziehen.

Eine zuverlässige und gezielte Ansprache von Taxa ist insbesondere im Naturschutz notwendig, sei es, weil die Erfassung der Bestandssituation gesetzlich vorgeschrieben ist, oder weil kostenintensive Naturschutzmaßnahmen auf gesicherten Erkenntnissen beruhen sollten. Bei den Flechten trifft der erste Fall nur bei Arten der Untergattung *Cladina* zu, die im Anhang V der FFH-Richtlinie als schützenswert aufgelistet werden. Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass die notorisch schwierige Unterscheidung der Rentierflechten *C. rangiferina* und *C. stygia* mittels molekulargenetischer Daten möglich ist. Die unabhängig bestimmten Referenzbelege beider Arten finden sich zuverlässig in zwei verschiedenen, gut unterstützten Kladen des Stammbaums. Ob dieses Ergebnis auch bei Untersuchung einer größeren Stichprobe standhält, ist ungewiss, aber sehr wahrscheinlich, da das von uns untersuchte Material auch Mittel- und Nordeuropa sowie Nordamerika umfasst. Die morphologische Nachuntersuchung ergab zudem subtile, aber dennoch reproduzierbare Unterschiede zwischen den Angehörigen beider Gruppen.

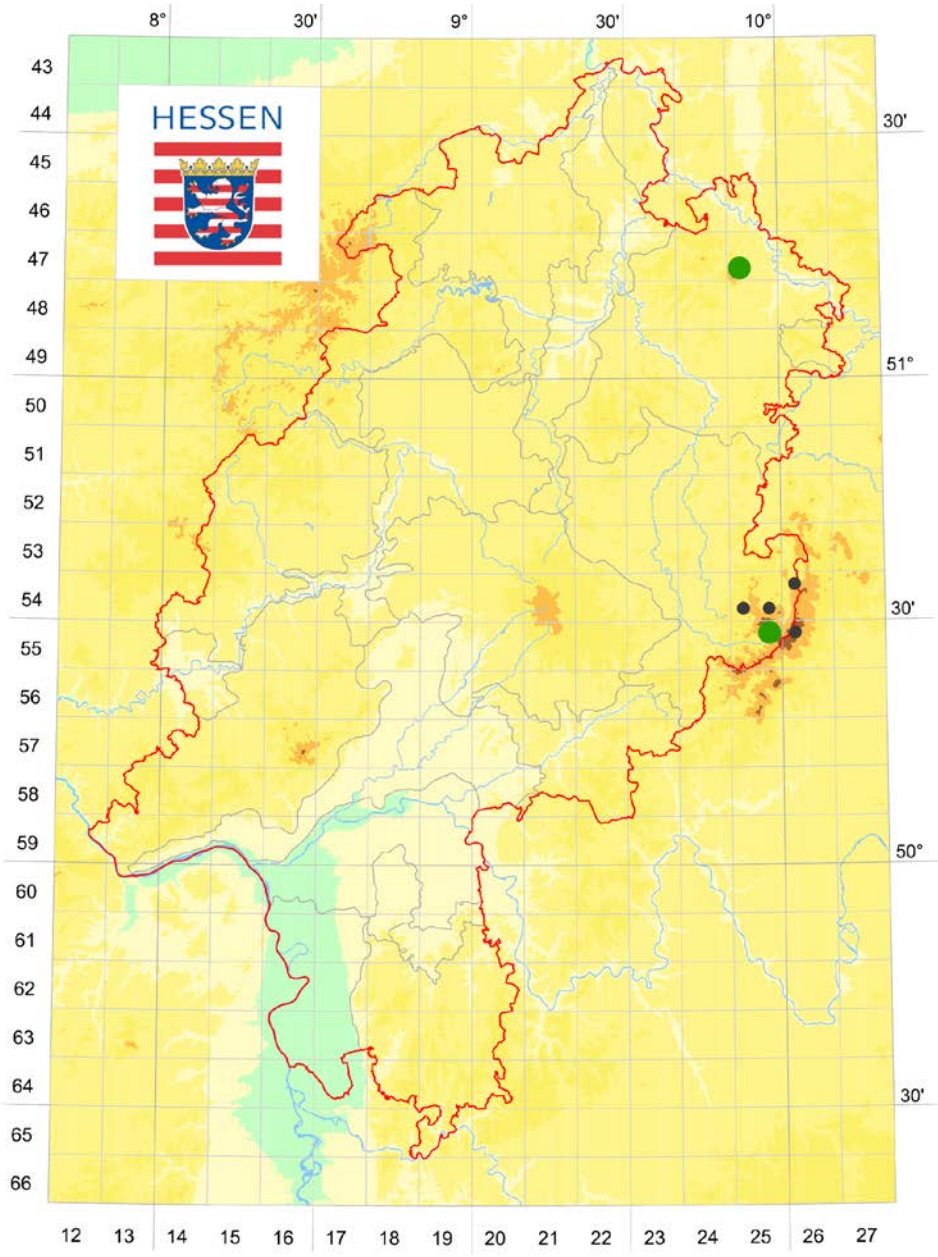


Abb. 6: Vermutete (schwarze Punkte) und mittels DNS-Sequenzdaten verifizierte (grüne Punkte) Verbreitung von *Cladonia stygia* in Hessen. – Presumed (black dots) and verified (by means of DNA sequence data, green dots) records of *C. stygia* in Hesse.

Gesichert ist das Vorkommen von *C. stygia* derzeit nur am Hohen Meißner und im Roten Moor in der Hohen Rhön. An fünf der bisher gemeldeten sieben hessischen Vorkommen von *C. stygia* scheint dagegen nur *C. rangiferina* vorzukommen. Da die hier vorgestellten Ergebnisse nur Aussagen über die wenigen gesammelten Belege erlauben, ist allerdings nicht auszuschließen, dass *C. stygia* hier und an anderen Standorten in kleinen Populationen auftritt. Die vorliegenden Daten beruhen ausnahmslos auf Zufallsfunden in dem einzigen hessischen Moor mit Rentierflechtenvorkommen („Rotes Moor") und in einer montanen Blockhalde am Meißner („Kalbe"). Eine gezielte Nachsuche an ökologisch geeigneten Standorten und eine nach Möglichkeit durch molekulargenetische Daten untermauerte Identifikation der Belege erscheint dringend erforderlich, um den Status von *C. stygia* in Hessen abschließend zu beurteilen.

