

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Biología Vegetal II



**VARIABILIDAD GENÉTICA, ESPECIES CRÍPTICAS Y
FILOGENIA MOLECULAR EN HONGOS LIQUENIZADOS
DEL GÉNERO *PARMELINA* (PARMELIACEAE,
ASCOMYCOTA)**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Jano Alex Núñez Zapata

Bajo la dirección de las doctoras

Ana María Crespo de las Casas
Paloma Cubas

MADRID, 2013



**Variabilidad genética, especies crípticas y filogenia
molecular en hongos liquenizados del género
Parmelina (Parmeliaceae, Ascomycota)**

Jano Alex Núñez Zapata

Tesis Doctoral

Madrid, 2013

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

**Facultad de Farmacia
Departamento de Biología Vegetal II**



Tesis Doctoral

**Variabilidad genética, especies crípticas y filogenia molecular en
hongos liquenizados del género *Parmelina* (Parmeliaceae,
Ascomycota)**

**Cryptic species, genetic variability and molecular phylogeny in
the lichen-forming fungal genus *Parmelina* (Parmeliaceae,
Ascomycota)**

Memoria presentada por el licenciado

Jano Alex Núñez Zapata

Para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid

Directores:

Ana María Crespo de las Casas
Catedrática
Departamento de Biología Vegetal II
Facultad de Farmacia
Universidad Complutense de Madrid

Paloma Cubas
Profesora Titular
Departamento de Biología Vegetal II
Facultad de Farmacia
Universidad Complutense de Madrid

Madrid, 2013

Doña ANA MARÍA CRESPO DE LAS CASAS, catedrática del Departamento de Biología Vegetal II (Universidad Complutense de Madrid), y doña PALOMA CUBAS, profesora titular del Departamento de Biología Vegetal II (Universidad Complutense de Madrid), informan:

Que el licenciado en Biología, don JANO ALEX NÚÑEZ ZAPATA, ha realizado bajo su dirección la tesis titulada: *Variabilidad genética, especies crípticas y filogenia en hongos liquenizados del género Parmelina (Parmeliaceae, Ascomycota)*, y la presenta en el departamento de Biología Vegetal II de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid para optar al grado de Doctor en Farmacia con mención de Doctorado Europeo, y autorizan su presentación para ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste y a los efectos oportunos, firman el presente informe en Madrid a 13 de mayo de 2013.

VºBº Directora de Tesis

Dra. ANA M. CRESPO DE LAS CASAS

VºBº Directora de Tesis

Dra. PALOMA CUBAS

Esta tesis doctoral ha sido desarrollada en el Departamento de Biología Vegetal II de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, gracias a una Beca Predoctoral para la Formación de Personal Investigador (FPI) BES–2008–003309 asociada al proyecto CGL2007 – 64652, y financiada por el Ministerio de Ciencia e Innovación del Gobierno de España.

Este mismo programa financió dos estancias breves en el extranjero:

- Università degli Studi di Trieste, Trieste, Italia.
- Biodiversität und Klima Forschungszentrum (BIK-F), Frankfurt am Main, Alemania.

A mis padres, Tomás e Hilda

A María José y Paula;

Hubert, Clara, Liz, Susy, Olivia, Josué y Jazmín

A mi abuela, Estelita

Agradecimientos

*Doy gracias a Dios
Que me ha guiado por este buen camino
Que ha puesto en él a maravillosas personas
Que me ha ayudado a llegar al final*

A España, y en ella a todas aquellas personas que he conocido en todo este tiempo, que me han dado más que todo alegrías, y que me han permitido crecer no sólo en el ámbito académico, sino también en lo cultural, en lo social, en lo personal. A todos ellos muchas gracias.

De personas y nombres, el primero es para Ana Crespo, quien me dio la oportunidad y la confianza, además de su apoyo en todo este tiempo; a Paloma Cubas, quien siempre me anduvo empujando para llegar a la meta; a Magdalena Pavlich quien me marcó el rumbo de este camino y a Pradeep Divakar, por su apoyo, ayuda y enseñanza constante.

A mis colegas becarios (hoy doctores) y no becarios: Tino, Ruth, Sergio, Billy, Guillermo, Zuzana, Beatriz Roca, Mercedes, Pepe, Elena, Beatriz Vilches, Ana Lumbreras, Ana Sanchez, Clara, Alba, Alicia, Jovi, Celia, David y Carlos con quienes compartimos trabajo, comidas, cañas; a los colegas del departamento de Biología Vegetal II y de Edafología, con quienes intercambiamos más que todo agradables momentos de tertulia; al personal de la Unidad de Genómica de la UCM, y por supuesto a Luisi.

A Mauro Tretiach, Paola Crisafulli, Stefano Bertuzzi, Fabio Candotto, Teresa Cragheiro y Elena con quienes compartí gratos momentos en mi estancia en Trieste; y de la misma forma a Imke Schmitt, Miki Balint, Anna Sadowska, Jurgen Otte, Fernando Fernández, Pamela Rodríguez y demás colegas de BiK-Frankfurt.

A todas aquellas personas que me han enviado líquenes “frescos” para hacer mis estudios, entre ellos Louise Lindblom, Camille Truong, Harry Sipman, Alejandro Quintanar, W. v Brachel, Mehmet Candan, Mats Wedin, P. R. Nelson y Paula Matos.

También a grandes amigos que me han abierto la puerta de sus casas y sus corazones: Javier, Helga y Nataly; Jennifer, Jessica, Vere, Javi y doña Carmen; Héctor y Teresa, y sus hijos Héctor, Martín, José y Miguel, Jimena y Matías.

A mis tíos y primos de Madrid: Miguel, Billy, Mariluz, Jordi, Buba, Ronald, Marlene, Fiorella y Fernando, Jaime, Kevin. A los amigos del club América y demás personas de Latinoamérica que han hecho de Madrid parte de sus vidas.

A María José, por su apoyo y aliento en esta última fase, por su comprensión, por aguantarme y aliviar mis momentos de penumbra y caos. A sus padres, Ángel y María José por su apoyo incondicional, y también a Ángel, Pico, Chema y Almudena.

Y en especial a mi familia por su constante apoyo a pesar de la distancia, por su comprensión y ayuda, han sido un gran motor en esta empresa.

¡Muchas gracias a todos por haber dibujado una sonrisa en mi rostro!

INDICE

ABSTRACT	01
INTRODUCCIÓN GENERAL/GENERAL INTRODUCTION.....	16
Antecedentes	17
El género <i>Parmelina</i>	20
Delimitación de las especies en líquenes	24
Filogeografía y genética de poblaciones en hongos liquenizados	26
Planteamiento de la investigación e hipótesis	28
Justificación de la investigación	29
OBJETIVOS/AIMS.....	31
METODOLOGÍAS COMUNES A LOS ESTUDIOS REALIZADOS/GENERAL	
METHODS.....	34
Material biológico	35
Extracción de ADN	35
Amplificación de regiones de ADN	36
Secuenciación y edición de secuencias de ADN	38
CAPÍTULO I/CHAPTER I.	
ESPECIES CRÍPTICAS DENTRO DEL GÉNERO <i>Parmelina</i> / CRYPTIC SPECIES WITHIN <i>Parmelina</i> GENUS	39
1.1 Abstract	40
1.2 Introducción	40
1.3 Material y métodos	42
Muestreo de ejemplares	42
Extracción de secuencias, amplificación y alineamiento de secuencias	42

Análisis filogenéticos: máxima parsimonia, análisis bayesiano	42
Test de Hipótesis: SH y ELW	45
Distancias genéticas	46
Análisis morfológico y químico.....	46
1.4 Resultados.....	47
Análisis filogenéticos.....	47
Distancias genéticas.....	51
Morfología y química.....	51
Taxonomía: descripción de <i>P. cryptotiliacea</i> sp. nov. y epitipificación de <i>P. tiliacea</i>	52
1.5 Discusión.....	55
[Conundrums in species concepts: the discovery of a new cryptic species segregated from <i>Parmelina tiliacea</i> (Ascomycota: Parmeliaceae)]	

CAPÍTULO II/CHAPTER II

DIVERSIFICACIÓN GENÉTICA DE <i>P. tiliacea</i> Y <i>P. pastillifera</i> Y SU RELACIÓN CON LAS VARIABLES AMBIENTALES / GENETIC DIVERSIFICATION AND CLIMATIC PREFERENCES OF EUROPEAN POPULATIONS OF THE LICHENIZED FUNGI <i>Parmelina</i> <i>tiliacea</i> AND <i>P. pastillifera</i>	58
2.1 Abstract.....	59
2.2 Introducción.....	59
2.3 Material y métodos.....	62
Muestreo y recolección de ejemplares.....	62
Extracción y amplificación de ADN.....	62
Alineamientos de secuencias, análisis de polimorfismos y eventos de recombinación.....	63

Árbol filogenético bayesiano y redes de haplotipos con SplitsTree.....	63
Análisis de la estructura poblacional mediante AMOVA, y métodos de agrupamiento (<i>clustering</i>) con Structure, Geneland y BAPS.....	69
Modelización de requerimientos ecológicos: PCA y MaxEnt.....	73
Partición de la varianza entre factores climáticos y geográficos.....	74
2.4 Resultados.....	75
Diversidad nucleotídica y molecular.....	75
Árbol filogenético y redes de haplotipos.....	80
Estructura de las poblaciones: AMOVA y clustering.....	82
Modelamiento de los requerimientos ecológicos.....	91
Partición de la varianza entre factores climáticos y geográficos.....	94
2.5 Discusión.....	95
Diferenciación genética de <i>Parmelina tiliacea</i>	95
Variables bioclimáticas y diferenciación de haplotipos.....	96
Factores pasados del modelamiento.....	97
Origen de <i>P. pastillifera</i> a partir de <i>P. tiliacea</i>	98

[Genetic diversification and climatic preferences of European populations of the lichenized fungi *Parmelina tiliacea* and *P. pastillifera*]

CAPITULO III/CHAPTER III

FILOGENIA, HISTORIA EVOLUTIVA Y BIOGEOGRAFÍA DEL GÉNERO <i>Parmelina</i> /PHYLOGENY, EVOLUTIONARY HISTORY AND BIOGEOGRAPHY OF <i>Parmelina</i> GENUS.....	100
3.1 Abstract.....	101
3.2 Introducción.....	101

3.3 Material y métodos.....	103
Material de estudio.....	103
Extracción y amplificación de regiones de ADN.....	105
Análisis filogenéticos: análisis bayesiano y máxima verosimilitud.....	105
Análisis de datación con BEAST usando puntos de calibración y tasas de sustitución de ITS.....	107
Reconstrucción del área ancestral con S-DIVA, Lagrange y Simmap.....	108
3.4 Resultados.....	110
Filogenia.....	111
Datación de los nodos de divergencia de <i>Parmelina</i>	114
Áreas geográficas ancestrales de <i>Parmelina</i> y <i>Myelochroa</i>	119
3.5 Discusión.....	121
Relaciones filogenéticas.....	121
Parafilia de <i>P. tiliacea</i> y <i>P. atricha</i>	123
Datación.....	124
Biogeografía histórica.....	125
CAPITULO IV. SISTEMÁTICA DEL GÉNERO <i>Parmelina</i> BASADA EN CARACTERES MORFOLÓGICOS Y QUÍMICOS / SYSTEMATICS OF <i>Parmelina</i> GENUS BASED ON MORPHOLOGICAL AND CHEMICAL CHARACTERS.....	127
4.1 Abstract.....	128
4.2 Introducción.....	128
4.3 Material y métodos.....	129
4.4 Resultados.....	130
Caracteres diferenciales entre <i>Parmelina</i> y <i>Myelochroa</i>	130

Diferenciación morfológica entre las especies de <i>Parmelina</i>	136
Clave taxonómica y descripción de las especies de <i>Parmelina</i>	139
4.5 Discusión.....	149
DISCUSIÓN GENERAL/GENERAL DISCUSSION.....	151
CONCLUSIONES/CONCLUSIONS.....	159
BIBLIOGRAFÍA/LITERATURE CITED.....	162
APÉNDICE/APPENDIX.....	190

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

La numeración de las tablas y figuras siguen el orden correlativo de la versión en español. Las tablas y figuras de la versión en inglés de los capítulos I y II siguen un orden independiente.

Tables and figures are numbered in sequential order in the Spanish version through all the chapters. Those of the English version of Chapters I and II are independently numbered.

INDICE DE TABLAS

METODOLOGÍAS COMUNES A LOS ESTUDIOS REALIZADOS

Tabla 1. Componentes utilizados para la amplificación de fragmentos de ADN. 36

Tabla 2. Programas de amplificación de las regiones ITS, nuLSU, mtSSU, EFA y mtLSU. 37

CAPÍTULO I

Tabla 3. Especímenes incluidos en el análisis filogenético. 43

Tabla 4. Distancias genéticas entre haplotipos ITS de los clados A y B de *P. tiliacea*. 51

CAPÍTULO II

Tabla 5. Información de localidad, número de individuos, códigos de herbario y del Genbank. 65

Tabla 6. Códigos de haplotipos utilizados para el análisis en Structure. 70

Tabla 7. Análisis estadístico de los marcadores nuITS, mtLSU y EFA. 76

Tabla 8. Estimaciones de los parámetros de variación genética, por localidad, y gen, de *P. tiliacea* y *P. pastillifera*. 77

Tabla 9. Análisis jerárquico de la varianza molecular (AMOVA) de poblaciones del clado *Parmelina tiliacea*-*P. pastillifera*. 83

Tabla 10. Estimaciones del valor de K siguiendo el método Evanno. 83

Tabla 11. Lista de las 10 iteraciones con mayores valores ln para K según el programa Geneland.	84
Tabla 12. Lista de las 10 iteraciones con mayores valores ln para K según el programa BAPS.	84
Tabla 13. Análisis AMOVA de los 4 clusters inferidos por Structure.	86
Tabla 14. Distancias genéticas entre los cuatro clusters inferidos por Structure, utilizando valores F_{st} .	86
Tabla 15. Proporción de pertenencia de cada localidad a los 4 <i>clusters</i> .	87
Tabla 16. Contribución relativa de las 5 principales variables bioclimáticas en el modelo de predicción MaxEnt para <i>Parmelina tiliacea</i> y <i>P. pastillifera</i> .	91
Tabla 17. Análisis particionado de la varianza entre clima y geografía.	94

CAPÍTULO III.

Tabla 18. Especímenes de <i>Parmelina</i> y <i>Myelochroa</i> incluidos en los análisis genéticos.	104
Tabla 19. Variabilidad genética de los marcadores utilizados.	110
Tabla 20. Edad media y rango de los puntos de divergencia estimados para el género <i>Parmelina</i> y <i>Myelochroa</i> .	114
Tabla 21. Edades estimadas y tasas de sustitución de los nodos de divergencia en el clado <i>Parmelina</i> .	117
Tabla 22. Probabilidad del área ancestral de <i>Parmelina</i> y <i>Myelochroa</i> según SIMMAP.	121

CAPÍTULO IV

Tabla 23. Características geográficas, morfológicas y químicas de especies de	
---	--

<i>Myelochroa</i> y <i>Parmelina</i> .	132
--	-----

INDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN

Figura 1. Árbol filogenético de la familia Parmeliaceae.	19
Figura 2. Arbol filogenético del clado <i>Parmelina</i> .	21
Figura 3. Especies del género <i>Parmelina</i> .	23
Figura 4. Variación morfológica de los isidios de <i>P. tiliacea</i> .	23

CAPÍTULO I

Figura 5. Árbol consenso 50% <i>majority-rule</i> de la región ITS de especies del género <i>Parmelina</i> .	48
Figura 6. Árbol consenso 50% <i>majority-rule</i> de la región mtLSU de especies del género <i>Parmelina</i> .	49
Figura 7. Árbol consenso 50% <i>majority-rule</i> de la matriz combinada de ITS y mtLSU de especies del género <i>Parmelina</i> .	50
Figura 8. Comparaciones anatómicas del ascocarpo de <i>P. cryptotiliacea</i> y <i>P. tiliacea</i> .	52
Figura 9. <i>Parmelina cryptotiliacea</i> (MAF-Lich 16454, holotipo).	54
Figura 10. <i>Parmelina tiliacea</i> (MAF-Lich 16485, epítipo).	55

CAPÍTULO II

Figura 11. Árbol consenso de matriz combinada de los haplotipos de <i>P. tiliacea</i> .	81
Figura 12. Redes de haplotipos de <i>P. tiliacea</i> y <i>P. pastillifera</i> .	82
Figura 13. Árbol NJ entre los <i>clusters</i> inferidos por el programa BAPS.	85

Figura 14. Número de grupos (K) y sus límites geográficos según Geneland.	86
Figura 15. Distribución geográfica de los cuatro grupos de haplotipos inferidos por Structure.	90
Figura 16. Modelos predictivos de condiciones ambientales adecuadas para <i>Parmelina tiliacea</i> y <i>P. pastillifera</i> según el programa Maxent.	92
Figura 17. Probabilidad de presencia de acuerdo a las principales variables ambientales para <i>P. tiliacea</i> y <i>P. pastillifera</i> según el modelo de Maxent.	93

CAPÍTULO III

Figura 18. Árbol consenso de la matriz combinada de <i>Parmelina</i> y <i>Myelochroa</i> .	111
Figura 19. Árbol filogenético de <i>Parmelina</i> .	113
Figura 20. Estimación de las edades de separación de parmelioides.	115
Figura 21. Comparación de los rangos y edades estimados para el clado <i>Parmelina</i> .	116
Figura 22. Cronograma de <i>Parmelina</i> usando la tasa de sustitución del ITS.	118
Figura 23. Áreas ancestrales de <i>Parmelina</i> y <i>Myelochroa</i> .	120

CAPÍTULO IV

Figura 24. Ascósporas de las especies de <i>Parmelina</i> .	137
Figura 25. Diagrama comparativos de la longitud y ancho de las esporas de las especies de <i>Parmelina</i> y <i>Myelochroa</i> .	138

ABSTRACT

Genetic variability cryptic species and molecular phylogeny in the lichen-forming fungal genus *Parmelina* (Parmeliaceae, Ascomycota)

ABSTRACT

Introduction

Recognition of species in different groups of lichens has been delimited under the morphological species concept (MSC), in which macro and micro characters are compared with those of differentiated species. However, recent studies show that these characters may not be sufficient to delimit species, especially in species with a wide distribution range. An alternative is the phylogenetic species concept (PSC), in which the species are separated on the basis of differences between target DNA sequences. Under this new assumption, two taxa may be recognized as different species if they appear in different clades in a phylogenetic species tree, even though the external morphology or chemistry is similar. This has allowed the recognition of “cryptic species”, which is defined as “organisms that appear identical but are genetically quite distinct”. Due to their similar morphology they have previously been recognized as a single species. Moreover, molecular techniques have revolutionized the species concept and increased the number of species in lichen-forming fungi and in other organisms in general. Molecular phylogenetic trees have not only been useful for delimiting or separating taxa, but also for establishing the phylogenetic relationships between them. When all their internal branches have statistical support, molecular trees give us the opportunity to trace the evolutionary history of a lineage, although more tools are needed to testing a variety of evolutionary hypotheses. However, one of the disadvantages of this method is the assumption of the bipartition of nodes as the only evolutionary process, which undervalues potential cross-linked speciation events. Nevertheless, this method currently represents the best available model for inferring the evolutionary history of a family or genus. In lichens, phylogenetic relationships have been studied mainly in mycobionts, either by isolation of cultures or using primers specific to fungi. One of the groups in which these studies have been emphasized is the family Parmeliaceae (Lecanoramycetes, Ascomycota), which

comprises more than 80 genera and 2700 species. Delimitation of its lineages has been explored, especially in one of its larger groups: the parmelioids.

Parmelioid lichens have mostly foliose, dorsiventral thalli, usually with rhizines on the lower surface, laminal pycnidia and apothecia, *Lecanora*-type asci and simple hyaline ascospores. On the basis of the polymorphic variability of four molecular markers, eight major clades have been identified within this group: Parmotrema, Xanthoparmelia, Cetrelia, Parmelina, Hypotrachyna, Parmeliopsis, Parmelia and Melanohalea. These names are associated with the main genera, although other small lineages are also included. Molecular phylogenies have recently been complemented by paleontological and geological data in developing hypotheses about the evolutionary history of the group. These studies have shown that parmelioid lineages diversified during the globally changing climatic conditions of the early Oligocene, Miocene, and early Pliocene.

All these advances and tools raise new questions about evolutionary events in lichens – including speciation processes – which could be better understood by studying lower levels, within a genus and even within a species. One of the parmelioid lichen groups that is well represented in the Iberian Peninsula and Europe is the genus *Parmelina*. The small number of species with a known distribution makes it an ideal group for studies of genetic differentiation at three levels: as a genus, between species, and at the population level.

The genus belongs to the Parmelina clade, giving the clade its name, and is grouped with the genera *Myelochroa*, *Bulbothrix*, *Parmelinella* and *Remototrachyna*. Species in the Parmelina clade have isolichenan in the cell walls, a pored epicortex, lack pseudocyphellae, and contain atranorin or usnic acid as cortical compounds.

Parmelina is a monophyletic genus of parmelioid lichens comprising seven species (as recognized at the beginning of this study), and is mainly distributed in Europe, North of Africa, Middle East, India and western North America. Similar morphological genera are *Myelochroa*, which differs mainly in its chemistry and geographical distribution, and *Austroparmelina*, which also has a different geographical distribution (Australia and Africa) and some morphological differences in ascoma anatomy and ascospore

size. *Austroparmelina* is phylogenetically distant from *Parmelina* and belongs to another parmelioid clade (the Parmotrema clade). The genus *Parmelina* was described by Hale (1974) as a segregate of *Parmelia sensu lato* to accommodate species with a gray-colored upper surface, narrow lobes, an upper surface maculate or not, a pored epicortex, a black lower surface, rare marginal cilia, simple rhizines, adnate apothecia, some species with isidia but not soredia, and hyaline and simple spores.

At the beginning of the present study, *Parmelina* comprised seven species distributed in the temperate regions of the Northern Hemisphere. *Parmelina coleae* was the only species restricted to North America, *P. gyrophorica* is known only from southern China, and five other species occur in Western Europe, with three of them extending to Asia (*P. quercina*, *P. tiliacea* and *P. pastillifera*). Three of the five species always have apothecia: *P. quercina*, *P. carporrhizans*, and *P. atricha*. *Parmelina tiliacea* and *P. pastillifera*, characterized by the presence of isidia, are frequently sterile, although individuals with apothecia are not unusual, especially in *P. tiliacea*.

In order to study the genetic variability between species, the genus *Parmelina* has been selected because of its small number of species and the clear morphological differences that exist between species. Additionally, genetic variability within a species – in this case *P. tiliacea* – has been explored on the basis of collections in different localities across its distributional range. With this purpose, the aims of the present study were to evaluate the phylogenetic species concept, identify the molecular differentiation between species, and elucidate the process of speciation.

Aims

The main objectives of this thesis are:

- To assess the diversity of species in the genus *Parmelina*, based on a combined examination of morphological, ecological and molecular features, and to establish the characters that discriminate it from other morphologically similar genera such as *Myelochroa*;

- To illustrate the genetic variability of *Parmelina* species, taking *P. tiliacea* as a model, determine its genetic structure and the degree of differentiation of their genetic populations;
- To elucidate the monophyly of the genus, determine the phylogenetic relationships among species of *Parmelina*, and evaluate the monophyletic status of each currently known species in the genus; and
- To sketch the evolutionary history of *Parmelina*, based on the molecular phylogeny, estimating divergence time events, inferring ancestral areas and migratory events that gave rise to the different lineages.

Methods

Data assembly- More than 1200 nuclear and mitochondrial ribosomal DNA sequences were included in the present study. Most of them (approximately 1150) were included in the population study of *P. tiliacea* and *P. pastillifera*, and the rest were included in phylogenetic analyses of the *Parmelina* and *Myelochroa* clades, in which other Parmelioid lichen sequences were included. For the *P. tiliacea* population study, sequences were obtained from fresh material collected at 43 localities in Europe, 6 localities in North Africa and 7 localities in the Canary Islands. Samples of *P. pastillifera* from 12 localities of different areas of Europe were also included. Samples of other *Parmelina* species were collected in North America and Europe, whereas samples of *Myelochroa* were mainly collected in Japan. Materials lodged in MAF Herbarium were also included in this study.

Small fragments of vegetative thallus from fresh or frozen herbarium specimens were ground with sterile glass pestles. Total DNA was extracted using the DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Barcelona) according to the manufacturer's instructions. Double-stranded DNA was amplified from five regions: ITS (Internal Transcribed Spacer), nuLSU (nuclear Large Subunit), mtLSU (mitochondrial Large Subunit), mtSSU (mitochondrial Small Subunit) and EFA (Factor Elongation 1- α). Amplification was done in an automatic thermocycler (Techne Progene) using the appropriate parameters for each region. PCR products were cleaned and sent to the Unidad de Genómica (Parque Científico de

Madrid) to obtain sequences fragments, which were assembled and manually adjusted in BioEdit 7.0.9.0 and SeqMan 4.03 (DNASStar). Sequence identity was confirmed using the 'megaBLAST' search function in GenBank. Alignments were performed using the Clustal W Multiple Alignment, Muscle, or MAFFT programs. The program Gblocks v0.91b was used to remove regions of alignment uncertainty, using options for a "less stringent" selection on the Gblocks web server (http://molevol.cmima.csic.es/castresana/Gblocks_server.html). For each data matrix, the RDP3 and DNASP 5 programs were used to detect recombination events and estimate molecular diversity indices, respectively.

Molecular phylogenetic analyses- Separate and concatenated data matrices were analyzed using Maximum Parsimony (MP), Maximum Likelihood (ML) and Bayesian inference (B/MCMC) methods. Two different matrices were derived. The first included regions of ITS, nuLSU and mtSSU of *Parmelina* and *Myelochroa* species; the second contained the regions of ITS, mtLSU and EFA solely of *Parmelina* species. The heterogeneity of phylogenetic signals in the different datasets was examined by the ML and Bayesian approaches. The level of bootstrap support and posterior probabilities were used to detect significance levels of localized incongruence among different gene partitions. The set of topologies $\geq 75\%$ bootstrap under ML and the 0.95 posterior probabilities for the Bayesian approach were estimated. If no conflict was evident, it was assumed that the data sets were congruent and could be combined.

Maximum Parsimony analyses were carried out using PAUP* 4.0b10 performed at www.bioportal.uio.no, with equally weighted characters and gaps being interpreted as missing data. A nonparametric bootstrap method was used to assess the robustness of clades. Bootstrapping was performed using 4000 pseudoreplicates with random sequence additions.

ML analyses were done using an online version of the program RaxML v.7.2.7, as implemented at the CIPRES Science Gateway (<http://phylo.org>). The GTRGAMMA model was used, which includes a parameter (Γ) for rate heterogeneity among sites. We chose not to include a parameter for estimating the proportion of invariable sites. Support values were assessed using the 'rapid bootstrapping' option with 1000

replicates. For combined datasets, the ML analyses were conducted using locus-specific model partitions in RAxML v7.2.7. All loci were treated as separate partitions. Search parameters and assessment of nodal support were performed as described above.

Separate and concatenated datasets were also analyzed by a Bayesian inference method, as implemented in MrBayes v3.1.2. Analyses assumed models of nucleotide substitution estimated by jModelTest v0.1 to each region of DNA using the AIC criterion. The Metropolis-coupled Markov chain Monte Carlo (MC³) method consisted of two independent runs of 5 million generations, starting with a random tree and employing 8 simultaneous chains each, in which one every 1000 trees was sampled. The outputs of MrBayes were examined with Tracer v1.5 to check for convergence of parameters. Posterior probabilities of clades were obtained on the basis of the 50% majority rule consensus of sampled trees after excluding the initial 10% as burn-in. Majority rule consensus trees were drawn using the FigTree program.

Hypothesis testing- To corroborate the differentiation of *P. cryptotiliacea* as a distinct lineage of *P. tiliacea*, we compared the ML tree constrained to have *P. tiliacea* and *P. cryptotiliacea* as a monophyletic clade, and the unconstrained ML tree. The Shimodaira–Hasegawa test (SH) and the expected likelihood weight (ELW) test, implemented in the program Tree-PUZZLE 5.2, were performed with the combined dataset from a sample of 200 unique trees and the unconstrained ML tree. These trees were inferred in Tree-PUZZLE employing the GTR + I+ G nucleotide substitution model.

Molecular dating analyses- To complement the information of phylogeny, ages of divergence events were estimated using an uncorrelated Bayesian relaxed molecular clock model implemented in the Beast v1.7.5 program. Two types of analyses were performed to compare the age estimates. In the first we used points of calibration estimated in previous studies (fossil records and data specific to Parmelioids); in the second we used substitution rates at the ITS locus. For the first analysis, a data matrix of three regions (ITS, nuLSU and mtSSU) was derived from 19 samples of *Parmelina*, 14 samples of *Myelochroa* and 89 samples of other Parmelioid species. We used a user-specified chronogram as the starting tree, which was generated by an ML analysis

using the Garli 0.96 program. The ML topology was converted to an ultrametric tree with the divergence of parmelioid node set at 60.28 Ma. The partitioned molecular data set was analyzed in BEAST, with unlinked substitution models across the loci, and a relaxed clock model (uncorrelated lognormal) for each partition. A Yule prior was assigned to the branching process. Two calibration points were used: (C1), with prior estimates of the crown group of parmelioids of 49.81–73.55 Ma, and (C2), in which the diversification node of *Parmelia* was calibrated with fossils from the Dominican amber (*Parmelia ambra*, 15–45 Ma). In the second analysis, a data matrix of three other regions (ITS, mtLSU and EFA) was derived including solely samples of *Parmelina*, because EFA was missing from other Parmelioids. The molecular data set was analyzed with unlinked substitutions models across the loci. A Yule tree model was used as a prior for the node heights, and a relaxed clock model (uncorrelated log normal) was assumed for each partition. We used molecular evolution rates for the ITS locus of *Parmelina* itself (estimated from the previous analysis), and ITS rates from other two organisms: *Melanelixia* (Parmeliaceae) and Erysiphales fungi (Ascomycota). For both analyses, two independent MCMC runs of 10 million generations were conducted, sampling one tree every 1000 generations. The program Tracer v1.5 was used to evaluate each chain, determine appropriate burn-in cut-off (10% of sampled trees). The two chains were combined (with LogCombiner v1.6.2 and TreeAnnotator v1.6.2) to obtain the mean node height posterior distributions of estimated divergence dates. Mean node age and the 95% highest posterior density (HPD) were mapped onto the maximum clade credibility tree.

Ancestral area reconstructions- To infer the origin and migration events of lineages, biogeographical analyses were performed with the dataset including *Parmelina* and *Myelochroa* using three programs: S-Diva analysis implemented in the program RASP, LaGrange and Simmap v1.5. Five biogeographical regions were delimited, based on the distribution of species of the two genera in the North Hemisphere: North and Central America, Europe and North Africa, India, North and Central Asia, and Southeast Asia. The differences between these programs reside in the likelihood search of ancestral areas, whereby the first and third use Bayesian inference while the second uses the maximum likelihood approach. Another difference appears in the results: S-Diva and

LaGrange can combine biogeographic areas whereas Simmap only assigns probabilities to each preselected area. S-Diva analysis complements the Dispersion-Vicariance analysis (DIVA) with Bayesian inference to determine the statistical support in the reconstruction of ancestral area. An initial condensed tree was elaborated from 5000 trees generated by previous Bayesian analysis, and geographical distribution was assigned to each taxon. This program also computes vicariance, dispersion and extinction events. LaGrange analysis assumes the Dispersion-Extinction-Cladogenesis (DEC) model that specifies instantaneous transition rates between discrete states (ranges) along phylogenetic branches and applies this to the estimation of probabilities of ancestral states. For this analysis, an initial tree was elaborated using an ML approach with the Garli program, and then converted to an ultrametric tree using the TreeEdit program. This tree was imported into the LaGrange 2.0 program (<http://lagrange.googlecode.com>) using the LaGrange configuration module (<http://www.reelab.net/lagrange/configurator/index>), including a data matrix distribution for each taxon. Finally, Simmap analysis takes an indirect Bayesian approach that integrates the combined uncertainty of the trees, branch lengths and substitution models using Markov chain Monte Carlo, and thus attempts to reconstruct the ancestral state of a character. For this analysis, the last 1000 trees of Bayesian analysis were combined with geographic data, and analyzed using the option Ancestral State Reconstruction (ASR) of Simmap.

Genetic diversity and population structure- Genetic variability in populations of *P. tiliacea* and *P. pastillifera* were studied using sequences of ITS, mtLSU and EFA. Haplotype diversity in each region and in the combined matrix was detected by the Arlequin program. To show the relatedness of haplotypes, we constructed haplotype networks using the median network method and the EqualAngle algorithm implemented in SplitsTree v.4; the relationship between haplotypes was also studied through a phylogenetic analysis including only one sample per haplotype, following the same parameters as described above for phylogenetic analyses.

Genetic structure was analyzed by two methods: hierarchical analysis of molecular variance (AMOVA) and a clustering model-based method. The alignment of the three DNA regions was used for the AMOVA analysis to estimate the apportioning of genetic

variation within and among populations, and also among species. Genetic structural analysis based on clustering methods was performed using the programs Structure v2.3, BAPS and Geneland. The best result with biological significance was detected with the Structure program. The combined matrix was converted into haplotypes and the number of clusters or gene pools (K) inferred, using the MCMC procedure implemented in Structure. The data matrix included the 362 samples with the locality and haplotype numbers for each locus. The analyses were run under admixture model considering that individuals may have mixed ancestry, with or without location information. For each model, we performed a series of independent runs for each value of K (between 1 and 10) with 10^6 iterations after a burn-in period of 10,000 iterations. Three replicates were considered for each value of K. The optimal value of "K" for the clade *P. tiliacea*-*P. pastillifera* was determined by the method of Evanno via the Structure Harvester portal (<http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester>).

Ecological requirement models for each genetic population (established previously with Structure program) were developed using the Maximum Entropy program MaxEnt v. 3.3, considering 19 bioclimatic variables obtained from the Worldclim repository (www.worldclim.org). We selected the variables that explain 95% of the cumulative variance of climate in the PCA analysis, and those variables were used to model the most suitable ecological conditions. MaxEnt uses the geo-referenced occurrences of species and the corresponding dataset of environmental variables (e.g., climate) to construct linear combinations of predictor variables that contain the greatest variance. The program produces maps of the predicted probability that conditions are suitable for a given set of samples. Using a cross-validation approach, the analyses were run with 15 replicates and the samples grouped into four groups (T1, T2, T3 and P1) corresponding to the clusters assigned by Structure.

To complement the information provided by the genetic structure, the partition of the variance was estimated by redundancy analysis (RDA) to evaluate the relative contributions of the climate, the spatial distribution of the samples (geography) and the interaction between the two factors to the genetic structure of populations of the *P. tiliacea*-*P. pastillifera* clade. We used the RDA function implemented in the *vegan* package of R.

Morphological studies- Thallus morphology was studied using a Leica L2 microscope to measure lobe shape, size and width. All specimens of *Parmelina* and *Myelochroa* included in the molecular analysis were studied. The morphology and anatomy of other samples lodged in different herbaria (MAF, Faculty of Pharmacy, Madrid Complutense University; B, Botanical Museum Berlin-Dahlem) were also studied. Vertical sections of apothecia were cut using a razor blade and colored with lactophenol blue. Ascospore sizes were observed and measured by light microscopy (Leitz DMRB).

Results

Genetic variability within *Parmelina* has shown that the species diversity in the genus was underestimated. Although previous studies have shown the correlation between morphology and molecular data about species differentiation, one of our first remarkable results was the discovery of a cryptic lineage inside the morphological and isidiated species *P. tiliacea*. This new species, called *P. cryptotiliacea*, has the same external morphology and habitat as *P. tiliacea*, although the range of its distribution is more restricted. The main morphological differences were detected in the width of the ascospores: *P. cryptotiliacea* has thinner ascospores than *P. tiliacea*. It is interesting to note that a population study of *P. tiliacea* over its entire range of distribution confirms that *P. cryptotiliacea* is only present in the central region of Iberian Peninsula, where it is sympatric with *P. tiliacea* at lower elevations. Posterior analyses have shown that the evolutionary history of the two lineages was different, and the separation of the ancestors of the two species was one of the first divergence events of *Parmelina*'s evolutionary history.

Another notable result was the detection of *P. pastillifera* within the *P. tiliacea* clade. The species were phylogenetically closely related, the main differences being the shape of the isidia (mainly cylindrical in *P. tiliacea* and button-like in *P. pastillifera*) and their ecology (*P. pastillifera* is present in more humid or oceanic habitats). In our molecular phylogenetic tree, samples of *P. pastillifera* formed a monophyletic group nested within the *P. tiliacea* clade. This made us consider the possibility that *P.*

pastillifera was a variation of *P. tiliacea* and not a different species. Although the second part of this investigation focused on establishing the genetic diversity within *P. tiliacea*, we included populations of *P. pastillifera* to analyze the genetic variability within the *P. tiliacea*-*P. pastillifera* clade. The analysis also aimed to determine whether *P. pastillifera* is a different species.

Parmelina tiliacea populations are divided into three genetic clusters and *P. pastillifera* is a fourth cluster but with different characteristics. No morphological differences between the three clusters of *P. tiliacea* were detected, and all the samples identified as *P. pastillifera* had button-like isidia. The geographical distribution of the clusters was relatively discriminatory. Only one of the clusters had a characteristic distribution in the periphery of the Mediterranean Sea with the Alps as its north limit. A second cluster was present mainly in the Iberian Peninsula, although it was also present in Central Europe and west of the UK. The third cluster was distributed mainly in Central and North Europe. The Canary Islands and west of the Anatolia peninsula (including the Greek islands) had individuals of all three clusters. Analysis of ecological requirements showed that precipitation in the driest and coldest quarters were the most influential variables in the Mediterranean cluster, whereas isothermality and precipitation in the coldest quarter were most important in the other two clusters of *P. tiliacea*. On the other hand, precipitation in the driest quarter and temperature seasonality were the variables with greatest influences in *P. pastillifera* populations. Redundancy analysis showed that climatic conditions have an influence close to 20% on the distribution of genetic groups of the *P. tiliacea*-*P. pastillifera* clade, whereas geography (latitude and longitude) has less than 10% influence. Considering all this information, we concluded that *P. pastillifera* is a different lineage that may have arisen in a recent speciation process, but that has enough morphological and ecological differences to be considered as a separate species of *P. tiliacea*. Furthermore, it implies that *P. tiliacea* is a paraphyletic species not all of whose descendants share the same morphology.

At the same time as exploring the genetic variability within *Parmelina*, another new species was described from Alaska and northeast of Russia: *P. yalungana*. With this new report, nine species could be included in the *Parmelina* genus: *P. atricha*, *P.*

carporrhizans, *P. coleae*, *P. cryptotiliacea*, *P. gyrophorica*, *P. pastillifera*, *P. quercina*, *P. tiliacea* and *P. yalungana*, all of which are distributed in the northern hemisphere. In the third part of this project we analyzed the phylogenetic relationship between species, although no samples of *P. gyrophorica* were included because it was not possible to obtain fresh material.

Parmelina is a monophyletic clade with *Myelochroa* as its closest genus. All species of *Parmelina* form monophyletic clusters, except *P. tiliacea* and *P. atricha*, which are paraphyletic species with *P. pastillifera* and *P. carporrhizans* nested within their clades, respectively. The relationships among species indicate the existence of three groups: (1) *P. quercina*, *P. yalungana* and *P. cryptotiliacea*; (2) *P. carporrhizans* and *P. atricha*; and (3) *P. tiliacea*, *P. pastillifera* and *P. coleae*. The last two groups have the closest phylogenetic relationship. These results led us to consider how the evolutionary history of this group occurred, given the position of *P. coleae* (a North American species) as the closest species to *P. tiliacea* and *P. pastillifera* (both from Europe), and the genetic proximity of *P. quercina*, *P. yalungana*, both of them being clustered with *P. cryptotiliacea*. Molecular dating analysis shows that *Parmelina* is a lineage that was separated from *Myelochroa* in the Upper Oligocene, approximately 28.5 Ma; the first diversification in *Parmelina* occurred during Miocene, approximately 13.9 Ma, with a subsequent differentiation until Pleistocene, when the contemporary species we are familiar with began their differentiation.

Biogeographic analyses showed that the ancestor of *Parmelina* and *Myelochroa* was distributed across the Eurasian continent, and a process of vicariance led to the separation of *Parmelina* to Europe and *Myelochroa* to Asia. Subsequent dispersion events may explain the presence of *Parmelina* in the west of North America, although by two different routes. In the case of *P. yalungana*, a dispersion event from Europe to North America across Asia could have occurred, while in the case of *P. coleae*, which is absent from Asia, long distance dispersal may explain its distribution in North America.

Main conclusions

- The species concept used in this thesis shows that a combination characters (morphological, molecular, chemical, geographical and ecological) provides a better solution for delimiting taxa in this group of lichenized fungi.
- *Parmelina cryptotiliacea* is a cryptic species, morphologically similar to *P. tiliacea* but with a different genetic composition (ITS, mtLSU and EFA), and restricted to the central region of the Iberian Peninsula.
- The internal genetic structure of *P. tiliacea* consists of three internal clusters whose genetic differentiation has some degree of geographical and environmental influence. Only one of these clades (T3) shows a clear preference for the environmental conditions of the peri-mediterranean area.
- *Parmelina pastillifera* is a species most probably derived from *P. tiliacea*. Its differentiation is very recent and possibly incomplete, although it shows clear morphological differences and has different ecological requirements.
- *Parmelina* is a genus present only in the northern hemisphere. It currently comprises nine species that differ primarily in their molecular, chemical and geographical characteristics. *Myelochroa* is the closest relative.
- While most of the traditionally circumscribed *Parmelina* species form monophyletic clusters, *Parmelina tiliacea* and *P. atricha* are paraphyletic, their descendants including *P. pastillifera* and *P. carporrhizans*, respectively.
- *Parmelina coleae* – with a distribution in the western Mediterranean in North America – is the nearest lineage to the European species *P. tiliacea* and *P. pastillifera*; whereas *P. yalungana* is the nearest lineage to *P. quercina*.
- *Parmelina* is a genus that appeared in the Miocene. Its main divergence and speciation events occurred in Europe with subsequent colonization of other regions such as East Asia and western North America.

- Morphological, ecological and geographic characters were sufficient to identify and largely separate the *Parmelina* species known to date. The greatest difficulty is presented by *P. tiliacea* and *P. cryptotiliacea* which are sympatric in the central region of the Iberian Peninsula.

Key words: *Parmelina*, molecular phylogeny, species recognition, genetic structure, evolution, speciation events, Parmeliaceae, Europe.

INTRODUCCIÓN

GENERAL

GENERAL

INTRODUCTION

Antecedentes.

Se denomina líquen a la asociación estable y autosuficiente entre un hongo (micobionte) y un alga o cianobacteria (fotobionte), funcionando en la naturaleza como una unidad (Kirk *et al.* 2008). Esta asociación mutualista genera talos liquénicos estables con morfología, anatomía, fisiología y ecología específica siendo considerados como un grupo biológico. Sin embargo, desde el punto de vista sistemático se consideran una estrategia trófica de los correspondientes hongos. Estos organismos son colonizadores primarios en casi todos los ecosistemas conocidos, su capacidad de adaptación a medios con escasos nutrientes hace que sean capaces de establecerse como pioneros y comenzar la formación de suelo para la posterior llegada de otros organismos (Barreno & Pérez-Ortega 2003). Algunas especies de líquenes son muy específicas respecto al sustrato y a las condiciones del medio en el que se desarrollan, otras son más tolerantes llegando incluso a adaptarse a ambientes antropogénicos. Es posible encontrar líquenes creciendo en diversos ecosistemas del planeta, incluso en medios extremadamente hostiles para la vida como las zonas polares o desérticas; sin embargo, las ventajas que les aporta la simbiosis hacen posible su establecimiento y desarrollo (Brodo *et al.* 2001, Barreno & Pérez-Ortega 2003, Hawksworth 2005, Divakar *et al.* 2006, Nash 2008).

Al no ser considerados un grupo sistemático, los estudios taxonómicos, filogenéticos y sistemáticos consideran a los simbioses dentro de sus respectivos grupos. A pesar de ello se investiga sobre la interacción genética que podría existir entre ambos simbioses (Otálora *et al.* 2010, Fernández *et al.* 2011, Piercey-Normore & Deduke 2011). La mayoría de trabajos publicados sobre filogenias de líquenes han sido referidos principalmente al hongo liquenizado o micobionte (Arup & Grube 1998, Crespo & Cubero 1998, Mattson & Wedin 1998, Blanco *et al.* 2006, James *et al.* 2006, Crespo *et al.* 2010b, Otálora *et al.* 2010, Huzefa *et al.* 2011, Miadlikowska *et al.* 2011, Nelsen *et al.* 2011, Rivas Plata & Lumbsch 2011, Šoun *et al.* 2011), siendo las filogenias del fotobionte aún escasas e incompletas (Romeike *et al.* 2002, Piercey-Normore 2006, Yahr *et al.* 2006, Muggia *et al.* 2010). Centrándonos específicamente en el micobionte, la liquenización es un proceso que se ha producido varias veces en la evolución (Gargas *et al.* 1995) y ha afectado a linajes muy diversos de hongos filamentosos. Se trata por tanto de un proceso polifilético. Así los hongos liquenizados pertenecen a diferentes familias, órdenes y hasta divisiones del esquema sistemático que hoy se acepta para los hongos (James *et al.* 2006, Hibbet *et al.* 2007). Un número elevado de hongos liquenizados (96%) están presentes en el phylum Ascomycota, mientras que los restantes han sido descritos dentro de los Basidiomycota (Lutzoni 1997, Lawrey *et al.* 2009, Schoch *et al.* 2009). Los hongos

liquenizados constituyen aproximadamente el 40% del phylum Ascomycota (Kirk *et al.* 2001), los cuales se encuentran agrupados en diferentes órdenes como por ejemplo Acarosporales, Arthoniales, Lecanorales, Mycoliciales, Peltigerales y Telochistales, entre otros.