Dank

Die vorliegende Studie wurde aus Mitteln der Botanischen Vereinigung für Naturschutz in Hessen finanziert. Zusätzliche Mittel stellte das Programm „LOEWE – Landes-Offensive zur Entwicklung Wissenschaftlich-ökonomischer Exzellenz" des Hessischen Ministeriums für Wissenschaft und Kunst zur Verfügung. Beiden Institutionen sei für ihre Unterstützung herzlich gedankt. Den Kuratoren des Herbariums der Universität Helsinki (H) danken wir für die Ausleihe von Referenzmaterial. Für die Erstellung der Verbreitungskarte möchten wir uns bei Sylvain Hodvina (Zwingenberg) bedanken.

5. Literatur

Ahti T. 1984: The status of *Cladina* as a genus segregated from *Cladonia*. – Nova Hedwigia, Beiheft **79**, 25–61, Weinheim.

Ahti T. 2000: *Cladoniaceae*. – Fl. Neotropica Monogr. **78**, 1–362, New York.

Ahti T. & S. Hyvönen 1985: *Cladina stygia*, a common, overlooked species of reindeer lichen. – Ann. Botan. Fenn. **22**, 223–229, Helsinki.

Ahti T., S. Stenroos & R. Moberg 2013: *Cladonia*. In: T. Ahti & al. (Hrsg.): Nordic Lichen Flora **5**, 8–87. – Sommerfield Books, Uppsala.

Altschul S., W. Gish, W. Miller, E. Myers & D. Lipman 1990: Basic local alignment search tool. – J. Mol. Biol. **215**, 403–410, Amsterdam u. a.

Castresana J. 2000: Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. – Mol. Biol. Evol. **17**, 540–552, Oxford u. a.

Cezanne R., M. Eichler, M.-L. Hohmann & D. Teuber 2009: Gutachten zur gesamthessischen Situation der Rentierflechten, Gattung *Cladonia* L. subgenus *Cladina* (Nyl.) Vain., Arten des Anhangs V der FFH-Richtlinie, 2. überarb. Fassung – Hessen-Forst FENA, Gießen, 74 Seiten.

Cezanne R., M. Eichler, M.-L. Hohmann & D. Teuber 2013: Die Situation der Rentierflechten in Hessen. – FENA Skripte **3**, 1–71 und Anhänge, Gießen.