La familia Parmeliaceae (Lecanorales, Ascomycetes) incluye aproximadamente 2500 especies de líquenes, representando así la familia más numerosa dentro del orden Lecanorales (Blanco *et al.* 2004a, Kirk *et al.* 2008, Crespo *et al.* 2010b). Entre los años 1950 a 1990, Mason E. Hale Jr. realizó estudios taxonómicos en diferentes grupos de esta familia llegando a describir varios géneros y especies basados en los caracteres morfológicos y químicos de los talos (Hale 1965, 1974, 1975, 1976a, 1976b, 1976c, 1976d, 1986, 1987, 1990; Hale & Kurokawa 1964, Elix & Hale 1987). La adición de caracteres moleculares en años posteriores ha producido cambios en la circunscripción de la familia y de los géneros y ha contribuido a esclarecer muchas de las relaciones filogenéticas entre éstos (Crespo *et al.* 2010b).

Los estudios acerca de las relaciones filogenéticas basados en marcadores moleculares en Parmeliaceae empezaron en el año 1998 (Crespo & Cubero 1998, Mattsson & Wedin 1998, DePriest 2004). La descripción de nuevos marcadores moleculares (e.g. MCM7; Schmitt *et al.* 2009) así como la inclusión de un mayor número de secuencias de ADN en los bancos de genes (e.g. GenBank) han permitido una reestructuración que se ha visto reflejada en la descripción de nuevos géneros y especies, así como en la sinonimización de otros (Blanco *et al.* 2004b, Molina *et al.* 2004, Divakar *et al.* 2005a, b, 2010, Thell *et al.* 2006, Amo de Paz *et al.* 2010a, b, Nelsen *et al.* 2011).

Crespo *et al.* (2007) corroboraron en gran medida, mediante marcadores moleculares, la agrupación morfológica propuesta por diversos autores y que se basaba principalmente en la forma de crecimiento, morfología del talo, así como caracteres propios del asco y las ascósporas, concluyendo que en la familia se reconocían al menos seis grupos monofiléticos (Fig. 1): Parmelioides, Alectorioides, Psiloparmelioides, Cetrarioides, Hypogymnioides y Letharioides. Dentro de Parmeliaceae, los parmelioides representan el grupo con mayor número de especies descritas hasta la fecha (aprox. 75%). Las especies de este grupo se caracterizan por presentar un talo folioso, rizinas en la cara inferior del talo, córtex superior epicorticado, con o sin poros, apotecios laminares, asco tipo lecanoral, y ascósporas simples y hialinas (Crespo *et al.* 2001, 2007, 2010b).

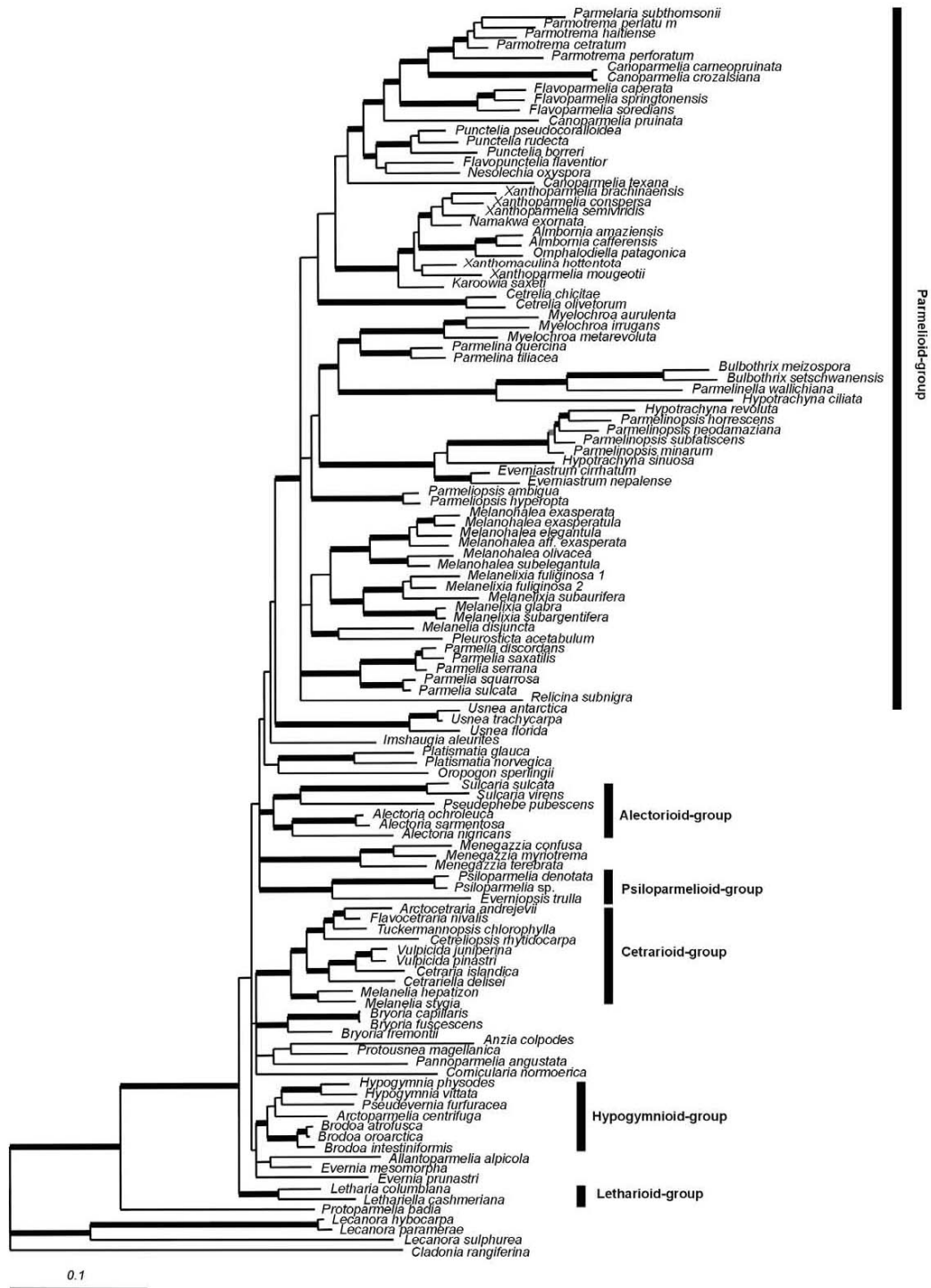


Fig. 1. Árbol filogenético de la familia Parmeliaceae (Lecanorales, Ascomycetes) basado en cuatro genes (Fuente: Crespo et al. 2007).

Blanco *et al.* (2004a, 2004b, 2005, 2006) llevaron a cabo los primeros estudios filogenéticos dentro de este grupo reagrupando los géneros en cuatro clados: grupo Xanthoparmelia, grupo Parmotrema, un grupo más complejo que incluía en parte el antiguo género *Melanelia* (*Melanelixia* y *Melanohalea*) además de *Parmelia*, y el grupo Hypotrachyna. Estudios

posteriores, así como el incremento del número de especies estudiadas, permitieron una aproximación más detallada a la sistemática y filogenia de los Parmelioides. Recientemente, Crespo *et al.* (2010b) han agrupado los géneros parmelioides en ocho clados denominados como: Parmotrema, Xanthoparmelia, Cetrrelia, Parmelina, Hypotrachyna, Parmelia, Nipponoparmelia y Melanohalea. En este estudio se utilizaron cuatro genes distintos y se incluyeron 762 especies pertenecientes a 31 de los 33 géneros aceptados para el grupo Parmelioide. Este estudio esclareció algunas relaciones filogenéticas dentro y entre los géneros del grupo Parmelioide, quedando pendiente conocer la filogenia dentro de estos géneros.

El género Parmelina

El género *Parmelina* –del latín *inae* (sufijo diminutivo indicativo de un subconjunto)– fue descrito por Hale en 1974 como una segregación del género *Parmelia* Acharius, basándose en caracteres morfológicos y químicos. En ella incluyó un total de 47 especies que compartían caracteres morfológicos como la forma adnada y estrecha de los lóbulos de los talos, así como la presencia de cilios marginales y la ausencia de ácido úsnico en el córtex. *Parmelina tiliacea* fue designada como especie tipo del género (siendo el basionimo *Lichen tiliaceus* Hoffm. Enum. Lich. 96. 1784). Actualmente, muchas de las especies incluidas por Hale (1974, 1976) se encuentran clasificadas en otros géneros como *Canomaculina*, *Myelochroa*, *Parmelinella*, *Parmelinopsis*, *Parmotremopsis* (Elix & Hale 1987) o *Austroparmelina* (Crespo *et al.* 2010a).

- Reino: Fungi
- Filo: Ascomycota
- Clase: Ascomycetes
- Orden: Lecanorales
- Familia: Parmeliaceae
- Género: *Parmelina*

Filogenéticamente el género *Parmelina* se relaciona como clado hermano con el género *Myelochroa*. Ambos géneros junto con *Remototrachyna* y *Bulbothrix* conforman el llamado ‘clado Parmelina’ (Fig. 2) dentro de los Parmelioides (Crespo *et al.* 2010b).

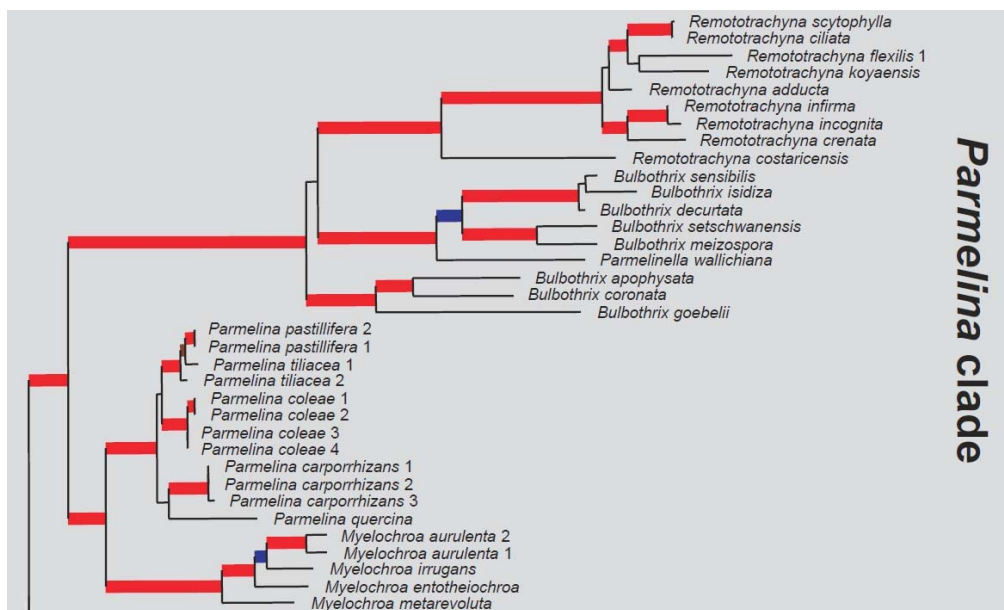


Fig. 2. Arbol filogenético del clado *Parmelina*, extraído del árbol filogenético de los Parmelioides, basados en tres marcadores moleculares. Las ramas gruesas indican apoyo estadístico $\geq 95\%$, líneas rojas indican congruencia entre tres análisis diferentes, la línea azul indica que solo uno de los tres análisis tiene soporte estadístico (Fuente: Crespo *et al.* 2010b).

Cuando se inicia este trabajo, el género *Parmelina* estaba reducido a tan solo siete especies: *Parmelina tiliacea* (Hale 1974), *P. quercina* (Hale 1974), *P. carporrhizans* (Poelt & Vězda 1977), *P. atricha* (Clerc & Truong 2008), *P. coleae* (Argüello *et al.* 2007), *P. pastillifera* (Hale 1976), y *P. gyrophorica* (Wang *et al.* 2000), basadas principalmente en diferencias en caracteres morfológicos y genéticos (Argüello *et al.* 2007, Clerc & Truong 2008). Al finalizar este estudio dos especies más fueron adicionadas: *P. cryptotiliacea* (Nuñez-Zapata *et al.* 2011) y *P. yalungana* (Nelson *et al.* 2012).

Las especies del género *Parmelina* (Fig. 3) se caracterizan por presentar un talo folioso desde adpreso hasta adnado, con lóbulos sublineares, irregulares y estrechos (1-4 mm) pero con los extremos de los lóbulos redondeados. La superficie superior puede presentar máculas blanquecinas y puede estar cubierta de pruina; pueden presentar isidios pero no soledios. La cara inferior es de color marrón-castaño oscuro o negro, con los márgenes externos más claros. Rara vez presentan cilios cortos axilares y las rizinas son simples. Los apotecios son adnados o sésiles, con un diámetro máximo de 5 mm, y con frecuencia variable. Las especies *P. carporrhizans*, *P. quercina*, *P. coleae*, *P. tiliacea*, *P. pastillifera* presentan rizinas en la parte inferior del anfitecio. Tres especies presentan isidios (*P. tiliacea*, *P. cryptotiliacea* y *P. pastillifera*), y ninguna presenta soledios.

Aunque todas las especies pueden presentar apotecios, la frecuencia de los cuerpos fructíferos disminuye notablemente en las especies isidiadas, sobre todo en *P. pastillifera*. Argüello *et al.* (2007) realizaron un estudio comparativo sobre la morfología de las especies apoteciadas (*P. quercina*, *P. carporrhizans* y *P. coleae*) encontrando diferencias en el epicórtex del talo, en la forma de las esporas así como en la longitud de los conidios; asimismo, Clerc & Truong (2008) concluyeron que el hábitat y el rango de distribución, además de la combinación de caracteres morfológicos como la ausencia de máculas en el talo y la longitud de las rizinas, también constituyen caracteres importantes para diferenciar especies, como ocurre con *P. atricha* y las otras dos especies similares *P. quercina* y *P. carporrhizans*.

En cuanto a las especies isidiadas, la principal diferencia entre *P. tiliacea* y *P. pastillifera* es la forma de los isidios; *P. tiliacea* presenta una mayor variabilidad morfológica de isidios siendo desde globosos hasta cilíndricos y ramificados (Fig. 4), mientras que *P. pastillifera* presenta isidios apastillados o en forma de botón. Otro carácter que diferencia ambas especies es la ecología, siendo *P. pastillifera* más propia de ambientes oceánicos mientras que *P. tiliacea* es más continental y de distribución más amplia (Dobson & Hacksworth 1976). *Parmelina tiliacea* y *P. cryptotiliacea* muestran similares formas de isidios, no existiendo de momento caracteres morfológicos externos para diferenciarlos (Capítulo I).

Químicamente las especies de *Parmelina* son muy similares. Casi todas presentan atranorina en el córtex y ácido lecanórico (y trazas de ácido girofórico) en la médula (Hale 1976b, Clerc & Truong 2008); mientras que *P. gyrophorica* presenta además ácido girofórico y trazas de ácido cloroatranorínico, ácido orselínico y orcinol (Wang *et al.* 2000); aunque es posible encontrar también algún ejemplar con otros componentes (por ejemplo, ácido evérnico en el ejemplar B600183598 de *P. tiliacea*, Herbario de Berlín).

En cuanto al hábitat, las especies del género *Parmelina* crecen sobre una amplia variedad de sustratos, pudiendo encontrarse sobre árboles de superficie ácida o neutra (Barkman 1958), sobre rocas silíceas (granitos, o gneises) y también sobre pizarras o incluso sobre calcáreas u otros soportes más o menos esporádicos; su distribución abarca regiones templadas que van desde el nivel del mar hasta zonas por encima de los 3000 m.s.n.m., colonizando principalmente bosques secundarios (Hale 1976b). Su distribución geográfica está restringida al hemisferio norte, con solo dos especies citadas para América del Norte (*P. coleae* y *P. yalungana*) mientras que las siete restantes se encuentran en el continente euroasiático (Argüello *et al.* 2007, Clerc & Truong 2008, Núñez-Zapata *et al.* 2011).

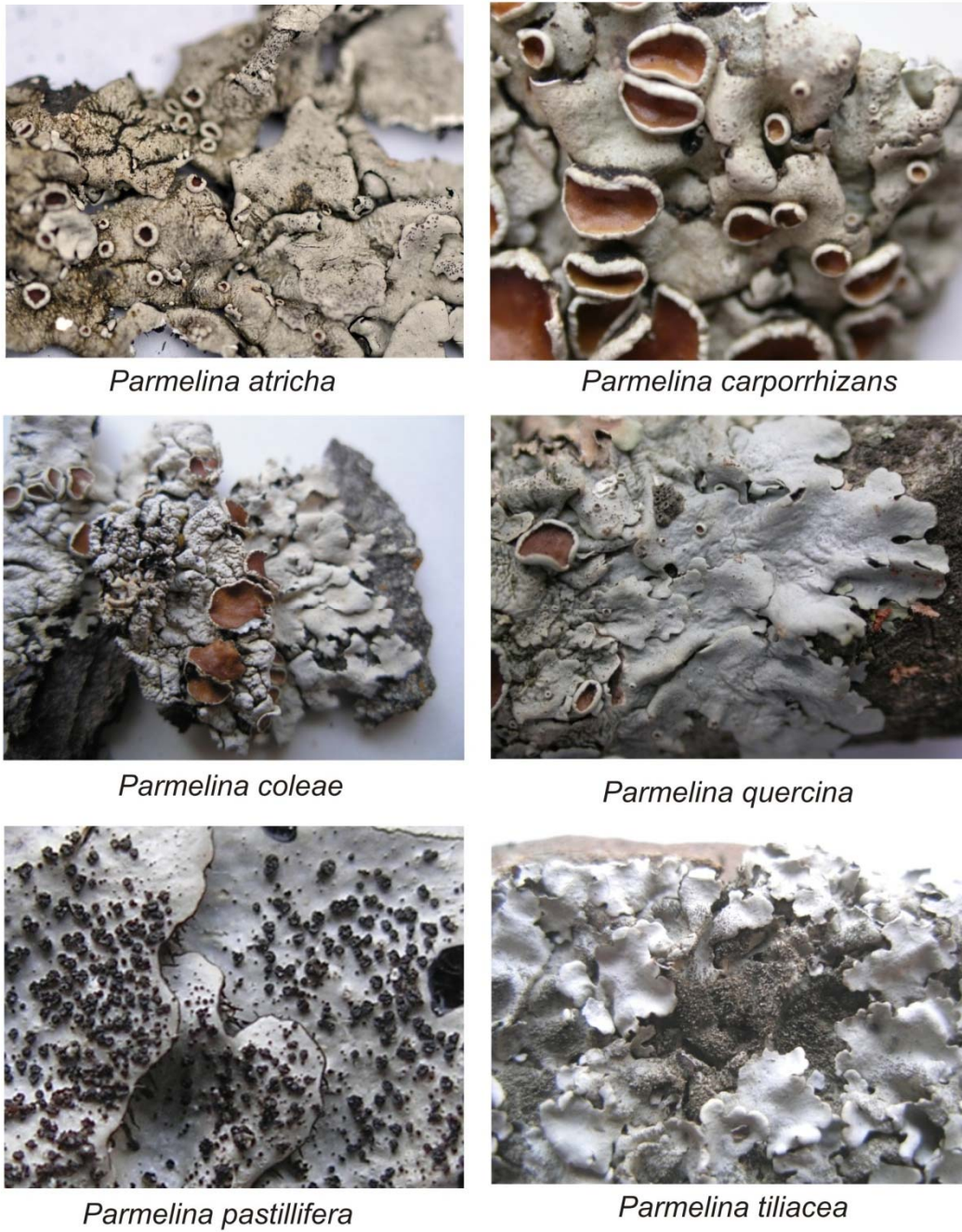


Fig. 3. Especies del género *Parmelina*.

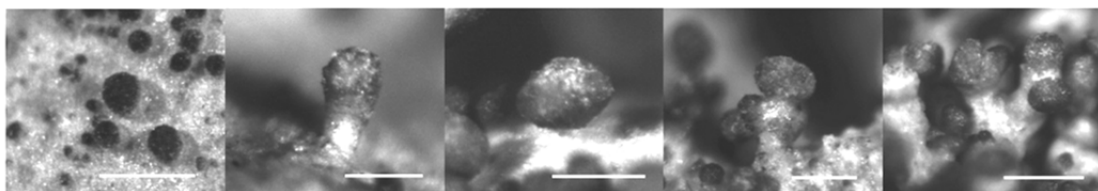


Fig. 4. Variación morfológica de los isidios de *P. tiliacea* (MAF 16485). Escala = 1 mm.

Delimitación de las especies en líquenes.

Considerando que las especies son las unidades básicas de la biodiversidad y su estudio está vinculado a los procesos de especiación, el concepto de especie así como la delimitación de las distintas especies son aspectos de interés para la biología evolutiva y para la investigación de la diversidad (De Queiroz 2005). Dado el contenido de nuestro trabajo se hace imprescindible analizar este aspecto en este capítulo introductorio.

Aunque puedan reducirse a cinco principales, se conocen más de 24 definiciones referidas al concepto de especie (Mayden 1997, De Queiroz 2007), lo que a veces dificulta su aplicabilidad.

En lo que nos afecta, son dos los conceptos que surgen habitualmente. Ambos conceptos son filéticos (Stuessy 2009), es decir, consideran la especie como un linaje que evoluciona independientemente. Los conceptos en discusión son los siguientes:

1. El reconocimiento de las especies basado en propiedades morfológicas, es decir, en la divergencia que presentan los caracteres morfológicos de los organismos que se comparan (y por extensión también en la de otros caracteres fenotípicos como por ejemplo los quimiotaxonómicos). Las especies definidas sobre esta base se acogen al concepto morfológico de especie (MSC).
2. El reconocimiento de las especies basado en las propiedades filogenéticas, es decir, en las divergencias entre ciertas secuencias diana de ADN que se llaman marcadores. Las divergencias que se miden son los cambios de las bases nucleotídicas (A, T, G, C, o 'gap') en cada posición homóloga. Las especies definidas sobre esta base se acogen al concepto filogenético de especie (PSC).

En ambos casos, el estudio debe basarse en un análisis objetivo de los caracteres con valor estadístico significativo y por tanto debe utilizar el mayor número de muestras posible y el mayor número de variables (caracteres).

La metodología a usar en uno u otro caso no es un tema menor. El estudio profundo de los caracteres morfológicos es muy complejo y requiere un alto grado de conocimiento de los mismos para poder seleccionar los rasgos morfológicos que puedan ser usados como tales caracteres y para poder apreciar su variabilidad; es decir, exige especialización por parte del investigador. Además, caso de aplicarse la metodología cladística que es la única disponible para análisis biosistemáticos, la identificación de apomorfías (carácter nuevo que deriva de

otro anterior llamado plesiomórfico) es muy compleja porque la homoplasia de los caracteres (falsas semejanzas o semejanzas que no son homólogas) es muy fuerte.

En el caso de los caracteres que ofrece el ADN (caracteres moleculares), en primer lugar son mucho más numerosos y en segundo lugar son más sencillos de diagnosticar porque la comparación entre secuencias deja menos margen al error; naturalmente se requiere conocer las técnicas estándar que por otro lado son muy generales y sirven para todos los organismos vivos (en principio no requieren especialización). Cuando se comparan secuencias de nucleótidos las apomorfías se pueden valorar mejor y la homoplasia es menor. Como consecuencia, la aplicación del método de análisis cladístico es viable y convincente.

Sin embargo, hay aspectos críticos que se deben tomar en cuenta a la hora de producir un análisis cladístico basado en marcadores moleculares. Uno de los fundamentales es que las diferentes regiones del ADN mutan independientemente y a distinto ritmo, es decir, son diacrónicas (Richards 2010), de tal manera que cada marcador puede dar un resultado ligeramente diferente. Dicho de otra forma, cada marcador ofrece la filogenia del locus diana pero no necesariamente la del organismo; obviamente en el genoma del organismo confluyen un gran número de loci y la filogenia inferida del mismo debe ser consecuencia de la ponderación de los resultados entre diferentes marcadores no ligados. Solo de esta forma se garantiza la independencia evolutiva del linaje. El corolario de esta circunstancia es que el linaje que se identifica como una especie debe quedar corroborado por varios marcadores independientes. En la actualidad se trabaja siempre con varias regiones de ADN, a ser posible de distinto origen (nucleares y mitocondriales). Cuando el PSC se ve así refrendado, la especie filogenética queda definida por una verdadera concordancia genealógica de las poblaciones que la constituyen (*Genealogical Concordance Phylogenetic Species Recognition* - GCPSR, Taylor et al. 2000).

Como consecuencia, tanto por operatividad como por tratarse de una aproximación científica más viable, el concepto de especie que se utiliza con mayor consenso o, al menos, como base es el filogenético (PSC optimizado mediante el GCPSR). Este concepto es el que se está manejando en los grupos de organismos mejor investigados. Siempre que ello es posible, lo habitual es la combinación de las propiedades filogenéticas con las propiedades morfológicas discutiéndose la coincidencia o discrepancia con el Concepto Morfológico de Especie (MSC) en el cual se basan la mayoría de las especies que hoy se reconocen.

El continuo descubrimiento de especies crípticas en los hongos (especies con morfología o química similar pero biológica o genéticamente distintas), ha demostrado que los caracteres

morfológicos (o químicos) por si solos resultan insuficientes (Crespo & Pérez-Ortega 2009, Lumbsch & Leavitt 2011) para la delimitación de especies. Sin embargo el GCPSR, apoyado en la concordancia filogenética de múltiples genes no ligados, para chequear la carencia de intercambio genético y por lo tanto la independencia evolutiva de los linajes, ha logrado mayor solidez. De esta forma el GCPSR, como actualización del concepto filogenético PSC, ha demostrado ser sumamente útil en los hongos porque se consigue identificar especies incluso cuando no se puedan diferenciar por falta de caracteres morfológicos.

En hongos liquenizados, el criterio GCPSR se ha extendido igualmente. De hecho Grube & Kroken (2000) llegaron a las mismas conclusiones que Taylor et al. (2000) aunque en ese momento los estudios en líquenes con más de un marcador molecular eran aún escasos; sin embargo, hoy en día muchos trabajos ejemplifican su aplicabilidad (Molina *et al.* 2004, Divakar *et al.* 2010a, b, Núñez-Zapata *et al.* 2011, Spribille *et al.* 2011). No obstante, en líquenes como en otros grupos el concepto morfológico de especie sigue siendo prioritariamente considerado entre algunos investigadores (Flakus *et al.* 2011, Aptroop *et al.* 2012).

En el presente estudio hemos trabajado inicialmente sobre el GCPSR. Aunque se partía a priori de especies reconocidas por sus autores según sus rasgos morfológicos (MSC), y así fueron identificadas por nosotros al iniciarse el trabajo; no se efectuaron análisis cladísticos basados en la morfología. Metodológicamente se procedió usando las hipótesis filogenéticas como modelo, sobre el que luego se contrastaron las propiedades morfológicas y químicas de los linajes monofiléticos o parafiléticos que resultaban en los clados terminales. Es decir, se aplicó en cierta medida el concepto general de linaje (*General Lineage Concept*, GLC) donde se considera la especie como un segmento de un linaje de poblaciones que evoluciona separadamente (De Queiroz 2007).

Filogeografía y genética de poblaciones en hongos liquenizados

El término filogeografía fue acuñado por Avise *et al.* (1987) y literalmente puede ser interpretado como el análisis filogenético de un organismo en el contexto de su distribución geográfica. Sin embargo esta rama de la ciencia surgió buscando comprobar si los procesos microevolutivos que operan dentro de una especie se podrían extrapolar para explicar las diferencias macroevolutivas entre especies y taxones superiores (Hickerson *et al.* 2010). Tal y como lo propusieron Avise *et al.* (1987), la filogeografía es el análisis filogenético de datos genéticos contextualizados geográficamente para probar hipótesis acerca de la relación causal

entre los fenómenos geográficos, la distribución de especies, y los mecanismos que conducen a la especiación.

A la vez que este concepto surgía, matemáticos y genetistas fueron formulando la teoría de la coalescencia (Hudson 1983, Tajima 1983) para explicar la variación genética dentro de una especie. La teoría tradicional de la genética de poblaciones se basó principalmente en modelos matemáticos que predijeran el comportamiento de las poblaciones permitiendo predecir las frecuencias de alelos en las generaciones futuras basadas en modelos de poblaciones enteras (Ewens 1979). Sin embargo, la teoría de la coalescencia planteó una forma eficaz de utilizar solo una muestra de alelos, de tal forma que las genealogías de genes se modelaran hacia atrás en el tiempo y prácticamente en cualquier historia demográfica compleja, con el fin de estimar los parámetros filogeográficos tales como el tamaño de las poblaciones históricas, el tiempo de divergencia, y las tasas de migración dadas por el calendario estocástico de eventos coalescentes (Wakeley 2008). En lugar de utilizar las genealogías de genes estimados para inferir directamente la historia demográfica, los métodos coalescentes generalmente tratan estas genealogías como un parámetro de transición para obtener estimaciones de los parámetros demográficos biogeográficamente informativos tales como los tiempos de divergencia y las tasas de migración (Hey & Machado 2003). La coalescencia también se ha vuelto relevante y necesaria para los filogeógrafos para estimar la filogenia a nivel de especies cuando se aprecian niveles bajos de divergencia a partir de datos de múltiples loci y múltiples individuos por subespecies o poblaciones (Edwards *et al.* 2007, Oliver 2008, Kubatko *et al.* 2009).

Con estos dos nuevos conceptos, los estudios filogeográficos profundizaron su enfoque descriptivo buscando su aplicación en la estimación de parámetros evolutivos, evaluación de modelos sobre migración y divergencia, estimación de historias demográficas espacialmente explícitas, o desarrollo de pruebas de congruencia espacio-temporales entre taxones que comparten áreas de distribución (Avice 2009, Hickerson *et al.* 2010). Todos estos estudios se han realizado en otros organismos diferentes de los hongos, razón por la cual en líquenes estos estudios aún son incipientes.

Uno de los primeros estudios filogeográficos en hongos liquenizados fue llevado a cabo por Printzen *et al.* (2003) en el cual trataron de inferir la historia poblacional de *Cavernularia hultenii* y asociarlo a eventos del Pleistoceno y Holoceno. Trabajos posteriores trataron de explicar la distribución actual de especies de amplia distribución geográfica o especies con distribución intercontinental también bajo un enfoque histórico (Printzen 2008, Geml *et al.*

2010). Recientemente se está poniendo énfasis en estudios biogeográficos comparativos que además muestren la interacción así como la estructura poblacional de ambos simbiontes con el objetivo de conocer más acerca de sus relaciones, modos de dispersión, colonización e historia evolutiva (Yahr *et al.* 2006, Otálora *et al.* 2010, Fernández *et al.* 2011).

Planteamiento de la investigación e hipótesis

Los conocimientos que hoy se tienen sobre la diversidad de hongos liquenizados, así como las herramientas moleculares con que se cuenta, han permitido inferir las relaciones filogenéticas entre clados, delimitar taxones, proponer rutas migratorias (pasadas y actuales) que expliquen la distribución actual de las especies, así como plantear hipótesis acerca de la historia evolutiva de las especies. Sin embargo, muchos aspectos aún permanecen sin resolver. La falta de apoyo estadístico en los nodos de los árboles filogenéticos, o el hecho de que algunas especies no resulten monofiléticas hacen pensar que algunos de los conceptos que manejamos para hongos liquenizados pueden estar incompletos o errados. Un ejemplo de ello son las llamadas especies parafiléticas que provienen de un ancestro común pero no incluye a todos sus descendientes (Henning 1962, Hörandl & Stuessy 2010). Algunos ejemplos en hongos liquenizados y específicamente en Parmeliaceae donde los árboles filogenéticos no muestran monofilia de géneros o especies, por ejemplo en *Hypotrachyna* y *Everniastrum* (Divakar *et al.* 2007, Crespo *et al.* 2010b) o en el caso de diversas especies de *Xanthoparmelia* (Leavitt *et al.* 2011, Amo de Paz *et al.* 2012).

Dentro del género *Parmelina*, la utilización de caracteres morfológicos y ecológicos ha resultado bastante concordante con la filogenia producida mediante marcadores moleculares (Hale 1976b, Argüello *et al.* 2007, Clerc & Truong 2008). Sin embargo, aún permanecen sin esclarecer algunas relaciones filogenéticas entre las especies. Por otro lado, también se desconoce cómo es la estructura poblacional de las especies del género, el grado de variación genética que pueden tener sus poblaciones, así como si existen factores externos (por ejemplo, climáticos) que estén relacionados con la diferenciación entre especies.

En comparación con otros géneros, *Parmelina* resulta un taxon bastante abordable por razón de dimensiones, grado de conocimiento de partida y por encontrarse geográficamente próximo en nuestra ubicación territorial. A partir de su estudio se pretende un mejor entendimiento de la historia evolutiva de los hongos liquenizados de la familia Parmeliaceae utilizando tanto patrones filogenéticos como estudios de genética de poblaciones.

Se pretende discutir las siguientes hipótesis:

- El género *Parmelina* constituye un clado monofilético dentro de la familia Parmeliaceae.
- Todas las especies del género *Parmelina* están formadas por clados monofiléticos.
- En la actual circunscripción del género *Parmelina*, los caracteres moleculares conforman un concepto de especie filogenética (PSC o GCPSR) que es convergente con el concepto morfológico de partida; propiedades ecológicas y geográficas pueden resultar complementarias para delimitar las especies dentro del género.

Justificación de la investigación

El número de especies y las relaciones filogenéticas entre ellas en el género *Parmelina* no están resueltas. En 1998, cuando se empezaron a desarrollar los trabajos que incluían marcadores moleculares en líquenes, se tenía una posición clara acerca de las especies que pertenecían al género *Parmelina* basadas principalmente en los caracteres morfológicos que presentaban las distintas especies. Se reconocían 15 especies en el género, las cuales crecían entre bajas y moderadas altitudes; se propusieron dos centros de especiación: Eurasia-norte de África y Australasia, y una de las especies, *P. quercina* se consideraba alopátrica de amplia distribución mundial. Los primeros trabajos de filogenia molecular en la familia Parmeliaceae buscaron esclarecer las relaciones de parentesco entre los géneros, razón por la cual se incluyeron solamente entre una y tres especies representativas (*P. tiliacea*, *P. pastillifera* y *P. quercina*) que sirvieran de referencia en los árboles filogenéticos de la familia (Elix 1993, Crespo & Cubero 1998, Crespo *et al.* 2001, 2007, 2010a, 2010b, Blanco *et al.* 2006).

Argüello *et al.* (2007) publican el primer modelo filogenético del género, en el que solo incluyen las especies de distribución europea *P. tiliacea* y *P. pastillifera*, así como la de más amplia distribución *P. quercina*. Sus resultados apoyaron la existencia de *P. carporrhizans* como especie distinta de *P. quercina* considerada sinónimo por numerosos autores (Hale 1976b, Clauzade & Roux 1985, Purvis *et al.* 1993, Wirth 1994), y revelaron la existencia de otras dos nuevas especies: *P. coleae*, distribuida en el occidente de América del Norte (California), y *P. elixia* en Australia; la monofilia de estas especies fue resuelta, mas no así las relaciones filogenéticas entre ellas.

Posteriormente, Crespo *et al.* (2010a) describen un nuevo género *Austroparmelina* Crespo, Divakar & Elix apoyado por la filogenia molecular (basada en tres marcadores moleculares), caracteres morfológicos (lóbulos estrechos, sublineares a subirregulares, con los ápices redondeados, ricinas cortas y simples, excípulo escleroplektenquimatoso, con la zona superior de las células del excípulo propio no carbonatada, y ascosporas elipsoidales y más grandes que *Parmelina*), así como una distribución geográfica exclusiva del hemisferio sur (Australia, Nueva Zelanda, Tasmania y Sudáfrica). En este nuevo género se incluye la antes citada *P. elixia*, así como las otras especies de *Parmelina* que estaban descritas para el hemisferio sur (*P. conlabrosa*, *P. endoleuca*, *P. euplectina*, *P. johnstoniae*, *P. labrosa*, *P. pseudorelicina*).

Como se ha anticipado en líneas anteriores, el género *Parmelina*, dada su distribución geográfica conocida, así como el escaso número de especies descritas, representa un clado ideal para profundizar los estudios sobre filogenia dentro de la familia Parmeliaceae, discutir el concepto de especie, y proponer hipótesis acerca de sus procesos evolutivos, de especiación y delimitación de especies. Basado en la variabilidad genética de los marcadores moleculares, el presente trabajo pretende servir como referencia de los procesos de especiación en líquenes foliáceos, o al menos en los hongos liquenizados de la familia Parmeliaceae.

OBJETIVOS

AIMS

OBJETIVOS

- ✓ Conocer la diversidad de especies que presenta el género *Parmelina*, basado en la comparación de caracteres morfológicos, ecológicos y moleculares, así como establecer los caracteres que identifican al género y los diferencian de otros taxones morfológicamente similares (*Myelochroa*).
- ✓ Mostrar la variabilidad genética que tienen las especies de *Parmelina*, tomando como modelo a *P. tiliacea*. Determinar su estructura genética, y el grado de diferenciación que tienen sus poblaciones.
- ✓ Demostrar la monofilia del género, evaluar el carácter monofilético en cada una de sus especies y determinar las relaciones filogenéticas entre las especies de *Parmelina*.
- ✓ Describir la historia evolutiva de *Parmelina*, a partir de la filogenia del género, reconocer los eventos de divergencia, inferir áreas ancestrales así como los eventos migratorios que dieron origen a los distintos linajes.

Los objetivos secundarios que se persiguen son:

- ✓ Evaluar la validez del concepto filogenético de especie (GCPSR) en las especies de *Parmelina*.
- ✓ Determinar el grado de influencia que tienen los factores ambientales y geográficos en la estructura genética de las especies de *Parmelina*, tomando como modelo a *P. tiliacea*.
- ✓ Plantear una hipótesis acerca de los procesos de especiación y evolución que ocurrieron en el género *Parmelina*, tasando su edad genealógica e infiriendo los procesos de dispersión y vicarianza que ocurrieron a lo largo de su historia evolutiva.
- ✓ Proponer una clave taxonómica para diferenciar las especies del género *Parmelina*.

Main aims:

- ✓ Know the diversity of species present *Parmelina* genus, based on the comparison of morphological, ecological and molecular characters, and to set the characters that identify the genus and separate from other morphologically similar taxa (*Myelochroa*).
- ✓ Show the genetic variability of *Parmelina* species, modeled on *P. tiliacea*. Determine its genetic structure, and the degree of difference in their populations.
- ✓ Demonstrate the monophyly of the genus, assessing the monophyletic character in each species, and determine the phylogenetic relationships among species of *Parmelina*.
- ✓ Describe *Parmelina* evolutionary history, from the phylogeny of the genus, recognizing divergence events, inferring ancestral areas and migratory events that gave rise to different lineages.

Secondary objectives are to:

- ✓ Evaluate the phylogenetic species concept (GCPSR) in *Parmelina* species.
- ✓ Determining the degree of influence of environmental and geographical factors in the genetic structure of *Parmelina* species, modeled on *P. tiliacea*.
- ✓ Suggest a hypothesis about the processes of speciation and evolution that occurred in the *Parmelina* genus, rating its genealogical age, and inferring the dispersal and vicariance processes that occurred during their evolutionary history.
- ✓ Propose a taxonomic key to distinguish the species of the genus *Parmelina*.

METODOLOGÍAS

COMUNES

A LOS ESTUDIOS

REALIZADOS

GENERAL

METHODS

Material biológico.

En el presente estudio se analizaron 321 individuos de *Parmelina tiliacea*, 42 de *P. pastillifera*, 7 de *P. cryptotiliacea*, 4 de *P. carporrhizans*, 4 de *P. atricha*, 3 de *P. coleae* y 3 de *P. quercina*. Asimismo, se incluyeron 14 especímenes de *Myelochroa* correspondientes a 10 especies. El material en su mayoría fue colectado directamente del campo, algunas muestras fueron enviadas por otros especialistas y también se recurrió a material incluido en el herbario MAF de la Facultad de Farmacia de la UCM (Anexo 1).

La determinación de los ejemplares se realizó utilizando el herbario MAF, claves generales (Clauzade & Roux 1975, Hale 1976b, Poelt & Vezda 1977, Purvis *et al.* 1993, Awasthi 2007, Smith *et al.* 2009) así como comparando secuencias (Blastn; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) de la región ITS (Internal Transcribed Spacer) del micobionte aportadas por trabajos anteriores (Blanco *et al.* 2006, Argüello *et al.* 2007). La conservación del material fresco se realizó desecando las muestras a temperatura ambiente. Cada ejemplar fue guardado en un sobre y etiquetado indicando el lugar de procedencia, coordenadas geográficas, altitud, hábitat, tipo de vegetación, fecha de colecta, colectores y código de extracción de ADN. Finalmente el material fue depositado en el Herbario MAF de la Facultad de Farmacia de la UCM.

Extracción de ADN.

La extracción del ADN se realizó en especímenes frescos recolectados durante el tiempo que duró el presente estudio, así como en especímenes de herbario de no más de cinco años de antigüedad.

Se seccionaron los lóbulos periféricos del talo vegetativo de los especímenes utilizando hojas de afeitar así como pinzas de disección. Con la ayuda de una lupa binocular (Leica Wild M8), además de un pincel y pinzas, se realizaron los cortes y se eliminaron toda clase de impurezas visibles. Estos pequeños fragmentos (aprox. 15 mg) fueron colocados dentro de tubos eppendorf estériles de 1.5 mL rotulados. Se adicionaron 400 μ L de acetona a cada tubo para eliminar los metabolitos secundarios producidos por los líquenes. Al cabo de una hora, se eliminó la acetona de las muestras y se permitió su ventilación durante unas dos horas más. Para facilitar la extracción de ADN, los fragmentos de líquenes fueron pulverizados utilizando varillas de vidrio; este proceso se facilitó sumergiendo cada eppendorf en nitrógeno líquido, de esta forma los trozos de talo se congelaban y su pulverización era más rápida y fácil. Una vez pulverizado se procedió a utilizar los buffers de extracción. Para la extracción del ADN total se

utilizó el DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Barcelona), de acuerdo a las instrucciones del fabricante, con ligeras modificaciones descritas por Crespo *et al.* (2001) y Blanco (2004).

Amplificación de regiones de ADN

La amplificación del ADNr se llevó a cabo utilizando los cebadores: ITS 1F (Gardes & Bruns 1993), ITS 4a (White *et al.* 1990), ITS-1LM (Myllys *et al.* 1999) e ITS-2KL (Lohtander *et al.* 1998) para la región ITS nuclear (Internal Transcribed Spacer, ITS); ML3 y ML4 (Printzen 2002) para la subunidad mayor del ADN mitocondrial (mtLSU); EFA-F y EFA-R (Johannesson *et al.* 2000) para el factor de elongación 1 alpha (EFA); LROR (Rehner & Samuels 1994), Al2R (Mangold *et al.* 2008), LR5 y LR6 (Vilgalys & Hester 1990) para la subunidad mayor del ADN nuclear (nuLSU); así como mrSSU1 y mrSSU3R (Zoller *et al.* 1999) para la subunidad menor del ADN mitocondrial (mtSSU).

Para la amplificación de las cinco regiones se preparó una mezcla de reacción de 20 o 50 μL por muestra y por región conteniendo buffer 10x con 2 mM de MgCl_2 , dNTPs (10 mM de cada base), cebadores (10 μM), ADN polimerasa (1 U μL^{-1}), agua estéril, y la muestra de ADN diluido (10%). Las cantidades por reacción se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Componentes utilizados para la amplificación de fragmentos de ADN.

Componente	20 μL	50 μL
H ₂ O	13.1	27.75
Buffer	2	5
dNTPs	0.4	1
Cebador Fw	1	2.5
Cebador Rev	1	2.5
Polimerasa	0.5	1.25
ADN diluido (10%)	2	10

Para algunas muestras que presentaron problemas de amplificación se utilizó el Pure Taq Ready-To-Go PCR Beads (GE Healthcare, Reino Unido). Cada uno de los beads contenía estabilizadores, BSA, dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 2.5 unidades de ADN polimerasa puReTaq y *buffer* de reacción, y se disolvieron sobre un volumen final de 25 μ L que contenían 17 μ L de agua estéril, 1.5 μ L de cada cebador y 5 μ L de la muestra de ADN diluido. Con este volumen la concentración de cada dNTP fue de 200 μ M in 10 mM Tris-HCl (pH 9.0 a temperatura ambiente), 50 mM de KCl y 1.5 mM de MgCl₂.

Las amplificaciones se realizaron en un termociclador automático (Techne Progene), utilizando los parámetros descritos en la Tabla 2. Para la región mtLSU se utilizó un segundo protocolo compuesto por dos variantes en la temperatura de anillamiento, en el primero se realizaron seis ciclos con la temperatura de anillamiento descendiendo 1°C cada siguiente ciclo (*touchdown*) empezando con una temperatura inicial de 63°C (30 seg.), este proceso fue seguido con 34 ciclos con una temperatura de anillamiento de 40°C (30 seg.); las temperaturas así como los tiempos de desnaturalización y elongación de la cadena fueron los mismos (95°C por 30 seg. y 72 °C por 1 min., respectivamente) para cada ciclo. La extensión final se hizo a 72°C por 10 min.

Tabla 2. Programas de amplificación de las regiones ITS, nuLSU, mtSSU, EFA y mtLSU.

	ITS, nuLSU, mtSSU y EFA			mtLSU*		
	Nº ciclos	T (°C)	Tiempo (min.)	Nº ciclos	T (°C)	Tiempo (min.)
Desnaturalización	1	94	5	1	94	10
Amplificación		94	1		94	1
	35	52-56	1	35	47	1
		72	1,5		72	3
Extensión final	1	72	10	1	72	10

*Segundo protocolo descrito en el texto.

La visualización de los productos de la PCR se realizó por electroforesis en geles de agarosa al 1% (p/v) con tampón TAE (Sambrook *et al.* 1989) (0.02%). El gel contenía 2-5 μ L de SYBR Green (Invitrogen). En los pocillos se aplicaron 4 μ L de producto de amplificación. La electroforesis se llevó a cabo a 120 V por un espacio de 20 minutos para un gel de 7x10 cm. Los geles se visualizaron en un transiluminador de luz UV (Upland CA 91786 USA), estimando su concentración y tamaño por comparación con un patrón de peso molecular (AmpliSize™ Molecular Ruler 50–2,000 bp Ladder Bio-Rad).

Los productos de PCR fueron purificados utilizando un kit de columnas Bioclean (Biotools, Madrid), siguiendo las instrucciones del fabricante, con ligeras modificaciones detalladas en Blanco (2004); también se utilizó la enzima ExoSAP-IT (USB) para lo cual se añadieron 2 μL de la enzima a una muestra de 10 μL de producto de PCR. La mezcla se colocó en el termociclador con el siguiente programa: 37°C por 15 min, 80°C por 30 min y enfriamiento a 4°C por tiempo indeterminado. Los resultados de ambas técnicas de purificación no mostraron diferencias.

Secuenciación y edición de secuencias

Los productos purificados (10 – 30 ng/ μL) se secuenciaron en el Centro de Genómica (Parque Científico de Madrid). La secuenciación se realizó utilizando el kit de reacción ABI Prism Dye Terminator Cycle Sequencing Ready (Applied Biosystems) con ambos cebadores de amplificación. Las condiciones de las reacciones de secuenciación fueron: 94 °C por 3 min, y 25 ciclos de 96 °C por 10 seg, 50-55 °C por 5 seg y 60 °C por 4 min. Las reacciones de secuenciación se analizaron en un secuenciador de ADN 3730 (Applied Biosystems).

Los fragmentos de secuencias obtenidas en direcciones 5' -> 3' y 3' -> 5' fueron ensamblados y editados manualmente utilizando el programa BioEdit 7.0.9.0 (Hall 1999). Con las secuencias editadas, se procedió a la elaboración de matrices de cada una de las regiones, así como de matrices combinadas.

En total se produjeron 1207 nuevas secuencias, de las cuales 1161 han sido incorporadas a la base de datos del GenBank.

CAPÍTULO I

Especies crípticas dentro
del género *Parmelina*

CHAPTER I

Cryptic species within
Parmelina genus

1.1 Abstract.

Parmelina tiliacea is a common, widely distributed species in south-western Europe, easily identifiable by morphology and much used as an air pollution bioindicator in many regions. A molecular phylogenetic survey of samples from many geographical areas, using Maximum Parsimony and Bayesian inference of nuITS and mtLSU rDNA regions, revealed a group of samples geographically restricted to a small region of the Iberian Peninsula and genetically separated from the other *P. tiliacea* specimens studied. These samples are morphologically indistinguishable from *P. tiliacea*, apart from subtle anatomical characters in the ascomata (hyphae of the exciple and ascospore width), which are frequently absent. Although geographically different, the two taxa occupy similar habitats and are even sympatric in some areas, indicating that they do not exchange genetic material. This previously overlooked, and apparently endemic lineage, is described as *P. cryptotiliacea* sp. nov., and the name *Lichen tiliaceus* is epitypified by a sequenced specimen to fix the application of *Parmelina tiliacea* to the widespread genotype. A second unexpected result was the discovery that the morphologically distinct *P. pastillifera* was nested within *P. tiliacea*. These two cases stress the need to use molecular tools to elucidate species concepts even within widespread morphologically well characterized macrolichens. Such investigations are necessary to improve our understanding and estimation of biodiversity, and to facilitate the development of sound biodiversity conservation strategies for lichens.

Keywords: genetic distances, mitochondrial LSU, nuclear ITS, *Parmelina cryptotiliacea*, phylogeny.

1.2 Introducción.

Se denomina especies crípticas a aquellos linajes filogenéticos independientes que exhiben o aparentan una morfología similar, por lo que fueron o han sido clasificados como una única especie (Bickford *et al.* 2007, Crespo & Pérez-Ortega 2009, Crespo & Lumbsch 2010). Las investigaciones filogenéticas moleculares han dado lugar a la detección de estas especies crípticas en diferentes organismos, como por ejemplo medusas (Dawson & Jacobs 2001), peces (Colborn *et al.* 2001), mariposas (Hebert *et al.* 2004), diatomeas (Amato *et al.* 2007) así como hongos (Pringle *et al.* 2005, Le Gac *et al.* 2007), entre ellos los líquenes (Crespo & Lumbsch 2010, Spribille *et al.* 2011). Dentro de la familia Parmeliaceae, en el grupo de los parmelioides, también se han citado algunos

casos, como por ejemplo *Parmelia ernstiae* (Feuerer & Thell 2002), *P. serrana* (Molina *et al.* 2004), *P. barrenoae* (Divakar *et al.* 2005a), *P. encryptata* (Molina *et al.* 2011), y *Melanelixia californica* (Divakar *et al.* 2010a).

Este concepto no ha sido ajeno al género *Parmelina*, donde se demostró la presencia de dos nuevas especies (*P. coleae* y *Austroparmelia elixia*) y la confirmación de otra (*P. carporrhizans*) a partir de lo que se consideraba una sola especie (*P. quercina*), apoyados en la combinación de caracteres moleculares, morfológicos y geográficos (Argüello *et al.* 2007), aunque, dadas las diferencias morfológicas encontradas por los autores, el término de especies crípticas no es estrictamente aplicable.

Con estas modificaciones y hasta antes del presente estudio, el género *Parmelina* incluía siete especies que se distribuyen en las regiones templadas del hemisferio norte (Elix 1993, Argüello *et al.* 2007, Clerc & Truong 2008). *Parmelina coleae* se limita a la costa occidental de América del Norte, *P. gyrophorica* solo se conoce del sur de China (Wang *et al.* 2000), y las otras cinco especies se distribuyen en el oeste y centro de Europa, extendiéndose algunas de ellas hasta Asia. Tres de estas cinco especies se caracterizan por presentar solo apotecios: *P. quercina*, *P. carporrhizans*, y *P. atricha* (Poelt & Vězda 1977; Nimis 1993; Clerc & Truong 2008), mientras que *P. tiliacea* y *P. pastillifera* se caracterizan por presentar isidios, aunque no es raro que simultáneamente presenten apotecios (Schauer 1965, Hale 1976b).

Sin embargo, la posibilidad de encontrar especies crípticas en alguna especie del género que presentara reproducción asexual no se había explorado; razón por la cual se seleccionó con este fin *Parmelina tiliacea*, dado que tiene un mayor ámbito geográfico que *P. pastillifera*. La distribución geográfica de *P. tiliacea* comprende Europa, Islas Canarias, el norte de África y el Medio Oriente, llegando hasta el subcontinente indio. Esta especie se comporta como una epífita o saxícola muy común en todas las regiones del centro de la Península Ibérica, frecuente en todo el suroeste de Europa, creciendo entre los 200-1500 m.s.n.m., aunque también ha sido encontrada a nivel del mar y a elevaciones próximas a los 3000 m.s.n.m. como en la India (Divakar & Upreti 2005). Debido a su escasa frecuencia en el norte de Europa, en algunos países como Dinamarca, Países Bajos, Polonia y Alemania está considerada una especie amenazada (Liška *et al.* 2006). Se desconocían las relaciones filogenéticas con otras especies de *Parmelina*, aunque estudios previos la sitúan como especie hermana de *P. pastillifera* (Blanco *et al.* 2006, Argüello *et al.* 2007, Crespo *et al.* 2007, Crespo *et al.* 2010b).

En el presente estudio se pretendió determinar si *P. tiliacea* constituía un clado monofilético o si existen especies crípticas dentro de su circunscripción actual. Las relaciones filogenéticas fueron evaluadas mediante el análisis de dos loci independientes (nuITS y mtLSU) con ejemplares procedentes de distintas zonas del área de distribución de la especie. Los caracteres morfológicos fueron re-evaluados y comparados con los datos moleculares.

1.3 Materiales y métodos.

Muestreo de ejemplares

Las muestras de *Parmelina tiliacea* se recolectaron en distintas localidades que presentaban diferente ecología y elevación a lo largo del rango de distribución de la especie. Las localidades incluyeron la Península Ibérica, Islas Canarias, Marruecos, Turquía, Francia, Alemania, Austria, Italia, Eslovenia, Túnez, e India. Los detalles de las localidades, códigos de herbario y números de GenBank se muestran en la Tabla 3 (mayores detalles en Anexo 1). También se incluyeron en el análisis filogenético muestras de otras especies de *Parmelina*: *P. carporrhizans* de Turquía e Islas Canarias, *P. coleae* de EE.UU., *P. atricha* de la vertiente francesa del Pirineo, *P. pastillifera* de la Península Ibérica y Turquía, y *P. quercina* de Turquía. Dos especies del género *Myelochroa*: *M. galbina* y *M. metarevoluta*, fueron utilizadas como grupos externos por considerarse grupo hermano del género *Parmelina* (Blanco *et al.* 2006, Crespo *et al.* 2007).

Extracción de ADN y amplificación

El presente estudio se realizó utilizando secuencias de las regiones ITS y mtLSU del ADN del micobionte. Para la extracción y amplificación se utilizaron los protocolos indicados en el apartado METODOLOGIAS COMUNES A LOS ESTUDIOS REALIZADOS.

Alineamiento de secuencias y análisis filogenéticos

Se elaboraron tres matrices individuales (una para cada gen y otro con la combinación de los dos genes) con todos los ejemplares citados en la Tabla 3. Para cada matriz se alinearon las secuencias de ADN utilizando el programa ClustalW Multiple (Thompson *et*

al. 1994), donde las regiones ambiguas se excluyeron manualmente. Las matrices alineadas fueron analizadas utilizando los métodos de máxima parsimonia (MP) y el análisis Bayesiano Markov Chain Monte Carlo (B/MCMC) (Larget & Simon 1999, Huelsenbeck *et al.* 2000).

Tabla 3. Especímenes incluidos en el análisis filogenético, con detalles del número de herbario, país de procedencia y códigos de GenBank.

Especie	Nº Herbario	Localidad	Códigos Genbank	
			ITS	mtSLU
<i>Parmelina tiliacea</i>				
<i>P. tiliacea</i> 1	MAF-Lich 16456	Turquía	JF756977	JF757026
<i>P. tiliacea</i> 2	MAF-Lich 16464	Francia	JF756982	JF757031
<i>P. tiliacea</i> 3	MAF-Lich 16458	Túnez	JF756987	JF757036
<i>P. tiliacea</i> 4	MAF-Lich 16482	España, Islas Canarias	JF756984	JF757033
<i>P. tiliacea</i> 5	MAF-Lich 16452	España	JF756979	JF757028
<i>P. tiliacea</i> 6	MAF-Lich 16457	España	JF756986	JF757035
<i>P. tiliacea</i> 7	MAF-Lich 16486	Marruecos	JF756976	JF757025
<i>P. tiliacea</i> 8	MAF-Lich 16470	España, Islas Canarias	JF756983	JF757032
<i>P. tiliacea</i> 9	MAF-Lich 16484	India	JF756978	JF757027
<i>P. tiliacea</i> 10	MAF-Lich 16483	Italia	JF756985	JF757034
<i>P. tiliacea</i> 11	MAF-Lich 16485	Alemania	JF756989	JF757038
<i>P. tiliacea</i> 12	MAF-Lich 16618	Austria	JF756991	JF757040
<i>P. tiliacea</i> 13	MAF-Lich 16619	Eslovenia	JF756992	JF757041
<i>P. tiliacea</i> 14	MAF-Lich 15350	Portugal	JF756981	JF757030
<i>P. tiliacea</i> 15	MAF-Lich 16467	España	JF756980	JF757029
<i>P. tiliacea</i> 16	MAF-Lich 16466	España, Islas Baleares	JF756990	JF757039
<i>P. tiliacea</i> 17	MAF-Lich 16468	Marruecos	JF756988	JF757037
<i>Parmelina pastillifera</i>				
<i>P. pastillifera</i> 1	MAF-Lich 16473	España	JF756998	JF757020
<i>P. pastillifera</i> 2	MAF-Lich 16472	España	JF756999	JF757021
<i>P. pastillifera</i> 3	MAF-Lich 16471	Turquía	JF756997	JF757019
<i>Parmelina atricha</i>				
<i>P. atricha</i>	MAF-Lich 15524	Francia	JF756965	
<i>Parmelina carporrhizans</i>				
<i>P. carporrhizans</i> 1	MAF-Lich 16477	España, Islas Canarias	JF756995	JF757007
<i>P. carporrhizans</i> 2	MAF-Lich 16474	España, Islas Canarias	JF756996	JF757008
<i>P. carporrhizans</i> 3	MAF-Lich 16476	Turquía	JF756994	JF757006
<i>P. carporrhizans</i> 4	MAF-Lich 16475	Turquía	JF756993	JF757005
<i>Parmelina quercina</i>				
<i>P. quercina</i> 1	MAF-Lich 16197	Turquía	JF757000	JF757022
<i>P. quercina</i> 2	MAF-Lich 16193	Turquía	JF757001	JF7570023

<i>P. quercina</i> 3	MAF-Lich 16194	Turquía	JF757002	JF7570024
<i>Parmelina coleae</i>				
<i>P. coleae</i> 1	MAF-Lich 16479	Estados Unidos	JF756966	JF757009
<i>P. coleae</i> 2	MAF-Lich 16481	Estados Unidos	JF756967	JF757010
<i>P. coleae</i> 3	MAF-Lich 16480	Estados Unidos	JF756968	JF757011
<i>Parmelina cryptotiliacea</i>				
<i>P. cryptotiliacea</i> 1	MAF-Lich 16451	España	JF756970	JF757013
<i>P. cryptotiliacea</i> 2	MAF-Lich 16449	España	JF756975	JF757018
<i>P. cryptotiliacea</i> 3	MAF-Lich 16461	España	JF756974	JF757017
<i>P. cryptotiliacea</i> 4	MAF-Lich 16454	España	JF756972	JF757015
<i>P. cryptotiliacea</i> 5	MAF-Lich 16450	España	JF756969	JF757012
<i>P. cryptotiliacea</i> 6	MAF-Lich 16453	España	JF756973	JF757016
<i>P. cryptotiliacea</i> 7	MAF-Lich 16455	España	JF756971	JF757014
<i>Myelochroa</i>				
<i>M. galbina</i>	MAF-Lich 10414	China	DQ279531*	-
<i>M. metarevoluta</i>	MAF-Lich 10208	China	AY611102+	-

La heterogeneidad de la señal filogenética entre las dos matrices de datos (nuITS y mtLSU) fue examinada con los métodos de MP y Bayesiano (Wiens 1998, Buckley *et al.* 2002, Divakar *et al.* 2010b). Para detectar los niveles significativos de incongruencias localizadas entre las dos particiones de genes y la matriz concatenada, se utilizaron el nivel de confianza del bootstrap (MP) y las probabilidades posteriores (B/MCMC). Se estimaron el conjunto de topologías que presentaban un valor de bootstrap superior o igual al 75% para MP, y superior o igual al 95% para probabilidades posteriores de la inferencia bayesiana (Hillis & Bull 1993). Dado que no se encontraron conflictos, se asumió que los dos conjuntos de datos eran congruentes y podían combinarse, por lo que se utilizó la matriz combinada para realizar el análisis filogenético de los clados.

El análisis de máxima parsimonia (MP) se realizó utilizando el programa PAUP * 4.0b10 (Swofford 2003) a través del portal www.biportal.uio.no dando a todos los caracteres igual ponderación, mientras que los *gaps* (-) fueron interpretados como datos ausentes. Una búsqueda heurística con 100 repeticiones adicionales al azar de los taxones se generó seleccionando las opciones de bisección-reconexión de árboles (*Tree Bisection-Reconnection*, TBR), intercambio de ramas (*branch swapping*) y salvando múltiples árboles (*Multrees*) que presenta el programa. Adicionalmente, se utilizó un bootstrap no paramétrico para evaluar la solidez de los clados (Felsenstein 1985), analizando 4000 pseudorréplicas con la misma configuración que en la búsqueda heurística. Solo aquellos clados que presentaban un valor de bootstrap por encima del 75% se consideraron con

soporte estadístico válido. Para evaluar los niveles de homoplasia se calculó el índice de consistencia (CI) y el índice de retención (RI) de cada búsqueda de parsimonia. El árbol consenso 50% majority-rule se visualizó utilizando el programa TreeView (Page 1996).

El análisis bayesiano se realizó utilizando el programa MrBayes 3.1.2 (Huelsenbeck & Ronquist 2001) utilizando una matriz particionada con ambos loci (ITS y mtLSU). Las probabilidades posteriores de cada rama del árbol se aproximaron utilizando el método de cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC), el cual cuenta la frecuencia de árboles que presentan la misma correspondencia de taxones durante el curso del análisis MCMC. El análisis se realizó asumiendo un modelo general de tiempo reversible (GTR) (Rodríguez *et al.* 1990), incluyendo la estimación de los sitios invariables, así como una distribución gamma discreta con seis categorías (GTR + I + G); con lo cual se asumió que cada nucleótido tiene una tasa de evolución diferente (Blanco 2004). El análisis se ejecutó con 2 millones de generaciones, empezando con un árbol al azar y empleando 8 cadenas simultáneas. Los muestreos se hicieron cada 100 árboles, llegando a obtener un total de 20000 árboles. Los resultados de las probabilidades logarítmicas de los puntos de muestreo fueron trazados en función del tiempo de generación, utilizando el programa TRACER 1.5 (Rambaut & Drummond 2009), para asegurarnos que los valores de probabilidad de registro alcanzaron un valor de equilibrio estable (Huelsenbeck & Ronquist 2001). Los primeros 2000 árboles fueron descartados. A partir de los 18000 árboles restantes se obtuvo un árbol consenso 50% *majority-rule* que mostraba el soporte estadístico que presentaba cada rama. El árbol consenso se visualizó utilizando el programa TreeView (Page 1996), donde *M. metarevoluta* y *M. galbina* fueron utilizadas como grupo externo. A diferencia de los valores de *bootstrap* no paramétricos (Felsenstein 1985), este método estima las probabilidades de los clados a partir de un modelo de evolución asumido (Rannala & Yang 1996). Las probabilidades posteriores $\geq 95\%$ se consideraron como soportes estadísticos significativos (Rannala & Yang 1996).

Test de hipótesis.

Como los resultados del análisis filogenético son incongruentes con el concepto actual de especie de *Parmelina tiliacea*, se examinó si los datos eran suficientes para rechazar la monofilia de esta especie. Se utilizaron dos métodos: 1) la prueba de Shimodaira-Hasegawa (SH) (Shimodaira & Hasegawa 1999), y 2) el peso esperado de la verosimilitud (Expected Likelihood weight, ELW) propuesto por Strimmer & Rambaut (2002). Se

comparó el árbol ML constreñido a tener *P. tiliacea* como grupo monofilético y el árbol de ML sin restricciones. Las pruebas de SH y ELW se efectuaron utilizando el programa Tree-PUZZLE 5.2 (Schmidt *et al.* 2004) con la matriz combinada de datos en una muestra con 200 árboles (los mejores árboles concordantes con la hipótesis nula) y el árbol ML no restringido. Estos árboles se infirieron en TREE-PUZZLE empleando el modelo de sustitución de nucleótidos GTR + I + G.

Distancias genéticas.

Se calcularon las distancias de máxima verosimilitud entre pares de bases de las secuencias de ITS, dadas por el número de sustituciones de nucleótidos por sitio, utilizando el programa Tree-PUZZLE 5.2 (Schmidt *et al.* 2004). Para ello se utilizó el modelo de sustitución de nucleótidos HKY + G (Hasegawa *et al.* 1985) con variación entre sitios asumiendo una distribución gamma discreta con seis categorías. Los caracteres ambiguos y haplotipos repetidos fueron eliminados de la matriz (Del-Prado *et al.* 2010).

Análisis morfológico y químico.

Todas las muestras incluidas en el análisis molecular (Tabla 3) se revisaron morfológicamente. En las muestras que presentaban apotecios se estudiaron el tamaño y forma de las ascósporas. Utilizando un microscopio binocular, se cortaron a mano secciones de apotecios con una hoja de afeitar, y se montaron en agua destilada. Las ascósporas y secciones longitudinales de los apotecios fueron observadas y fotografiadas con un microscopio óptico (Leitz DMRB). Las medidas de la longitud y anchura se tomaron en 20 ascósporas bien desarrolladas por muestra, a 1000x de aumento. La descripción de la forma de las esporas sigue las propuestas de Kirk *et al.* (2008). Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software Statgraphics Plus 5.1.

Los análisis químicos fueron realizados por cromatografía en capa fina con los métodos estándar para todas las muestras analizadas (Culbertson 1972; Elix & Ernst Russell-1993; Orange *et al.* 2001).

1.4. Resultados.

Análisis filogenéticos.

Se generaron setenta y seis nuevas secuencias para este estudio, incluyendo 38 de ITS rDNA y 39 de mtLSU rDNA. Las matrices alineadas contaban con 436 posiciones inequívocas de nucleótidos para ITS y 668 para mtLSU. La comparación de la topología de los árboles de MP y bayesiano, basado en los genes individuales, no mostró conflictos soportados (Fig. 5 y Fig. 6), por lo que ambas regiones se combinaron para aumentar la resolución de los clados.

El análisis de MP de la matriz combinada obtuvo 30 árboles más parsimoniosos (longitud del árbol = 259 pasos, CI = 0.8147, RI = 0.9159). Treinta y seis posiciones en la matriz fueron parsimónicamente no informativas y 145 fueron informativas. Para el análisis Bayesiano, los parámetros de verosimilitud mostraron los siguientes valores promedio [\pm desviación estándar (DE)]: verosimilitud (lnL) = -3,095.525 (0.2307), frecuencias de base $\pi(A) = 0.2097$ (0.0003), $\pi(C) = 0.2829$ (0.0003), $\pi(G) = 0.2644$ (0.0003), $\pi(T) = 0.243$ (0.0003); tasa de matrices $r(AC) = 0.1256$ (0.0007), $r(AG) = 0.1365$ (0.0007), $r(AT) = 0.1667$ (0.0009), $r(CG) = 0.0764$ (0.0005), $r(CT) = 0.4096$ (0.001), $r(GT) = 0.0851$ (0.0005); parámetro de forma gamma $\alpha = 90.139$ (2.8764) y pinvar = 0.5757 (0.0045).

La topología del árbol (Fig. 7) reveló que las muestras de *P. carporrhizans*, *P. coleae* y *P. quercina* forman clados monofiléticos con soporte estadístico. *Parmelina atricha* se muestra como clado hermano de *P. carporrhizans*, sin embargo otras relaciones entre especies carecen de soporte estadístico. Por otro lado, las muestras de *P. tiliacea* se separaron en dos grupos independientes (clados A y B), cada una con un apoyo estadístico significativo. El clado A de *P. tiliacea* incluye especímenes de una amplia área geográfica así como muestras de *P. pastillifera*. El clado B incluye solo muestras provenientes del centro de España. La monofilia de *P. tiliacea* como una sola especie (incluidos los subtipos A y B) fue rechazada de manera significativa ($P < 0.002$) en las pruebas de SH y ELW. Se obtuvo idéntico resultado incluyendo o excluyendo *P. pastillifera* en el clado A.

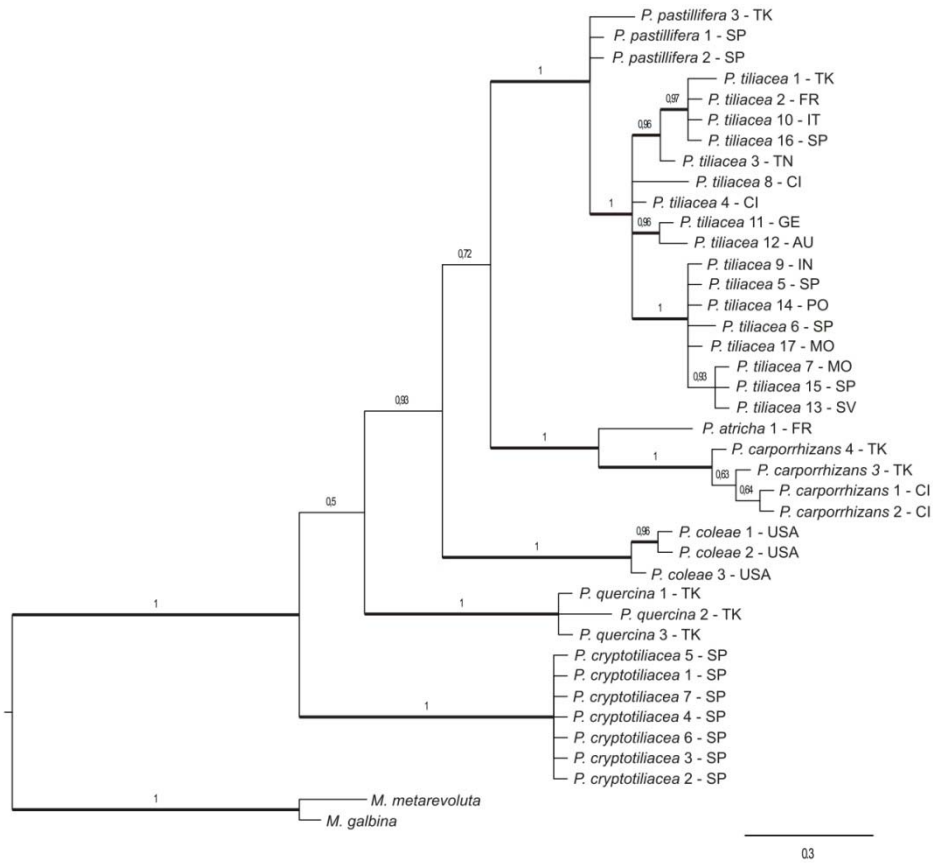


Fig. 5. Árbol consenso 50% *majority-rule* basado en 18 000 árboles a partir del análisis B/MCMC de la matriz de secuencias de ITS. Las probabilidades posteriores ≥ 0.95 en el análisis bayesiano están indicadas arriba de las ramas. Las ramas con soporte estadístico significativo en el análisis aparecen remarcadas. (AU = Austria, CI = Islas Canarias, FR = Francia, GE = Alemania, IN = India, IT = Italia, MO = Marruecos, PO = Portugal, SP = España, SV = Eslovenia, TK = Turquía, TN = Túnez, USA = Estados Unidos de Norte América).

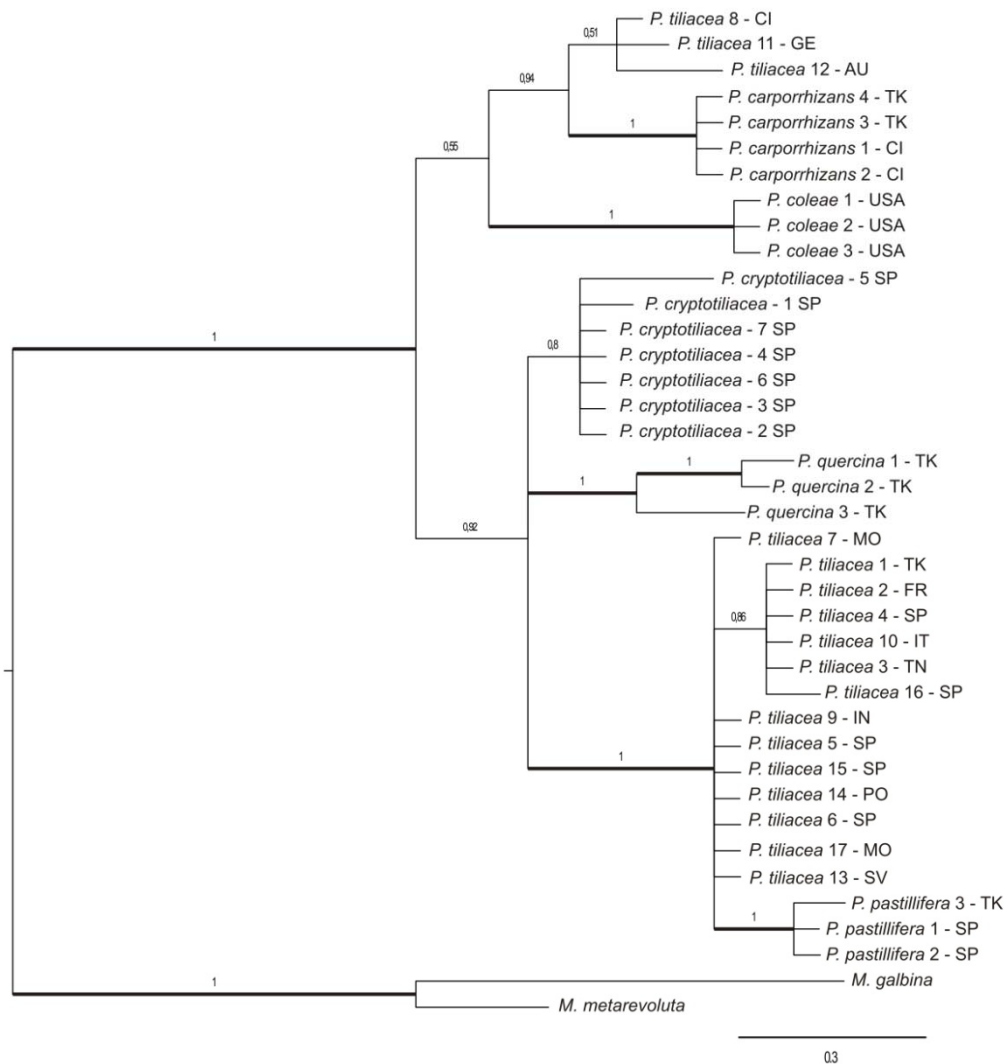


Fig. 6. Árbol consenso 50% *majority-rule* basado en 18 000 árboles a partir del análisis B/MCMC de la matriz de secuencias de mtLSU. Las probabilidades posteriores ≥ 0.95 en el análisis bayesiano están indicadas arriba de las ramas. Las ramas con soporte estadístico significativo en el análisis aparecen remarcadas. (AU = Austria, CI = Islas Canarias, FR = Francia, GE = Alemania, IN = India, IT = Italia, MO = Marruecos, PO = Portugal, SP = España, SV = Eslovenia, TK = Turquía, TN = Túnez, USA = Estados Unidos de Norte América).

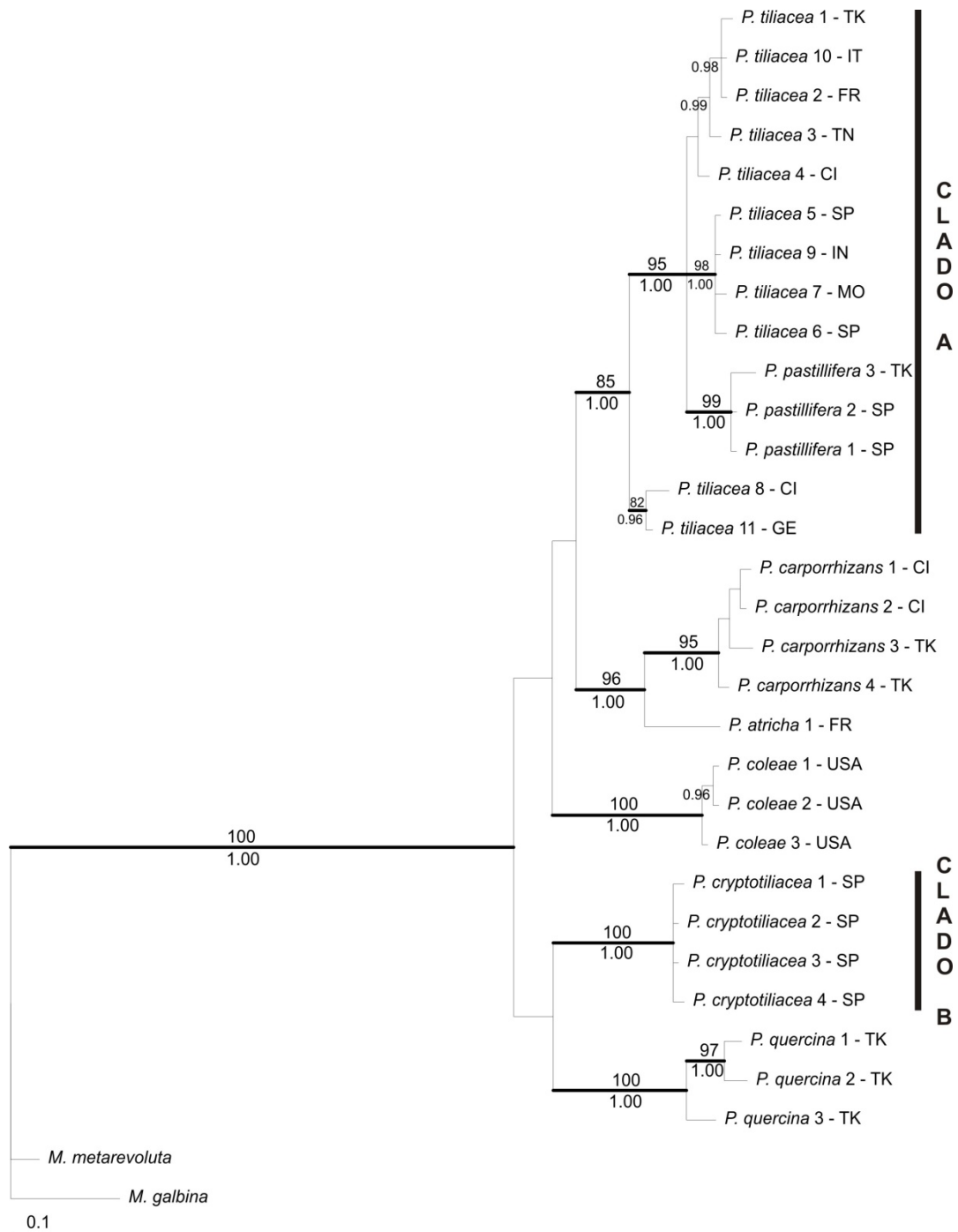


Fig. 7. Árbol consenso 50% *majority-rule* basado en 18 000 árboles a partir del análisis B/MCMC de una matriz combinada de secuencias de ITS y mtLSU. Las probabilidades posteriores ≥ 0.95 en el análisis bayesiano están indicadas arriba de las ramas y los valores de bootstrap (MP) ≥ 0.75 están debajo de las ramas. Las ramas con soporte estadístico significativo en ambos análisis aparecen remarcadas. (AU = Austria, CI = Islas Canarias, FR = Francia, GE = Alemania, IN = India, IT = Italia, MO = Marruecos, PO = Portugal, SP = España, SV = Eslovenia, TK = Turquía, TN = Túnez, USA = Estados Unidos de Norte América).

Distancias genéticas

Las distancias genéticas entre los haplotipos de la región ITS de los clados A y B se muestran en la Tabla 4. Cuando todas las muestras fueron asignadas a una sola especie, la media intraespecífica fue notablemente alta (0.030 ± 0.006 s/s), con una distancia máxima de 0.093 s/s. Por otro lado, cuando las muestras de los clados A y B se consideraban como dos especies separadas, los valores máximos de sus distancias genéticas intraespecíficas bajaron a 0.0169 s/s para el clado A y 0.002 para el clado B, y las distancias interespecíficas variaron entre 0.071 y 0.093. Estos valores mostraron poca variación cuando las muestras de *P. pastillifera* se incluyeron en el clado A (Tabla 4).

Tabla 4. Distancias genéticas entre haplotipos de ITS de los clados A y B de *P. tiliacea*.

Distancias genéticas intraespecíficas (sustituciones/sitio)	Media \pm desviación estándar	Rango
Muestras de clados A y B	0.0305 ± 0.0335	0.0023 – 0.0929
(excluyendo <i>P. pastillifera</i>)	(0.0338 ± 0.0360)	(0.0023 – 0.0929)
Muestras de clado A	0.0100 ± 0.0045	0.0023 – 0.0169
(excluyendo <i>P. pastillifera</i>)	(0.0093 ± 0.0047)	(0.0023 – 0.0167)
Muestras de clado B (<i>P. cryptotiliacea</i>)	-	0.0023
Distancias genéticas interespecíficas (sustituciones/sitio)	Promedio \pm desviación estándar	Rango
Clado A versus Clado B	0.0830 ± 0.0062	0.0712 – 0.0929
Entre todas las especies de <i>Parmelina</i>	0.0564 ± 0.0306	0.0023 – 0.1045

Morfología y química

El análisis morfológico de los apotecios de los ejemplares de ambos grupos A y B, reveló diferencias sutiles en la capa externa de las hifas que forman el excípulo. Las células del excípulo en el grupo B presentan paredes más delgadas que las del grupo A (Fig. 8). Las medidas de las ascosporas de los ejemplares de cada clado mostró que ambos grupos tienen esporas de longitud similar (clado A, media \pm SD = $10.53 \mu\text{m} \pm 1.17$, rango = 8-

15µm; clado B, media ± SD = 10.66 µm ± 0.94, rango = 9-13 µm) con una diferencia estadística no significativa ($P = 0.4130$). Por el contrario, el ancho medio de las ascósporas de ambos clados sí difieren significativamente ($P = 0.0000$): las del grupo A (media ± SD = 5.69 µm ± 0.58, rango = 5-7 µm) presentan ascósporas más anchas que las del grupo B (media ± SD = 4.51 µm ± 0.53, rango = 3-5 µm). Siguiendo la terminología propuesta por Kirk *et al.* (2008), las ascósporas de clado A son alargadas (proporción largo/ancho = 1.85), mientras que las de clado B son cilíndricas (proporción largo/ancho = 2.36). El análisis químico reveló la presencia de ácido lecanorico y atranorina en todos los ejemplares estudiados de *Parmelina*, no existiendo compuestos químicos propios de ningún clado.

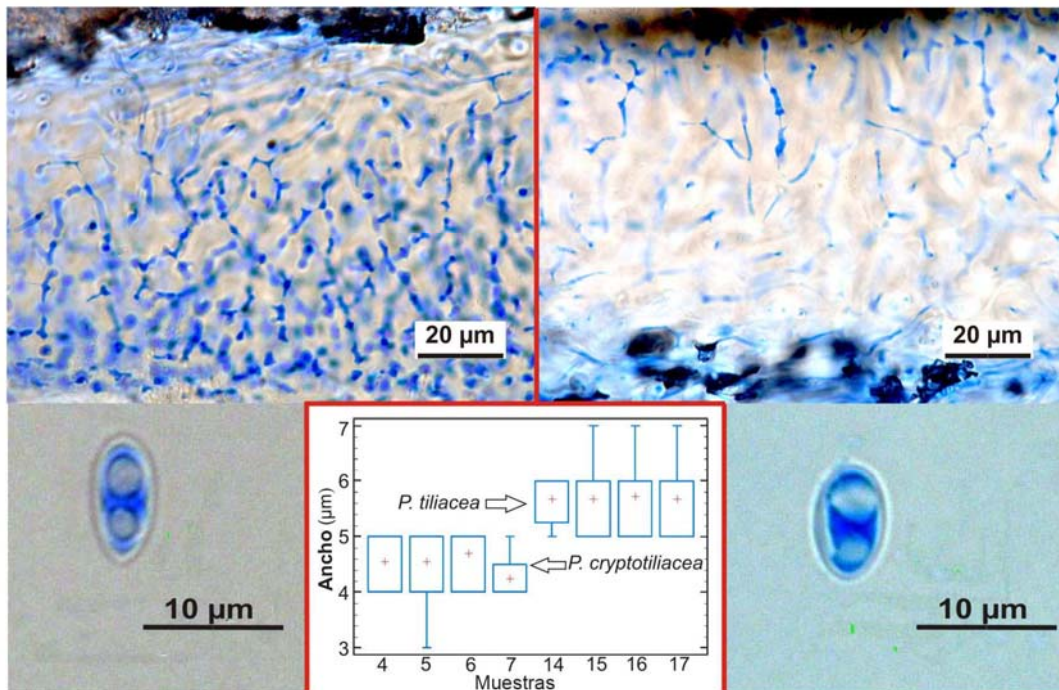


Fig. 8. Comparaciones de la anatomía del excípulo y de las esporas de *P. cryptotiliacea* (izquierda) (MAF-Lich 16453) y *P. tiliacea* (derecha) (MAF-Lich 15350); el gráfico central muestra el promedio (+), el intervalo de la mitad del 50% de los datos y el rango total del ancho de las ascósporas en los ejemplares de ambas especies. Las distancias genéticas promedio entre las especies son estadísticamente significativas ($P = <0.0001$). Detalle de las muestras en la Tabla 3.

Taxonomía

Parmelina tiliacea fue descrita como *Liquen tiliaceus* por Hoffmann en 1784; aunque se desconoce la localidad exacta donde fue colectada por primera vez, se piensa que fue recogida en el sur de Alemania. Basados en los resultados de nuestro análisis filogenético,

se proponen cambios taxonómicos para indicar que bajo el actual nombre de *P. tiliacea* se encuentran dos linajes distintos que presentan diferencias genéticas significativas, y que merecen un reconocimiento formal. Las muestras de uno de los linajes (grupo A) se asignan a *P. tiliacea*, considerando que incluye muestras de Europa Central (Alemania, Austria, Italia y Eslovenia). Para la aplicación de ese nombre en este trabajo se designa un epítipo secuenciado (MAF-Lich 16485, Fig. 10). Las muestras del clado B (que incluye solo ejemplares de España) se proponen como la nueva especie *Parmelina cryptotiliacea* sp. nov. Esta nueva especie presenta secuencias de ITS y mtLSU distintas de *P. tiliacea*, un área de distribución más restringida, así como diferencias morfológicas a nivel del ascocarpo y ascósporas.

Parmelina cryptotiliacea A. Crespo & Núñez-Zapata sp. nov.

Mycobank No.: 561685

Similis *Parmelina tiliacea* sed differte in ascosporis angusta (3–5 m latis), cellulis in hypis excipulis cum muris attenuatis, et in sequencis molecularis ITS et mtLSU.

Typus: Spain, Extremadura, Parque Natural de Monfragüe, 39°49'37.9''N 06°03'27.5''W, on *Quercus ilex* subsp. *ballota*, alt. 207 m, June 2005, H. T. Lumbsch, A. Green, P. K. Divakar & A. Argüello (MAF-Lich 16454—holotypus).

(Fig. 9)

Talo adpreso a las cortezas, de color gris mineral pálido a gris mineral; lóbulos irregularmente ramificados, sublineares a alargados, a menudo imbricados, con ápices redondeados, 2-7 mm de ancho, márgenes más o menos crenados y ondulados, no ciliado; superficie superior más o menos brillante, con máculas, por lo general pruinosa, irregularmente agrietada, densamente isidiada; *médula* blanca; superficie inferior de color negro con borde marrón, de moderada a alta densidad de rizinas, rizinas negras, simples, y 1-2 mm de longitud. Isidios cilíndricos, cortos 0.5–1.5 mm, rara vez ramificados, por lo general presentan las puntas ennegrecidas. Apotecios frecuentes y adpresos, hasta 4 mm de diámetro. Ascas con 8 ascósporas. Ascósporas de forma cilíndrica, longitud 9-13 μm ($10.66 \pm 0.94 \mu\text{m}$), ancho de 3-5 μm ($4.51 \pm 0.53 \mu\text{m}$). Picnidios no observados.

Química. Corteza superior K + amarillo; médula K-, C+ rojo, KC+ rojo, P-. Contiene atranorina y ácido lecanorico, pero no ácidos grasos.

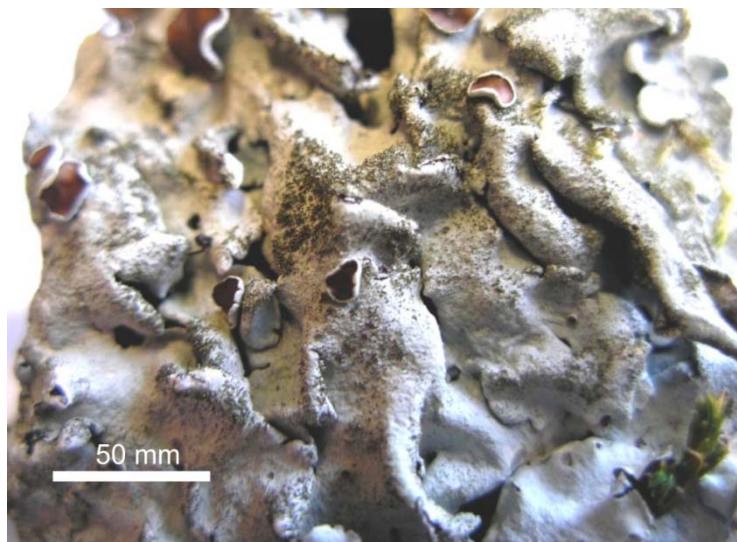


Fig. 9. *Parmelina cryptotiliacea* (MAF-Lich 16454, holotipo)

Distribución y ecología. En la actualidad la especie se conoce solo en cinco localidades de España: el Parque Nacional de Monfragüe y Navalvillar (Extremadura), El Pardo (Madrid), Puertollano y las minas de San Quintín (ambos en Castilla - La Mancha). Crece en los troncos de los árboles y sobre rocas en áreas relativamente bajas (alt. 250 - 700 m.s.n.m.) con escasa precipitación de verano. Es simpátrica con *P. tiliacea*.

Observaciones. *Parmelina cryptotiliacea* es una forma críptica de *P. tiliacea*. Cuando los ejemplares presentan apotecios, *P. cryptotiliacea* puede ser diferenciada de *P. tiliacea* por sus ascósporas más estrechas (ancho 3 - 5 μm , en comparación con 5 - 7 μm en *P. tiliacea*) así como por las paredes más delgadas de las células del excípulo. Sin embargo, para ejemplares que carecen de apotecios, la comparación de secuencias de ITS es la manera más fiable de distinguir esta especie críptica.

Parmelina tiliacea (Hoffm.) Hale

Phytologia 28: 481 (1974).—*Lichen tiliaceus* Hoffm., Enum. Lich.: 96 (1784); type: Europe, *sine loc.*, *op. cit.*: tab. 16 fig. 2 (—lectotype designated by Jørgensen 1972); Germany, Bavaria, Oberfranken, Kteis Forchheim, Ehrenburg, alt. 450 m, on *Tilia platyphyllos*, 27 September 2009, W.&G. Brachel (MAF-Lich 16485— **epitypus hic designatus**).

Para los sinónimos, véase Hale (1976b) y Dobson & Hawksworth (1976).