Conti M. E. & G. Cecchetti 2001: Biological monitoring: lichens as bioindicators of air pollution assessment – a review. – Environ. Pollut. **114**, 471–492, Amsterdam u. a.

Dolnik C., A. Beck & D. Zarabska 2010: Distinction of *Cladonia rei* and *C. subulata* based on molecular, chemical and morphological characteristics. – Lichenologist **42**, 373–386, Cambridge.

Elbert W., B. Weber, S. Burrows, J. Steinkamp, B. Büdel, M. O. Andreaea, U. Pöschl 2012: Contribution of cryptogamic covers to the global cycles of carbon and nitrogen. – Nat. Geosci. **5**, 459–462, London.

Gardes M. & T. D. Bruns 1993: ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts. – Mol. Ecol. **2**, 113–118, Oxford u. a.

Hasegawa M., H. Kishino, T. Yano 1985: Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. – J. Mol. Evol. **22**, 160–174, Berlin & Heidelberg.

Hebert P. D., A. Cywinska, S. L. Ball & J. R. deWaard 2003: Biological identifications through DNA barcodes. – Proc. Royal Soc., B, Biolog. Sci. **270**, 313–321, London.

Katoh K., K. Misawa, K. Kuma & T. Miyata 2002: MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. – Nucleic Acids Res. **30**, 3059–3066, Oxford.

Kimura M. 1980: A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. – J. Mol. Evol. **16**, 111–120, Berlin, Heidelberg.

Kotelko R. & M. Piercey-Normore 2010: *Cladonia pyxidata* and *C. pocillum*, genetic evidence to regard them as conspecific. – Mycologia **102**, 534–545, Lawrence, KS.

Lanfear R., B. Calcott, S. Y. W. Ho & S. Guindon 2012: PartitionFinder: Combined Selection of Partitioning Schemes and Substitution Models for Phylogenetic Analyses. – Mol. Biol. Evol. **29**, 1695–1701, Oxford.

Matheny P. B., Y. J. Liu, J. F. Ammirati & B. D. Hall 2002: Using RPB1 sequences to improve phylogenetic inference among mushrooms (*Inocybe*, *Agaricales*). – American J. Bot. **89**, 688–698, Colombus, Ohio.

Piercey-Normore M., T. Ahti & T. Goward 2010: Phylogenetic and haplotype analyses of four segregates within *Cladonia arbuscula* s. l. – Bot. **88**, 397–408, Ottawa.

Pino-Bodas R., A. R. Burgaz & M. P. Martín 2010: Elucidating the taxonomic rank of *Cladonia subulata* versus *C. rei* (*Cladoniaceae*). – Mycotaxon **113**, 311–326, Ithaka.

Pino-Bodas R., A. R. Burgaz, M. P. Martín & H. T. Lumbsch 2011: Phenotypic plasticity and homoplasy complicate species delimitation in the *Cladonia gracilis* group (*Cladoniaceae*, *Ascomycota*). – Organisms, Diversity Evol. **11**, 343–355, Berlin, Heidelberg.

Pino-Bodas R., A. R. Burgaz, M. P. Martín & H. T. Lumbsch 2012a: Species delimitation in the *Cladonia cariosa* group (*Cladoniaceae*, *Ascomycota*). – Lichenologist **44**, 121–135, Cambridge.

Pino-Bodas R., M. P. Martín & A. R. Burgaz 2012b: *Cladonia subturgida* and *C. iberica* (*Cladoniaceaea*) form a single, morphologically and chemically polymorphic species. – Mycological Progress **11**, 269–278, Berlin & Heidelberg.

Pino-Bodas R., T. Ahti, S. Stenroos, M. P. Martín & A. R. Burgaz 2013: Multilocus approach to species recognition in the *Cladonia humilis* complex (*Cladoniaceae*, *Ascomycota*). – American J. Bot. **100**, 664–678, Columbus/Ohio.

Printzen C. 2002: Fungal specific primers for PCR-amplification of mitochondrial LSU in lichens. – Molec. Ecol. Notes **2**, 130–132, Hoboken/NJ u. a.

Printzen C. & S. Ekman 2003: Local population subdivision in the lichen *Cladonia subcervicornis* as revealed by mitochondrial cytochrome oxidase subunit 1 intron sequences. – Mycologia **95**, 399–406.