Observaciones. Jørgensen (1972) designó la ilustración original de *Parmelina tiliacea* (Hoffman 1784) como lectotipo debido a que no se ha localizado ningún material

recogido y nombrado por Hoffmann antes de 1784. Existe material recolectado por Hoffmann en el herbario de Moscú (MW), que fue estudiado por Peter W. James en 1975, y que corresponde al concepto actual que se tiene de la especie; pero como dicho material no fue localizado y además fue probablemente recolectado después de 1804 no puede ser tratado como material original apropiado para lectotipificación (Dobson & Hawksworth 1976). Con el objetivo de corregir la aplicación del epíteto de Hoffmann de forma que pueda ser utilizado en el presente trabajo, hemos designado a un ejemplar recolectado en el sur de Alemania y secuenciado (MAF-Lich 16485), como el epítipo para *P. tiliacea* (Fig. 10).

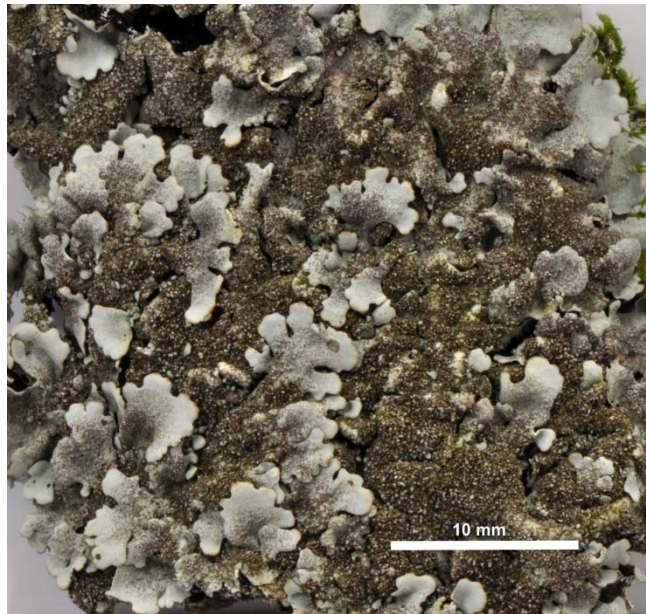


Fig. 10. *Parmelina tiliacea* (MAF-Lich 16485, epítipo).

1.5 Discusión.

Dentro de la familia Parmeliaceae parece ser bastante común encontrar especies crípticas, sobre todo en el seno de aquellas especies que presentan una distribución amplia o intercontinental, como se señaló anteriormente. La especie críptica encontrada dentro de *P. tiliacea s. lat.* no fue detectada en investigaciones anteriores (Blanco *et al.* 2004a, 2006, Thell *et al.* 2004; Argüello *et al.* 2007). La presente investigación, en la cual se amplió el muestreo a lo largo de todo el ámbito geográfico de la especie, detectó la variabilidad de haplotipos entre y dentro de las poblaciones de *P. tiliacea s. lat.*

La topología del árbol basada en dos loci independientes (ITS y mtLSU), así como las pruebas de hipótesis SH y ELW, indicaron que los ejemplares de *P. tiliacea* no forman un grupo monofilético; por el contrario forman dos linajes independientes, cada uno con soporte estadístico (clados A y B, Fig. 7) denominados aquí como *P. tiliacea* s. str. y *P. cryptotiliacea*, respectivamente. El análisis de distancias genéticas entre los haplotipos de nuITS también es compatible con la separación de los dos linajes independientes: la asignación de todas las muestras a una sola especie dio una media intraespecífica muy alta (0.030 ± 0.006 s/s), con una distancia máxima (0.093 s/s) que es cuatro a cinco veces mayor que los valores encontrados en otras especies de *Parmelina* (por ejemplo, *P. quercina* media = 0.007 ± 0.004 s/s, distancia máxima = 0.013 s/s, Del Prado *et al.* 2010); mientras que cuando los clados A y B se consideraron como especies separadas (*P. tiliacea* y *P. cryptotiliacea*), sus distancias intraespecíficas caen dentro del rango de especie encontrado para otras especies de Parmeliaceae (0.017 s/s; Del Prado *et al.* 2010).

Cabe señalar que las distancias genéticas entre los haplotipos de ITS del clado A, entran dentro del rango general intraespecífico, incluso incluyendo los haplotipos de *P. pastillifera*. Estos datos sugieren que genéticamente *P. pastillifera* está estrechamente relacionada con *P. tiliacea*, a pesar de los rasgos morfológicos distintivos (isidios con apariencia de botón frente a los isidios cilíndricos de *P. tiliacea*; Dobson & Hawksworth 1976) y al patrón ecológico diferente (*P. pastillifera* es mucho más común en zonas húmedas de Europa occidental que *P. tiliacea*).

Parmelina cryptotiliacea fue recolectada cerca del Sistema Central, en la zona centro-sur de la Península Ibérica, entre 250 y 700 m.s.n.m., donde las condiciones climáticas se caracterizan por escasas lluvias de verano. Sin embargo, *P. tiliacea* también resultó estar presente en las mismas localidades, aunque se debe resaltar que *P. tiliacea* tiene una distribución y un rango de altitud mucho mayor (ver Tabla 3), y por lo tanto aparentemente un grado de adaptación más amplio a diversas condiciones climáticas. La distribución conocida de *P. cryptotiliacea* muestra que crece simpátricamente con *P. tiliacea* a bajas elevaciones y que ambas especies comparten el mismo hábitat.

Las muestras de *P. tiliacea* y *P. cryptotiliacea* no se pueden distinguir morfológicamente de manera clara en ausencia de apotecios. Los tipos de poros epicorticales en la superficie superior del talo, que permiten el intercambio de gases y que se han considerado como un atributo discriminante en la taxonomía de los parmelioides (por ejemplo, *Parmelina* en

Argüello *et al.* 2007, *Melanelia* en Blanco *et al.* 2004b, el grupo parmotremonoide en Blanco *et al.* 2005) no han podido ser analizados debido a la presencia de pruina en la superficie superior de las muestras examinadas. Por otro lado, de los caracteres morfológicos estudiados en líquenes, las ascósporas no han sido sistemáticamente estudiadas principalmente debido a la frecuente ausencia de ascomas. Sin embargo Argüello *et al.* (2007) observaron una correlación entre el tamaño de ascósporas y la hipótesis filogenética, caracterizando a cada especie con una forma o tamaño de espora singular. En el presente estudio hemos confirmado la variabilidad de (aunque sutil) de los citados caracteres: ancho de las ascósporas, que tiene apoyo estadístico, y también la anatomía del excípulo. Sin embargo no hemos entrado en su análisis más profundo por razones prácticas. Ambos caracteres resultan difíciles de analizar debido a la frecuente carencia de ascomas y por otro a la variabilidad que pueden presentar dependiendo del grado de madurez de los apotecios y esporas. Por último, la química no proporciona ningún dato discriminante, ya que todas las especies del género *Parmelina* presentan los mismos compuestos químicos (Hale 1976b, Díaz-Guerra & Manrique 1984).

El presente estudio fue publicado en el año 2011 con el título: “*Conundrums in species concepts: the discovery of a new cryptic species segregated from Parmelina tiliacea (Ascomycota: Parmeliaceae)*” en la revista *The Lichenologist* 43(6): 603–616. Autores: Jano Núñez-Zapata, Pradeep K. Divakar, Ruth Del-Prado, Paloma Cubas, David L. Hawksworth y Ana Crespo.

Conundrums in species concepts: the discovery of a new cryptic species segregated from *Parmelina tiliacea* (Ascomycota: *Parmeliaceae*)

Jano NÚÑEZ-ZAPATA, Pradeep K. DIVAKAR,
Ruth DEL-PRADO, Paloma CUBAS, David L. HAWKSWORTH
and Ana CRESPO

Abstract: *Parmelina tiliacea* is a common, widely distributed species in south-western Europe, easily identifiable by morphology and much used as an air pollution bioindicator in many regions. A molecular phylogenetic survey of samples from many geographical areas, using Maximum Parsimony and Bayesian inference of nuITS and mtLSU rDNA regions, revealed a group of samples geographically restricted to a small region of the Iberian Peninsula and genetically separated from the other *P. tiliacea* specimens studied. These samples are morphologically indistinguishable from *P. tiliacea*, apart from subtle anatomical characters in the ascomata (hyphae of the exciple and ascospore width), which are frequently absent. Although geographically different, the two taxa occupy similar habitats and are even sympatric in some areas, indicating that they do not exchange genetic material. This previously overlooked, and apparently endemic lineage, is described as *P. cryptotiliacea* sp. nov., and the name *Lichen tiliaceus* is epitypified by a sequenced specimen to fix the application of *Parmelina tiliacea* to the widespread genotype. A second unexpected result was the discovery that the morphologically distinct *P. pastillifera* was nested within *P. tiliacea*. These two cases stress the need to use molecular tools to elucidate species concepts even within widespread morphologically well-characterized macrolichens. Such investigations are necessary to improve our understanding and estimation of biodiversity, and to facilitate the development of sound biodiversity conservation strategies for lichens.

Keywords: genetic distances, mitochondrial LSU, nuclear ITS, *Parmelina cryptotiliacea*, phylogeny

Introduction

Molecular phylogenetic investigations have led to the detection of many cryptic species amongst the parmelioid lichens. Examples include *Parmelia ernstiae* (Feuerer & Thell 2002), *P. serrana* (Molina *et al.* 2004), *P. barroanae* (Divakar *et al.* 2005), *P. encryptata* (Molina *et al.* 2011), and *Melanelixia californica* (Divakar *et al.* 2010a). This approach has been especially useful in *Parmelina*, where the combination of molecular and morphological information provided evidence of

polyphyly of the genus: the Australasian species appear in a clade that is unrelated to the Northern Hemisphere species, and are now accommodated in the new genus *Austroparmelina* (Crespo *et al.* 2010). At the species level, as in other organisms, speciation in lichens has not always been accompanied by morphological variation. For instance, phylogenetic analysis and detailed morphological studies found two previously overlooked morphospecies within the widespread *P. quercina*: *P. coleae* and the re-established *P. carporrhizans* (Argüello *et al.* 2007).

At present, *Parmelina* includes seven species distributed in the temperate regions of the Northern Hemisphere (Elix 1993; Argüello *et al.* 2007; Clerc & Truong 2008). *Parmelina coleae* is restricted to North America, *P. gyrophorica* is known only from

J. Núñez-Zapata, P. K. Divakar, R. Del-Prado, P. Cubas, D. L. Hawksworth and A. Crespo (corresponding author): Departamento de Biología Vegetal II, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Plaza Ramón y Cajal, 28040, Madrid, Spain. Email: acrespo@farm.ucm.es

southern China (Wang *et al.* 2000), and five other species occur in western Europe, extending to Asia. Three of those five species always have apothecia: *P. quercina*, *P. carporrhizans*, and *P. atricha* (Poelt & Vězda 1977; Nimis 1993; Clerc & Truong 2008). *Parmelina tiliacea* and *P. pastillifera*, characterized by the presence of isidia, are frequently sterile although individuals with apothecia are not unusual (Schauer 1965; Hale 1976; Divakar & Upreti 2005).

Parmelina tiliacea has a wide distribution, including Europe, northern Africa, the Middle East, Asia and the Indian subcontinent. It is a frequent epiphyte in south-western Europe, at *c.* 200–1500 m above sea level. However, this species is considered to be threatened in countries such as Denmark, The Netherlands, Poland, and Germany (Liška *et al.* 2006). Phylogenetic information about this species was, however, scarce and based on small samples. This study aimed to establish whether *P. tiliacea* was monophyletic or if cryptic species were hidden within its current circumscription, and to evaluate any implications for species conservation programmes. The phylogenetic relationships were assessed by analysis of two independent loci (nuclear ITS and mitochondrial LSU) with extensive sampling covering most of the distributional range. Samples of the isidiate species, *P. pastillifera*, found to be sister to *P. tiliacea* in previous studies (Argüello *et al.* 2007), were also included in the analysis. Morphological characters were re-evaluated and compared with the relationships found in the molecular analyses.

Material and Methods

Taxon sampling

Specimens of *Parmelina tiliacea* were collected from most of its distributional range, and from different altitudes and ecological areas. Locations included the Iberian Peninsula, the Canary Islands, Morocco, Turkey, France, Germany, Austria, Italy, Slovenia, Tunisia, and India. Details of localities, voucher specimens, and GenBank accession numbers are shown in Table 1. Samples of other *Parmelina* species were included in the phylogenetic analysis: *P. carporrhizans* from Turkey and the Canary Islands, *P. coleae* from the USA, *P. atricha* from France, *P. pastillifera* from the

Iberian Peninsula and Turkey, and *P. quercina* from Turkey (Table 1). Two closely related *Parmeliaceae*, *Myelochroa metarevoluta* and *M. galbina*, were used as an outgroup (Blanco *et al.* 2006).

DNA extraction and amplification

Small fragments of vegetative thallus from fresh or frozen herbarium specimens were ground with sterile glass pestles. Total DNA was extracted using the DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Barcelona) according to the manufacturer's instructions, slightly modified as previously described (Crespo *et al.* 2001). Double-stranded DNA amplification of the two regions was performed using the primers: 1) ITS1-LM (Myllys *et al.* 1999) and ITS2-KL (Lohtander *et al.* 1998) for the fungal nuITS rDNA region, and 2) ML3 and ML4 (Printzen 2002) for the fungal mtLSU rDNA region. For ITS amplification we used a reaction mixture of 50 µl, containing 5 µl of ×10 buffer with 2 mM MgCl₂, 1 µl of dNTPs (10 mM of each base), 2.5 µl of each primer (10 µM), 1.25 µl of DNA polymerase (1 U µl⁻¹), 27.75 µl of sterile water and 10 µl of dilute DNA template. Amplification of the mtLSU region was performed using PuRe Taq Ready-To-Go PCR Beads (GE Healthcare, UK) in a 25 µl volume containing 13.4 µl of sterile water, 2.5 U of puReTaq DNA Polymerase, 200 µM of each dNTP, BSA, buffer reaction and stabilizers (10 mM Tris-HCl pH 9.0, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂), 1.5 µl of each primer and 5 µl of dilute DNA template.

The amplifications were run in an automatic thermocycler (Techne Progene) using the following parameters for nuITS rDNA: initial denaturation for 5 min at 94°C, followed by 35 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 56°C and 1.5 min at 72°C, and a final extension of 5 min at 72°C. Parameters for mtLSU rDNA were: initial denaturation for 10 min at 94°C, followed by 35 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 47°C and 3 min at 72°C, and a final extension of 10 min at 72°C.

PCR products were cleaned using a Bioclean Columns kit (Biotools, Madrid) according to the manufacturer's instructions. Sequencing was performed using the ABI Prism Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems) with the amplification primers. Sequencing reactions were electrophoresed on a 3730 DNA analyzer (Applied Biosystem) at the Unidad de Genómica (Parque Científico de Madrid). Sequence fragments obtained were assembled and manually adjusted in BioEdit 7.0.9.0 (Hall 1999).

Sequence alignments and phylogenetic analysis

Three separate matrices (one for each gene and another with both genes combined) were constructed and aligned using the Clustal W Multiple alignment program (Thompson *et al.* 1994). Ambiguously aligned regions were excluded manually from the matrices. The alignments were analyzed by Maximum Parsimony (MP) and a Bayesian Markov Chain Monte Carlo (B/MCMC) approach (Larget & Simon 1999; Huelsenbeck *et al.* 2000). The trees were rooted using *M. galbina* and *M. metarevoluta* as an outgroup.

TABLE 1. Specimens included in the phylogenetic study, with details of location, collectors, herbarium code and GenBank accession numbers

Species	Locality	Substratum	Altitude (m)	Collectors	Herbarium	GenBank.Accession N°	
						nuITS	mtLSU
<i>Parmelina tiliacea</i> 1	Turkey, Bursa, Uludağ	<i>Quercus cerris</i>	1330	<i>A. Crespo, P. K. Divakar, M. Candan & H.T. Lumbsch</i>	MAF-Lich 16456	JF756977	JF757026
<i>P. tiliacea</i> 2	France, Provence, road between Saint-Tropez and Toulon	–	35	<i>A. Argüello</i>	MAF-Lich 16464	JF756982	JF757031
<i>P. tiliacea</i> 3	Tunisia, Jendouba, Al Mawajin	siliceous rock	698	<i>A. Quintanar</i>	MAF-Lich 16458	JF756987	JF757036
<i>P. tiliacea</i> 4	Spain, Canary Islands, Gran Canaria, Valleseco	rock	1305	<i>A. Crespo, P. Cubas, A. Santos & P. K. Divakar</i>	MAF-Lich 16482	JF756984	JF757033
<i>P. tiliacea</i> 5	Spain, Madrid, El Pardo	<i>Quercus ilex</i>	675	<i>A. Crespo & J. Núñez-Zapata</i>	MAF-Lich 16452	JF756979	JF757028
<i>P. tiliacea</i> 6	Spain, Ciudad Real, San Quintín mine	<i>Quercus ilex</i>	660	<i>A. Crespo, P. K. Divakar, P. Cubas, J. Núñez-Zapata, R. Oyarzun</i>	MAF-Lich 16457	JF756986	JF757035
<i>P. tiliacea</i> 7	Morocco, Midle Atlas, Ifrane	<i>Quercus ilex</i>	1375	<i>A. Crespo, P. K. Divakar & R. Del-Prado</i>	MAF-Lich 16486	JF756976	JF757025
<i>P. tiliacea</i> 8	Spain, Canary Islands, La Palma, road to Roque	rock	794	<i>A. Crespo, P. Cubas, A. Santos & P. K. Divakar</i>	MAF-Lich 16470	JF756983	JF757032
<i>P. tiliacea</i> 9	India, Uttarakhand, Badrinath	rock	3200	<i>P. K. Divakar</i>	MAF-Lich 16484	JF756978	JF757027
<i>P. tiliacea</i> 10	Italy, Val Trompia, Lodrino	<i>Quercus</i> sp.	710	<i>A. Crespo & P. K. Divakar</i>	MAF-Lich 16483	JF756985	JF757034
<i>P. tiliacea</i> 11	Germany, Bavaria, Oberfranken	<i>Tilia platyphyllos</i>	450	<i>W & G .v. Brachel</i>	MAF-Lich 16485	JF756989	JF757038
<i>P. tiliacea</i> 12	Austria, Salzburg, Mittersill	–	812	<i>J. Núñez-Zapata & F. Candotto</i>	MAF-Lich 16618	JF756991	JF757040
<i>P. tiliacea</i> 13	Slovenia, Carniola, Bled	<i>Pinus</i> sp.	475	<i>J. Núñez-Zapata</i>	MAF-Lich 16619	JF756992	JF757041
<i>P. tiliacea</i> 14	Portugal, Braganza,	<i>Quercus suber</i>	640	<i>V. J. Rico</i>	MAF-Lich 15350	JF756981	JF757030
<i>P. tiliacea</i> 15	Spain, Madrid, El Escorial	<i>Quercus pyrenaica</i>	1100	<i>J. Núñez-Zapata</i>	MAF-Lich 16467	JF756980	JF757029

TABLE 1. *Continued*

Species	Locality	Substratum	Altitude (m)	Collectors	Herbarium	GenBank.Accession N°	
						nuITS	mtLSU
<i>P. tiliacea</i> 16	Spain, Mallorca, Binifaldo	<i>Quercus ilex</i>	524	<i>A. Crespo, P. K. Divakar, G. Amo & J. Nuñez-Zapata</i>	MAF-Lich 16466	JF756990	JF757039
<i>P. tiliacea</i> 17	Morocco, Middle Atlas, Ifrane, Forest de Yeiva	<i>Quercus ilex</i>	1325	<i>A. Crespo, P. K. Divakar & R. Del-Prado</i>	MAF-Lich 16468	JF756988	JF757037
<i>P. cryptotiliacea</i> 1	Spain, Madrid, El Pardo	<i>Quercus ilex</i>	675	<i>A. Crespo & J. Nuñez-Zapata</i>	MAF-Lich 16451	JF756970	JF757013
<i>P. cryptotiliacea</i> 2	Spain, Ciudad Real, San Quintín mine	<i>Quercus ilex</i>	660	<i>A. Crespo, P. K. Divakar, P. Cubas, J. Nuñez-Zapata, R. Oyarzun</i>	MAF-Lich 16449	JF756975	JF757018
<i>P. cryptotiliacea</i> 3	Spain, Ciudad Real, Castillo de Calatrava	<i>Pistacia terebinthus</i>	666	<i>A. Crespo, P. K. Divakar & J. Nuñez-Zapata</i>	MAF-Lich 16461	JF756974	JF757017
<i>P. cryptotiliacea</i> 4	Spain, Caceres, Natural Park Monfragüe	<i>Quercus ilex</i>	207	<i>H. T. Lumbsch, A. Green, P. K. Divakar & A. Argüello</i>	MAF-Lich 16454	JF756972	JF757015
<i>P. cryptotiliacea</i> 5	Spain, Madrid, El Pardo	<i>Quercus ilex</i>	675	<i>A. Crespo & J. Nuñez-Zapata</i>	MAF-Lich 16450	JF756969	JF757012
<i>P. cryptotiliacea</i> 6	Spain, Caceres, Natural Park Monfragüe	<i>Quercus ilex</i>	207	<i>H. T. Lumbsch, A. Green, P. K. Divakar & A. Argüello</i>	MAF-Lich 16453	JF756973	JF757016
<i>P. cryptotiliacea</i> 7	Spain, Caceres, Natural Park Monfragüe	<i>Quercus ilex</i>	207	<i>H. T. Lumbsch, A. Green, P. K. Divakar & A. Argüello</i>	MAF-Lich 16455	JF756971	JF757014
<i>P. atricha</i>	France, Midi-Pyrénées, Ariège, Merens-les-Vals	rock	1500	<i>A. Argüello</i>	MAF-Lich 15524	JF756965	–
<i>P. carporrhizans</i> 1	Spain, Canary Islands, Gran Canaria, Degollada de Becerra	<i>Pinus radiata</i>	1499	<i>A. Crespo, P. Cubas, A. Santos & P. K. Divakar</i>	MAF-Lich 16477	JF756995	JF757007
<i>P. carporrhizans</i> 2	Spain, Canary Islands, Tenerife, El Saural	<i>Fagus orientalis</i>	894	<i>A. Crespo, P. Cubas, A. Santos & P. K. Divakar</i>	MAF-Lich 16474	JF756996	JF757008
<i>P. carporrhizans</i> 3	Turkey, Prov. Canakale, N of Karadag	<i>Quercus</i> sp. bark	400	<i>A. Crespo, P. K. Divakar, M. Candan & H. T. Lumbsch</i>	MAF-Lich 16476	JF756994	JF757006
<i>P. carporrhizans</i> 4	Turkey, Prov. Bursa, Uludaj roadside	<i>Fagus orientalis</i>	1030	<i>A. Crespo, P. K. Divakar, M. Candan & H. T. Lumbsch</i>	MAF-Lich 16475	JF756993	JF757005

TABLE 1. *Continued*

Species	Locality	Substratum	Altitude (m)	Collectors	Herbarium	GenBank.Accession N°	
						nuITS	mtLSU
<i>P. coleae</i> 1	USA, California, Mendocino, Sonoma lake	<i>Quercus</i> sp.	500	<i>A. Crespo, P. K. Divakar, R. DelPrado & F. Fernandez-Mendoza</i>	MAF-Lich 16479	JF756966	JF757009
<i>P. coleae</i> 2	USA, California, Mendocino	<i>Quercus</i> sp.	700	<i>A. Crespo, P. K. Divakar, R. DelPrado & F. Fernandez-Mendoza</i>	MAF-Lich 16481	JF756967	JF757010
<i>P. coleae</i> 3	USA, California, Mendocino, Sonoma lake	<i>Quercus</i> sp.	500	<i>A. Crespo, P. K. Divakar, R. DelPrado & F. Fernandez-Mendoza</i>	MAF-Lich 16480	JF756968	JF757011
<i>P. pastillifera</i> 1	Spain, Cantabria, La Lomba	<i>Fagus sylvatica</i>	1132	<i>A. Crespo & J. Núñez-Zapata</i>	MAF-Lich 16473	JF756998	JF757020
<i>P. pastillifera</i> 2	Spain, Asturias, Saliencia	–	1325	<i>S. Perez-Ortega</i>	MAF-Lich 16472	JF756999	JF757021
<i>P. pastillifera</i> 3	Turkey, prov. Canakale, distr. Lapseki, N. of village Dumanli	<i>Fagus orientalis</i>	670	<i>A. Crespo, P. K. Divakar, M. Candan & H. T. Lumbsch</i>	MAF-Lich 16471	JF756997	JF757019
<i>P. quercina</i> 1	Turkey, Prov. Canakale, Biga, S. of Bakacik	<i>Quercus</i> sp. bark	70	<i>A. Crespo, P. K. Divakar, M. Candan & H. T. Lumbsch</i>	MAF-Lich 16197	JF757000	JF757022
<i>P. quercina</i> 2	Turkey, Prov. Eskisehir, Tandir village	<i>Quercus cerris</i>	1350	<i>A. Crespo, P. K. Divakar, M. Candan & H. T. Lumbsch</i>	MAF-Lich 16193	JF757001	JF757023
<i>P. quercina</i> 3	Turkey, Prov. Bursa, Uludaj	<i>Fagus orientalis</i>	1030	<i>A. Crespo, P. K. Divakar, M. Candan & H. T. Lumbsch</i>	MAF-Lich 16194	JF757002	JF757024
<i>Myelochroa galbina</i>	China, Yunnan, Jianchian County	–	2490	<i>A. Crespo, O. Blanco & A. Argüello</i>	MAF-Lich 10414	DQ279531*	
<i>M. metarevoluta</i>	China, Yunnan, Jianchian County	<i>Quercus</i> sp.	2490	<i>A. Crespo, O. Blanco & A. Argüello</i>	MAF-Lich 10208	AY611102†	

* Divakar *et al.* (2006), † Blanco *et al.* (2004)

Parsimony analyses were carried out using PAUP* 4.0b10 (Swofford 2003) performed at www.bioportal.uio.no, with equally weighted characters and gaps being interpreted as missing data. A heuristic search with 100 random taxon addition replicates was generated with tree-bisection-reconnection (TBR) branch-swapping and the MulTrees option in effect. Nonparametric bootstrap (Felsenstein 1985) was used to assess robustness of clades, running 4000 pseudoreplicates with the same settings as in the heuristic search. Only clades that received bootstrap support above 75% were considered to be strongly supported. To assess homoplasy levels, we calculated the consistency index (CI) and retention index (RI) from each parsimony search. Majority rule consensus trees were drawn using TREEVIEW (Page 1996).

The heterogeneity in phylogenetic signal between the two data partitions was examined by MP and Bayesian approach (Wiens 1998; Buckley *et al.* 2002; Divakar *et al.* 2010b). The level of bootstrap support and posterior probabilities were used to detect significance levels of localized incongruence between the two gene partitions and the concatenated analysis. The set of topologies reaching $\geq 75\%$ bootstrap under parsimony and the 0.95 posterior probabilities for the Bayesian approach were estimated (Hillis & Bull 1993). If no conflict was evident, it was assumed that the two data sets were congruent and could be combined.

Bayesian analyses were carried out using the program MrBayes 3.1.2 (Huelsenbeck & Ronquist 2001). Posterior probabilities were approximated by sampling trees using a Markov Chain Monte Carlo (MCMC) method. The posterior probabilities of each branch were calculated by counting the frequency of trees that were visited during the course of the MCMC analysis. The analysis was performed assuming the general time reversible model (Rodriguez *et al.* 1990) including estimation of invariant sites and assuming a discrete gamma distribution with six rate categories (GTR + I + G) for the single-gene and the combined analyses. A run with 2 million generations, starting with a random tree and employing 8 simultaneous chains, was executed. Every 200th tree was saved to a file. We plotted the log-likelihood scores of sample points against generation time using TRACER version 1.0 (<http://evolve.zoo.ox.ac.uk/software.html?id=tracer>) and determined that stationarity had been achieved when the log-likelihood values of the sample points reached a stable equilibrium value (Huelsenbeck & Ronquist 2001). The first 2000 trees were discarded as burn-in before stationarity was reached. Unlike nonparametric bootstrap values (Felsenstein 1985), these are estimated probabilities of the clades under the assumed model (Rannala & Yang 1996), and hence posterior probabilities $\geq 95\%$ were considered significant support.

Hypothesis testing

As the results of the phylogenetic analysis are incongruent with the current species concept of *Parmelina tiliacea*, we examined whether our data were sufficient to reject the monophyly of *P. tiliacea*. Two methods

were employed: 1) the Shimodaira–Hasegawa (SH) test (Shimodaira & Hasegawa 1999); 2) the expected likelihood weight (ELW) test following Strimmer and Rambaut (2002). We compared the ML tree constrained to have *P. tiliacea* as monophyletic and the unconstrained ML tree. The SH and ELW tests were performed using Tree-PUZZLE 5.2 (Schmidt *et al.* 2004) with the combined dataset from a sample of 200 unique trees (the best trees agreeing with the null hypotheses) and the unconstrained ML tree. These trees were inferred in Tree-PUZZLE employing the GTR + I + G nucleotide substitution model.

Genetic distances

Pairwise maximum likelihood distances, given as the number of nucleotide substitutions per site, between the ITS rDNA sequences were calculated with TREE-PUZZLE 5.2 (Schmidt *et al.* 2004) using the HKY+G (Hasegawa *et al.* 1985) model of nucleotide substitution with between-site variation, and assuming a discrete gamma distribution with six rate categories. Ambiguous characters and repeated haplotypes were removed in the matrix as explained in Del-Prado *et al.* (2010).

Morphological and chemical studies

All specimens included in the molecular analysis were morphologically revised (Table 1). The size and shape of the ascospores were studied in the specimens bearing apothecia. Sections of apothecia were hand-cut with a razor blade under a binocular microscope, and mounted in distilled water. Ascospores and longitudinal sections of apothecia were observed and photographed under a light microscope (Leitz DMRB). Measurements of the length and width were taken in 20 well-developed ascospores per sample at $\times 1000$ magnification. The description of spore shape follows Kirk *et al.* (2008). Statistical tests were performed using STATGRAPHICS Plus 5.1.

Chemical analyses were performed by thin-layer chromatography using standard methods (Culbertson 1972; Elix & Ernst-Russell 1993; Orange *et al.* 2001) in all the specimens analyzed.

Results

Phylogenetic analyses

Seventy-six new sequences were generated for this study, including 38 new nuclear ITS rDNA and 39 new mitochondrial LSU rDNA sequences. The aligned matrices had 436 unambiguous nucleotide positions in the nuITS and 668 in the mtLSU. Comparison of the topology of MP and Bayesian trees based on the individual genes showed no supported conflicts (results not shown), thus both regions were combined to increase the resolution of the clades.

The MP analysis of the combined data matrix resulted in the 30 most parsimonious trees (tree length = 259 steps, CI = 0.8147, RI = 0.9159). Thirty-six positions in the matrix were parsimony uninformative and 145 were informative. For the Bayesian analysis the likelihood parameters had the following average values [\pm one standard deviation (SD)]: likelihood (lnL) = -3095.525 (0.2307), base frequency $\pi(A) = 0.2097$ (0.0003), $\pi(C) = 0.2829$ (0.0003), $\pi(G) = 0.2644$ (0.0003), $\pi(T) = 0.243$ (0.0003), rate matrix $r(AC) = 0.1256$ (0.0007), $r(AG) = 0.1365$ (0.0007), $r(AT) = 0.1667$ (0.0009), $r(CG) = 0.0764$ (0.0005), $r(CT) = 0.4096$ (0.001), $r(GT) = 0.0851$ (0.0005), the gamma shape parameter $\alpha = 90.139$ (2.8764) and the pinvar = 0.5757 (0.0045). Since the topologies of combined dataset analyses using MP and B/MCMC approaches showed no supported conflicts, only the 50% majority rule consensus tree of Bayesian tree sampling is shown (Fig. 1).

The topology of the tree (Fig. 1) showed that the samples of *P. carporrhizans*, *P. coleae* and *P. quercina* form well-supported monophyletic groups. *Parmelina atricha* is sister to *P. carporrhizans* but other relationships lacked statistical support. However, the samples of *P. tiliacea* separated into two independent groups (clades A and B) with strong statistical support. Clade A included *P. tiliacea* specimens from a wide geographic area and also a nested clade with all the *P. pastillifera* specimens examined. Clade B included only samples from central Spain. As the relationships between the *Parmelina* species are not well supported, the monophyly of *P. tiliacea* as a single species (including clades A and B) was tested and significantly rejected ($P < 0.002$ in the SH and ELW tests). The same results were obtained irrespective of whether *P. pastillifera* was included in clade A.

The pairwise genetic distances between the ITS haplotypes were also calculated to estimate the genetic divergence of clades A and B (Table 2). When all the samples were assigned to a single species, the intraspecific mean was remarkably high (0.030 ± 0.006 s/s), with a maximum distance of 0.093 s/s.

On the other hand, when specimens of clades A and B are considered as two separate species, the maximum values of their intra-specific genetic distances fall to 0.0169 s/s for clade A and 0.002 for clade B, and the inter-specific distances range from 0.071–0.093. Similar values were obtained irrespective of whether *P. pastillifera* specimens were included in clade A (Table 2).

Morphology and chemistry

Morphological analysis of apothecia of both groups A and B revealed subtle differences in the outer hyphae forming the true exciple. The cells of the exciple in group B had thinner walls than those of group A (Fig. 2B). Measurements of the ascospores of representative specimens of each clade showed that both clades had spores of similar length (clade A, $\bar{x} \pm SD = 10.53 \mu\text{m} \pm 1.17$, range = 8–15 μm ; clade B, $\bar{x} = 10.66 \mu\text{m} \pm 0.94$; range = 9–13 μm) that did not show a statistically significant difference ($P = 0.4130$). On the contrary, however, the mean width of the ascospores of both clades differed significantly ($P = 0.0000$): those from group A ($\bar{x} \pm SD = 5.69 \pm 0.58$, range = 5–7 μm) being wider than those of group B ($\bar{x} \pm SD = 4.51 \pm 0.53$, range = 3–5 μm). Spores of clade A (length/breadth ratio of 1.85) can be termed as elongate while those of clade B (length/breadth ratio of 2.36) are cylindrical. Chemical analysis revealed the presence of lecanoric acid and atranorin in all species of *Parmelina* studied.

Taxonomy

Parmelina tiliacea was first described as *Lichen tiliaceus* by Hoffmann in 1784, and was almost certainly collected in southern Germany although no locality was indicated. Based on the results of our phylogenetic analysis, taxonomic changes are made to reflect that the current name *P. tiliacea* encompasses two separate lineages, separated by a large genetic distance, that merit formal recognition. Specimens of clade A are assigned to *P. tiliacea* because it includes samples from

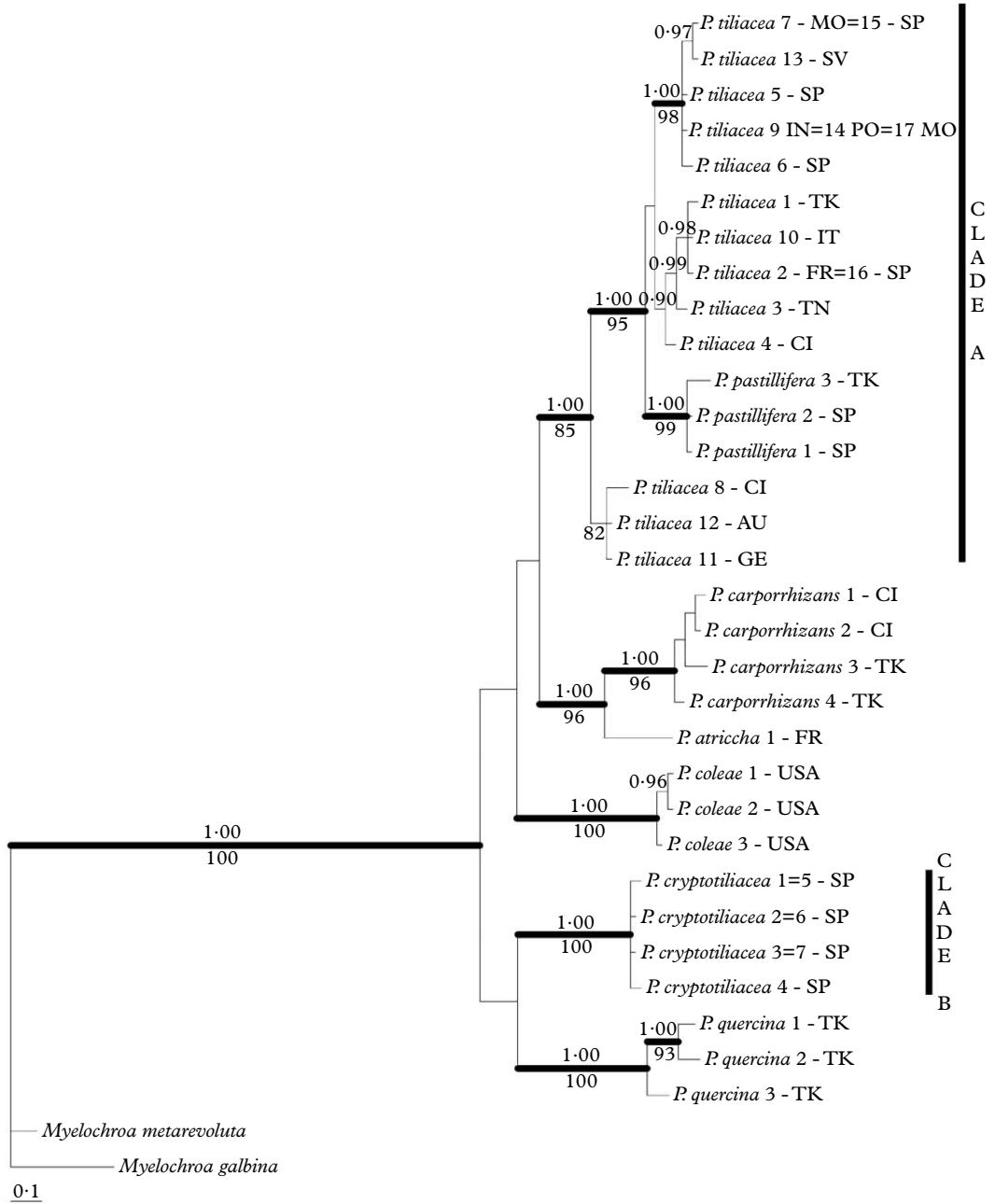


FIG. 1. Majority-rule consensus tree based on 18 000 trees from B/MCMC tree sampling procedure from a combined data set of nuITS rDNA and mtLSU rDNA sequences. Posterior probabilities ≥ 0.95 in the Bayesian analysis are indicated above the branches and MP bootstrap values ≥ 0.75 below branches. Branches with significant support in both analyses are in bold. (AU = Austria, CI = Canary Islands, FR = France, GE = Germany, IN = India, IT = Italy, MO = Morocco, PO = Portugal, SP = Spain, SV = Slovenia, TK = Turkey, TN = Tunisia, USA = United States of America).

TABLE 2. Pairwise genetic distances between ITS haplotypes

Intraspecific genetic distances (substitutions/site)	Mean \pm standard deviation	Range
Samples of clades A and B (excluding <i>P. pastillifera</i>)	0.0305 \pm 0.0335 (0.0338 \pm 0.0360)	0.0023–0.0929 (0.0023–0.0929)
Samples of clade A (excluding <i>P. pastillifera</i>)	0.0100 \pm 0.0045 (0.0093 \pm 0.0047)	0.0023–0.0169 (0.0023–0.0167)
Samples of Clade B (<i>P. cryptotiliacea</i>)	–	0.0023
Interspecific genetic distances (substitutions/site)	Mean \pm standard deviation	Range
Clade A versus Clade B	0.0830 \pm 0.0062	0.0712–0.0929
Between all species of <i>Parmelina</i>	0.0564 \pm 0.0306	0.0023–0.1045

central Europe (Germany, Austria, Italy and Slovenia), and the application of that name is fixed here by designation of a sequenced epitype. Specimens of clade B (which included samples from Spain) are recognized as the new species *Parmelina cryptotiliacea* sp. nov. The new species has a large genetic distance, a more restricted distributional area, and small morphological differences compared with *P. tiliacea*.

***Parmelina cryptotiliacea* A. Crespo & Núñez-Zapata sp. nov.**

Mycobank No.: 561685

Similis *Parmelina tiliacea* sed differte in ascosporis angusta (3–5 μ m latis), cellulisi in hyphis excipulis cum muris attenuatis, et in sequenciis molecularis ITS et mtLSU.

Typus: Spain, Extremadura, Parque Natural de Monfragüe, 39°49'37.9"N 06°03'27.5"W, on *Quercus ilex* subsp. *ballota*, alt. 207 m, June 2005, H. T. Lumbsch, A. Green, P. K. Divakar & A. Argüello (MAF-Lich 16454—holotypus).

(Fig. 2)

Thallus adnate on bark, pale mineral grey to mineral grey; lobes irregularly branched, sublinear-elongate, often imbricate, rounded at the apices, 2–7 mm wide, the margins more or less crenate and undulate, not ciliate; upper surface more or less shiny, without maculae, usually pruinose, irregularly cracked, densely isidiate; *medulla* white;

lower surface black with brown edge, moderately to densely rhizinate, rhizines black, simple, 1–2 mm long. *Isidia* cylindrical, short 0.5–1.5 mm, rarely branched, usually blackening at the tips.

Apothecia frequent, adnate, to 4 mm diam. *Asci* 8-spored. *Ascospores* cylindrical, length 9–13 μ m (10.66 \pm 0.94 μ m), width 3–5 μ m (4.51 μ m \pm 0.53 μ m).

Pycnidia not seen.

Chemistry. Upper cortex K+ yellow; medulla K–, C+ red, KC+ red, P–. Containing atranorin and lecanoric acid, but no fatty acids.

Distribution and ecology. At present the species is known only from four localities in Spain: National Park of Monfragüe (Extremadura), El Pardo (Madrid), Puertollano, and San Quintin mine (both Castilla – La Mancha). It grows on tree trunks and rocks in relatively lowland areas (alt. 250–700 m asl) with a low relative humidity. At low elevations the new species is sympatric with *P. tiliacea*.

Remarks. *Parmelina cryptotiliacea* is a cryptic morph of *P. tiliacea*. When apothecia are present, *P. cryptotiliacea* can be morphologically differentiated from *P. tiliacea* by its narrower ascospores (width 3–5 μ m, compared with 5–7 μ m in *P. tiliacea*) and the thinner

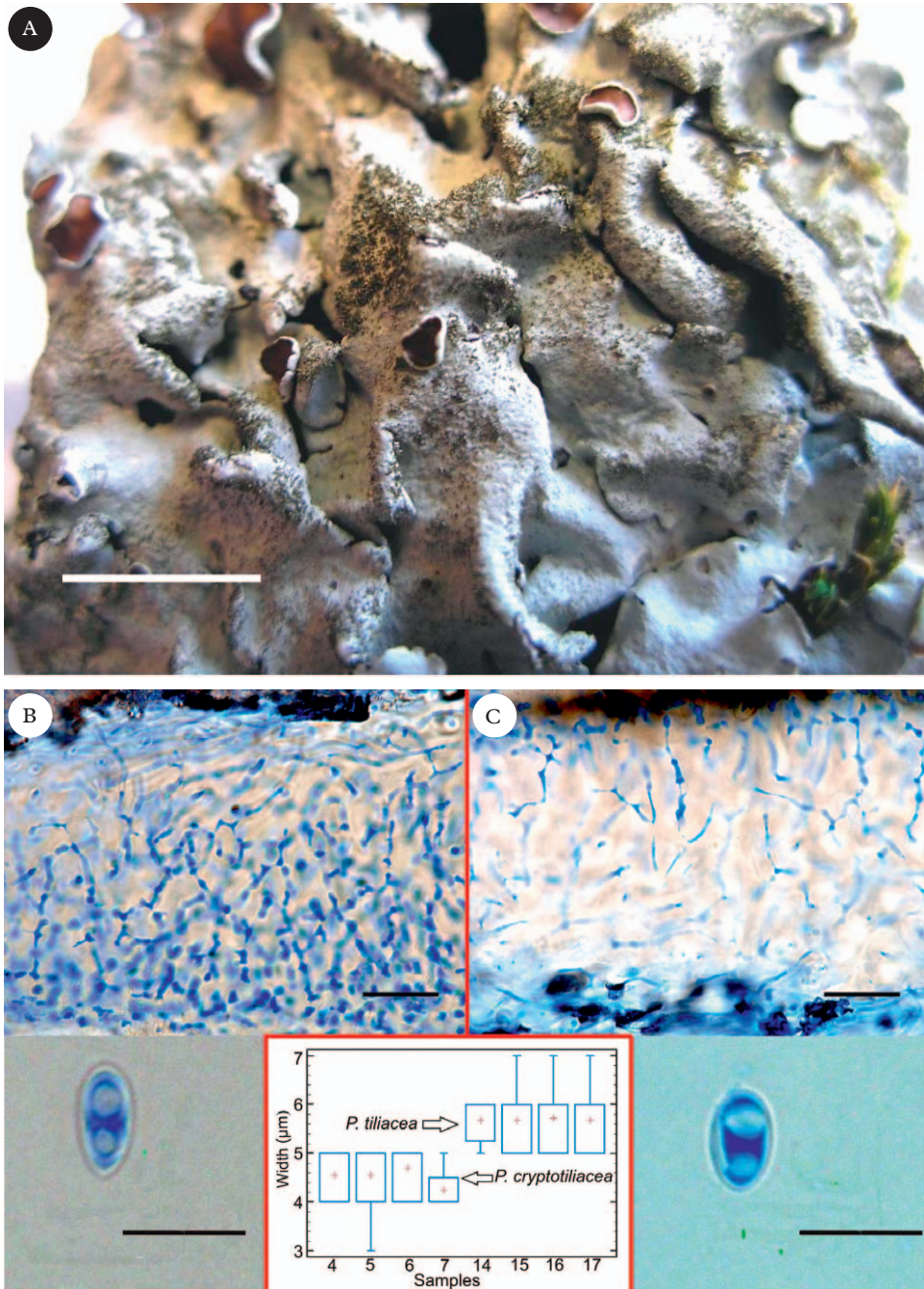


FIG. 2. *Parmelina cryptotiliacea*. A, habit (MAF-Lich 16454, holotype). B & C, comparison of exciple cells and ascospores; B, *P. cryptotiliacea* (MAF-Lich 16453); C, *P. tiliacea* (MAF-Lich 15350); the graph shows the mean (+), the range of the middle 50% of the data and the full range of the width of the ascospores in samples of both species. Mean differences between species are statistically significant ($P = <0.0001$). See details of samples in Table 1. Scales: A=50 mm; B & C=20 µm (exciples) and 10 µm (ascospores).

walls of the exciple cells. However, for samples lacking apothecia, a comparison of the ITS sequences is the only reliable way to distinguish this cryptic species.

***Parmelina tiliacea* (Hoffm.) Hale**

Phytologia 28: 481 (1974).—*Lichen tiliaceus* Hoffm., *Enum. Lich.*: 96 (1784); type: Europe, *sine loc.*, *op. cit.*: tab. 16 fig. 2 (—lectotype designated by Jørgensen 1972); Germany, Bavaria, Oberfranken, Kteis Forchheim, Ehrenburg, alt. 450 m, on *Tilia platyphyllos*, 27 September 2009, W. & G. Brachel (MAF-Lich 16485—**epitypus hic designatus**).

For further synonyms see Hale (1976) and Dobson & Hawksworth (1976).

Remarks. As no material collected and named by Hoffmann prior to 1784 has been located, Jørgensen (1972) designated the original illustration as lectotype for this name. There is Hoffmann material in the Moscow herbarium (MW) which was studied by Peter W. James in 1975 and which belongs to the current concept of the species, but as it is unlocalized and was probably collected after 1804 this cannot be treated as original material appropriate for lectotypification (Dobson & Hawksworth 1976). In order to fix the application of Hoffmann's epithet in the sense it is used in the present paper, we therefore designate a sequenced collection from southern Germany as an epitype for the name.

Discussion

The presence of cryptic species in widely or disjunctly distributed species has often been found in *Parmeliaceae* and seems to be a rather common phenomenon, as noted above. The cryptic species found here within *P. tiliacea* s. lat., was not detected in previous investigations due to the restricted sampling used in earlier phylogenetic studies (Blanco *et al.* 2004, 2006; Thell *et al.* 2004; Argüello *et al.* 2007).

The present investigation, based on more extensive sampling throughout the geographical range of the species, has detected haplotype variability between and within

populations of *P. tiliacea* s. lat. The topology of the tree, based on two independent loci nuITS and mtLSU, and the SH and ELW hypothesis tests, indicates that specimens of *P. tiliacea* do not form a monophyletic group but fall in two independent strongly supported clades (clades A and B; Fig. 1), named here as *P. tiliacea* s. str. and *P. cryptotiliacea*, respectively. The genetic distances between the ITS haplotypes also supports the separation of the two independent clades at the specific level: assignment of all the samples to a single species gave an extremely high intraspecific mean (0.030 ± 0.006 s/s), with a maximum distance (0.093 s/s) that is four to five times larger than the values found in other *Parmelina* species (e.g. *P. quercina* mean = 0.007 ± 0.004 s/s; maximum distance = 0.013 s/s; Del Prado *et al.* 2010). When clades A and B are considered as separate species (*P. tiliacea* and *P. cryptotiliacea*), their intraspecific distances fall within the species range found in other *Parmeliaceae* (≤ 0.017 s/s; Del Prado *et al.* 2010).

It should be noted that the genetic distances between ITS haplotypes of clade A, fall within the general intraspecific range even if the haplotypes of *P. pastillifera* are included. These data suggest that *P. pastillifera* is genetically very close to *P. tiliacea*, despite the morphological distinctive features (button-like isidia *versus* the cylindrical isidia of *P. tiliacea*; Dobson & Hawksworth 1976) and the different geographical ranges (*P. pastillifera* is much more common in humid western European areas than *P. tiliacea*). A comprehensive population study is being carried out to establish the phylogenetic relationships between *P. tiliacea* and *P. pastillifera*, and no formal taxonomic changes are made pending the outcome of that on-going investigation.

Despite the genetic and small anatomical differences, *P. tiliacea* and *P. cryptotiliacea* do not have clear ecological differences. *Parmelina cryptotiliacea* was collected near the Central System and in the south central area of the Iberian Peninsula between 250 and 700 m above sea level, where climatic conditions are characterized by low summer rainfall. However, *P. tiliacea* is also present in

the same localities where *P. cryptotiliacea* was collected. *Parmelina tiliacea* has a more extensive distribution and altitudinal range (see Table 1), and therefore grows under a wider range of climatic conditions. The known distribution of *P. cryptotiliacea* shows that it grows sympatrically with *P. tiliacea* at low elevations and shares the same habitats.

Specimens of *P. tiliacea* and *P. cryptotiliacea* cannot be easily differentiated by morphology alone in the absence of apothecia. Types of perforations of the thallus surface that allow gas exchange, have been regarded as a key character for interspecific characters in parmelioids (e.g. *Parmelina* in Argüello *et al.* 2007, *Melanelia* in Blanco *et al.* 2004, parmotremond groups in Blanco *et al.* 2005). However, the presence of pruina on the upper surface of the specimens examined prevented us from critically analyzing this feature. Ascospores of parmelioid lichens have not been routinely studied, mainly due to the frequent absence of ascocmata, but Argüello *et al.* (2007) showed a correlation between ascospore sizes and phylogenetic hypothesis, especially in the *Parmelina* group. Although the difference in width of ascospores has statistical support in the present study, it is not strong and could be misleading if the degree of maturity of the apothecia and spores is not taken into account. Internal structures of ascocmata have also not been considered in any depth in parmelioid lichens (Hale 1976); the other difference between *P. tiliacea* and *P. cryptotiliacea* (the thickness of the cell wall of the exciple) is also subtle and, due to the frequent absence of apothecia in *P. tiliacea*, this structure has been scarcely studied in the past. Chemistry does not provide any diagnostic characters because all species in the genus *Parmelina* share the same compounds (Hale 1976; Diaz-Guerra & Manrique 1984).

Conclusion

As found in other cosmopolitan species of lichenized fungi, molecular phylogeny based on nuITS and mtLSU rDNA regions has revealed that the traditional concept of *Par-*

melina tiliacea includes two separate lineages: one corresponding to *P. tiliacea* s. str., a widespread lichen from Europe, and another cryptic, genetically separated lineage that is formally described here as a new species, *P. cryptotiliacea*. *Parmelina cryptotiliacea* can be considered a cryptic species because it can be morphologically separated from *P. tiliacea* only by small anatomical differences in the apothecium and ascospores, and a high proportion of populations lack apothecia. In this and similar cases, molecular data are the most reliable way to distinguish such morphologically close species. Our data indicate that *P. tiliacea* s. str. has a wide distribution, growing in Europe, Middle-East Asia and the Indian subcontinent, while *P. cryptotiliacea* has only been found in Spain, where it is sympatric with *P. tiliacea* at low elevations. The restricted area of *P. cryptotiliacea* suggests that it could be a threatened endemic species, and its conservation status should be evaluated independently of *P. tiliacea* even if molecular tools are necessary for its identification.

We would like to express our sincere thanks to all the collectors and herbaria listed in Table 1 for sending us fresh material for examination, and Phil Mason for his comments and suggestions. We thank two anonymous referees and the editor for critical comments on the manuscript. Sequencing was carried out in the Centro de Genómica (Parque Científico de Madrid). This work was supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation (CGL2010 – 21646/BOS), Ramón y Cajal grant (RYC02007-01576) to PKD, FPI grant to JN-Z, and undertaken while DLH was also in receipt of a Spanish Ministry of Science and Innovation grant (CGL 2008-01600).

REFERENCES

- Argüello, A., Del Prado, R., Cubas, P. & Crespo, A. (2007) *Parmelina quercina* (Parmeliaceae, Lecanorales) includes four phylogenetically supported morphospecies. *Biological Journal of the Linnean Society* **91**: 455–467.
- Blanco, O., Crespo, A., Divakar, P. K., Esslinger, T., Hawksworth, D. L. & Lumbsch, H. T. (2004) *Melanelixia* and *Melanohalea*, two new genera segregated from *Melanelia* (Parmeliaceae) based on molecular and morphological data. *Mycological Research* **108**: 873–884.
- Blanco, O., Crespo, A., Divakar, P. K., Elix, J. A. & Lumbsch, H. T. (2005) Molecular phylogeny of parmotremond lichens (Ascomycota, Parmeliaceae). *Mycologia* **97**: 150–159.

- Blanco, O., Crespo, A., Ree, R. H. & Lumbsch, H. T. (2006) Major clades of parmelioid lichens (*Parmeliaceae*, *Ascomycota*) and the evolution of their morphological and chemical diversity. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **39**: 52–69.
- Buckley, T. R., Arensburger, P., Simon, C. & Chambers, G. K. (2002) Combined data, Bayesian phylogenetics, and the origin of the New Zealand cicada genera. *Systematic Biology* **51**: 4–18.
- Clerc, P. & Truong, C. (2008) The non-soresiate and non-isidiate *Parmelina* species (lichenized ascomycetes, *Parmeliaceae*) in Switzerland – *Parmelina atricha* (Nyl.) P. Clerc reinstated in the European lichen flora. *Sauteria* **15**: 175–194.
- Crespo, A., Blanco, O. & Hawksworth, D. L. (2001) The potential of mitochondrial DNA for establishing phylogeny and stabilising generic concepts in the parmelioid lichens. *Taxon* **50**: 807–819.
- Crespo, A., Ferencov, Z., Perez-Ortega, S., Elix, J. A. & Divakar, P. K. (2010) *Austroparmelina*, a new Australasian lineage in parmelioid lichens (*Parmeliaceae*, *Ascomycota*). *Systematics and Biodiversity* **8**: 209–221.
- Culberson, C. F. (1972) Improved conditions and new data for the identification of lichen products by a standardized thin-layer chromatographic method. *Journal of Chromatography* **72**: 113–125.
- Del-Prado, R., Cubas, P., Lumbsch, H. T., Divakar, P. K., Blanco, O., Amo De Paz, G., 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.
- Diaz-Guerra, D. & Manrique, E. (1984) Sustancias líquénicas en taxones de la provincia de Madrid, *Evernia prunastri* (L.) Ach. y *Parmelina tiliacea* (Hoffm.) Hale. *Lazaroa* **6**: 267–268.
- Divakar, P. K. & Upreti, D. K. (2005) *Parmelioid Lichens in India (A Revisionary Study)*. Dehra Dun: Bishen Singh and Mahendra Pal Singh.
- Divakar, P. K., Molina, M. C., Lumbsch, H. T. & Crespo, A. (2005) *Parmelina barrenoae*, a new lichen species related to *Parmelia sulcata* (*Parmeliaceae*) based on molecular and morphological data. *Lichenologist* **37**: 37–46.
- Divakar, P. K., Figueras, G., Hladun, N. L. & Crespo, A. (2010a) Molecular phylogenetic studies reveal an undescribed species within the North American concept of *Melanelixia glabra* (*Parmeliaceae*). *Fungal Diversity* **42**: 47–55.
- Divakar, P. K., Lumbsch, H. T., Ferencova, Z., Del-Prado, R. & Crespo, A. (2010b) *Remototrachyna*, a new tropical lineage in hypotrachynoid lichens (*Parmeliaceae*, *Ascomycota*) originated in India. *American Journal of Botany* **97**: 579–590.
- Dobson, F. S. & Hawksworth, D. L. (1976) *Parmelia pastillifera* (Harm.) Schub. and Klem. and *P. tiliacea* (Hoffm.) Ach. in the British Isles. *Lichenologist* **8**: 47–59.
- Elix, J. A. (1993) Progress in the generic delimitation of *Parmelia sensu lato* lichens (*Ascomycotina*: *Parmeliaceae*) and a synoptic key to the *Parmeliaceae*. *Bryologist* **96**: 359–383.
- Elix, J. A. & Ernst-Russell, K. D. (1993) *A Catalogue of Standardized Thin Layer Chromatographic Data and Biosynthetic Relationships for Lichen Substances*. 2nd edn. Canberra: Australian National University.
- Felsenstein, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**: 783–791.
- Feuerer, T. & Thell, A. (2002) *Parmelia ernstiae* – a new macrolichen from Germany. *Mitteilungen aus dem Institut der Allgemeine Botanik, Hamburg* **30–32**: 49–60.
- Hale, M. E. (1976) A monograph of the lichen genus *Parmelina* Hale (*Parmeliaceae*). *Smithsonian Contributions to Botany* **33**: 1–60.
- Hall, T. A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* **41**: 95–98.
- Hasegawa, M., Kishino, H. & Yano, T. (1985) Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution* **22**: 160–174.
- Hillis, D. M. & Bull, J. J. (1993) An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Systematic Biology* **42**: 182–192.
- Huelsenbeck, J. P. & Ronquist, F. (2001) MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* **17**: 754–755.
- Huelsenbeck, J. P., Rannala, B. & Masly, J. P. (2000) Accommodating phylogenetic uncertainty in evolutionary studies. *Science* **288**: 2349–2350.
- Jørgensen, P. M. (1972) Noen interessante lavfunn, særlig fra Vestlandet. *Blyttia* **30**: 153–162.
- Kirk, P. M., Cannon, P. F., Minter, D. W. & Stalpers, J. A. (2008) *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi*. 10th edn. Wallingford: CAB International.
- Large, B. & Simon, D. (1999) Markov chain Monte Carlo algorithms for the Bayesian analysis of phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **16**: 750–759.
- Liška, J., Palice, Z., Dětinský, R. & Vondrák, J. (2006) Changes in distribution of rare and threatened lichens in the Czech Republic II. In *Central European Lichens: Diversity and Threat* (A. Lackovičová, A. Guttová, E. Lisická & P. Lizoň, eds): 241–258. Ithaca, New York: Mycotaxon Ltd.
- Lohtander, K., Myllys, L., Sundin, R., Källersjö, M. & Tehler, A. (1998) The species pair concept in the lichen *Dendrographa leucophaea* (*Arthoniales*) analyses based on ITS sequences. *Bryologist* **101**: 404–411.
- Molina, M. C., Crespo, A., Blanco, O., Lumbsch, H. T. & Hawksworth, D. L. (2004) Phylogenetic relationships and species concepts in *Parmelia* s. str. (*Parmeliaceae*) inferred from nuclear ITS rDNA and beta-tubulin sequences. *Lichenologist* **36**: 37–54.
- Molina, M. C., Divakar, P. K., Millanes, A. M., Sanchez, E., Hawksworth, D. L. & Crespo, A. (2011) *Parmelia sulcata* (*Ascomycota*: *Parmeliaceae*)

- a sympatric monophyletic species complex. *Lichenologist* **43**: 585–601.
- Myllys, L., Lohtander, K., Källersjö, M. & Tehler, A. (1999) Sequence insertions and ITS data provide congruent information on *Rocella canariensis* and *R. tuberculata* (Arthoniales, Euascomycetes) phylogeny. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **12**: 295–309.
- Nimis, P. L. (1993) *The Lichens of Italy. An Annotated Catalogue*. [Monografia no. XII.] Torino: Museo Regionale di Scienze Naturali.
- Orange, A., James, P. W. & White, F. J. (2001) *Microchemical Methods for the Identification of Lichens*. London: British Lichen Society.
- Page, R. D. M. (1996) TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applied Biosciences* **12**: 357–358.
- Poelt, J. & Vězda, A. (1977) *Bestimmungsschussel Europäischer Flechten. Ergänzungsheft I*. [Bibliotheca Lichenologica no. 9.] Vaduz: J. Cramer.
- Printzen, C. (2002) Fungal specific primers for PCR-amplification of mitochondrial LSU in lichens. *Molecular Ecology Notes* **2**: 130–132.
- Rannala, B. & Yang, Z. (1996) Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference. *Journal of Molecular Evolution* **43**: 304–311.
- Rodriguez, F., Oliver, J. F., Marin, A. & Medina, J. R. (1990) The general stochastic model of nucleotide substitution. *Journal of Theoretical Biology* **142**: 485–501.
- Schauer, T. (1965) Ozeanische Flechten in Nordalpenraum. *Portugaliae Acta Biologica (B)* **8**: 17–229.
- Schmidt, H. A., Strimmer, K., Vingron, M. & von Haeseler, A. (2004) TREE-PUZZLE Version 5.2: maximum likelihood phylogenetic analysis using quartets and parallel computing. *Bioinformatics* **18**: 502–504.
- Shimodaira, H. & Hasegawa, M. (1999) Multiple comparisons of log-likelihoods with applications to phylogenetic inference. *Molecular Biology and Evolution* **16**: 1114–1116.
- Strimmer, K. & Rambaut, A. (2002) Inferring confidence sets of possibly misspecified gene trees. *Proceedings of the Royal Society of London, Biological Sciences* **269**: 137–142.
- Swofford, D. L. (2003) *PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods)*. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.
- Thell, A., Feuerer, T., Kärnefelt, I., Myllys, L. & Stenroos, S. (2004) Monophyletic groups within the *Parmeliaceae* identified by ITS rDNA, β -tubulin and GAPDH sequences. *Mycological Progress* **3**: 297–314.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994) Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22**: 4673–4680.
- Wang, S. L., Chen, J. B. & Elix, J. A. (2000) New species of *Parmeliaceae* (lichenized Ascomycotina) from China. *Mycotaxon* **76**: 293–298.
- Wiens, J. J. (1998) Combining data sets with different phylogenetic histories. *Systematic Biology* **47**: 568–581.

CAPÍTULO II

**Diversificación genética de
P. tiliacea y *P. pastillifera* y
su relación con las variables
geográficas y climáticas**

CHAPTER II

**Genetic diversification and
climatic preferences of
European populations of the
lichenized fungi *Parmelina
tiliacea* and *P. pastillifera***

2.1 Abstract

The amount of genetic variability among populations in lichenized fungi neither shows a general pattern nor can be directly attributed to a single cause. We studied populations of two foliose lichen species: *Parmelina tiliacea* (very common in southern Europe) and the closely related *P. pastillifera*. Based on DNA sequences of three loci, we analyzed the population spatial structure and the ecological factors that could explain the present distribution of both taxa. Haplotype networks, analysis of molecular variance and clustering methods detected four groups of haplotypes, a genetic structure of *P. tiliacea* populations, and differentiation of *P. pastillifera*. The genetic structure in *P. tiliacea* is not directly associated to geographical areas, but appeared to be influenced by climate. In particular, correlations were with precipitation in the coldest and driest seasons, and isotherm patterns. In contrast, the pattern in *P. pastillifera* was correlated with the precipitation during the driest season, and temperature seasonality. The results support the recognition of *P. pastillifera* as a distinct species which evolved from different groups of *P. tiliacea* while colonizing more humid regions, and then differentiating morphological and genetically. It is suggested that successive changes in vegetation through southern Europe, especially forests types associated with climatic variation during the Quaternary, also contributed to the present distribution of both species.

Keywords: Population structure, biogeography, *Parmelina tiliacea*, Europe.

2.2 Introducción

Los hongos liquenizados son organismos mutualistas cuyo modo de dispersión, rutas migratorias, e historia evolutiva no se conocen del todo. Diversos estudios tratan actualmente de rellenar estos vacíos de información a partir de la variabilidad genética que presentan estos organismos (Printzen & Ekman 2002, Lindblom & Ekman 2006, Yahr *et al.* 2006, Fernández *et al.* 2011). Posibles explicaciones de esta variabilidad genética intraespecífica se han atribuido a factores como las diferencias en el tipo de hábitat o el modo de reproducción (sexual o vegetativa), así como a la perturbación debida a la acción humana en el paisaje, entre otros. La distribución geográfica de las especies también puede haber jugado un papel importante, ya sea a nivel regional o intercontinental, sin embargo no se ha encontrado un patrón generalizable respecto a la variabilidad genética que puede existir entre poblaciones de hongos liquenizados (Werth 2010). La marcada diferenciación

geográfica entre poblaciones de especies con distribución discontinua se ha atribuido a causas como la historia post-glacial de la misma especie, como ocurre por ejemplo entre las poblaciones costeras y continentales de *Lobaria pulmonaria* (Walser *et al.* 2005), o se ha asociado al proceso de recolonización del árbol hospedante, como en el caso de *Biatora helvola* (Printzen *et al.* 1999), o al flujo asimétrico de genes entre regiones separadas por barreras geográficas, como es el caso de las poblaciones boreales de *Porpidia flavicunda* (Buschbom 2007); otra causa podría ser la dispersión a partir de los refugios glaciales aislados y/o distantes y la deriva genética, como sugieren Printzen & Ekman (2002) para explicar la estructura filogeográfica de *Cavernularia hultenii*. Sin embargo, en otros casos se ha encontrado baja variabilidad genética en algunas especies de amplia distribución, como lo muestran las poblaciones europeas y californiana de *Letharia vulpina*, hecho que fue interpretado como evidencia de un reciente proceso de colonización de la población europea a partir de la dispersión intercontinental desde América del Norte (Högberg *et al.* 2002), o como el resultado de cuellos de botella genéticos debido a oscilaciones en el clima del Pleistoceno (Werth 2010). Estos datos indican que no hay un patrón general para explicar cómo los factores ecológicos, pasados o actuales, pueden haber influido en la variabilidad genética en los hongos liquenizados.

Parmelina tiliacea (Parmeliaceae, Ascomycota) es un ejemplo potencial para investigar la estructura poblacional de una especie de amplia distribución continental (Eurasia y el norte de África extendiéndose por la Macaronesia, excepto Azores y Cabo Verde); tiene un rango altitudinal que va desde 0 a 1500 m sobre el nivel del mar, llegando incluso a altitudes mayores como 3200 m en la India (Divakar & Upreti 2005). En Europa es común en torno a la cuenca del Mediterráneo, especialmente abundante en el centro de la Península Ibérica, extendiéndose por el centro y norte de Europa, siendo rara en Escocia y dispersa en Irlanda, así como en el sur de Escandinavia (Lowhoff 2009). Esta especie crece sobre las cortezas ricas en nutrientes de árboles de hoja ancha, caducifolios o perennifolios, o árboles de coníferas, así como rocas ácidas o silíceas y también sobre los tejados. Se caracteriza por la presencia de isidios, los cuales son del color grisáceo del talo, sin embargo suelen oscurecerse hacia los ápices adquiriendo un color pardo a casi negro; son laminares, dispersos o cubren densamente los lóbulos centrales, presentan una forma cilíndrica a claviforme, pueden ser simples o coraloides, densamente agrupados y formando casi una costra de apariencia continua. Otra especie morfológicamente similar a *P. tiliacea* es *P. pastillifera*, que difiere en el color y la forma de los isidios. Estos suelen ser de color negro azabache, proporcionalmente cortos con la parte superior aplanada y discoidal, con el

borde desarrollando un margen elevado irregular, a veces confluentes, rara vez ramificados, sésiles o con pie corto (Clauzade & Roux 1975, Dobson & Hawksworth 1976). *Parmelina pastillifera* es un caso poco común donde los isidios tienen un alto grado de diferenciación interna y externa (Honegger 1987), en ocasiones el borde del disco es radialmente estriado y en otras adquiere la apariencia de un primordio apotecial con borde carbonáceo y disco pardo claro. La especie crece sobre cortezas ricas en nutrientes, con frecuencia en las ramas horizontales gruesas, aunque también sobre rocas silíceas, tejas y monumentos en lugares bien iluminados. *Parmelina pastillifera* es menos común que *P. tiliacea* en el sur de Europa donde se presenta preferentemente en bosques montanos de caducifolios especialmente de *Fagus* y en general puede decirse que prefiere zonas donde el clima es húmedo (oceánico), siendo más común en las Islas Británicas, en montañas eurosiberianas bajas o en zonas no estrictamente costeras pero con alta precipitación (Dobson & Hawksworth 1976, Nimis 1993). Otra especie también muy similar a *P. tiliacea* es *P. cryptotiliacea*, que como se detalló en el capítulo I, presenta caracteres macromorfológicos semejantes, aunque el tamaño de las esporas lo diferencia de la primera.

Parmelina tiliacea y *P. pastillifera* son especies genéticamente muy cercanas (Blanco *et al.* 2006, Argüello *et al.* 2007, Crespo *et al.* 2010b), mas no así *P. cryptotiliacea* (Núñez-Zapata *et al.* 2011), que genéticamente está muy alejada, razón por la cual se ha excluido del presente estudio. *Parmelina pastillifera* forma un clado monofilético que se anida dentro de *P. tiliacea* en los árboles filogenéticos basados en los marcadores ITS y mtLSU del ADN ribosómico del micobionte (Núñez-Zapata *et al.* 2011). La distribución de las dos especies se solapa en algunos lugares y, por otra parte, los individuos juveniles pueden ser más o menos difíciles de distinguir cuando los isidios están comenzando a desarrollarse, debido a que muchas veces los isidios jóvenes de *P. tiliacea* pueden ser sésiles y subesféricos (Dobson & Hawksworth 1976). En esos casos, la identificación morfológica de ambas especies puede no resultar tan fácil. Sin embargo, al menos para un experto, en individuos adultos rara vez se plantea la duda en una identificación.

En el presente estudio hemos analizado poblaciones de *Parmelina tiliacea* como un ejemplo de organismos con una amplia distribución, donde una combinación de estudios filogenéticos y de genética de poblaciones podría arrojar luz sobre las relaciones entre los procesos genéticos de divergencia y las diferentes condiciones del medio ambiente donde se desarrollan las poblaciones. Esta información también podría resolver las relaciones filogenéticas de *P. tiliacea* y *P. pastillifera*.

El estudio se centra en: 1) establecer si *Parmelina tiliacea* muestra alguna estructura poblacional, así como la escala espacial de las unidades biológicas presentes, 2) determinar si hay poblaciones de *P. tiliacea* que estén más estrechamente relacionadas con *P. pastillifera*, 3) explorar los factores ecológicos que podrían explicar la actual distribución de ambos taxones, y 4) determinar el rango taxonómico apropiado que refleje las diferencias encontradas. Para ello se utilizaron muestras de ambas especies provenientes de diferentes localidades, así como tres marcadores moleculares del micobionte para construir redes de haplotipos, se analizó la estructura de la población a través de modelos de agrupamiento y análisis molecular de la varianza, y se construyó un modelo de distribución geográfica en base a factores bioclimáticos que pudieran limitar las ocurrencias de las especies. También se discute la posible influencia de los cambios climáticos del pasado y de la vegetación en la distribución actual de ambas especies.

2.3 Material y métodos

Muestreo de ejemplares

Se recolectaron 320 muestras de *P. tiliacea* en 57 localidades y 42 muestras de *P. pastillifera* en 12 localidades, en diferentes altitudes y zonas ecológicas. En nueve localidades se encontraron ambas especies creciendo juntas. Los detalles de la ubicación, códigos de herbario, y los números de GenBank de los ejemplares analizados en el presente estudio figuran en la Tabla 5. La mayoría de las muestras fueron identificadas morfológicamente; sin embargo, la adscripción a una u otra especie (*P. tiliacea* o *P. pastillifera*) de los talos jóvenes o de los talos que presentaban isidios no claramente diferenciados requirió un estudio morfológico más detallado, para lo cual se utilizaron los caracteres proporcionados por Dobson & Hawksworth (1976).

Extracción de ADN y amplificación

El presente estudio se realizó utilizando secuencias de las regiones ITS, mtLSU y EFA del ADN del micobionte. Para la extracción y amplificación se utilizaron los protocolos indicados en el apartado METODOLOGÍAS COMUNES A LOS ESTUDIOS REALIZADOS.

Alineamientos de secuencias, análisis de polimorfismos y eventos de recombinación

Se elaboraron cuatro matrices (una por cada gen y una matriz concatenada de los tres genes) que incluyeron todas las muestras de *P. tiliacea*, así como de *P. pastillifera*. Las secuencias fueron alineadas utilizando el programa ClustalW (Thompson *et al.* 1994) incluido en el programa BioEdit (Hall 1999). Las regiones ambiguas y los intrones fueron excluidos de forma manual de las matrices. En cada una de las matrices se estimó el número de sitios polimórficos (S), el número de haplotipos (h), la diversidad haplotípica y la diversidad nucleotídica (π) utilizando el programa DnaSP v5 (Librado & Rozas 2009). Con el mismo programa se hicieron las pruebas de Tajima's D y de Fu's F_s para probar la neutralidad de la evolución molecular (Tajima 1989, Fu & Li 1993). También se calcularon para cada localidad los índices de diversidad molecular (número de sitios polimórficos, la diversidad genética y la diversidad nucleotídica) utilizando el programa Arlequin 3.5.1.2 (Excoffier *et al.* 2005). Para detectar los eventos de recombinación en cada matriz, se realizaron diferentes pruebas (Boot-scanning, Chimaera, Geneconv, MasChi, RDP) implementadas en el programa RDP3 (Martin *et al.* 2010).

Árbol filogenético y redes de haplotipos

El análisis filogenético se llevó a cabo para confirmar la posición parafilética de *P. tiliacea* y la inserción de *P. pastillifera* como clado monofilético emergente dentro de *P. tiliacea* (Núñez-Zapata *et al.* 2011). Se calculó el número de haplotipos presentes en la matriz combinada de los tres genes (ITS+mtLSU+EFA) de *P. tiliacea* y de *P. pastillifera*, y se construyó una matriz "particionada" utilizando un ejemplar de cada haplotipo, además de ejemplares de otras especies de *Parmelina* (*P. quercina*, *P. carporrhizans*, *P. atricha*, *P. cryptotiliacea* y *P. coleae*). El análisis bayesiano (B / MCMC) se realizó con el programa MrBayes 3.1.1 (Huelsenbeck & Ronquist 2001) utilizando los modelos de sustitución nucleotídica K80+G para ITS, F81 para mtLSU y Trnef+G para EFA, de acuerdo con el modelo de mejor ajuste estimado por el programa JModelTest (Posada 2008). La matriz se dividió en tres partes, de acuerdo a la posición y longitud de cada gen, y a cada partición se le proporcionó sus propios parámetros (Nylander *et al.* 2004). No se asumió ningún reloj molecular. Las probabilidades posteriores se aproximaron, utilizando una variante del método de muestreo de la cadena de Markov Monte Carlo (MCMC). Se llevaron a cabo dos análisis MCMCs independientes de 10 millones de generaciones, y con muestreo de un árbol cada 1000 generaciones, empezando con un árbol al azar y utilizando ocho cadenas

simultáneas. Los valores logarítmicos de verosimilitud de los puntos muestreados se representaron frente a las generaciones, utilizando el programa TRACER 1.5 (Rambaut & Drummond 2009) para asegurarse que los valores de verosimilitud alcanzaban un valor de equilibrio estable (Huelsenbeck & Ronquist 2001). Los primeros 1000 árboles fueron descartados y se construyó un árbol consenso a partir de los 18 000 restantes, con los valores promedios de las ramas, utilizando la opción *sumt* de MrBayes. Se obtuvieron las probabilidades posteriores para cada rama del árbol, y sólo las ramas con probabilidades posteriores $\geq 0,95$ fueron considerados estadísticamente significativos. El árbol filogenético se visualizó con el programa Figtree v.1.3.1 (Rambaut 2009) enraizando en el punto medio.

Para mostrar las relaciones entre los haplotipos se construyeron redes de haplotipos utilizando el método de *Median Network* y el algoritmo *EqualAngle* implementados en el programa SplitsTree4 (Huson & Bryant 2006). Este método utiliza todas las posiciones de la matriz alineada que contienen exactamente dos estados diferentes, sin considerar los gaps o los nucleótidos ambiguos de las secuencias (Bandelt *et al.* 1995). El programa muestra gráficamente el contenido global de información de los datos de secuencias, pero reduce la complejidad de la red al identificar paralelismos basándose en la frecuencia de los haplotipos. El análisis se repitió para las cuatro matrices con todas las muestras de *P. tiliacea* y *P. pastillifera*; para la red de la matriz combinada se optó por la opción *Greedily Compatible* (dos o más divisiones se juntan si son compatibles) para obtener una representación más clara de la matriz concatenada (Huson & Bryant 2006).

Tabla 5. Información de la localidad, número de individuos estudiados por localidad, códigos de herbario y accesiones del Genbank de todos los individuos utilizados en el presente estudio. MAF: Herbario de la Facultad de Farmacia de la UCM, B: Herbario del Museo Botánico de Berlin-Dahlem.

No Loc.	Localidad	No indiv	Herbario	Código de GenBank		
				ITS	mtLSU	EFA
<i>Parmelina tiliacea</i>						
1	El Roque, La Palma, Islas Canarias, España	9	MAF-Lich 16469; 17231 - 17238	JX466130 - JX466138	JX466479 - JX466487	JX465753 - JX465761
2	Degollada del Teno Alto, Tenerife, Islas Canarias, España	10	MAF-Lich 17239 - 17248	JX466139 - JX466148	JX466488 - JX466497	JX465762 - JX465771
3	La Escalona, Tenerife, Islas Canarias, España	9	MAF-Lich 17249 - 17257	JX466149 - JX466157	JX466498 - JX466506	JX465772 - JX465780
4	Vega de San Mateo a Tenteniguada, Gran Canaria, Islas Canarias, España	10	MAF-Lich 17277 - 17286	JX466177 - JX466186	JX466526 - JX466535	JX465801 - JX465810
5	Galdar, Gran Canaria, Islas Canarias, España	10	MAF-Lich 16470; 17287 - 17295	JF756983; JX466187 - JX466195	JF757032; JX466536 - JX466544	JX465811 - JX465820
6	Degollada de la Becerra, Gran Canaria, Islas Canarias, España	10	MAF-Lich 17258 - 17267	JX466158 - JX466167	JX466507 - JX466516	JX465781 - JX465790
7	Valleseco, Gran Canaria, Islas Canarias, España	10	MAF-Lich 16482; 17268 - 17276	JF756984; JX466168 - JX466176	JF757033; JX466517 - JX466525	JX465791 - JX465800
8	Rabat, Rabat-Salé-Zemmour-Zaer, Marruecos	1	MAF-Lich 17296	JX466196	JX466545	JX465821
9	Mulay Idriss, Mequinez-Tafilalet, Marruecos	1	MAF-Lich 17306	JX466206	JX466555	JX465832
10	Ifrane, Mequinez-Tafilalet, Marruecos	10	MAF-Lich 16468; 17297 - 17305	JF756988; JX466197 - JX466205	JF757037; JX466546 - JX466554	JX465823 - JX465831
11	Ain Taoujdate, Mequinez-Tafilalet, Marruecos	1	MAF-Lich 16486	JF756976	JF757025	JX465833
12	Taza, Taza-Al Hoceima-Taounate, Marruecos	1	MAF-Lich 17307	JX466207	JX466556	JX465834
13	Chauen, Tánger-Tetuán, Marruecos	1	MAF-Lich 17308	JX466208	JX466557	JX465835
14	La Saucedá, Andalucía, España	10	MAF-Lich 17309 - 17318	JX466209 - JX466218	JX466558 - JX466567	JX465836 - JX465845
15	Grazalema, Andalucía, España	9	MAF-Lich 17319 - 17327	JX466219 - JX466227	JX466568 - JX466576	JX465846 - JX465854
16	Puertollano, Castilla-La Mancha, España	3	MAF-Lich 17328 - 17330	JX466228 - JX466230	JX466577 - JX466579	JX465855 - JX465857
17	San Quintín, Castilla-La Mancha, España	3	MAF-Lich 16457; 17331 - 17332	JF756986; JX466231 - JX466232	JF757035; JX466580 - JX466581	JX465858 - JX465860
18	Navalvillar, Extremadura, España	1	MAF-Lich17355	JX466256	JX466605	JX465884

19	Monfragüe, Extremadura, España	9	MAF-Lich 17333 - 17341	JX466233 - JX466241	JX466582 - JX466590	JX465861 - JX465869
20	Cuacos de Yuste, Extremadura, España	5	MAF-Lich 16465; 17342 - 17345	JX466242 - JX466246	JX466591 - JX466595	JX465870 - JX465874
21	Peña de Francia, Castilla y León, España	4	MAF-Lich 17346 - 17349	JX466247 - JX466250	JX466596 - JX466599	JX465875 - JX465878
22	Morasverdes, Castilla y León, España	5	MAF-Lich 17350 - 17354	JX466251 - JX466255	JX466600 - JX466604	JX465879 - JX465883
23	Braganza, Alto Trás-os-Montes, Portugal	2	MAF-Lich 15243 - 15350	JF756981; JX466257	JF757030; JX466606	JX465885 - JX465886
24	El Escorial, Madrid, España	5	MAF-Lich 16467; 17358 - 17361	JF756980; JX466260 - JX466263	JF757029; JX466609 - JX466612	JX465890 - JX465894
25	El Pardo, Madrid, España	3	MAF-Lich 16452; 17356 - 17357	JF756979; JX466258 - JX466259	JF757028; JX466607 - JX466608	JX465887 - JX46589
26	Montejo de la Sierra, Madrid, España	5	MAF-Lich 17362 - 17366	JX466264 - JX466268	JX466613 - JX466617	JX465895 - JX465899
27	Saliencia, Principado de Asturias, España	4	MAF-Lich 16462; 17379 - 17381	JX466283 - JX466286	JX466632 - JX466635	JX465915 - JX465918
28	La Lomba, Cantabria, España	4	MAF-Lich 17375 - 17378	JX466279 - JX466282	JX466628 - JX466631	JX465910 - JX465913
29	Moral de Hornuez, Castilla y León, España	10	MAF-Lich 16459 - 16460; 17367 - 17374	JX466269 - JX466278	JX466618 - JX466627	JX465900 - JX465909
30	Belagua, Navarra, España	2	MAF-Lich 17382 - 17383	JX466287 - JX466288	JX466636 - JX466637	JX465920 - JX465921
32	Castellón, Valencia, España	10	MAF-Lich 17391 - 17400	JX466296 - JX466305	JX466645 - JX466654	JX465929 - JX465938
33	Banyalbufar, Mallorca, Islas Baleares, España	3	MAF-Lich 17401 - 17403	JX466306 - JX466308	JX466655 - JX466657	JX465939 - JX465941
34	Ufanes, Mallorca, Islas Baleares, España	4	MAF-Lich 16466; 17404 - 17406	JF756990; JX466309 - JX466311	JF757039; JX466658 - JX466660	JX465942 - JX465945
35	Al mawajin, Jendouba, Túnez	2	MAF-Lich 16458; 17407	JF756987; JX466312	JF757036; JX466661	JX465946 - JX465947
36	Badde Orca, Cerdeña, Italia	9	MAF-Lich 17408 - 17416	JX466313 - JX466321	JX466662 - JX466670	JX465948 - JX465956
37	Saint-Tropez, Provence-Alpes-Côte d'Azur, Francia	2	MAF-Lich 16464; 17417	JF756982; JX466322	JF757031; JX466671	JX465957 - JX465958
38	Lodrino, Lombardía, Italia	10	MAF-Lich 16483; 17455 - 17463	JF756985; JX466360 - JX466368	JF757034; JX466709 - JX466717	JX465996 - JX466005
39	Poggioferro, Toscana, Italia	10	MAF-Lich 17440 - 17449	JX466345 - JX466354	JX466694 - JX466703	JX465981 - JX465990
40	Ansedonia, Toscana, Italia	9	MAF-Lich 17431 - 17439	JX466336 - JX466344	JX466685 - JX466693	JX465972 - JX465980
41	Monte Amiatta, Toscana, Italia	1	MAF-Lich 17450	JX466355	JX466704	JX465991
42	Château de Cordes, Auvernia, Francia	4	MAF-Lich 17418 - 17421	JX466323 - JX466326	JX466672 - JX466675	JX465959 - JX465962
43	Neuchâtel, Neuchâtel, Suiza	9	MAF-Lich 17422 - 17430	JX466327 - JX466335	JX466676 - JX466684	JX465963 - JX465971
45	Camporosso in Valcanale, Friuli-Venecia Julia, Italia	8	MAF-Lich 17474 - 17481	JX466379 - JX466386	JX466728 - JX466735	JX466016 - JX466023

46	Bled, Alta Carniola, Eslovenia	9	MAF-Lich 16619; 17484 - 17491	JF756992; JX466389 - JX466396	JF757041; JX466738 - JX466745	JX466026 - JX466034
47	Mittersill, Salburgo, Austria	8	MAF-Lich 16618; 17492 - 17498	JF756991; JX466397 - JX466403	JF757040; JX466746 - JX466752	JX466035 - JX466042
48	Bad Reichenhall, Alta Baviera, Alemania	8	MAF-Lich 17499 - 17506	JX466404 - JX466411	JX466753 - JX466760	JX466043 - JX466050
49	Regensburg (Ratisbona), Baviera, Alemania	5	MAF-Lich 16485; 17509 - 17512	JF756989; JX466414 - JX466417	JF757038; JX466763 - JX466766	JX466053 - JX466057
50	Rhydlydan, Gales, Reino Unido	4	MAF17528 - 17531	JX466443 - JX466446	JX466792 - JX466795	JX466085 - JX466088
51	Sandford, Cumbria, Noroeste Inglaterra, Reino Unido	5	MAF-Lich 17535 - 17539	JX466450 - JX466454	JX466799 - JX466803	JX466092 - JX466096
53	Uppsala, Uppland, Suecia	10	MAF-Lich 17548 - 17557	JX466463 - JX466472	JX466812 - JX466821	JX466105 - JX466114
54	Maries, Isla Thasos, Grecia	4	B600183598; B600183667; B600183986; B600186705	JX466418 - JX466421	JX466767 - JX466770	JX466058 - JX466061
55	Daphnes, Isla de Samotracia, Grecia	4	B600184168; B600185102; B600185118; B600186947	JX466423 - JX466426	JX466772 - JX466775	JX466063 - JX466066
56	Dumanli, Çanakkale, Turquía	2	MAF-Lich 17513 - 17514	JX466428 - JX466429	JX466777 - JX466778	JX466068 - JX466069
57	Bursa, Uludaj, Turquía	1	MAF-Lich 16456	JF756977	JF757026	JX466072
58	Asagi Caglan, Eskisehir, Turquía	3	MAF-Lich 17516 - 17518	JX466431 - JX466433	JX466780 - JX466782	JX466073 - JX466075
59	Sivrihisar Mountains, Eskisehir, Turquía	8	MAF-Lich 17519 - 17526	JX466434 - JX466441	JX466783 - JX466790	JX466076 - JX466083
60	Inköyü, Cankiri, Turquía	1	MAF-Lich 17527	JX466442	JX466791	JX466084
<i>Parmelina pastillifera</i>						
27	Saliencia, Principado de Asturias, España	1	MAF-Lich 16472	JF756999	JF757021	JX465919
28	La Lomba, Cantabria, España	1	MAF-Lich 16473	JF756998	JF757020	JX465914
31	Puerto de Velate, Navarra, España	7	MAF-Lich 17384 - 17390	JX466289 - JX466295	JX466638 - JX466644	JX465922 - JX465928
41	Monte Amiatta, Toscana, Italia	4	MAF-Lich 17451 - 17454	JX466356 - JX466359	JX466705 - JX466708	JX465992 - JX465995
44	Fielis, Friuli-Venecia Julia, Italia	10	MAF-Lich 17464 - 17473	JX466369 - JX466378	JX466718 - JX466727	JX466006 - JX466015
45	Camporosso en Valcanale, Friuli-Venecia Julia, Italia	2	MAF-Lich 17482 - 17483	JX466387 - JX466388	JX466736 - JX466737	JX466024 - JX466025
48	Bad Reichenhall, Alta Baviera, Alemania	3	MAF-Lich 17507 - 17508	JX466412 - JX466413	JX466761 - JX466762	JX466051 - JX466052
50	Rhydlydan, Gales, Reino Unido	3	MAF-Lich 17532 - 17534	JX466447 - JX466449	JX466796 - JX466798	JX466089 - JX466091
52	Bergen, Hordaland, Noruega	8	MAF-Lich 17540 - 17547	JX466455 - JX466462	JX466804 - JX466811	JX466097 - JX466104

54	Maries, Isla Thasos, Grecia	1	B600183985	JX466422	JX466771	JX466062
55	Daphnes, Isla de Samotracia, Grecia	1	B600185101	JX466427	JX466776	JX466067
56	Dumanli, Çanakkale, Turquía	2	MAF-Lich 16471; 17515	JF756997; JX466430	JF757019; JX466779	JX466070; JX466071
Otras Parmelinas						
	<i>P. atricha</i>	3	MAF-Lich 16634; 17558 - 17559	JX466473 - JX466475	JX466822 - JX466824	JX466115 - JX466117
	<i>P. carporrhizans</i>	3	MAF-Lich 16474; 16476 - 16477	JF756994 - JF756996	JF757006 - JF757008	JX466118 - JX466120
	<i>P. quercina</i>	3	MAF-Lich 16193 - 16194; 17560	JF757001 - JF757002; JX466478	JF7570023 - JF7570024; JX466827	JX466121 - JX466123
	<i>P. cryptotiliacea</i>	3	MAF-Lich 16455; 17561 - 17562	JF756971; JX466476 - JX466477	JF757014; JX466825 - JX466826	JX466124 - JX466126
	<i>P. coleae</i>	3	MAF-Lich 16479 - 16481	JF756966 - JF756968	JF757009 - JF757011	JX466127 - JX466129

Análisis de la estructura poblacional

La estructura genética fue analizada por dos procedimientos diferentes: análisis jerárquico de la varianza molecular (AMOVA; Excoffier *et al.* 1992), y métodos de agrupamiento basados en modelos usando genotipos multilocus de individuos georeferenciados (Pritchard *et al.* 2000, Corander *et al.* 2006, Guillot *et al.* 2005).

El análisis jerárquico de la varianza molecular (AMOVA; Excoffier *et al.* 1992) para estimar la distribución de la variabilidad genética dentro y entre poblaciones se realizó a partir de una matriz con las tres regiones de ADN, se estimaron las distancias moleculares con el modelo *pairwise difference*, y se calculó la significancia de los índices de fijación utilizando un procedimiento de permutación no paramétrica con 10 000 permutaciones. Los individuos fueron agrupados por especie y por localidades formando un total de 69 subgrupos. Adicionalmente, se llevó a cabo el test de Mantel, utilizando la distancia por pares *Fst* para probar la significación de la correlación entre la distancia geográfica y la distancia genética de las poblaciones. Ambos análisis se realizaron con el programa Arlequin versión 3.5.1 (Excoffier *et al.* 2005).