Richtlinie 92/43/EWG des Rates vom 21. Mai 1992 zur Erhaltung der natürlichen Lebensräume sowie der wildlebenden Tiere und Pflanzen. – Amtsbl. **L 206** 22/07/1992, 7–50, Brüssel.

Ronquist F., M. Teslenko, P. van der Mark, D. Ayres, A. Darling, S. Höhna, B. Larget, L. Liu, M. A. Suchard & J. P. Huelsenbeck 2012: MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. – System. Biol. **61**, 539–542, Oxford.

Rose F 1976: Lichenological indicators of age and environmental continuity in woodlands. In: Brown D. H., D. L. Hawksworth & R. H. Bailey (Hrsg.): Lichenology: Progress and Problems, 279–307. – Academic Press, London.

Ruoss E. 1985: Die Rentierflechte *Cladonia stygia* in den Alpen. – Bot. Helvet. **95**, 239–245, Basel.

Schoch C. L., K. A. Seifert, S. Huhndorf V. Robert, J. L. Spouge, C. A. Levesque, W. Chen & Fungal Barcoding Consortium 2012: Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. – PNAS **109**, 6241–6246, Washington.

Schöller H 1997: Anthropogene Lebensraumgestaltung und Biodiversität von Flechten. – Kleine Senckenberg-Reihe **27**, 157–166, Frankfurt am Main.

Silvestro D. & I. Michalak 2011: RaxmlGUI: A graphical front-end for RAxML. – Organisms Diversity Evol. **12**, 335–337, Berlin, Heidelberg.

Stiller J. W. & B. D. Hall 1997: The origin of red algae: Implications for plastid evolution. – PNAS **94**, 4520–4525, Washington.

Vainio E. A. 1887: Monographia Cladoniarum universalis. I. – Acta Societatis pro Fauna et Flora Fennica **4**, 1–509, Helsinki.

Vainio E. A. 1894: Monographia Cladoniarum universalis. II. – Acta Societatis pro Fauna et Flora Fennica **10**, 1–499, Helsinki.

Van Herk C. M., A. Aptroot, H. F. van Dobben 2002: Long-term monitoring in the Netherlands suggests that lichens respond to global warming. – Lichenologist **34**, 141–154, Cambridge.

White T. J., T. Bruns, S. Lee & J. W. Taylor 1990: Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky & T. J. White (Hrsg.): PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, 315–322. – Academic Press, New York.

Wirth V., M. Hauck, & M. Schultz 2013: Die Flechten Deutschlands **1** & **2**. – Eugen Ulmer, Stuttgart. **1**(1–672), **2**(677–1244).

Wirth V., M. Hauck, W. von Brackel, R. Cezanne, U. de Bryun, O. Dürhammer, M. Eichler, A. Gnüchtel, V. John, B. Litterski, V. Otte, U. Schiefelbein, P. Scholz, M. Schultz, R. Stordeur, T. Feuerer, T. & D. Heinrich 2011: Rote Liste und Artenverzeichnis der Flechten und flechtenbewohnenden Pilze Deutschlands. – Natursch. Biolog. Vielfalt **70(6)**, 7–122, Bonn.

Yahr R., R. Vilgalys & P. T. DePriest 2006: Geographic variation in algal partners of *Cladonia subtenuis* (*Cladoniaceae*) highlights the dynamic nature of a lichen symbiosis. – New Phytologist **171**, 847–860, Hoboken/NJ u. a.

Zhou S. & G. R. Stanosz 2001: Primers for amplification of mt SSU rDNA, and a phylogenetic study of *Botryosphaeria* and associated anamorphic fungi. – Mycologiacl Res. **105**, 1033–1044, Amsterdam u. a.

Zoller S., C. Scheidegger & C. Sperisen 1999: PCR primers for the amplification of mitochondrial small subunit ribosomal DNA of lichen-forming ascomycetes. – Lichenologist **31**, 511–516, Cambridge.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Botanik und Naturschutz in Hessen

Jahr/Year: 2015

Band/Volume: 28

Autor(en)/Author(s): Kanz Birgit, Brackel Wolfgang von, Cezanne Rainer, Eichler Marion, Hohmann Marie-Luise, Teuber Dietmar

Artikel/Article: Molekulargenetische Untersuchung zum Vorkommen der Rentierflechte Cladonia stygia in Hessen 5-20