En el método de agrupamiento se estimó el número apropiado de *clusters* “K” que conforman el clado *P. tiliacea-P. pastillifera* utilizando métodos de agrupamiento con una aproximación bayesiana (MCMC: *Markov chain Monte Carlo*). La estimación se realizó a partir de datos genotípicos de marcadores no ligados, asumiendo que se encuentran en equilibrio *Hardy-Weinberg* y en equilibrio de ligamiento (*linkage equilibrium*). El valor de K se calculó utilizando 3 programas distintos: Structure v2.3 (Pritchard *et al.* 2000), Geneland v 2.0.0 (Guillot *et al.* 2005) y BAPS v5.2 (Corander *et al.* 2006), los cuales infieren un valor apropiado para K. Una vez obtenido el valor óptimo de K, Structure y BAPS calculan la proporción del genoma de cada individuo originado a partir de cada *cluster* inferido, con lo que se obtiene una estimación de la proporción de mezcla (*admixture*), es decir, la contribución genética de cada *clusters* al genotipo del individuo.

Para el programa Structure se construyó una matriz de datos con las 362 muestras, que incluía el número de localidad (Tabla 5) y el código de haplotipos de cada gen (Tabla 6). Se utilizaron haplotipos en lugar de secuencias para evitar que los datos fueran dominados por una o pocas regiones poco o nada recombinantes, según sugieren Pritchard *et al.* (2010). El análisis se realizó con el modelo *admixture* teniendo en cuenta que los individuos podrían tener una ascendencia mixta (no adm = 0) y considerando o no la información de localidad (*locprior* = 0 o 1). El uso del modelo *locprior* mejora el rendimiento del análisis de datos si

estos son poco informativos y no tiende a encontrar estructura cuando no existe (Hubisz *et al.* 2009, Pritchard *et al.* 2010). Para cada modelo se realizaron una serie de análisis independientes con diferentes valores de K (entre 1 y 10) con un período de *burning* de 10^3 y 10^6 iteraciones posteriores. El período de *burning* indica al programa cuantas veces deben realizarse las simulaciones antes de empezar a recoger los datos para minimizar el efecto de la configuración inicial. El número de iteraciones posteriores marca el número de simulaciones que deben realizarse después del *burning* para obtener una estimación precisa de los parámetros. De cada análisis se realizaron tres réplicas.

Tabla 6. Códigos de haplotipos utilizados para el análisis en Structure. Se muestra la correspondencia entre los 80 haplotipos multilocus (3 genes) y los haplotipos de cada gen individual, así como el número de individuos y las localidades de procedencia (Tabla 5).

3 genes	ITS	mtLSU	EFA	No. Ind.	Localidades
<i>P. tiliacea</i>					
1	5	5	5	1	3
2	5	4	5	20	3, 4, 5, 8
3	22	4	2	3	43, 48
4	6	4	2	8	19, 24, 43, 53
5	8	4	1	1	10
6	12	4	1	1	19
7	13	4	1	1	29
8	21	4	1	1	42
9	25	4	1	5	45, 47, 48
10	22	4	1	5	43, 47, 48, 53
11	28	4	1	1	58
12	6	4	1	46	15, 23, 24, 29, 30, 42, 43, 45, 47, 48, 49, 51, 53, 58, 59
13	1	1	1	1	1
14	25	1	1	1	49
15	3	2	1	1	49
16	6	2	1	1	45
17	19	3	1	1	33
18	6	6	6	1	3
19	3	2	3	2	1
20	3	2	14	1	22
21	2	2	14	5	20, 21, 24, 27
22	15	2	3	2	46
23	2	2	8	1	6
24	3	2	2	24	6, 7, 10, 14, 15, 19, 23, 28, 54
25	3	7	7	1	6
26	3	2	7	3	6, 10, 12
27	2	2	7	5	6, 10, 16, 25
28	2	7	2	1	7
29	11	2	2	1	19
30	2	2	11	4	10, 20
31	3	2	11	2	17, 22
32	3	2	13	3	17, 18, 19
33	2	2	15	1	24
34	3	2	15	2	25, 26
35	2	2	16	1	26
36	2	2	17	1	26

37	2	9	2	1	27
38	3	2	22	1	48
39	2	2	22	2	46, 48
40	2	2	2	41	1, 6, 7, 11, 14, 15, 16, 17, 21, 22, 26, 27, 28, 42, 50, 55, 59
41	15	2	7	1	30
42	24	2	7	1	56
43	15	2	2	7	41, 45, 46, 48
44	26	2	2	1	54
45	15	2	22	7	38, 45, 46, 58
46	24	2	22	3	45, 56
55	7	3	2	1	7
56	9	3	2	1	14
57	4	3	2	4	14
58	18	3	2	3	40
59	10	3	2	1	14
60	6	3	2	1	40
61	7	3	4	2	4, 6
62	7	3	10	1	4
63	7	3	9	2	7, 20
64	4	3	12	1	14
65	18	3	20	1	36
66	4	3	20	1	36
67	4	3	19	5	36
68	19	3	4	1	39
69	19	3	9	2	54, 57
70	4	3	9	3	34, 39
71	4	3	4	44	2, 3, 5, 9, 13, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 40
72	18	3	12	1	35
73	23	3	21	1	40
74	18	3	21	1	39
75	18	3	9	7	39, 40, 54
76	18	3	4	5	33, 40, 55, 56
77	6	3	12	1	25
78	6	3	9	2	39
79	6	3	4	3	7, 32, 55
80	20	3	19	1	36
<i>P. pastillifera</i>					
47	17	10	18	1	31
48	16	8	2	2	41, 48
49	16	8	4	1	54
50	16	8	18	4	50, 55
51	16	10	18	11	31, 52
52	27	8	18	1	56
53	14	8	18	9	27, 28, 31, 44, 45, 56
54	14	8	2	13	41, 44, 48

El valor óptimo de *clusters* K para el clado *P. tiliacea*-*P. pastillifera* se determinó con el método de Evanno *et al.* (2005) a través de portal Structure Harvester (<http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester>). El valor óptimo se calculó mediante el estadístico ΔK , que muestra la diferencia en el valor de verosimilitud logarítmica (*log likelihood*) de los datos entre valores de k sucesivos. El mejor valor de K corresponde al valor máximo de ΔK (Earl & vonHoldt 2012).

El mismo procedimiento se realizó excluyendo los individuos de la misma localidad que presentaban igual combinación haplotípica (clones) para determinar si la redundancia de información influía en la designación de K (matriz = 184 individuos).

Para el programa Geneland, implementado en el paquete R 2.4.1 (Ihaka & Gentleman 1996, Guillot *et al.* 2005), se elaboró una matriz particionada con los tres genes correlacionados con las coordenadas geográficas de cada individuo. Este método utiliza un modelo bayesiano implementado en un esquema MCMC para inferir la localización de discontinuidades genéticas a partir de genotipos multi-locus de individuos georeferenciados, sin un conocimiento a priori sobre las unidades poblacionales y sus límites. De esta forma, infiere un valor de K, asigna cada individuo georeferenciado a un determinado *cluster*, y establece límites geográficos entre *clusters*. Para este análisis también se asumió un modelo de mezcla (*admixture model*), considerando que cada individuo podría provenir de distintos grupos. El análisis se ejecutó con 200 000 iteraciones, con muestreo cada 100, admitiendo una incertidumbre en las coordenadas de 0.2 unidades, así como un número máximo de poblaciones $K = 10$, y con 5 análisis independientes. Dada la aleatoriedad de inicio del MCMC, el análisis se repitió 20 veces, y se seleccionaron los valores de K con mayores probabilidades posteriores $\log Pr(X/K)$.

Finalmente, el programa BAPS (*Bayesian Analysis of Population Structure*) infiere un número de *clusters* con un perfil alélico similar a partir de la frecuencia de alelos de los marcadores moleculares (o frecuencia de nucleótidos de las secuencias de ADN) y el número de grupos genéticamente divergentes en la población (Corander *et al.* 2003, Corander & Tang 2007). Para ello se construyó una matriz particionada multilocus de los 362 individuos. Se utilizó la opción *Clustering with linkage loci*, en el cual el modelo bayesiano cuenta las dependencias presentes entre los loci, se seleccionó el modelo de enlace independiente, y se predefinieron los valores de K en 5, 10, 15, 20, 25 y 30, con 2 repeticiones en cada uno. En un segundo paso, se estimó la probabilidad de que alguno de los loci de un individuo pueda originarse de un *cluster* distinto (*admixture*), mostrando al individuo con una composición genética mezclada (Corander & Marttinen 2006); para lo cual se llevaron a cabo 200 simulaciones a partir de las frecuencias posteriores de los alelos.

Modelado de los requerimientos ecológicos

Este análisis se llevó a cabo para comprobar si la distribución y diversificación de los haplotipos refleja en algún grado distintas preferencias bioclimáticas. Para este análisis se extrajeron 19 variables bioclimáticas de las capas 30 segundos de arco de resolución (~ 1km) de la página de WorldClim (<http://www.worldclim.org/>, Hijmans *et al.* 2005) para las 60 localidades donde se recolectaron *P. tiliacea* y *P. pastillifera*. Como varias de las variables bioclimáticas se correlacionan linealmente, realizamos un análisis de componentes principales (PCA) utilizando la función *prcomp* del paquete *stats* del programa R (<http://www.r-project.org>). PCA reduce las dimensiones del conjunto de variables reconstruyéndola en combinaciones no correlacionadas y estimando su contribución relativa. Las variables que explicaron el 95% o más de la varianza acumulada del clima en el análisis de PCA fueron seleccionadas para modelar las condiciones ecológicas más apropiadas utilizando el programa de máxima entropía MaxEnt v.3.3 (<http://www.cs.princeton.edu/~schapire/maxent/>; Phillips *et al.* 2004, 2006; Elith *et al.* 2011).

MaxEnt es un programa diseñado para modelar la distribución geográfica de una especie a partir de datos de presencia, mediante el método de máxima entropía, es decir, buscando una distribución de probabilidades de presencia lo más extendida posible, o casi uniforme, sujeta a una serie de restricciones derivadas de la información previa disponible. El programa utiliza los lugares de presencia de la especies (“muestras”) expresados en coordenadas geográficas, y un directorio con una serie de capas (*layers*) con las variables. Las capas son cuadrículas (*raster grids*) en ASCII (en el formato .asc de ESRI), cada una de las cuales describe una variable ambiental. Todas las cuadrículas deben tener los mismos límites geográficos, tamaño de celda y sistema de proyección.

El programa genera un parámetro de ganancia (*gain*) relacionado con la desviación, una medida de la bondad de ajuste del modelo. Esta medida empieza en el valor 0 y va aumentando asintóticamente durante el proceso de modelización. Durante este proceso, MaxEnt genera una distribución de probabilidad de las celdas en la cuadrícula empezando por una distribución uniforme y, de forma iterativa, mejora el ajuste de la distribución a los datos de muestreo. La ganancia se define como el logaritmo medio de la probabilidad de las muestras de presencia, menos una constante que hace la distribución uniforme cuando la ganancia toma valor de 0. Al final del proceso, el valor de ganancia indica cómo de ajustado está el modelo a las muestras de presencia. El modelo se puede contrastar mediante tests

realizados sobre una submuestra tomada al azar de las localidades, sobre datos independientes, o mediante validación cruzada de réplicas del análisis.

El programa produce diversos resultados, uno de ellos es un mapa que muestra la probabilidad predicha de condiciones favorables para la especie, taxón, o conjunto de muestras en estudio. En ese mapa se distinguen las áreas con alta probabilidad de condiciones favorables, zonas con condiciones típicas de lugares donde el grupo ha sido muestreado y áreas con una baja probabilidad de condiciones ambientales favorables.

MaxEnt produce una estimación de cuáles son las variables ambientales que condicionan más la distribución geográfica del objeto de estudio, generando una tabla con la contribución porcentual de cada variable. También produce dos conjuntos de curvas de respuesta. En el eje X se representa la variación de la variable ambiental y en el eje Y la probabilidad predicha de condiciones favorables.

El primer conjunto de curvas muestra cómo cambia el modelo predicho al variar una a una las variables mientras se mantienen las otras en su valor promedio, es decir, el efecto marginal de modificar una variable. Estas curvas son difíciles de interpretar si las variables están muy correlacionadas. El segundo conjunto muestra las curvas de respuesta obtenidas al generar el modelo usando cada una de las variables independientemente, obviando el resto de las variables (en vez de fijarlas en su valor medio, como en el caso anterior). Los análisis se llevaron a cabo mediante validación cruzada (*cross validation*) utilizando 15 repeticiones y agrupando las muestras de la siguiente forma: (a) cuatro grupos (T1, T2, T3 y P1) correspondientes a los grupos asignados por el programa Structure, y (b) dos grupos, uno que incluye los tres grupos de haplotipos de *P. tiliacea* (T1-T3), y otro con los haplotipos de *P. pastillifera* (P1), basados en la identificación morfológica.

Contribución del clima y geografía a la estructuración genética del clado P. tiliacea-P. pastillifera: "partición" de la varianza y significancia de las fracciones

Se estimó la partición de la varianza mediante análisis de redundancia (*Redundancy Analysis Ordination, RDA*) con el fin de evaluar la contribución relativa del clima, de la distribución espacial de las muestras (geografía) y de la interacción de ambos factores a la estructura genética de las poblaciones del clado *P. tiliacea-P. pastillifera*. Se utilizó la frecuencia de cada *cluster* en cada localidad (*proportion of membership of each pre-defined population*) obtenida en Structure como variable respuesta, y como variables explicativas los datos de

latitud y longitud (matriz geográfica) y las 5 variables ambientales utilizadas en el modelamiento de los requerimientos ecológicos (matriz climática). Se usaron las funciones *varpart* y *rda* del paquete *vegan* de R acopladas a un test de permutación (tipo anova) para estimar la significancia de las fracciones (Oksanen *et al.* 2012).

2.4 Resultados

Diversidad nucleotídica y molecular

Se generaron un total de 1086 secuencias de genes para este estudio. El alineamiento de la matriz de datos combinados tuvo una longitud de 1724 posiciones, con 91 caracteres variables. No se detectaron eventos de recombinación en las matrices individuales.

Los índices de diversidad genética para cada gen se detallan en la Tabla 7. La región EFA tiene el mayor número de sitios polimórficos y la más alta diversidad de nucleótidos, mientras que la región mtLSU tiene los valores más bajos.

Los tres loci fueron polimórficos mostrando 28 haplotipos en ITS, 10 haplotipos en mtLSU y 22 haplotipos en EFA, aunque la diversidad haplotípica fue similar en los tres genes. *Parmelina tiliacea* mostró 24 haplotipos en la región ITS, 8 en la región mtLSU y 19 en la región EFA; en *P. pastillifera* se encontraron 4 haplotipos de ITS, 2 en mtLSU y 3 en EFA. Sólo dos haplotipos de la región EFA se encontraron presentes tanto en individuos de *P. tiliacea* como de *P. pastillifera*, el resto de haplotipos fueron propios de cada especie. Las tres regiones mostraron ser selectivamente neutrales de acuerdo a los valores del test de Tajima'D ($p > 0.10$), mientras que el valor negativo de la región ITS en la prueba de Fu's F_s indicó un exceso de mutaciones recientes, por lo tanto un exceso de alelos raros, o la expansión de la población. Se identificaron un total de 80 haplotipos diferentes cuando los tres loci se analizaron de forma conjunta: 72 haplotipos estaban presentes en muestras de *P. tiliacea* y 8 haplotipos en *P. pastillifera*. No se detectaron haplotipos compartidos entre las especies, además 42 haplotipos estaban representados por un solo un individuo (Tabla 6).

Tabla 7. Análisis estadístico de las regiones ITS, mtLSU y EFA.

	ITS	mtLSU	EFA
Número de secuencias	362	362	362
Número de pares de bases	462	716	546
Sitios polimórficos (S)	30	19	42
Número de haplotipos (H)	28	10	22
Diversidad haplotípica	0.8880 ± 0.0070	0.7400 ± 0.0100	0.8340 ± 0.0120
Diversidad nucleotídica (π)	0.0082 ± 0.0003	0.0070 ± 0.0003	0.0175 ± 0.0003
Test de Tajima's D	-0.7060 (n.s.)	1.7485 (n.s.)	0.9539 (n.s.)
Test de Fu's Fs	-5.035	8.032	6.347

n.s.=no significativo (P>0.10)

El número de haplotipos, las diferencias por pares y los valores de diversidad nucleotídica varían de una población a otra en cada región del ADN (Tabla8). Los valores más altos para todos los índices se encontraron en las poblaciones de *P. tiliacea*. La región ITS presentó el mayor número de haplotipos (5) en SAU_T (sur de España), sitios polimórficos (10) en BRH_T (sur de Alemania), y diversidad nucleotídica en LAP_T (Turquía), mientras que la diversidad genética mayor (1.000) se encontró en 10 localidades. La región mtLSU tuvo el mayor número de haplotipos y de sitios polimórficos en ESA_T (Islas Canarias), mientras que el mayor valor de diversidad genética (1.000) y diversidad nucleotídica (0.014) se encontró en BEL_T (España) y BRA_T (Portugal). En la región EFA, 5 localidades (DBE_T-Islas Canarias, IFR_T-Marruecos, ESC_T-España, MOS_T-España y ANS_T-Italia) presentaron el número más alto de haplotipos (4), CUA_T (España) presentó el mayor número de sitios polimórficos (25), 5 localidades (SNQ_T-España, BRA_T-Portugal, PAR_T-España, BEL_T-España y TUN_T-Túnez) tuvieron los mayores valores de diversidad genética (1.000), y BEL_T (España) tuvo la diversidad nucleotídica más elevada (0.030). Los índices más altos de diversidad molecular en la matriz combinada se encontraron en DBE_T con 7 haplotipos, BRH_T, también con 7 haplotipos y 38 sitios polimórficos; BRA_T y LAP_T con 1.00 de diversidad genética, y BEL_T también con 1.00 de diversidad genética y 0.018 de diversidad nucleotídica.

Tabla 8. Estimaciones de los parámetros de variación genética basados en las matrices de ITS, mtLSU, EFA, y en la matriz combinada en 57 localidades de *P. tiliacea* (T) y 12 localidades de *P. pastillifera* (P). N = número de individuos. H = número de haplotipos. S = número de sitios polimórficos. GD = número promedio de diferencias entre pares. π = diversidad nucleotídica. SD = desviación estándar. Los valores más altos se muestran en negrita.

No. Loc.	Codigo	ITS					mtLSU					EFA				3 Genes			
		N	H	S	GD	$\pi \pm SD$	H	S	GD	$\pi \pm SD$	H	S	GD	$\pi \pm SD$	H	S	GD \pm SD	$\pi \pm SD$	
1	ROQ_T	9	3	4	0.5556	0.0025 \pm 0.0020	2	9	0.2222	0.0028 \pm 0.0020	3	23	0.5556	0.0160 \pm 0.0093	3	36	0.44 \pm 0.34	0.0072 \pm 0.0041	
2	DEG_T	10	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	
3	ESA_T	9	3	5	0.6389	0.0057 \pm 0.0038	4	15	0.6944	0.0091 \pm 0.0054	3	16	0.6389	0.0107 \pm 0.0064	4	36	0.66 \pm 0.46	0.0086 \pm 0.0048	
4	MAT_T	10	2	4	0.3556	0.0031 \pm 0.0023	2	11	0.3556	0.0055 \pm 0.0034	3	8	0.3778	0.0050 \pm 0.0033	3	23	0.36 \pm 0.29	0.0047 \pm 0.0027	
5	GAL_T	10	2	5	0.2000	0.0022 \pm 0.0018	2	11	0.2000	0.0031 \pm 0.0021	2	7	0.2000	0.0026 \pm 0.0020	2	23	0.20 \pm 0.19	0.0027 \pm 0.0016	
6	DBE_T	10	3	4	0.6000	0.0023 \pm 0.0019	3	2	0.3778	0.0006 \pm 0.0006	4	16	0.7111	0.0072 \pm 0.0045	7	22	0.56 \pm 0.40	0.0031 \pm 0.0018	
7	VAL_T	10	4	4	0.7333	0.0036 \pm 0.0026	3	2	0.6000	0.0009 \pm 0.0009	3	15	0.3778	0.0098 \pm 0.0058	6	21	0.57 \pm 0.41	0.0043 \pm 0.0025	
8	RAB_T	1	1	0	-	-	1	0	-	-	1	0	-	-	1	0	0	0	
9	MUL_T	1	1	0	-	-	1	0	-	-	1	0	-	-	1	0	0	0	
10	IFR_T	10	3	4	0.6000	0.0023 \pm 0.0019	2	10	0.2000	0.0028 \pm 0.0020	4	20	0.7111	0.0080 \pm 0.0049	5	34	0.50 \pm 0.37	0.0045 \pm 0.0026	
11	AIN_T	1	1	0	-	-	1	0	-	-	1	0	-	-	1	0	0	0	
12	TAZ_T	1	1	0	-	-	1	0	-	-	1	0	-	-	1	0	0	0	
13	CHA_T	1	1	0	-	-	1	0	-	-	1	0	-	-	1	0	0	0	
14	SAU_T	10	5	7	0.7556	0.0060 \pm 0.0039	2	1	0.4667	0.0006 \pm 0.0007	2	15	0.2000	0.0057 \pm 0.0036	6	23	0.47 \pm 0.35	0.0036 \pm 0.0021	
15	GRA_T	9	3	3	0.4167	0.0018 \pm 0.0016	2	10	0.2222	0.0031 \pm 0.0022	2	17	0.2222	0.0063 \pm 0.0040	3	30	0.29 \pm 0.25	0.0040 \pm 0.0023	
16	PTO_T	3	1	0	0	0	1	0	0	0	2	2	0.6667	0.0024 \pm 0.0025	2	2	0.22 \pm 0.27	0.0008 \pm 0.0008	
17	SNQ_T	3	2	1	0.6667	0.0014 \pm 0.0018	1	0	0	0	3	3	1.0000	0.0037 \pm 0.0035	3	4	0.56 \pm 0.53	0.0015 \pm 0.0014	
18	NAV_T	1	1	0	-	-	1	0	-	-	1	0	-	-	1	0	0	0	
19	MON_T	9	4	4	0.5833	0.0027 \pm 0.0021	2	10	0.3889	0.0055 \pm 0.0034	3	18	0.4167	0.0067 \pm 0.0042	5	32	0.46 \pm 0.35	0.0051 \pm 0.0029	
20	CUA_T	5	2	4	0.4000	0.0035 \pm 0.0029	2	1	0.4000	0.0006 \pm 0.0007	3	25	0.7000	0.0226 \pm 0.0144	3	30	0.5 \pm 0.41	0.0082 \pm 0.0051	
21	PEF_T	4	1	0	0	0	1	0	0	0	2	17	0.5000	0.0152 \pm 0.0107	2	17	0.17 \pm 0.21	0.0047 \pm 0.0033	
22	MVD_T	5	2	1	0.6000	0.0013 \pm 0.0014	1	0	0	0	3	19	0.7000	0.0136 \pm 0.0090	3	20	0.43 \pm 0.37	0.0046 \pm 0.0030	
23	BRA_T	2	2	2	1.0000	0.0043 \pm 0.0053	2	10	1.0000	0.0141 \pm 0.0148	2	17	1.0000	0.0283 \pm 0.0292	2	29	1.00 \pm 1.10	0.0159 \pm 0.0162	

24	ESC_T	5	2	3	0.6000	0.0039 ± 0.0031	2	10	0.6000	0.0085 ± 0.0057	4	24	0.9000	0.0223 ± 0.0142	4	37	0.70 ± 0.54	0.0115 ± 0.0072
25	PAR_T	3	3	3	1.0000	0.0044 ± 0.0041	2	1	0.6667	0.0009 ± 0.0012	3	17	1.0000	0.0220 ± 0.0172	3	21	0.89 ± 0.78	0.0084 ± 0.0065
26	MOS_T	5	2	1	0.4000	0.0009 ± 0.0011	1	0	0	0	4	4	0.9000	0.0033 ± 0.0027	4	5	0.43 ± 0.37	0.0013 ± 0.0010
27	SAL_T	4	1	0	0	0	2	1	0.5000	0.0007 ± 0.0009	2	17	0.6667	0.0203 ± 0.0140	3	18	0.39 ± 0.36	0.0066 ± 0.0045
27	SAL_P	1	1	0	-	-	1	0	-	-	1	0	-	-	1	0	0	0
28	LOM_T	4	2	1	0.5000	0.0011 ± 0.0013	1	0	0	0	1	0	0	0	2	1	0.17 ± 0.20	0.0003 ± 0.0004
28	LOM_P	1	1	0	-	-	1	0	-	-	1	0	-	-	1	0	0	0
29	MHO_T	10	2	1	0.2000	0.0004 ± 0.0006	1	0	0	0	1	0	0	0	2	1	0.07 ± 0.10	0.0001 ± 0.0002
30	BEL_T	2	2	5	1.0000	0.0109 ± 0.0119	2	10	1.0000	0.0141 ± 0.0148	2	18	1.0000	0.0302 ± 0.0311	2	33	1.00 ± 1.10	0.0182 ± 0.0185
31	PVE_P	7	3	5	0.7143	0.0056 ± 0.0039	2	1	0.5714	0.0008 ± 0.0008	1	0	0	0	3	6	0.43 ± 0.34	0.0018 ± 0.0012
32	CAS_T	10	2	2	0.2000	0.0009 ± 0.0010	1	0	0	0	1	0	0	0	2	2	0.07 ± 0.10	0.0002 ± 0.0003
33	BAN_T	3	3	2	1.0000	0.0029 ± 0.0030	1	0	0	0	2	14	0.6667	0.0150 ± 0.0120	3	16	0.56 ± 0.53	0.0054 ± 0.0043
34	UFA_T	4	1	0	0	0	1	0	0	0	2	1	0.6667	0.0012 ± 0.0014	2	1	0.22 ± 0.25	0.0004 ± 0.0004
35	TUN_T	2	2	1	1.0000	0.0022 ± 0.0031	1	0	0	0	2	1	1.0000	0.0018 ± 0.0026	2	2	0.67 ± 0.78	0.0012 ± 0.0014
36	CER_T	9	3	3	0.4167	0.0018 ± 0.0016	1	0	0	0	3	2	0.5556	0.0011 ± 0.0011	5	5	0.32 ± 0.27	0.0008 ± 0.0006
37	PRV_T	2	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
38	LOD_T	10	2	6	0.3556	0.0047 ± 0.0032	2	1	0.3556	0.0005 ± 0.0006	2	15	0.3556	0.0101 ± 0.0060	2	22	0.36 ± 0.29	0.0046 ± 0.0026
39	POG_T	10	4	3	0.6444	0.0020 ± 0.0017	1	0	0	0	3	2	0.3778	0.0010 ± 0.0010	5	5	0.34 ± 0.28	0.0008 ± 0.0006
40	ANS_T	9	4	3	0.6944	0.0018 ± 0.0016	1	0	0	0	4	16	0.7500	0.0155 ± 0.0090	6	19	0.48 ± 0.36	0.0053 ± 0.0030
41	AMI_T	1	1	0	-	-	1	0	-	-	1	0	-	-	1	0	0	0
41	AMI_P	4	2	4	0.5000	0.0044 ± 0.0037	1	0	0	0	1	0	0	0	2	4	0.17 ± 0.20	0.0012 ± 0.0010
42	CCO_T	4	3	4	0.8333	0.0044 ± 0.0036	2	10	0.5000	0.0070 ± 0.0052	2	17	0.5000	0.0141 ± 0.0100	3	31	0.61 ± 0.51	0.0085 ± 0.0058
43	SUI_T	9	2	2	0.3889	0.0017 ± 0.0015	1	0	0	0	2	17	0.5000	0.0141 ± 0.0082	4	19	0.30 ± 0.26	0.0048 ± 0.0028
44	FIE_P	10	1	0	0	0	1	0	0	0	2	3	0.2000	0.0011 ± 0.0011	2	3	0.07 ± 0.10	0.0003 ± 0.0003
45	CAM_T	8	4	7	0.8214	0.0073 ± 0.0048	2	10	0.4286	0.0060 ± 0.0038	3	18	0.6786	0.0163 ± 0.0096	6	35	0.64 ± 0.46	0.0096 ± 0.0054
45	CAM_P	2	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
46	BLE_T	9	2	8	0.2222	0.0039 ± 0.0028	1	0	0	0	3	18	0.7222	0.0128 ± 0.0075	4	26	0.31 ± 0.27	0.0050 ± 0.0029
47	MIT_T	8	3	2	0.6786	0.0018 ± 0.0016	1	0	0	0	1	0	0	0	3	2	0.23 ± 0.22	0.0005 ± 0.0004
48	BRH_T	8	6	10	0.8929	0.0076 ± 0.0049	2	10	0.5357	0.0076 ± 0.0046	3	18	0.7500	0.0160 ± 0.0094	7	38	0.73 ± 0.51	0.0102 ± 0.0058

48	BRH_P	2	2	4	1.0000	0.0088 ± 0.0098	1	0	0	0	1	0	0	0	2	4	0.33 ± 0.46	0.0023 ± 0.0026
49	BAV_T	5	3	3	0.7000	0.0026 ± 0.0023	2	10	0.7000	0.0059 ± 0.0041	1	0	0	0	3	13	0.47 ± 0.39	0.0031 ± 0.0021
50	WAL_T	4	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
50	WAL_P	3	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
51	CUM_T	5	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
52	NRW_P	8	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
53	SWN_T	10	2	2	0.3556	0.0016 ± 0.0014	1	0	0	0	2	17	0.2000	0.0056 ± 0.0036	3	19	0.18 ± 0.18	0.0022 ± 0.0014
54	THA_T	4	4	8	1.0000	0.0098 ± 0.0073	2	1	0.6667	0.0009 ± 0.0010	2	15	0.6667	0.0189 ± 0.0131	4	24	0.78 ± 0.62	0.0089 ± 0.0060
54	THA_P	1	1	0	-	-	1	0	-	-	1	0	-	-	1	0	0	0
55	SAM_T	4	3	4	0.8333	0.0047 ± 0.0039	2	1	0.5000	0.0007 ± 0.0009	2	14	0.5000	0.0132 ± 0.0093	3	19	0.61 ± 0.51	0.0057 ± 0.0039
55	SAM_P	1	1	0	-	-	1	0	0.00	-	1	0	-	-	1	0	0	0
56	LAP_T	2	2	7	1.0000	0.0153 ± 0.0164	2	1	1.0000	0.0014 ± 0.0020	2	15	1.0000	0.0282 ± 0.0291	2	23	1.00 ± 1.10	0.0135 ± 0.0138
56	LAP_P	2	2	2	1.0000	0.0043 ± 0.0053	1	0	0	0	1	0	0	0	2	2	0.33 ± 0.46	0.0012 ± 0.0014
57	BUR_T	1	1	0	-	-	1	0	-	-	1	0	-	-	1	0	0	0
58	ASA_T	3	3	6	1.0000	0.0087 ± 0.0074	2	10	0.6667	0.0094 ± 0.0076	2	18	0.6667	0.0202 ± 0.0158	3	34	0.78 ± 0.69	0.0126 ± 0.0096
59	SIV_T	8	2	3	0.4286	0.0028 ± 0.0022	2	10	0.4286	0.0060 ± 0.0038	2	17	0.4286	0.0121 ± 0.0073	2	30	0.43 ± 0.34	0.0070 ± 0.0041
60	CAN_T	1	1	0	-	-	1	0	-	-	1	0	-	-	1	0	0	0

Árbol filogenético y redes de haplotipos

De la matriz combinada de *P. tiliacea* y *P. pastillifera* se obtuvieron 80 haplotipos diferentes cuyas relaciones filogenéticas se muestran en la Fig. 11. Los parámetros de verosimilitud del análisis mostraron los siguientes valores promedio (\pm desviación estándar): la probabilidad (lnL) = -5161.96 (0.2743), frecuencia de bases π (A) = 0.215 (1.8161E-4), π (C) = 0.276 (1.9429E-4), π (G) = 0.237 (1.8574E-4), π (T) = 0.273 (2.1952E-4), tasa de matriz $r(AC) = 7.722E-2$ (2.2466E-4), $r(AG) = 0.208$ (4.985E-4), $r(AT) = 7.398E-2$ (2.2208E-4), $r(GC) = 7.074E-2$ (2.3343E-4), $r(CT) = 0.472$ (6.6303E-4), $r(GT) = 9.829E-2$ (2.8005E-4).

La topología del árbol mostró que la especie estrictamente sexual *P. coleae* (California - EE.UU.) es el grupo hermano de un clado monofilético formado por las especies isidiadas europeas *P. tiliacea* y *P. pastillifera*. Dentro del clado monofilético formado por *P. tiliacea* y *P. pastillifera*, algunos haplotipos de *P. tiliacea* (T1) se separan por unas pocas mutaciones de un clado monofilético principal que incluye el resto de haplotipos de *P. tiliacea* (T2 y T3), así como un clado en el que anidan todos los haplotipos de *P. pastillifera* (P1), confirmando la topología o distribución parafilética de *P. tiliacea*.

Las redes de haplotipos de cada gen y de la matriz combinada se muestran en la Fig. 12. La región mtLSU formó la red más simple con 10 haplotipos separados claramente en dos grupos, mientras que las redes de las regiones ITS y EFA, con 24 divergencias (*splits*) cada una, mostraron eventos reticulados. En la red de ITS, 18 haplotipos de *P. tiliacea* formaron un grupo principal (A) que surge del mismo punto, mientras que el resto de los haplotipos están dispersos. Dos haplotipos de *P. pastillifera* (14, 27) se conectaron a los haplotipos dispersos de *P. tiliacea* mientras que los otros dos (16, 17) se mostraron más separados. En la red de mtLSU, los 8 haplotipos de *P. tiliacea* se dividieron en dos grupos principales: los haplotipos 1, 4 y 5 formaron un grupo, mientras que el resto (2, 3, 6, 7, 9) se relacionaron estrechamente con los haplotipos exclusivos de *P. pastillifera* (8, 10). En la red de EFA, los 21 haplotipos de *P. tiliacea* también formaron dos grupos principales, uno de ellos compuesto por 9 haplotipos (B) y el otro por 12 (C); los dos haplotipos (2, 4) compartidos por *P. tiliacea* y *P. pastillifera* se encontraron en cada uno de estos grupos principales; un haplotipo exclusivo de *P. pastillifera* (18) se situó entre los dos grupos de *P. tiliacea*. La red de haplotipos de la matriz combinada de las tres regiones (Fig. 12) mostró tres grupos formados por los haplotipos de *P. tiliacea*, y una rama larga separada donde se conectaron los haplotipos de *P. pastillifera*; la agrupación de dichos haplotipos fue similar a la establecida en el árbol filogenético.

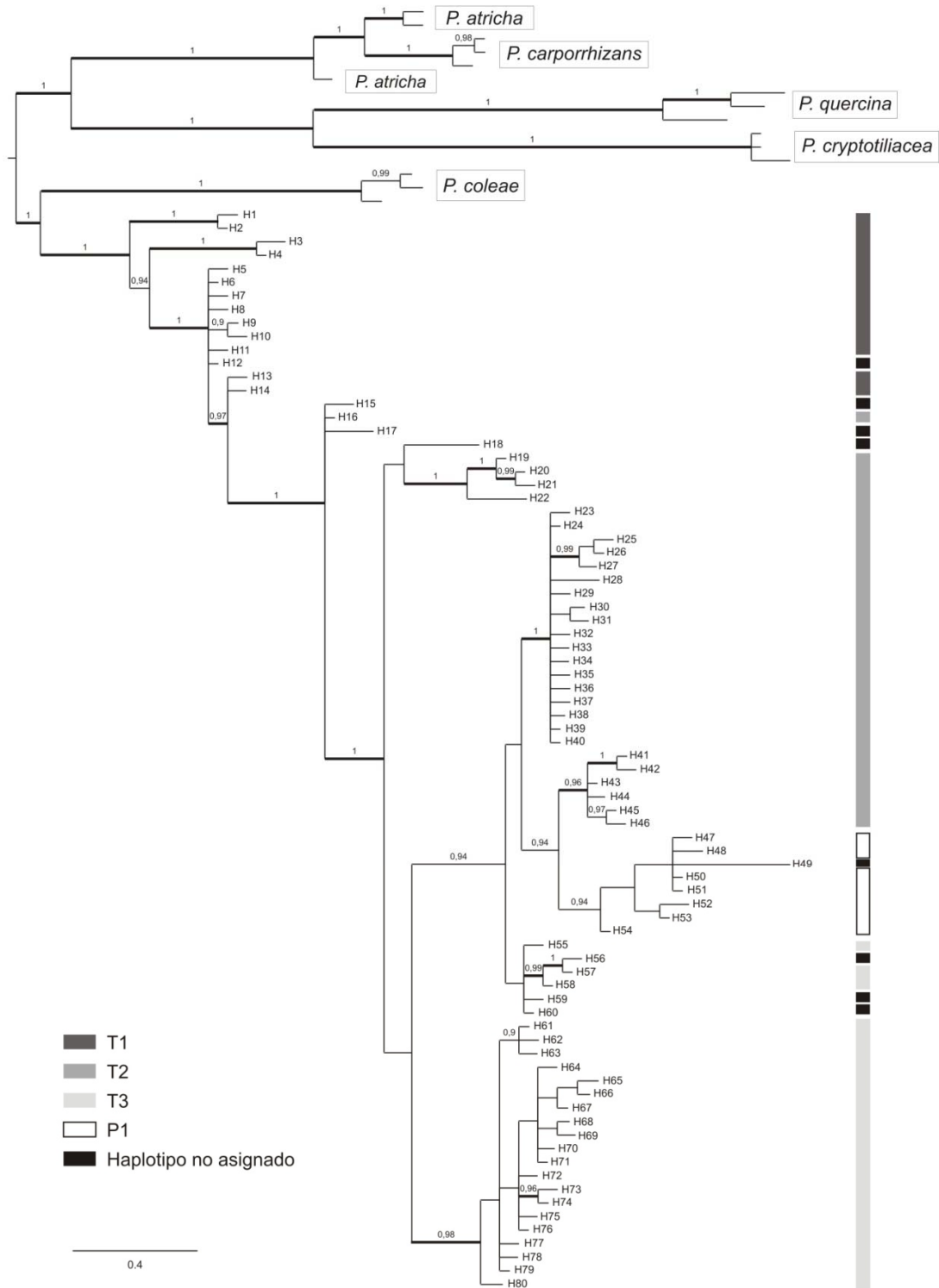


Fig. 11. Árbol consenso basado en 9000 árboles siguiendo el método B/MCMC a partir de una matriz de las regiones ITS, mtLSU y EFA. Las probabilidades posteriores en el análisis Bayesiano se indican sobre las ramas. Las ramas con un apoyo significativo (≥ 0.95) aparecen resaltadas.

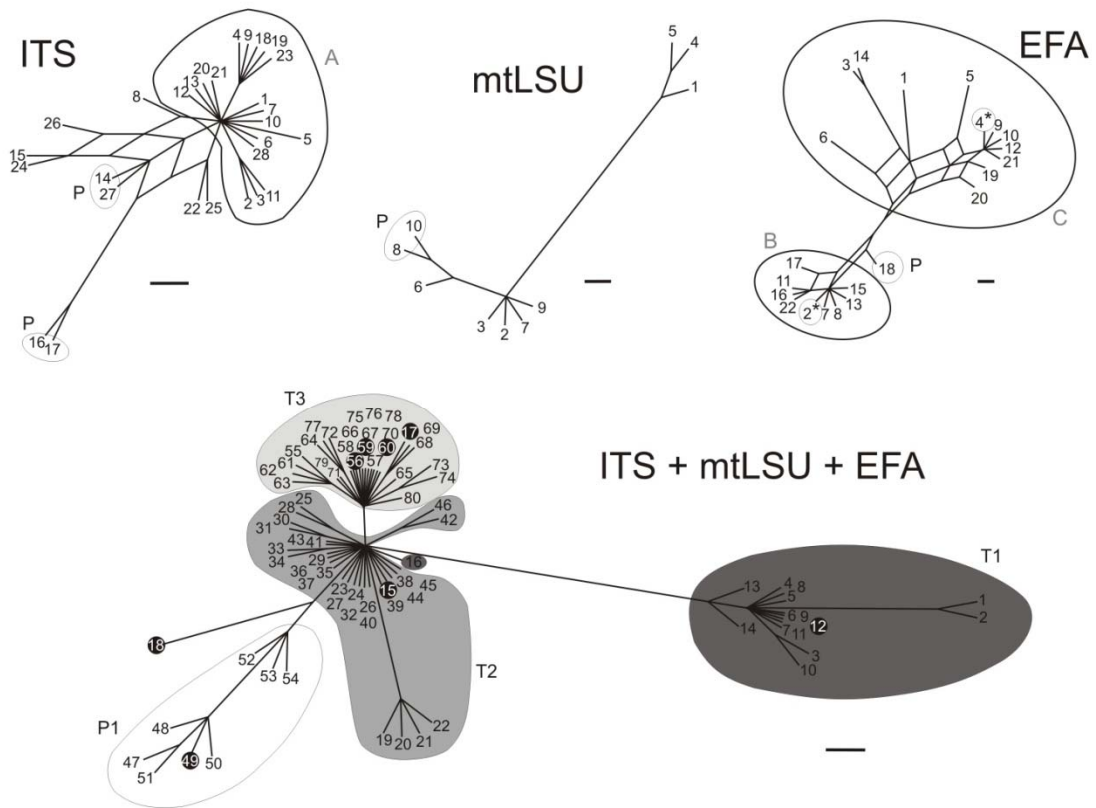


Fig. 12. Redes de haplotipos de *Parmelina tiliacea* y *P. pastillifera* construido a partir de las matrices de ITS, mtLSU, la EFA, y la matriz combinada de los tres genes. Los colores hacen referencia a los grupos encontrados en el análisis de estructura de la población (T1-T3, P1). Los números en circunferencias negras corresponden a los haplotipos no asignados a ningún grupo.

Estructura poblacional

El análisis AMOVA de la matriz combinada de secuencias de ADN mostró que el 27% de la variación se explica por la diferenciación como dos especies, un 38% es atribuible a las diferencias entre localidades dentro de cada especie, mientras que un 34% se debe a la variación entre individuos de la misma localidad y especie (Tabla 9). Los valores variaron al excluir los haplotipos redundantes. El test de Mantel indicó que existe una correlación significativa baja ($r = 0.18$, $p = 0.001$) entre la distribución geográfica y las distancias genéticas de las diferentes localidades muestreadas medidas por F_{st} , por lo que la subdivisión de las poblaciones no puede ser explicado solo por su origen geográfico, es decir, no hay un claro aislamiento por distancia.

Tabla 9. Análisis jerárquico de la varianza molecular (AMOVA) de poblaciones del clado *Parmelina tiliacea*-*P. pastillifera*.

Fuente de variación	g.l.	Suma de cuadrantes	Varianza	Porcentaje de variación	P	ϕ
s						
Diferenciación específica (Incluyendo todas las muestras)						
Entre especies	1	36.670	0.43549	27.42	0.0000	0.2742
Entre localidades dentro de especies	67	248.067	0.60740	38.25	0.0000	0.5270
Dentro de localidades	293	159.729	0.54515	34.33	0.0000	0.6567
Total	361	444.467	1.58804			
Diferenciación específica (excluyendo los haplotipos redundantes)						
Entre especies	1	149.807	4.28336	33.55	0.0000	0.3355
Entre localidades dentro de especies	67	819.358	2.25395	17.66	0.0000	0.2657
Dentro de localidades	115	716.264	6.22839	48.79	0.0000	0.5121
Total	183	1685.429	1.58804			

En el análisis por agrupamiento, los tres programas utilizados para inferir el número de *clusters* (K) que conforman el clado *P. tiliacea*-*P. pastillifera* proporcionaron diferente información. En el análisis realizado con el programa Structure, la estimación del número de *clusters* fue de K = 4 con un valor $\ln P(k) = -1297.2$, sin considerar la información de ubicación ($\text{locprior} = 0$) (Tabla 10). La utilización de datos geográficos no mejoró la designación del valor de K ($r > 3$).

Tabla 10. Estimaciones del valor de K siguiendo el método Evanno ($\text{loc prior} = 0$).

K	Reps	Mean $\ln P(K)$	Stdev $\ln P(K)$	$\ln'(K)$	$ \ln''(K) $	Delta K
1	3	-2272.0333	0.0577	—	—	—
2	3	-1742.1333	36.4886	529.9000	226.8667	6.2175
3	3	-1439.1000	3.6000	303.0333	161.1000	44.7500
4	3	-1297.1667	0.5033	141.9333	216.3333	429.8108
5	3	-1371.5667	59.6674	-74.4000	36.1333	0.6056
6	3	-1409.8333	5.2291	-38.2667	39.9667	7.6431
7	3	-1488.0667	35.1440	-78.2333	16.4667	0.4685
8	3	-1549.8333	18.9616	-61.7667	34.9333	1.8423
9	3	-1646.5333	19.9212	-96.7000	63.5667	3.1909
10	3	-1679.6667	15.6692	-33.1333	—	—

La estimación de *clusters* utilizando el programa Geneland mostró un valor promedio de K = 5 con un valor $\ln_{\text{max}} = -735.39$, en alguna de las repeticiones también se apreció algún valor de K = 4, sin embargo todos los valores mostraron una probabilidad por debajo del 50% (Tabla 11).

Tabla 11. Lista de las 10 iteraciones con mayores valores ln para K según el programa Geneland.

Prueba	Run	ln	Probabilidad	K
10	7	-735.3924	38.59%	5
9	1	-828.3905	41.83%	5
10	6	-835.2526	39.90%	5
10	10	-843.0427	40.17%	5
8	4	-850.8340	38.30%	5
10	8	-862.5337	40.66%	5
8	3	-867.4373	36.69%	5
3	4	-871.9021	39.45%	4
9	4	-911.4863	39.55%	5
3	2	-1012.0910	50.31%	5

El análisis realizado con el programa BAPS estimó el valor mínimo de K = 8 con un valor Log (ML) = -2988.82 y una probabilidad del 96.48% (Tabla 12), otros valores estimados para K fueron 9 y 10 pero sus probabilidades fueron por debajo del 5%.

Tabla 12. Lista de iteraciones con los 10 mejores valores de K basados en sus valores probabilísticos log (ML) según el programa BAPS.

K	Log (ML)	Probabilidad
8	-2988.8199	0.9648
8	-2991.9247	-
9	-2992.1314	0.0352
9	-2995.2362	-
8	-2997.0706	-
10	-3000.1711	1.13x10 ⁻⁵
8	-3000.1754	-
9	-3000.5616	-
10	-3003.2758	-
10	-3008.6765	-

Pese a las diferencias en el valor de K, los tres programas mostraron ciertas congruencias en la designación de *clusters*. La asignación de los 4 *clusters* inferida por Structure fue congruente con la agrupación obtenida en la red de haplotipos de la matriz combinada (Fig. 12), donde tres grupos incluyeron sólo muestras de *P. tiliacea*, mientras que el cuarto estuvo compuesto exclusivamente por muestras de *P. pastillifera*. Estos resultados también fueron congruentes con los obtenidos en BAPS ya que, aunque BAPS estimó como número de *clusters* más probable K = 8, un agrupamiento de nivel superior realizando un árbol NJ de los *clusters* mostró una asociación similar a la obtenida con Structure (Fig. 13), la única diferencia fue T2 que se dividió en dos grupos, uno de los cuales se encontró más próximo al *cluster* “mediterráneo” T3. La delimitación geográfica entre los *clusters* inferidos por

Geneland también se mostró coincidente con la delimitación establecida por Structure (Fig.14); los *clusters* de Geneland se agruparon por áreas geográficas: (1) oeste de Reino Unido, Península Ibérica y Marruecos, (2) periferia del Mediterráneo Central, (3) centro - norte de Europa y este de Turquía, (4) Italia (excluyendo las localidades del norte y de la costa occidental), y (5) Grecia y oeste de Turquía; las localidades de Islas Canarias fueron asignadas a dos *clusters* diferentes, uno de ellos coincidente con las poblaciones del Mediterráneo Central (T3). Sin embargo, no hubo un *cluster* exclusivo para *P. pastillifera*, estando conformados la mayoría de los *clusters* por ejemplares de ambas especies, es decir, el programa no detectó una barrera geográfica nítida entre ambas especies.

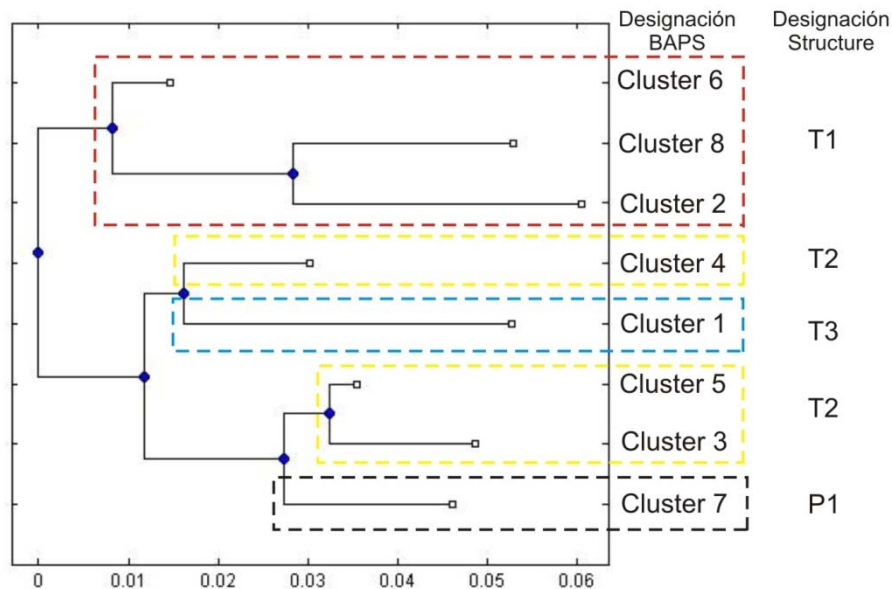


Fig. 13. Árbol NJ entre los *clusters* inferidos por el programa BAPS. La inferencia filogenética se estimó utilizando la distancia genética KL (*Kullback-Leibler*).

El análisis AMOVA agrupando a los individuos por *clusters* mostró que este tipo de agrupamiento explica el 74% de la variación, un 14% es atribuible a las diferencias entre localidades dentro de cada *cluster*, mientras que un 12% se debe a la variación entre individuos de la misma localidad y *cluster* (Tabla 13). Las distancias genéticas utilizando valores F_{st} (Tabla 14) muestran que los grupos más próximos son los *clusters* T2 y P1, y los más distantes T1 con T3, coincidiendo con lo mostrado en las redes de haplotipos (Fig. 12)

Tabla 13. Análisis AMOVA agrupando a los individuos de acuerdo a los 4 *clusters* inferidos por Structure.

<i>Clusters</i> estimados por Structure, excluyendo los individuos con “admixture”						
Entre <i>clusters</i>	3	2295.293	8.85435	74.12	0.0000	0.7412
Entre localidades dentro de <i>clusters</i>	88	674.659	1.67135	13.991	0.0000	0.5407
Dentro de localidades	262	371.873	141954	11.88	0.0000	0.8812
Total	353	3341.873	11.94525			

Tabla 14. Distancias genéticas entre los cuatro *clusters* inferidos por Structure, utilizando valores *Fst*.

	<i>Cluster</i> T1	<i>Cluster</i> T2	<i>Cluster</i> T3
<i>Cluster</i> T1	-	-	-
<i>Cluster</i> T2	0.57540	-	-
<i>Cluster</i> T3	0.59841	0.57860	-
<i>Cluster</i> P1	0.56398	0.51397	0.56635

P. tiliacea y *P. pastillifera*

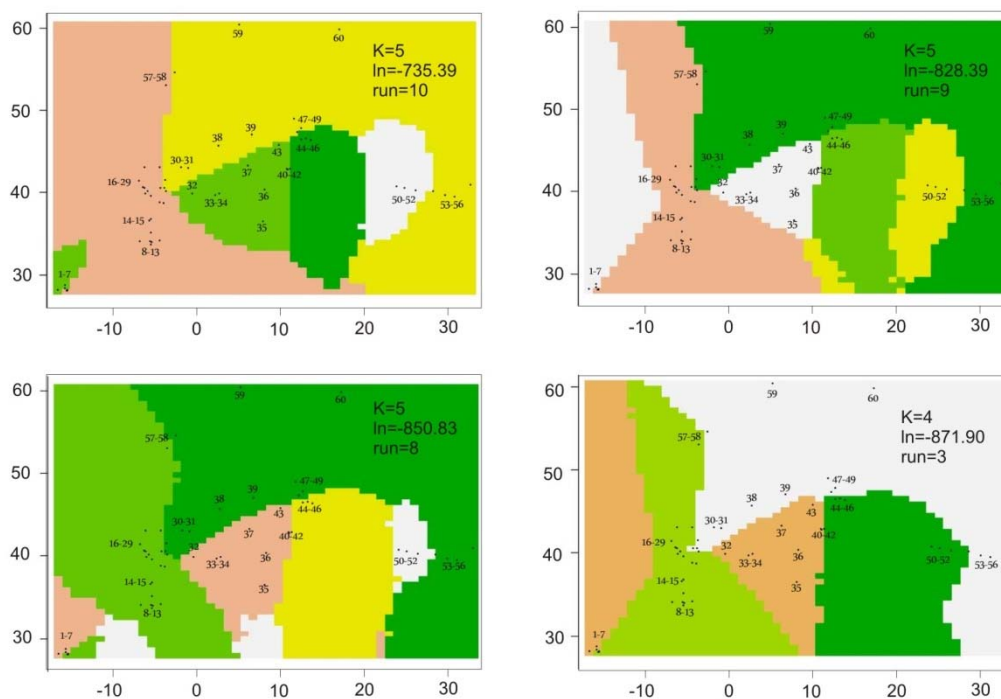


Fig. 14. Estimación del número de grupos (K) y sus límites geográficos según el programa Geneland.

La proporción de cada localidad de pertenecer a cada *cluster* estimada por Structure se muestra en la Tabla 15. Más del 75% de las localidades mostraron una probabilidad ≥ 0.75 de pertenecer a un solo *cluster*, aunque en algunas localidades se encontraron dos *clusters* predominantes (Fig. 15). Los haplotipos del *cluster* T1 (rojo) dominaron en la mayoría de localidades del centro y norte de Europa, en el centro de la Península Ibérica la mayoría de las localidades incluyeron sólo individuos con haplotipos del *cluster* T2 (amarillo), mientras que los haplotipos del *cluster* T3 (azul) predominaron en todo el litoral mediterráneo. El *cluster* P1 incluyó a todas las localidades y ejemplares de *P. pastillifera*. Las localidades de las Islas Canarias tuvieron haplotipos de los tres *clusters* T1, T2 y T3, pero no del *cluster* P1, y del mismo modo, se encontró una alta diversidad en Europa del Este y Turquía, donde en la misma localidad se encontró haplotipos de tres o cuatro *clusters* (incluyendo P1). Sólo ocho individuos mostraron tener ascendencia de más de un *cluster* (*admixture*): ESA1992 (T1, T2), SAU2047 (T3, P1), SAU2053 (T3, P1), BAN1767 (T3, T1), ANS1880 (T3, T1), CAM1847 (T1, T3), BAV1623 (T3, T1) y THA2787 (P1, T3).

Tabla 15. Proporción de pertenencia de cada localidad a los 4 *clusters*: T1-T3 (*Parmelina tiliacea*) y P1 (*P. pastillifera*) inferidos por el programa Structure.

Código	Localidad	Nº indiv.	T1	T2	T3	P1
1	ROQ (España)	9	0.106	0.859	0.013	0.022
2	DEG (España)	10	0.010	0.010	0.969	0.011
3	ESA (España)	9	0.407	0.013	0.554	0.027
4	MAT (España)	10	0.777	0.011	0.198	0.015
5	GAL (España)	10	0.872	0.011	0.107	0.011
6	DBE (España)	10	0.012	0.863	0.108	0.017
7	VAL (España)	10	0.017	0.677	0.284	0.022
8	RAB (Marruecos)	1	0.967	0.010	0.011	0.011
9	MUL (Marruecos)	1	0.010	0.010	0.969	0.011
10	IFR (Marruecos)	10	0.105	0.870	0.012	0.014
11	AIN (Marruecos)	1	0.011	0.963	0.012	0.014
12	TAZ (Marruecos)	1	0.011	0.966	0.011	0.012
13	CHA (Marruecos)	1	0.010	0.010	0.969	0.011
14	SAU (España)	10	0.018	0.326	0.607	0.048
15	GRA (España)	9	0.117	0.858	0.011	0.013
16	PTO (España)	3	0.011	0.965	0.011	0.013
17	SNQ (España)	3	0.012	0.962	0.012	0.015

18	NAV (España)	1	0.013	0.958	0.012	0.017
19	MON (España)	9	0.218	0.748	0.014	0.021
20	CUA (España)	5	0.011	0.774	0.202	0.013
21	PEF (España)	4	0.011	0.964	0.011	0.013
22	MVD (España)	5	0.011	0.964	0.011	0.014
23	BRA (España)	2	0.490	0.487	0.011	0.012
24	ESC (España)	5	0.575	0.397	0.013	0.015
25	PAR (España)	3	0.044	0.646	0.293	0.017
26	MOS (España)	5	0.014	0.954	0.014	0.018
27	SAL (España)	4	0.015	0.943	0.014	0.028
27	SAL P (España)	1	0.010	0.010	0.010	0.969
28	LOM (España)	4	0.011	0.964	0.011	0.013
28	LOM P (España)	1	0.010	0.010	0.011	0.969
29	MHO (España)	10	0.966	0.011	0.011	0.011
30	BEL (España)	2	0.490	0.488	0.011	0.012
31	PVE P (España)	7	0.011	0.011	0.011	0.967
32	CAS (España)	10	0.015	0.010	0.964	0.011
33	BAN (España)	3	0.098	0.012	0.871	0.019
34	UFA (España)	4	0.010	0.010	0.969	0.011
35	TUN (Túnez)	2	0.012	0.011	0.963	0.014
36	CER (Italia)	9	0.012	0.012	0.960	0.016
37	PRV (Francia)	2	0.010	0.010	0.969	0.011
38	LOD (Italia)	10	0.010	0.201	0.777	0.011
39	POG (Italia)	10	0.022	0.011	0.954	0.013
40	ANS (Italia)	9	0.034	0.027	0.907	0.032
41	AMI (Italia)	1	0.012	0.961	0.011	0.016
41	AMI P (Italia)	4	0.012	0.021	0.012	0.955
42	CCO (Francia)	4	0.724	0.250	0.012	0.014
43	SUI (Suiza)	9	0.930	0.030	0.015	0.024
44	FIE P (Italia)	10	0.012	0.020	0.012	0.956
45	CAM (Italia)	8	0.344	0.629	0.013	0.014
45	CAM P (Italia)	2	0.010	0.010	0.010	0.969
46	BLE (Eslovenia)	9	0.012	0.962	0.012	0.015
47	MIT (Alemania)	8	0.967	0.011	0.011	0.011
48	BRH (Alemania)	8	0.588	0.378	0.013	0.021
48	BRH P (Alemania)	2	0.013	0.021	0.012	0.954
49	BAV (Alemania)	5	0.808	0.163	0.013	0.016
50	WAL (Reino Unido)	4	0.011	0.964	0.011	0.013

50	WAL P (Reino Unido)	3	0.010	0.010	0.011	0.969
51	CUM (Reino Unido)	5	0.968	0.010	0.011	0.011
52	NRW P (Noruega)	8	0.011	0.010	0.011	0.969
53	SWN (Suecia)	10	0.963	0.013	0.011	0.012
54	THA (Grecia)	4	0.014	0.472	0.490	0.024
54	THA P (Grecia)	1	0.013	0.012	0.129	0.846
55	SAM (Grecia)	4	0.022	0.249	0.717	0.012
55	SAM P (Grecia)	1	0.011	0.011	0.010	0.969
56	LAP (Turquía)	2	0.012	0.484	0.490	0.014
56	LAP P (Turquía)	2	0.012	0.012	0.012	0.964
57	BUR (Turquía)	1	0.013	0.011	0.960	0.016
58	ASA (Turquía)	3	0.644	0.330	0.012	0.014
59	SIV (Turquía)	8	0.729	0.249	0.011	0.011
60	CAN (Turquía)	1	0.013	0.958	0.013	0.016

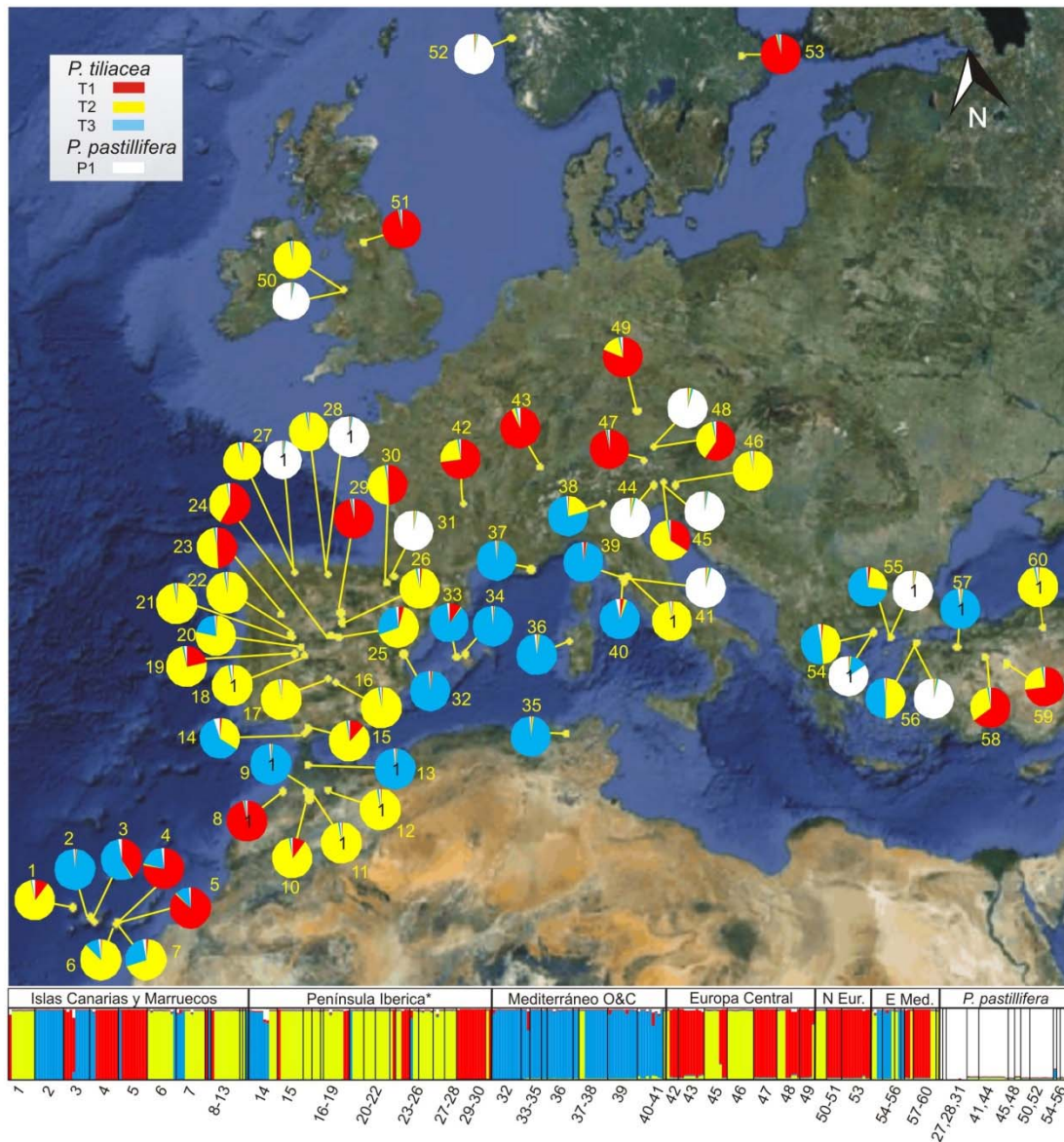


Fig. 15. Distribución geográfica de los cuatro grupos de haplotipos inferidos por Structure. Cada circunferencia representa una localidad de colecta y están numeradas como en la Tabla 5. Los sitios en los que se estudió solo un individuo están indicados con 1. Abajo: Individuos ordenados por localidades y amplios rangos geográficos. Cada individuo está representado por una única línea vertical dividida en segmentos de color, la presencia de más de un color indica asignación a más de un *cluster* (*admixture*).

Modelamiento de los requerimientos ecológicos

Hemos investigado si las variables climáticas actuales contribuyen a explicar la estructura genética detectada con Structure. El conjunto inicial de 19 variables bioclimáticas se redujo en un análisis de PCA a cinco combinaciones no correlacionadas que explicaron el 95% de la varianza. Las variables con mayor peso fueron las precipitaciones en el trimestre más seco (BIO17) y el trimestre más frío (BIO19) del año, la isothermalidad (BIO3), la temperatura estacional (BIO4), y la temperatura media del trimestre más húmedo (BIO8). La estimación de la contribución relativa de las variables se muestra en la Tabla 16, estos valores no mostraron variación significativa al excluir los individuos que presentaban asignación a más de un *cluster* (*admixture*). Estas cinco variables se utilizaron para construir el modelo MaxEnt de predicción de probabilidad de presencia (i.e., de adecuación del hábitat) de los cuatro grupos T1-T3 y P1 (Fig. 16).

Tabla 16. Estimación de la contribución relativa de las cinco principales variables bioclimáticas en el modelo de predicción MaxEnt de condiciones ambientales adecuadas para los grupos de haplotipos de *Parmelina tiliacea* (T1-T3) y *P. pastillifera* (P1). Los valores mostrados son los promedios de más de 15 repeticiones. Los valores más altos están resaltados en negrita. % C = Porcentaje de contribución.

	T1	T2	T3	<i>P. tiliacea</i> (T1-T3)	<i>P. pastillifera</i> (P1)
Variable*	% C	% C	% C	% C	% C
BIO3	36.8	30.5	20.4	27.6	1.5
BIO4	14.9	10.3	20.2	19.8	32.8
BIO8	0.5	2.6	6.5	1.4	10.7
BIO17	11.1	12.1	25.9	12.9	54.2
BIO19	36.7	44.5	27.1	38.3	0.8

* BIO3 = Isothermalidad (rango de media diaria/rango de temperatura anual), BIO4 = Temperatura estacional (desviación estándar * 100), BIO8 = temperatura media del trimestre más húmedos, BIO17 = Precipitación del trimestre más seco, BIO19 = Precipitación del trimestre más frío.

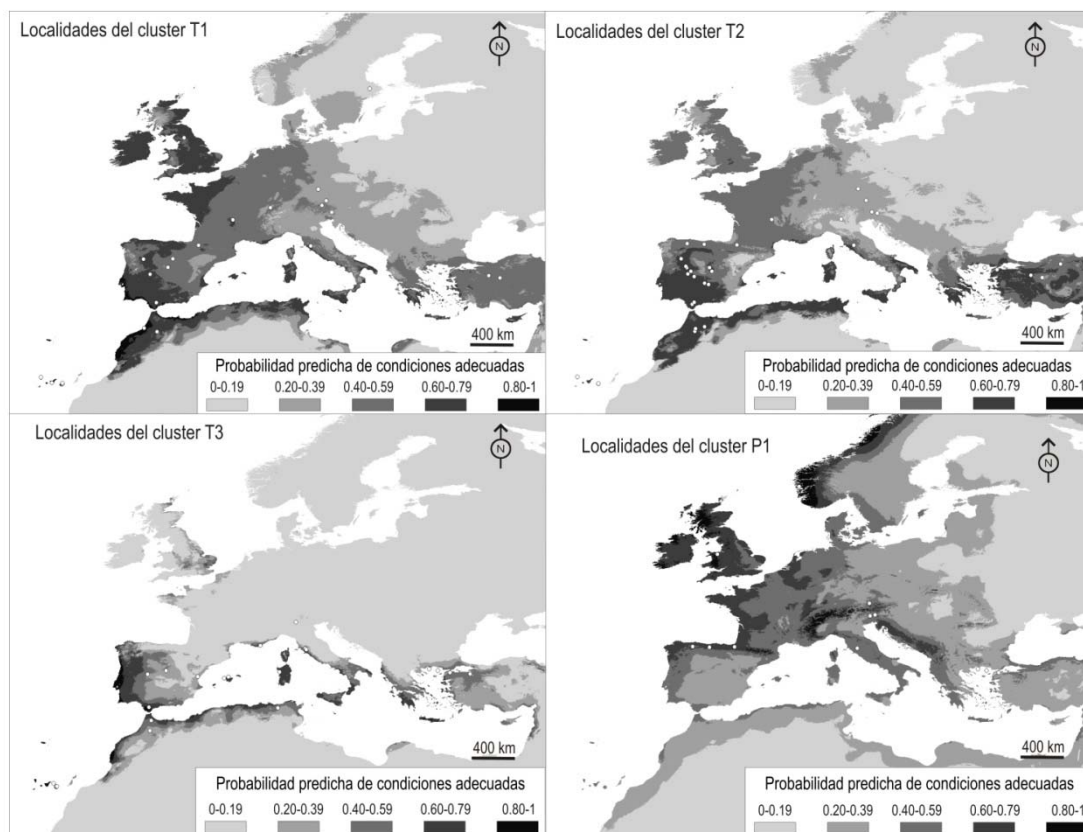


Fig. 16. Modelos predictivos de condiciones ambientales adecuadas para cada grupo de haplotipos: T1-T3 (*Parmelina tiliacea*) y P1 (*P. pastillifera*), obtenidos con el programa MaxEnt.

La isothermalidad (BIO3) y la precipitación en el trimestre más frío (BIO19) son las variables ambientales con mayor contribución a los modelos de los grupos T1 y T2 (haplotipos de *P. tiliacea*), aunque los umbrales (probabilidad de presencia = 0.5) fueron ligeramente superiores para el grupo T1 que para el grupo T2 (Fig. 17 A, B). El modelo para el grupo T3 también fue influenciado por BIO19, pero la precipitación en el trimestre más seco (BIO17) tuvo un gran peso para el modelo (Fig. 17, C), es decir, la probabilidad de presencia de T3 disminuye cuando la precipitación de la estación más fría y de la estación más seca aumenta. Por el contrario las variables que más influyen en el modelo de P1 (haplotipos de *P. pastillifera*) fueron la precipitación en el trimestre más seco (BIO17) y la estacionalidad de la temperatura (BIO4) (Fig. 17, D), es decir, la probabilidad de que el ambiente sea adecuado para P1 aumenta cuando la precipitación de estación más seca se incrementa y cuando la estacionalidad de la temperatura disminuye.

Las diferencias fueron más notables cuando los modelos fueron construidos para los haplotipos de *P. tiliacea* contra los haplotipos de *P. pastillifera* (Tabla16). La probabilidad de

la presencia de *P. tiliacea* disminuye cuando la precipitación en la época más fría y la isothermalidad aumentan, y para *P. pastillifera* las condiciones más adecuadas parece ser más lluvias en la estación más seca y poca variación de las temperaturas a lo largo del año (Fig. 17).

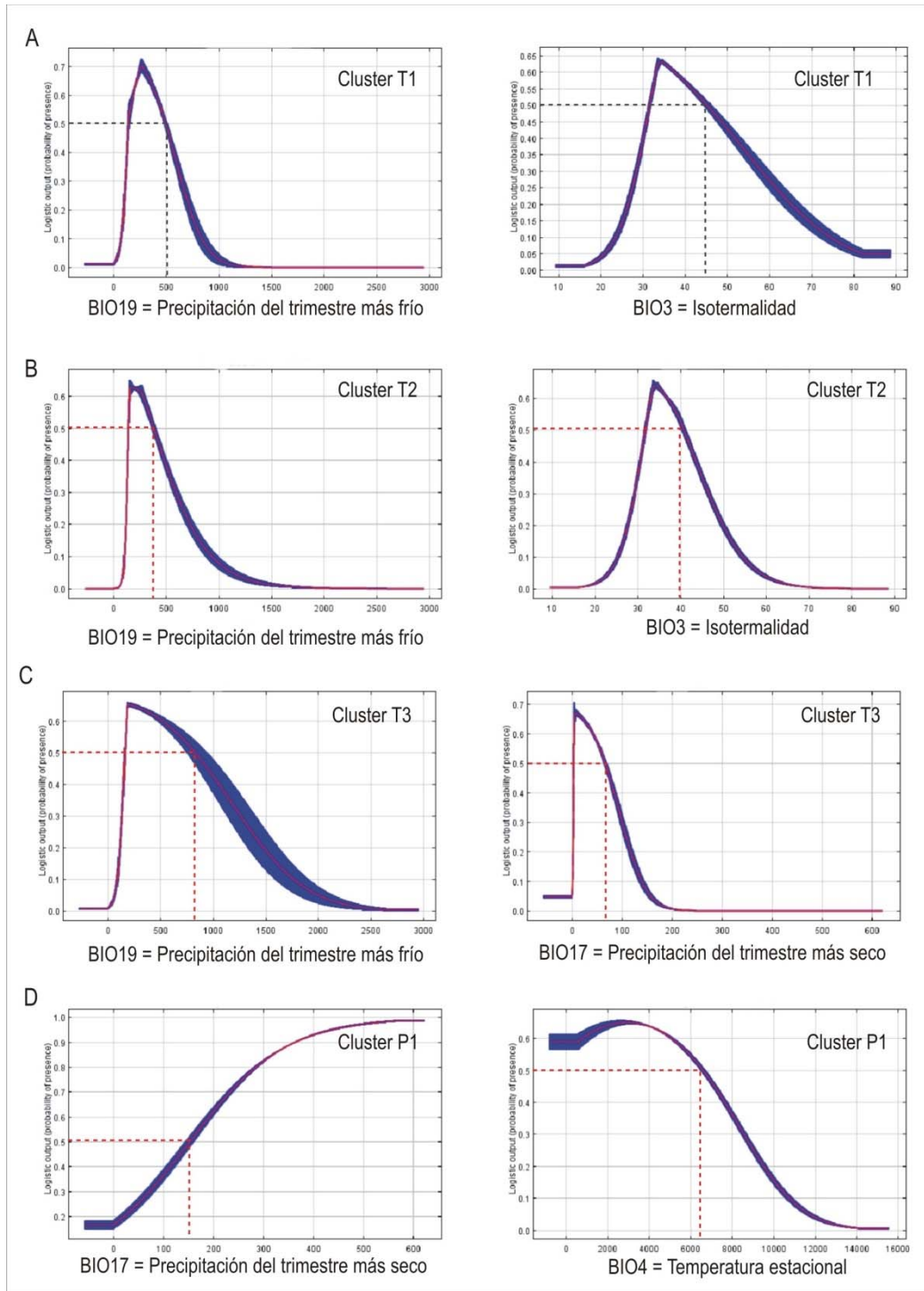


Fig. 17. Relaciones entre la probabilidad de presencia de los clusters (T1-T3; P1) y los valores de las principales variables ambientales, según el modelo de predicción de Maxent.

Partición de la varianza entre clima y geografía

Los análisis anteriores indican que el clima actual influye en la estructura genética del clado *P. tiliacea-P. pastillifera*, sin embargo los efectos del clima y la geografía tienden a confundirse. El análisis de redundancia determinó que el clima y la geografía explican un 25.5% de la estructura genética del clado *P. tiliacea-P. pastillifera*; el aporte individual del clima es del 21.1% mientras que el de la geografía es del 8% (Tabla 17). Estos valores se ven ligeramente disminuidos cuando los datos de longitud son excluidos, el clima y la latitud en conjunto explican el 20.2% de la estructura genética, el aporte sólo del clima es del 16%, la latitud un 2.8% y la interacción de ambos un 1.4%. Ambos análisis demuestran que el clima actual tiene mayor influencia en la estructura genética del clado *P. tiliacea-P. pastillifera* que la geografía.

Tabla 17. Análisis particionado de la varianza para explicar la estructura genética basada en el clima y geografía.

Con 5 variables climáticas + datos georeferenciados (lat + long)				
Tabla particionada:				
	D.f.	R ²	Adj. R ²	Pr(>F)
Clima+Interacción	5	0.23495	0.17423	-
Geografía+Interacción	2	0.07196	0.04384	-
Clima+Geografía+Interacción	7	0.33129	0.25455	0.005
Fracciones individuales:				
Clima	5		0.21071	0.005
Geografía	2		0.08032	0.005
Interacción	0		-0.03648	-
Otros			0.74545	-
Con 5 variables climáticas + sólo latitud				
Tabla particionada:				
	D.f.	R ²	Adj. R ²	
Clima+Interacción	5	0.23495	0.17423	-
Geografía+Interacción	1	0.05583	0.04174	-
Clima+Geografía+Interacción	6	0.27219	0.20176	0.005
Fracciones individuales:				
Clima	5		0.16002	0.005
Geografía	1		0.02753	0.028
Interacción	0		0.01421	-
Otros			0.79824	-

2.5 Discusión

Diferenciación genética de Parmelina tiliacea

Los tres marcadores moleculares (ITS, mtLSU y EFA) utilizados en este estudio detectaron la existencia de variabilidad genética en las especies *P. tiliacea* y *P. pastillifera*, además de una estructura genética dividida en la población global de *P. tiliacea*. También proporcionaron algunas pistas sobre las relaciones entre *P. tiliacea* y *P. pastillifera*. La región ITS es una de las regiones de ADN más utilizadas para estudios filogenéticos en hongos y se ha propuesto como marcador universal del código de barras de ADN para diferenciar especies, aunque no es discriminante en todos los casos, como ocurre por ejemplo con *Aspergillus* (Geiser *et al.* 2007, Schoch *et al.* 2012). En nuestro estudio, el ITS mostró una diferenciación genética en las poblaciones de *P. tiliacea* y *P. pastillifera* revelando la presencia de diferentes haplotipos, incluso dentro de una misma localidad. La región mtLSU mostró menor variabilidad que el ITS, como fue comunicado en otros estudios en líquenes (Printzen & Ekman 2002, Fernández-Mendoza *et al.* 2011); sin embargo, este marcador detectó una marcada diferenciación en las muestras de *P. tiliacea* separándolas en dos grupos principales. La región EFA, un gen poco utilizado en la genética de poblaciones de hongos liquenizados (Yahr *et al.* 2006, Werth & Sork 2008), mostró una variabilidad genética que complementa la información generada por los otros dos marcadores. La información de todos estos marcadores detectó una clara diferenciación entre grupos de haplotipos, estructuración genética de las poblaciones de *P. tiliacea*, y una marcada separación de *P. pastillifera*.

Un reto para próximos estudios en genética de poblaciones en líquenes, y particularmente en el caso de *P. tiliacea* y *P. pastillifera*, es entender cómo se origina esta variabilidad genética considerando que estos organismos se pueden reproducir a través de procesos tanto sexuales como asexuales. La reproducción asexual produce descendencia sin recombinación, lo que limita la cantidad de variabilidad genética dentro de las poblaciones y podría aumentar la variabilidad entre poblaciones. En nuestro estudio, los tres marcadores moleculares (ITS, mtLSU y EFA) fueron capaces de detectar variabilidad genética entre poblaciones de *P. tiliacea* y dentro de ellas, como era de esperar en un organismo con reproducción sexual, aunque la contribución relativa de ambos procesos no se ha establecido.

Variables bioclimáticas y diferenciación de haplotipos

La diferenciación genética de *Parmelina tiliacea* no se corresponde con variantes morfológicas ni está completamente asociada con zonas geográficas; la distribución de los haplotipos en las diferentes localidades parece estar relacionada con variables bioclimáticas, aunque tampoco es el único factor. Los tres *clusters* encontrados tienen una influencia particular por alguna de las variables bioclimáticas estudiadas. La distribución de los haplotipos de *P. tiliacea* T1 y T2 están principalmente modelizadas por la cantidad de agua disponible durante la estación más fría del año y la isothermalidad (es decir, promedio del rango diario / rango de la temperatura anual), mientras que los haplotipos T3 están más influenciados por la precipitación (baja) de la estación más seca y de la más fría del año. Los haplotipos T3 también podrían tener un límite geográfico ya que no se encontraron individuos en el centro y norte de Europa (Fig. 15); los Pirineos y los Alpes podrían haber actuado como una barrera geográfica como se ha sugerido para ciertas plantas e insectos (Taberlet *et al.* 1998, Grivet & Petit 2002, Médail & Diadema 2009, Mende *et al.* 2010).

La distribución de *P. pastillifera* parece obedecer a diferentes variables bioclimáticas, siendo limitantes la falta de precipitaciones durante la estación más seca y la estacionalidad de la temperatura (desviación estándar de las temperaturas mensuales). Las preferencias ecológicas de *P. pastillifera* por condiciones más húmedas que *P. tiliacea* ya se habían descrito previamente (Clauzade & Roux 1975, Dobson & Hawksworth 1976), y nuestro análisis indica que la estacionalidad de temperaturas es otra variable que influye potencialmente en la distribución de esta especie. Un muestreo más amplio de ejemplares de *P. pastillifera* ayudaría a corroborar esta hipótesis. Dobson & Hawksworth (1976) también sugirieron que la tolerancia a la contaminación de dióxido de azufre podría ser otro factor que influyese en la distribución de ambas especies cuando realizaron su estudio en el Reino Unido, pero este factor, así como otros impactos provocados por el hombre, no han sido evaluados en el presente estudio. Aun así, se conoce que *P. tiliacea* es uno de los líquenes parmelioides más resistentes a la contaminación urbana, como se demostró en el centro de la Península Ibérica (por ejemplo Madrid, Crespo *et al.* 1977).

Factores pasados del modelamiento

El modelo de predicción de la idoneidad del hábitat que se presenta aquí es solo un primer intento, ya que no tiene en cuenta las condiciones microclimáticas que pueden ser importantes para las exigencias ecológicas de los hongos liquenizados (por ejemplo, Pearson 1969), que dependen de la humedad atmosférica mucho más que las plantas vasculares. Además, este modelo sólo representa los efectos combinados de las variables bioclimáticas contemporáneas generales, sin embargo la diferenciación de *Parmelina tiliacea* también podría reflejar eventos climáticos pasados. La alta variabilidad encontrada en *P. tiliacea* en las Islas Canarias en comparación con la zona continental sugiere que estas islas, que tienen diversos nichos ecológicos diferenciados, todavía alojan la mayor parte de la variabilidad de la especie. La diversificación de *P. tiliacea* debió de ser un proceso relativamente reciente teniendo en cuenta la fecha estimada (8.45 Ma) para la diversificación del género *Parmelina* (Amo *et al.* 2011). La estructuración actual de las poblaciones continentales podría también haber sido influenciada por las glaciaciones del Pleistoceno, como fue sugerido para otros organismos (Taberlet *et al.* 1998), incluyendo los líquenes (Printzen 2008). Varios ejemplos de supervivencia periglacial de los líquenes (Buschbom 2007) y recolonización de las regiones del norte a partir de los refugios del sur (Printzen & Ekman 2002, Arnerup *et al.* 2004) han sido documentados. Por lo tanto, la estructuración actual de *P. tiliacea* podría ser el resultado de la fragmentación de una distribución anterior más amplia que se extendería por Europa y norte de África; esta área pudo fragmentarse cuando las poblaciones fueron empujadas hacia el sur por las glaciaciones del Pleistoceno, y posteriormente cuando emigraron hacia el norte con el calentamiento posterior a la última glaciación (LGM, *Last Glacial Maximum*, 18000-21000 años BP). Durante este movimiento, los individuos con los haplotipos más adecuados para las condiciones ambientales locales prosperaron, lo que contribuyó a la diferenciación actual de las poblaciones de *P. tiliacea*.

Otro factor que podría haber contribuido a la diferenciación de las poblaciones de *P. tiliacea* podría estar en relación con su modo de vida. Cabe señalar que *P. tiliacea* es capaz de crecer tanto en árboles como en rocas, aunque se encuentra más comúnmente en los árboles. La respuesta de la vegetación al último cambio climático glacial alrededor del Atlántico Norte fue rápida y generalizada (Williams *et al.* 2002), con lo que, muy probablemente, la expansión y la disminución del área de los árboles debió tener un impacto importante en la "salud" y la dinámica de las poblaciones de líquenes. Por ejemplo, las especies de robles que crecen en la Península Ibérica muestran una división clara entre

las poblaciones del Mediterráneo y de las regiones atlánticas de la Península Ibérica, lo que sugiere que ambas zonas han sostenido de forma independiente poblaciones viables durante un período prolongado (Olalde *et al.* 2002, Petit *et al.* 2002a, b, Rodríguez-Sánchez *et al.* 2010). Esta división, fuertemente influenciada por los cambios climáticos pasados, se explica por la existencia de refugios glaciales mutuamente aislados y situados cerca de cada una de las dos costas, a partir de las cuales las poblaciones se habrían expandido hacia el interior después del LGM (Rodríguez-Sánchez *et al.* 2010). Del mismo modo, la existencia de numerosos refugios LGM de encinas (*Quercus ilex* / *Q. rotundifolia*) en varias regiones costeras y del interior de la Península se apoya en análisis genéticos y paleoecológicos (López de Heredia *et al.* 2007). Así, los sucesivos cambios en la vegetación del sur de Europa relacionados con el cambio climático también deben haber tenido una fuerte influencia en la distribución actual de *P. tiliacea* y sus haplotipos.

Parmelina pastillifera se originó a partir de *P. tiliacea*.

Las especies estrechamente relacionadas que han divergido recientemente no suelen distinguirse claramente en los árboles filogenéticos, ya sea por falta de señal filogenética de los marcadores moleculares utilizados o por procesos evolutivos tales como la separación incompleta de linajes (ILS, *incomplete lineage sorting*). Los árboles filogenéticos son adecuados para representar la historia evolutiva cuando los principales eventos son la especiación (en los nodos internos del árbol) y la descendencia y modificación (a lo largo de las ramas del árbol), pero estos árboles son poco adecuados para representar mecanismos de evolución reticulada, tales como la transferencia horizontal de genes, hibridación, recombinación, o separación incompleta de linajes (Huson *et al.* 2010). Los resultados de nuestro análisis filogenético muestran que *P. pastillifera* forma un grupo monofilético más estrechamente relacionado con *P. tiliacea* que con cualquier otra especie de *Parmelina*, pero representa también a *P. tiliacea* como una especie parafilética, y con *P. pastillifera* anidada dentro de ella.

Parmelina tiliacea presenta una variabilidad genética de alguna manera relacionada con las condiciones climáticas pasadas y presentes, pero no muestra discontinuidades morfológicas claras entre las poblaciones, de la misma forma que la topología del árbol no muestra clados internos. Por otro lado, *P. pastillifera*, con sus isidios característicos y diferentes preferencias ecológicas, aparece en el árbol filogenético y en las redes combinadas como una rama separada y divergente de parte de los haplotipos de *P. tiliacea*. Esto parece ser un

caso de especiación por escisión (*split-off, budding speciation*): el origen de un nuevo taxón que no afecta a la existencia y a los atributos del taxón parental (Mayr & Bock 2002, Horand & Stuessy 2010). La diferenciación morfológica, genética y ecológica presente de *P. pastillifera* sustenta la hipótesis de que *P. pastillifera* es una especie distinta que evolucionó a partir de diferentes grupos de *P. tiliacea* en un proceso de colonización de nuevas áreas ecológicas (más húmedas).

Parte de los resultados del presente estudio se encuentran en revisión para su publicación con el título: “Genetic diversification and climatic preferences of European populations of the lichenized fungi *Parmelina tiliacea* and *P. pastillifera*”. Autores: Jano Núñez-Zapata, Paloma Cubas, David L. Hawksworth y Ana Crespo.

1 **Genetic diversification and climatic preferences of European populations of the**
2 **lichenized fungi *Parmelina tiliacea* and *P. pastillifera***

3
4 J. Nuñez-Zapata, P. Cubas, D. L. Hawksworth & A. Crespo*

5 Departamento de Biología Vegetal II, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense,
6 Pl. Ramon y Cajal s/n, 28040 Madrid, Spain.

7 *Corresponding author: acrespo@farm.ucm.es

8
9 **Abstract**

10 Based on DNA sequences of three loci, we analyzed the population subdivision and the
11 climatic factors that could explain the present distribution of two foliose lichen fungi,
12 *Parmelina tiliacea* (very common in southern Europe) and the closely related *P.*
13 *pastillifera*. Haplotype networks, analysis of molecular variance, and clustering
14 methods detected four groups of haplotypes, genetic structuring in *P. tiliacea*
15 populations, and differentiation of *P. pastillifera*. The distribution of the three genetic
16 clusters (TI-T3) detected in *P. tiliacea* reflected climatic preferences, in particular
17 precipitation in the coldest and driest seasons, and isothermality patterns. In contrast,
18 the distribution of cluster P (*P. pastillifera*) was correlated with the precipitation during
19 the driest season and temperature seasonality. It is suggested that successive changes
20 in vegetation through southern Europe, especially forests types associated with
21 climatic variation during the Quaternary, also contributed to the present distribution
22 of both species. The results support the recognition of *P. pastillifera* as a distinct
23 species, differentiated morphological and genetically from *P. tiliacea* and associated to
24 to more humid regions.

25
26 **Keywords:** Population structure, genetic differentiation, biogeography, *Parmelina*
27 *tiliacea*, *Parmelina pastillifera*, climatic variables, Europe

28 Running title: Genetic diversification in *Parmelina tiliacea*

29
30 **Introduction**

31 Lichen-forming fungi are mutualistic organisms whose exact mode of dispersal,
32 routes of migration and life histories are poorly known and in many cases obscure.

33 Major differences in the degree of genetic variation and geographical differentiation
34 have been found in widespread lichen fungi as a result of their various evolutionary
35 backgrounds, life and population histories, dispersal capabilities, and ecological
36 amplitudes. Different hypotheses on the processes explaining large-scale population
37 structure have been proposed. For example, different post-glacial histories of coastal
38 and inland populations (e.g. *Lobaria pulmonaria*; Walser *et al.* 2005); persistence in
39 separated glacial refugia and genetic drift (e.g. *Cavernularia hultenii*; Printzen & Ekman
40 2002); southern refugia during the latest glaciations and recolonisation to central and
41 northern Europe from these sites (e.g. *Letharia vulpine*; Arenrup *et al.* 2004). In other
42 cases, lichens genetic structuring of the populations have been related to the
43 interaction of climatic and geographical factors, with locally adapted photobionts and
44 strong isolation by distance of the mycobionts (e.g. *Cetraria aculeata*; Fernández-
45 Mendoza *et al.* 2012). Besides, in the case of lichens that grow mostly on trees,
46 changes on the supporting vegetation can affect profoundly lichen populations, e.g.
47 fragmentation of the distributional area of the host tree, and natural and human-
48 induced modification of the areas covered by suitable trees have been related to
49 genetic differentiation and structuring of the populations of *Biatora helvetica* (Printzen
50 *et al.* 1999) and *Lobaria pulmaria* (Werth *et al.* 2006, 2007; Scheidegger *et al.* 2012).

51 The situation in a lichen fungi with a wide continental distribution in Eurasia as
52 *Parmelina tiliacea* (*Parmeliaceae*, *Ascomycota*) has not, however, previously been
53 documented. *Parmelina tiliacea* is a foliaceous lichen characterized by the presence of
54 isidia, that serve as asexual propagules of both partners (algae and fungi)
55 simultaneously. The isidia in *P.tiliacea* are characteristically pale brown to grey-brown,
56 cylindrical to clavate, simple or coralloid, crowded, and forming \pm a continuous crust.
57 Another species (*Parmelina pastillifera*) is morphologically similar to *P. tiliacea*, but
58 differs in the colour and shape of isidia, which are blue-black, short and initially flat-
59 topped with tips developing a raised margin (button-like) and becoming knob-like and
60 contorted, \pm branched, and sessile or short-stalked (Clauzade & Roux 1985; Dobson &
61 Hawksworth 1976). Both species can occasionally bear sexual reproduction structures
62 (apothecia).

63 The range of *P. tiliacea* includes Macaronesia (except the Azores and Cape
64 Verde), Europe, North Africa, and eastwards to Asia, occurring from 0 to 1500 m above

65 sea level, and even to 3200 m in India. In Europe the species is particularly common
66 around the Mediterranean Basin, especially in the centre of the Iberian Peninsula,
67 extending through central to northern Europe, becoming rare in Scotland and with
68 scattered localities in Ireland and Southern Scandinavia (Hale 1976; Smith *et al.* 2009;
69 Thell & Moberg 2011). *Parmelina pastillifera* is less common than *P. tiliacea*, although
70 also extends from Scandinavia to the Mediterranean area. Its distribution is more
71 oceanic and grows in areas with a high rainfall (Dobson & Hawksworth 1976; Nimis
72 1993). Both species grow on nutrient-rich bark of broad-leaved trees, deciduous or
73 coniferous trees, acid or siliceous rocks, as well as roofing tiles and memorials in well-
74 lit situations.

75 *Parmelina tiliacea* and *P. pastillifera* are genetically closely allied (Blanco *et al.*
76 2006; Argüello *et al.* 2007; Crespo *et al.* 2011), and *P. pastillifera* forms a monophyletic
77 clade nested within *P. tiliacea* in phylogenetic trees based on nuITS and mtLSU rDNA
78 regions (Nuñez-Zapata *et al.* 2011). The areas of both species overlap in some localities
79 and juvenile individuals can be difficult to distinguish on the basis of the shape of the
80 isidia alone, as young isidia of *P. tiliacea* tend to be sessile and somewhat rounded
81 (Dobson & Hawksworth 1976). Thus, the separation of both species is not always clear-
82 cut, and this has raised questions on their taxonomic status, and whether they should
83 be treated as conspecific despite the clear morphological differences evident in mature
84 specimens.

85 We investigated *Parmelina tiliacea* and its close relative *P. pastillifera* as an
86 example of organisms with a wide distribution where a combination of phylogenetics
87 and population genetics methods could shed new light on the process of genetic
88 diversification at large-scale, and allow exploring relationships between climatic
89 factors and genetic differentiation in lichen fungi. This information could also help to
90 clarify the phylogenetic relationships and taxonomic status of *P. pastillifera*.

91 The study focuses on: (1) establishing whether the widespread lichen *Parmelina*
92 *tiliacea* shows any population subdivision, and the geographical distribution of any
93 group of panmictic individuals present; (2) ascertaining which populations of *P. tiliacea*
94 are most closely related to *P. pastillifera*; (3) exploring whether climatic factors are
95 related to the genetic structuring of *P. tiliacea*; and (4) determining the appropriate
96 taxonomical rank to reflect differences found. We used samples of both species from a

97 range of localities and three molecular markers of the fungal partner to build
98 haplotype networks, analyze the population structure through clustering models and
99 molecular variance analyses, and build a model based on bioclimatic factors of the
100 geographical range likely to be related to the genetic structure of the populations. The
101 possible influence of past climate and vegetation changes in their present distribution
102 is also discussed.

103

104 **Material and methods**

105 *Taxon Sampling*

106 320 samples of *Parmelina tiliacea* from 57 localities and 42 samples of *P. pastillifera*
107 from 12 localities were collected from different altitudes and habitats, in nine of the
108 localities both species grew together. Details of location, voucher specimens, and
109 GenBank accession numbers are given in Suppl. Material 1. Most of the samples were
110 easily identified morphologically; however, the adscription to one or other species of
111 young individuals or individuals with not clearly differentiated isidia required a more
112 detailed morphological study, using the characters provided by Dobson & Hawksworth
113 (1976).

114

115 *DNA Extraction and Amplification*

116 DNA extraction and amplification of the nuclear internal transcribed spacer region
117 (nuITS) and partial large subunit of the mitochondrial ribosomal DNA (mtLSU) followed
118 the procedures described in Nuñez-Zapata *et al.* (2011) with few modifications.
119 Primers ITS 1F (Gardes & Bruns 1993) and ITS4A (White *et al.* 1990) were also used for
120 amplification of nuITS; for mtLSU region a second protocol was implemented: the
121 annealing temperature was decreased 1 °C per 6 cycles from 63 °C to 58 °C, following
122 by 34 cycles at 40 °C annealing for 30 sec. A partial sequence of the elongation factor
123 1- α (EFA) was amplified using primers EFA-F and EFA-R (Johannesson *et al.* 2000), with
124 similar parameters than ITS but with an annealing temperature of 52 °C. PCR products
125 were cleaned using Exo-sap (Isogen) according to the manufacturer's instructions.
126 Sequencing was performed using the ABI Prism Dye Terminator Cycle Sequencing
127 Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, Life Technologies) with the amplification
128 primers. Sequencing reactions were electrophoresed on a 3730 DNA analyser (Applied

129 Biosystems, Life Technologies) at the Unidad de Genómica (Parque Científico de
130 Madrid). Sequences fragments obtained were assembled and manually adjusted in
131 BioEdit 7.0.9.0 (Hall 1999).

132

133 *Sequence Alignments, Polymorphism Analysis, and Recombination Events*

134 Four separate matrices (one for each gene and a concatenated matrix of the three
135 genes) were built with all samples of *P. tiliacea* and *P. pastillifera*. Sequences were
136 aligned using the ClustalW Multiple alignment program (Thompson *et al.* 1994)
137 included in BioEdit (Hall 1999). Ambiguously aligned regions and introns were excluded
138 manually from matrices. The number of polymorphic sites (S), number of haplotypes
139 (h), haplotype diversity, and nucleotide diversity (π) were estimated with DnaSP v5
140 (Librado & Rozas 2009) for the matrix of each gene. Tajima's D and Fu's F_S tests were
141 performed with the same program for testing neutrality of molecular evolution (Tajima
142 1989; Fu & Li 1993). The number of polymorphic sites, gene diversity, and nucleotide
143 diversity were estimated for each locality using Arlequin 3.5.1.2 (Excoffier *et al.* 2005).
144 Tests to detect recombination events (RDP, GENECONV, CHIMAERA, MAXCHI) were
145 performed for each locus with the options implemented in RDP3 (Martin *et al.* 2010).

146

147 *Phylogenetic tree and haplotype networks*

148 Phylogenetic analysis was run to confirm the paraphyletic position of *P. tiliacea* with *P.*
149 *pastillifera* (Nuñez-Zapata *et al.* 2011), using a combined data matrix (ITS+mtLSU+EFA)
150 built with one sample of each multilocus haplotype of *P. tiliacea* and *P. pastillifera*
151 together with samples of other species of *Parmelina* (*P. quercina*, *P. carporrhizans*, *P.*
152 *atricha*, *P. cryptotiliacea* and *P. coleae*). Bayesian phylogenetic analysis was performed
153 using MrBayes 3.1.1 (Huelsenbeck & Ronquist 2001) using the K80 + G model for ITS,
154 F81 model for mtLSU, and TrNef + G model for EFA, according to the best-fit model of
155 nucleotide substitution estimated by jModelTest (Posada 2008). The data set was
156 partitioned into the three genes and each partition was allowed to have its own
157 parameter values (Nylander *et al.* 2004). No molecular clock was assumed. Posterior
158 probabilities were approximated by sampling trees using a variant of Markov Chain
159 Monte Carlo (MCMC) method. Two parallel runs of 10^7 generations were made,
160 starting with a random tree and employing 4 simultaneous chains each. Every 1000th

161 tree was saved into a file. Log-likelihood scores of sample points were plotted against
162 the number of generations using TRACER 1.5 (Rambaut & Drummond 2009) to ensure
163 that the log likelihood values reached a stable equilibrium value (Huelsenbeck &
164 Ronquist 2001). The first 10^6 generations were discarded as burn in. A majority rule
165 consensus tree with average branch lengths was calculated with the remaining trees
166 using the sumt option of MrBayes. Posterior probabilities were obtained for each
167 clade. Only clades with posterior probabilities ≥ 0.95 in the Bayesian analysis were
168 considered statistically significant. Phylogenetic trees were visualized with midpoint
169 rooting using the program FigTree v.1.3.1 (Rambaut 2009).

170 To show the relatedness of haplotypes, we constructed haplotype networks
171 using the median network method and the EqualAngle algorithm implemented in
172 SplitsTree4 (Huson & Bryant 2006). This method uses all sites in the character
173 alignment that contain exactly two different states, and no gaps or missing states
174 (Bandelt *et al.* 1995). The program displays graphically the full information content of
175 the sequence data but reduces the complexity of the network identifying parallelisms
176 based on the frequency of haplotypes. The analysis was run for the three individual
177 DNA markers and the combined matrices with all the individuals; the combined
178 network was made greedily compatible (two or more splits were joint if they are
179 compatible) to obtain a clear representation of the concatenated matrix (Huson &
180 Bryant 2006).

181

182 *Population structure analyses*

183 Bayesian clustering and hierarchical analyses of molecular variance (AMOVA;
184 Excoffier *et al.* 1992) were used for analysis of the genetic structure. The clustering
185 analysis was run with Structure v2.3 (Pritchard *et al.* 2000) using multilocus haplotypes
186 for inference of the number of clusters (k) and assignment of individual thalli to
187 gene pools. We used haplotypes instead of sequences to avoid that data were
188 dominated by one or a few non- or low-recombining regions, as suggested by Pritchard
189 *et al.* (2010). The analyses were run with an admixture model considering that
190 individuals may have a mixed ancestry, with a uniform prior of individual admixture for
191 all gene pools, and independent panmictic gene pool allele frequencies (Falush *et al.*
192 2003). We performed three replicate runs for each value of k (between 1 and 10) with

193 10⁶ iterations after a burn-in period of 10⁵ iterations. Analyses were run with a data set
194 that included all 362 individuals and with a collapsed data set excluding redundant
195 haplotypes within sites. The best k value for the *P. tiliacea*-*P. pastillifera* populations
196 was selected based on the rate of change in the log likelihood of the data between
197 successive k values runs (ΔK) using the methods given in Evanno *et al.* (2005), through
198 the Structure Harvester portal (<http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/>).
199 We used Distruct V1.1 (Rosenberg 2004) to graphically represent the individual
200 assignment output of Structure. Individuals with over 85% probability of ancestry in a
201 given gene pool were regarded as 'assigned' to this gene pool, whereas all other
202 individuals were classified as 'unassigned'

203 For the AMOVA analysis the alignment of the three DNA regions was used to
204 estimate the apportionment of genetic variation within and among groups. Molecular
205 distances were estimated with the Tamura & Nei (1993) model and the significance of
206 the fixation indices was computed using nonparametric permutation procedures with
207 10000 permutations. Two different hierarchical groupings were tested: a) individuals
208 grouped by species (*P. tiliacea* and *P. pastillifera*) and localities, and b) individuals
209 grouped by the cluster assignation obtained in Structure. To account for the inference
210 of clonal signal in the structure found, both analysis were run including a) all the
211 samples and b) eliminating redundant multilocus haplotypes from each site. A Mantel
212 test using the pairwise *Fst* distance was run to test the significance of the correlation
213 between the geographical distance of the collection sites and their genetic distances.
214 Both analyses were run with Arlequin version 3.5.1 (Excoffier *et al.* 2005).

215

216 *Modeling of climatic requirements*

217 We investigated whether the distribution of the genetic clusters reflected any climatic
218 preferences, and the weight of different bioclimatic variables. For this analysis we
219 extracted 19 bioclimatic variables from the 30 arc seconds resolution (~1 km) layers in
220 the WorldClim repository (<http://www.worldclim.org/>; Hijmans *et al.* 2005) for the 60
221 localities where *P. tiliacea* or *P. pastillifera* were collected. The values of the bioclimatic
222 variables for each site were extracted with Diva-GIS 7.5 (Hijmans *et al.* 2011). As
223 several of the bioclimatic variables are linearly correlated, a principal component
224 analysis (PCA) was implemented in R function *prcomp* of package *stats* ([7](http://www.r-</p></div><div data-bbox=)

225 project.org). The variables that explained 95% or more of the cumulative variance of
226 climate in the PCA analysis were used.

227 The most suitable climatic conditions for each cluster were modeled using the
228 Maximum Entropy program MaxEnt v. 3.3 ([http://www.cs.princeton.edu/~schapire/
229 maxent/](http://www.cs.princeton.edu/~schapire/maxent/); Phillips *et al.* 2004, 2006; Elith *et al.* 2011). The geo-referenced occurrences
230 of the species and the corresponding dataset of bioclimatic variables were used to
231 construct linear combinations of the predictor variables that contain the greatest
232 variance. The analyses were run with a cross-validation approach with 15 replicates
233 and the samples grouped into: (a) four groups (T1, T2, T3 and P) corresponding to the
234 clusters assigned by Structure; and (b) two groups, one including the three clusters of
235 *P. tiliacea* (T1-T3), and another one with the *P. pastillifera* (P) individuals. The program
236 produced maps of predicted probability that conditions are suitable for a given cluster.

237 In order to partial out the explanatory fractions of geography and climate on
238 the variation of clustered genetic structure of *P. tiliacea* and *P. pastillifera*, we used
239 redundancy analysis (RDA)-based variation partitioning (Borcard *et al.* 1992; Peres-
240 Neto *et al.* 2006). The proportion of assignment to the clusters was used as response
241 variable, and the climatic component and geographical coordinates as explanatory
242 variables as in Fernández-Mendoza *et al.* (2011). The significance of the fractions of
243 interest was estimated with functions *varpart* and *rda* coupled with a permutation test
244 (*anova*) implemented in the R package *vegan* (Oksanen *et al.* 2012).

245

246 **Results**

247 A total of 1086 gene sequences were generated for this study. The alignment of the
248 combined data set was 1724 positions in length, with 91 variable characters. No
249 recombination events were detected in the single matrices. Genetic diversity indices
250 for each gene are detailed in Table 1. The EFA region had the highest number of
251 polymorphic sites and the highest nucleotide diversity while the mtLSU region had the
252 lowest values.

253 The three loci were polymorphic yielding 28 haplotypes in ITS, 10 haplotypes in
254 mtLSU and 22 haplotypes in EFA, although the haplotype diversity was similar for the
255 three genes. *Parmelina tiliacea* showed 24 ITS, 8 mtLSU and 19 EFA haplotypes; in *P.*
256 *pastillifera* 4 ITS, 2 mtLSU and 3 EFA haplotypes were found. Only two EFA haplotypes

257 were shared by *P. tiliacea* and *P. pastillifera*. No recombination events were detected
258 in any region. The three regions appeared to be selectively neutral ($p > 0.10$) according
259 to Tajima's D values, whereas negative value of ITS region in Fu's F_S test indicated an
260 excess of recent mutations, therefore an excess of rare alleles, or population
261 expansion. A total of 80 different multilocus haplotypes were identified when
262 haplotypes of the three loci were jointly analyzed (Table 2): 72 haplotypes were found
263 in *P. tiliacea* samples and 8 haplotypes in *P. pastillifera*. No multilocus haplotypes were
264 shared between species, and 42 multilocus haplotypes were private of one individual.
265 Molecular diversity indices for each locality and each species are detailed in Suppl.
266 Material 2.

267

268 *Phylogenetic tree and haplotype networks*

269 The 50% majority rule consensus tree (Fig. 1) obtained in the Bayesian analysis
270 based on the partitioned matrix of the three regions showed that the strictly sexual *P.*
271 *coleae* (California – USA) is the sister group of a monophyletic group formed by the
272 European isidiate *P. tiliacea* and *P. pastillifera* where a few *P. tiliacea* haplotypes
273 separate by few mutations from a main clade that includes the rest of *P. tiliacea*
274 haplotypes and a nested clade (P) with all the haplotypes of *P. pastillifera*.

275 Haplotype networks for each gene are shown in Fig 2. The mtLSU region formed
276 the simplest network with 10 splits and two clearly separated groups of haplotypes
277 while the ITS and EFA (24 splits each one) networks showed reticulations. In the ITS
278 network, 18 haplotypes of *P. tiliacea* formed a main group (A) while the rest were
279 scattered. Two haplotypes of *P. pastillifera* (14, 27) were connected to the dispersed *P.*
280 *tiliacea* ones while the other two (16, 17) were more separated. In the mtLSU network,
281 the 8 haplotypes of *P. tiliacea* split into two groups: haplotypes 1, 4 and 5 form a group
282 while the rest (2, 3, 6, 7, 9) were closely related to haplotypes of *P. pastillifera* (8, 10).
283 In the EFA network, the 21 haplotypes of *P. tiliacea* also formed two groups. One of
284 them composed by 9 haplotypes (B) and the other one by 12 (C); the two haplotypes
285 shared by *P. tiliacea* and *P. pastillifera* (2, 4) entered one in each group. The exclusive
286 *P. pastillifera* haplotype (18) were located between the two groups of *P. tiliacea*.

287 The network with the multilocus haplotypes of the three combined regions (Fig.
288 2) depicted three groups formed by the *P. tiliacea* haplotypes (T1-T3). T1 separated by

289 a long branch from the others while T2 and T3 were closely related and connected to a
290 loose group including the *P. pastillifera* haplotypes (P). Haplotype 18 (exclusive of one
291 individual from site ESC (Canary Islands) clearly separated from the rest.

292

293 *Structure of populations*

294 Two separate analyses based on the distribution of haplotypes of the three
295 markers in the different sites were run with the Structure program to estimate the
296 genetic subdivision of the populations. In the first one including all the *P. tiliacea* and
297 *P. pastillifera* samples, the best estimated number of clusters was $K=4$. Three clusters
298 (T1-T3) included only *P. tiliacea* samples whereas the other one (P) was composed
299 exclusively by *P. pastillifera* samples. The analysis was run again without *P. pastillifera*
300 samples to know if they influenced cluster delimitation; in this case $k=3$ was the best
301 estimated number of clusters, and the groups comprised the same individuals,
302 corroborating the results of the first analysis. Similar groups were obtained when the
303 analysis was run excluding redundant multilocus haplotypes in each site.

304 The proportion of membership of each locality in the 4 clusters is shown in Fig.
305 3 and Suppl. Mat. 3. The four clusters were spatially intermingled (Table 3) but
306 haplotypes of T1 (red) prevailed in most of the central and northern Europe while
307 haplotypes of T3 (blue) predominated around the Mediterranean coast. In Central
308 Iberia, most of the sites included only individuals with T2 haplotypes (yellow). The
309 localities from the Canary Islands had mixed ancestries from T1, T2 and T3 but not
310 from cluster P, and similarly high diversity was discovered in Eastern Europe and
311 Turkey where haplotypes from three or four groups (including P) were found at the
312 same site. Seven individuals of *P. tiliacea* and one of *P. pastillifera* shown admixture
313 ancestry from two clusters (Table 4). Remarkably, one sample from the Canary Islands
314 (ESA) and two samples from southern Spain (SAU)) shown admixture from clusters T3
315 and P. A very low correlation between the geographical and the genetic distances of
316 the different localities was detected by Mantel test for the whole set of samples ($r=$
317 0.18 , $p = 0.001$) and for the *P. tiliacea* samples ($r= 0.17$, $p = 0.002$).

318 The AMOVA analysis (Table 5) of the combined DNA sequence matrix showed
319 that 27% of the variation was due to species differences and 38% attributable to
320 differences among sites within species. When the clonal signal was excluded (i.e.,

321 excluding redundant haplotypes) the variation attributable to specific differentiation
322 was slightly higher (33%). Much more variation was explained (74%) when samples
323 were grouped according to cluster assignment. Genetic distances between clusters
324 (Table 6) estimated by F_{ST} pairwise differences showed that the closest clusters were T2
325 and P (0.51) while T1 and T3 gave the largest distance (0.60).

326

327 *Climatic variables and distribution of haplotypes*

328 We investigated whether climatic variables are related with the distribution of
329 haplotype clusters. The initial set of 19 bioclimatic variables was reduced by PCA
330 analysis to five uncorrelated combinations that explained 95% of the variance. The
331 variables with the highest weights were precipitation in the driest (BIO17) and coldest
332 quarters (BIO19), isothermality (BIO3), temperature seasonality (BIO4), and the mean
333 temperature of the wettest quarter (BIO8). These five variables were used to build the
334 MaxEnt model of predicted probability of presence of the four clusters of haplotypes.
335 The estimate of the relative contribution of the variables and the predicted models of
336 presence for clusters T1-T3 and P are shown in Table 7 and Fig. 5.

337 Isothermality (BIO3) and the precipitation in the coldest quarter (BIO19) were
338 the environmental variables with the major contribution to the models of clusters T1
339 and T2 (*P. tiliacea* haplotypes), although the thresholds (probability of presence = 0.5)
340 were slightly higher for cluster T1 than for cluster T2 (Fig. 5 A, C). The model for T3 was
341 also influenced by BIO19 but the precipitation in the driest quarter (BIO17) had the
342 highest weight for the model (Fig. 5, B), i.e. the probability of presence of T3 decreases
343 when the precipitation of the coldest and driest seasons increases. In the case of
344 cluster P (*P. pastillifera*) the more influential variables modeling its presence were the
345 precipitation in the driest quarter (BIO17) and the temperature seasonality (BIO4) (Fig.
346 5, D), i.e. the probability of the presence of cluster P increases when the precipitation
347 in the driest season increases and the temperature seasonality decreases.

348 The differences were more marked when models were built for *P. tiliacea*
349 against *P. pastillifera* haplotypes (Table 7). The probability of presence of *P. tiliacea*
350 decreased when the precipitation in the coldest season and isothermality increased,
351 and for *P. pastillifera* more suitable conditions were higher rains in the driest season
352 and lower differences in temperatures along the year.

353

354 *Variation partitioning of climate and geography*

355 The relative contribution of climate and spatial distance to the clustered structure was
356 partialled out using RDA-based variation partitioning (Table 8). Climate explained 21%
357 of the structure, and geography a smaller fraction (8%). The interaction of both
358 (climate and geography) was non explanatory. When only latitude was taken into
359 account climate still accounted for 16% of the variation while latitude alone explained
360 only a small fraction of the genetic variation (2.7%). A small amount (1.4%) of the
361 variation in cluster distances was explained by the spatial structuring that is shared by
362 climatic data.

363

364 **Discussion**

365 *Genetic differentiation of Parmelina tiliacea*

366 The three molecular markers (nuITS, EFA and mtLSU) used in this study allowed to
367 detect genetic variability in *P. tiliacea* and *P. pastillifera*, a partitioned genetic structure
368 in the global population of *P. tiliacea*, and clear indication of the relationships between
369 *P. tiliacea* and *P. pastillifera*. The ITS region is frequently used for phylogenetic studies
370 in *Fungi* and has been proposed as a universal DNA barcode marker to differentiate
371 species, although it is not discriminating in all cases, e.g. *Aspergillus* (Geiser *et al.* 2007;
372 Schoch *et al.* 2012). In *Parmelina tiliacea*, ITS detected genetic differentiation even
373 within single sites and revealed that *P. tiliacea* and *P. pastillifera* do not share any
374 haplotype. The mtLSU showed less variability than ITS, as has been found to be the
375 case in some other lichens (Printzen & Ekman 2002; Fernández-Mendoza *et al.* 2011).
376 However, this marker detected a strong differentiation of the *P. tiliacea* samples into
377 two main groups. Even EFA, a gene little-used in population genetics of lichenized fungi
378 (but see Yahr *et al.* 2006; Werth & Sork 2008), showed genetic variability that
379 complemented the information generated by the other markers. The combination of
380 the three regions demonstrated differentiation into four groups of haplotypes (clusters
381 T1-T3 including only samples of *P. tiliacea*) and cluster P (composed exclusively by *P.*
382 *pastillifera* samples). A biologically interesting aspect of *P. tiliacea* and *P. pastillifera* is
383 that they can reproduce through both sexual and asexual processes. In our study
384 nuITS, EFA and mtLSU detected genetic variability in *P. tiliacea* among and within

385 populations as expected in an organism with sexual reproduction, although the
386 relative contribution of both processes remains unknown.

387

388 *Geography, climate and haplotype differentiation*

389 The genetic differentiation of *P. tiliacea* at large-scale could not be explained by
390 geographic origin, i.e. there was no clear isolation by distance pattern, but the
391 distribution of haplotypes in the different localities does appear to be related to
392 bioclimatic variables. The effects of climate and geography are usually confounded but
393 the partition analysis indicated that climate contributes much more than geography to
394 the present genetic structure of *P. tiliacea*. The distributions of the *P. tiliacea*
395 haplotypes T1 and T2 are mainly modeled by the amount of water available during the
396 coldest season and isothermality (i.e. mean diurnal range/temperature annual range),
397 while the T3 haplotypes are more influenced by the precipitation of driest and coldest
398 seasons. T3 haplotypes could also have a geographic limit since no individuals were
399 found in central or northern Europe; the Pyrenees and the Alps may thus act as a
400 geographic northern barrier as suggested for certain plants and insects (Taberlet *et al.*
401 1998; Grivet & Petit 2002; Médail & Diadema 2009; Mende *et al.* 2010).

402 The climate influence on the distribution of *P. pastillifera* was marked by a lack
403 of precipitation during the driest season and temperature seasonality (standard
404 deviation of monthly temperatures). Our analysis did not cover thoroughly all the
405 distribution area of this species but the inclusion of samples from sites with extreme
406 values of temperature and precipitation, allows to infer the climatic preferences of *P.*
407 *pastillifera* for more humid conditions than *P. tiliacea* as already reported (Clauzade &
408 Roux 1985; Dobson & Hawksworth 1976). Our analysis also indicates that the variation
409 of temperatures through the seasons is another variable that potentially influences the
410 distribution of this species. A more extensive sampling of *P. pastillifera* will help to
411 corroborate this result. Dobson & Hawksworth (1976) also suggest tolerance to
412 sulphur dioxide pollution as another factor with influence in the distribution of both
413 species in the UK at that time, but this factor was not evaluated in the present study.
414 In any case, *P. tiliacea* is the parmelioid lichen most resistant to urban pollution in the
415 central Iberian Peninsula (e.g., Madrid; Crespo *et al.* 1977).

416

417 *Past modeling forces could have also contributed to genetic differentiation*

418 The predicted model of habitat suitability presented here is only a first attempt as it
419 does not take into account local microclimatic conditions that can be important for the
420 ecological requirements of lichen forming-fungi (e.g. Pearson 1969), which rely on
421 atmospheric humidity much more than vascular plants. Moreover, the model only
422 accounts for the combined effects of contemporary general bioclimatic variables but
423 the differentiation of *P. tiliacea* could also reflect past climatic events.

424 The diversification of *P. tiliacea* must be a relatively recent process considering
425 the recent estimated date (8.45 Ma) for the diversification of *Parmelina* (Amo *et al.*
426 2011). The present structuring of the continental populations could therefore also
427 have been influenced by Pleistocene glaciations events, as suggested for some other
428 organisms (Taberlet *et al.* 1998) including lichens (Printzen 2008). Several examples of
429 recolonization of northern parts from southern refugia (Printzen & Ekman 2002;
430 Printzen *et al.* 2003; Arnerup *et al.* 2004) have been documented. For instance, the
431 existence of southern refugial areas during the latest glaciations have been found in
432 *Letharia vulpina*, where the highest genetic diversity of the Moroccan and Caucasian
433 populations compared to the Swedish and Italian ones indicates that southern areas
434 acted as refugia during quaternary glaciations, and that central and northern Europe
435 may have been recolonised from one or both of these areas (Arenrup *et al.* 2004).

436 The higher variability found in *P. tiliacea* at the Canary Islands compared to the
437 continental area suggests that these islands could have been a Pleistocene refugium.
438 At the Canary Islands *P. tiliacea* does not grow at very low altitudes, where it is
439 replaced mainly by *Parmotrema* species, but it has been found growing on rocks, pine
440 forests, chestnuts, etc, and even in the well-lit borders of the laurel forest, from 700 to
441 to 2000 m of altitude. The Canary Islands like other oceanic islands in the low latitudes
442 are generally considered to have been fairly well buffered from the pronounced
443 climate change of the last 2 Ma (Axelrod, 1975). Nevertheless, the composition of the
444 forest in the Canary Islands (at least in Tenerife) has undergone major changes during
445 the Late Holocene. In particular, arboreal species of *Quercus* and *Carpinus*, major
446 component of the vegetation alongside laurel forest and pine forest, have declined
447 due to the role of human activity and climatic variation (Nascimento *et al.* 2009). Thus
448 the present genetic variation found in *P. tiliacea* could be the remnant of an even

449 major genetic diversity. The eastern Mediterranean area could also have been other
450 plausible refugium; however, a more extensive sampling is needed in this area to
451 contrast this hypothesis.

452 Thus, the contemporary structuring of *P. tiliacea* could be the result of
453 fragmentation of a formerly wide and coherent distribution through Europe and
454 northern Africa when populations were pushed southward by the Pleistocene
455 glaciations and later migrated northwards following the Last Glacial Maximum (LGM,
456 18–21 kyr BP) warming. During this movement, individuals with the most suitable
457 haplotypes for the local environmental conditions thrived better, contributing to the
458 present differentiation of the populations of *P. tiliacea*.

459 Besides, it should be noted that *P. tiliacea* is able to grow both on trees and
460 rocks, although it is more commonly found on trees. Vegetation responses to late
461 glacial climate change were rapid and widespread (Williams *et al.* 2002), thus, most
462 probably, the expansion and decrease of the range of trees must have had an
463 important impact on the dynamics of the lichens. Fragmentation of the distributional
464 area of the host trees (e.g. *Betula helvola*; Printzen *et al.* 1999), and natural and
465 human-induced modification of the areas covered by suitable trees for *Lobaria*
466 *pulmaria* have been related to genetic differentiation and structuring of the lichen
467 populations (Werth *et al.* 2006, 2007; Scheidegger *et al.* 2012). These are examples of
468 recent relationships between the distribution of host trees and the genetic structure of
469 epiphytic lichens that can illustrate how vegetation changes could have influenced the
470 genetic structuring of *P. tiliacea* in the past. In the Iberian Peninsula the white oak
471 species, one of the common host trees of *P. tiliacea*, show a clear-cut divide between
472 populations from the Mediterranean and from the Atlantic regions. This divide is
473 assigned to the existence of mutually isolated glacial refugia located near each of the
474 two coasts, from which populations would have expanded inland after the LGM
475 (Olalde *et al.* 2002; Petit *et al.* 2002a, b; Rodríguez-Sánchez *et al.* 2010). Similarly,
476 genetic and palaeoecological analyses support the existence of numerous LGM refugia
477 of holm oaks (*Quercus ilex* / *Q. rotundifolia*), another common host tree of *P. tiliacea*, in
478 several coastal and inland regions across the Iberian Peninsula (López de Heredia *et al.*
479 2007).

480

481 *Parmelina pastillifera* originated from *P. tiliacea*

482 The population structure found in *P. tiliacea* is neither related to clear-cut
483 morphological discontinuities nor restricted to geographical areas. The observed
484 relation to different climatic conditions, especially in the case of cluster T3, suggests a
485 complex history affected by climate among other factors. On the other hand, *P.*
486 *pastillifera* appears as a nested clade within *P. tiliacea* in the phylogenetic tree, and as
487 a separated and divergent branch of part of the populations of *P. tiliacea* in the
488 combined network.

489 Closely related species that have recently diverged often do not clearly
490 separate in phylogenetic trees, either by lack of phylogenetic signal of the molecular
491 markers or due to incomplete lineage sorting. Phylogenetic trees are well-suited to
492 represent evolutionary history in which the main events are speciation (at the internal
493 nodes of the tree) and descent and modification (along the edges of the tree) but such
494 trees are less suited to model horizontal gene transfer, hybridization, recombination,
495 or incomplete lineage sorting (Huson *et al.* 2010). The divergence of *P. pastillifera*
496 seems to be a case of speciation by split-off or budding: the origin of a new taxon that
497 does not affect the existence and attributes of the parental taxon (Mayr & Bock 2002;
498 Hörandl & Stuessy 2010). The morphological, genetic and ecological differentiation of
499 *P. pastillifera* supports *P. pastillifera* as a distinct species that evolved from different
500 groups of *P. tiliacea* in a process of colonization of new ecological (more humid) areas.

501

502 **Acknowledgements**

503 This study was supported by a grant from the Spanish Ministerio de Ciencia e
504 Innovación (CGL2010-21646) and a Ph.D. grant to J. N.-Z. The Universidad
505 Complutense de Madrid is thanked for providing all complementary facilities and funds
506 (SYSTEMOL research group UCM-BSCH GR35/10A). We thank all the colleagues that
507 kindly provided fresh material for this work.

508

509 **References**

510 Amo de Paz G, Cubas P., Divakar PK, Lumbsch HT, Crespo A (2011) Origin and
511 diversification of major clades in parmelioid lichens (Parmeliaceae, Ascomycota)

512 during the Paleogene inferred by Bayesian analysis. *PLoS ONE*, **6(12)**, e28161.
513 doi:10.1371/journal.pone.002816.

514 Argüello A, Del Prado R., Cubas P, Crespo A (2007) *Parmelina quercina* (Parmeliaceae,
515 Lecanorales) includes four phylogenetically supported morphospecies. *Biological
516 Journal of the Linnean Society*, **91**, 455–467.

517 Arnerup J, Högberg N, Thor G (2004) Phylogenetic analysis of multiple loci reveal the
518 population structure within *Letharia* in the Caucasus and Morocco. *Mycological
519 Research*, **108**, 311–316.

520 Axelrod DI (1975) Evolution and biogeography of Madrean–Tethyan sclerophyll
521 vegetation. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, **62**, 280–334.

522 Bandelt HJ, Forster P, Sykes BC, Richards MB (1995) Mitochondrial portraits of human
523 population using median networks. *Genetics*, **141**, 743–53.

524 Blanco O, Crespo ., Ree RH, Lumbsch HT (2006) Major clades of parmelioid lichens
525 (Parmeliaceae, Ascomycota) and the evolution of their morphological and chemical
526 diversity. *Molecular Phylogenetics and Evoution*, **39**, 52–69.

527 Borcard D, Legendre P, Drapeau P. (1992) Partialling out the spatial component of
528 ecological variation. *Ecology*, **73**, 1045–55.

529 Clauzade G, Roux C (1985) Likenoj de okcidenta Europo, ilustrita determinlibro.
530 *Bulletin de la Societé Botanique du Centre-Ouest*, Nouvelle série, numéro spécial, **7**,
531 1–893.

532 Crespo A, Manrique E, Barreno E, Serriñá E (1977) Valoración de la contaminación
533 atmosférica del área urbana de Madrid mediante bioindicadores (líquenes
534 epífitos). *Anales del Instituto Botánico Cavanilles*, **34**, 71–94.

535 Crespo A, Kauff F, Divakar PK, del Prado R, Pérez-Ortega S, Amo de Paz G, Ferencova Z,
536 Blanco O, Roca-Valiente B, Núñez-Zapata J *et al.* (2011) Phylogenetic generic
537 classification of parmelioid lichens (Parmeliaceae, Ascomycota) based on
538 molecular, morphological and chemical evidence. *Taxon*, **59**, 1735–1753.

539 Dobson FS, Hawksworth DL (1976) *Parmelia pastillifera* (Harm.) Schub. and Klem. and
540 *P. tiliacea* (Hoffm.) Ach. in the British Isles. *Lichenologist*, **8**, 47–59.

541 Elith J, Steven J, Phillips SJ, Hastie T, Dudík M, Chee YE, Yates CJ (2011) A statistical
542 explanation of MaxEnt for ecologists. *Diversity and Distributions*, **17**, 43–57.

543 Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals
544 using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, **14**, 2611–
545 2620.

546 Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM (1992) Analysis of molecular variance inferred from
547 metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA
548 restriction data. *Genetics*, **131**, 479–491.

549 Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) ARLEQUIN ver. 3.0: an integrated software
550 package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics*, **1**,
551 47–50.

552 Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2003) Inference of population structure using
553 multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*,
554 **164**, 1567–1587.

555 Fernández-Mendoza F, Domaschke S, García M A, Jordan P, Martín MP, Printzen C
556 (2011) Population structure of mycobionts and photobionts of the widespread
557 lichen *Cetraria aculeata*. *Molecular Ecology*, **20**, 1 208–1232.

558 Fu YX, Li WH (1993) Statistical test of neutrality of mutations. *Genetics*, **133**, 693–709.

559 Gardes M, Bruns TD (1993) ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes -
560 application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, **2**,
561 113–118.

562 Geiser DM, Klich MA, Frisvad JC, Peterson SW, Varga J, Samson RA (2007) The current
563 status of species recognition and identification in *Aspergillus*. *Studies in Mycology*,
564 **59**, 1–10.

565 Grivet D, Petit RJ (2002) Phylogeography of the common ivy (*Hedera* sp.) in Europe:
566 genetic differentiation through space and time. *Molecular Ecology*, **11**, 1351–1362.

567 Hale ME (1976) A monograph of the lichen genus *Parmelina* Hale (*Parmeliaceae*).
568 *Smithsonian Contributions to Botany*, **33**, 1–60.

569 Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and
570 analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, **41**,
571 95–98.

572 Hijmans RJ, Cameron SE, Parra JL, Jones PG, Jarvis A (2005) Very high resolution
573 interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of*
574 *Climatology*, **25**, 1965–1978.

575 Hijmans RJ, Guarino L, Mathur P 2011. DIVA-GIS Version 7.5 <http://diva-gis.org>

576 Hörandl E, Stuessy TF (2010) Paraphyletic groups as natural units of biological
577 classification. *Taxon*, **59**: 1641–1653.

578 Huelsenbeck JP, Ronquist F (2001) MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees.
579 *Bioinformatics*, **17**, 754–755.

580 Huson DH, Bryant D (2006) Application of phylogenetic networks in evolutionary
581 studies. *Molecular Biology and Evolution*, **23**, 254–267.

582 Huson DH, Rupp R, Scornavacca C (2010) *Phylogenetic networks. Concepts, algorithms*
583 *and applications*. Cambridge University Press, New York

584 Johannesson HS, Johannesson KHP, Stenlid J (2000) Development of primer sets to
585 amplify fragments of conserved genes for use in population studies of the fungus
586 *Daldinia loculata*. *Molecular Ecology*, **9**, 375–377.

587 Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA
588 polymorphism data. *Bioinformatics*, **25**, 1451–1452.

589 López de Heredia U, Carrión JS, Jiménez P, Collada C, Gil L (2007) Molecular and
590 palaeoecological evidence for multiple glacial refugia for evergreen oaks on the
591 Iberian Peninsula. *Journal of Biogeography*, **34**, 1505–1517.

592 Martin DP, Lemey P, Lott M, Moulton V, Posada D, Lefevre P (2010) RDP3: a flexible
593 and fast computer program for analyzing recombination. *Bioinformatics*, **26**, 2462–
594 2463.

595 Mayr E, Bock WJ (2002) Classifications and other ordering systems. *Journal of*
596 *Zoological Systematics and Evolutionary Research*, **40**, 169–194.

597 Médail F, Diadema K (2009) Glacial refugia influence plant diversity patterns in the
598 Mediterranean Basin. *Journal of Biogeography*, **36**, 1333–1345.

599 Mende M, Biström O, Meichssner E, Kölsch G (2010) The aquatic leaf beetle *Macrolea*
600 *mutica* (Coleoptera: Chrysomelidae) in Europe: Population structure, postglacial
601 colonization and the signature of passive dispersal. *European Journal of*
602 *Entomology*, **107**, 101–113.

603 Nascimento L de, Willis KJ, Fernández-Palacios JM, Criado C, Whittaker, RJ (2009) The
604 long-term ecology of the lost forests of La Laguna, Tenerife (Canary Islands).
605 *Journal of Biogeography*, **36**, 499–514.

606 Nimis PL (1993) The lichens of Italy. An annotated catalogue. [Monografia no. XII.]
607 Torino: Museo Regionale di Scienze Naturali.

608 Nylander JAA, Ronquist F, Huelsenbeck JP, Nieves-Aldrey JL (2004) Bayesian
609 phylogenetic analysis of combined data. *Systematic Biology*, **53**, 47–67.

610 Nuñez-Zapata J, Divakar PK, Del-Prado R, Cubas P, Crespo A (2011) Conundrums in
611 species concepts: the discovery of a new cryptic species segregated from *Parmelina*
612 *tiliacea* (Ascomycota: Parmeliaceae). *Lichenologist*, **43**, 603–616.

613 Oksanen, J., Blanchet, F.G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P.R., O'Hara, R.B.,
614 Simpson, G.L., Solymos, P., Stevens, M.H.H. & Wagner, H. 2012. vegan: Community
615 Ecology Package. R package version 2.0-5. [http://CRAN.R-project.org/
616 package=vegan](http://CRAN.R-project.org/package=vegan).

617 Olalde M, Herrán A, Espinel S, Goicoechea PG (2002) White oaks phylogeography in
618 the Iberian Peninsula. *Forest Ecology and Management*, **156**, 89–102.

619 Pearson LC (1969) Influence of temperature and humidity on distribution of lichens in a
620 Minnesota bog. *Ecology*, **50**, 740–746.

621 Peres-Neto PR, Legendre P, Dray S, Borcard D (2006) Variation partitioning of species
622 data matrices: estimation and comparison of fractions. *Ecology*, **87**, 2614–2625.

623 Petit RJ, Csaikl UM, Bordács S, Burg K, Coart E, Cottrell J, van Dam B, Deans JD, Glaz, I,
624 Dumolin-Lapègue S *et al.* (2002a) Chloroplast DNA variation in European white
625 oaks: phylogeography and patterns of diversity based on data from over 2600
626 populations. *Forest Ecology and Management*, **156**, 5–26.

627 Petit RJ, Brewer S, Bordács S, Burg K, Cheddadi R, Coart E, Cottrell J, Csaikl UM, van
628 Dam B, Deans JD *et al.* (2002b) Identification of refugia and post-glacial
629 colonisation routes of European white oaks based on chloroplast DNA and fossil
630 pollen evidence. *Forest Ecology and Management*, **156**, 49–74.

631 Phillips SJ, Dudik M, Schapire RE (2004) A maximum entropy approach to species
632 distribution modeling. In: *Proceedings of the 21st International Conference on*
633 *Machine Learning*, pp. 655–662. ACM Press, New York.

- 634 Phillips SJ, Anderson RP, Schapire RE (2006) Maximum entropy modeling of species
635 geographic distributions. *Ecological Modelling*, **190**, 231–259.
- 636 Posada D (2008) jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and*
637 *Evolution*, **25**, 1253–1256.
- 638 Printzen C (2008) Uncharted terrain: the phylogeography of arctic and boreal lichens.
639 *Plant Ecology & Diversity*, **1**, 265–271.
- 640 Printzen C, Ekman S (2002) Genetic variability and its geographical distribution in the
641 widely disjunct *Cavernularia hultenii*. *Lichenologist*, **34**, 101–111.
- 642 Printzen C, Ekman S, TØnsberg T (2003) Phylogeography of *Cavernularia hultenii*:
643 evidence of slow genetic drift in a widely disjunct lichen. *Molecular Ecology* **12**,
644 1473–1483.
- 645 Printzen C, Lumbsch HT, Schmitt I, Feige GB (1999) A study on the genetic variability of
646 *Biatora helvola* Körb. ex Hellb. using RAPD markers. *Lichenologist*, **31**, 491–499.
- 647 Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using
648 multilocus genotype data. *Genetics*, **155**, 945–959.
- 649 Pritchard JK, Wena X, Falush D (2010) Documentation for structure software: Version
650 2.3. <http://pritch.bsd.uchicago.edu/structure.html>.
- 651 Rambaut A (2010) FigTree v1.3.1. Institute of Evolutionary Biology, University of
652 Edinburgh, Edinburgh.
- 653 Rambaut A, Drummond AJ (2009) Tracer version 1.5 [computer program]
654 <http://beast.bio.ed.ac.uk>
- 655 Rodríguez-Sánchez F, Hampe A, Jordano P, Arroyo J (2010) Past tree range dynamics in
656 the Iberian Peninsula inferred through phylogeography and palaeodistribution
657 modelling: A review. *Review of Palaeobotany and Palynology*, **162**, 507–521.
- 658 Rosenberg NA (2004). DISTRUCT: a program for the graphical display of population
659 Structure. *Molecular Ecology Notes*, **4**, 137–138.
- 660 Scheidegger C, Bilovitz PO, Werth S, Widmer I, Mayrhofer H (2012) Hitchhiking with
661 forests: population genetics of the epiphytic lichen *Lobaria pulmonaria*. *Ecology*
662 *and Evolution* **2(9)**, 2223–2240.
- 663 Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, André Levesque C, Wen Chen
664 W, Fungal Barcoding Consortium (2012) Nuclear ribosomal internal transcribed

665 spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the*
666 *National Academy of Sciences of the United States of America*, **109**, 6241–6246.

667 Smith CW, Aptroot A, Coppins BJ, Fletcher A, Gilbert OL, James PW, Wolseley PA (eds)
668 (2009) *The Lichens of Great Britain and Ireland*. London: British Lichen Society.

669 Taberlet P, Fumagalli L, Wust-Saucy AG, Cosson JF (1998) Comparative phylogeographic
670 and postglacial colonization in Europe. *Molecular Ecology*, **7**, 453–464.

671 Tajima F (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA
672 polymorphism. *Genetics*, **123**, 585–595.

673 Tamura K, Nei M (1993) Estimation of the number of nucleotide substitutions in the
674 control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular*
675 *Biology and Evolution*, **10**, 512–526.

676 Thell A, Moberg R (eds) (2011) *Nordic Lichen Flora*. Vol. 4. *Parmeliaceae*. Uppsala:
677 Museum of Evolution.

678 Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) Clustal W: improving the sensitivity of
679 progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-
680 specific gap penalties and weigh matrix choice. *Nucleic Acids Research*, **22**, 4673–
681 4680.

682 Walser JC, Holderegger R, Gugerli F, Hoebee SE, Scheidegger C (2005) Microsatellites
683 reveal regional population differentiation and isolation in *Lobaria pulmonaria*, an
684 epiphytic lichen. *Molecular Ecology*, **14**, 457–467.

685 Werth S, Wagner HH, Holderegger R, Kalwij JM, Scheidegger C (2006) Effect of
686 disturbances on the genetic diversity of an old-forest associated lichen. *Molecular*
687 *Ecology* **15**, 911–921.

688 Werth S, Gugerli F, Holderegger R, Wagner HH., Csencsics D, Scheidegger C (2007)
689 Landscape-level gene flow in *Lobaria pulmonaria*, an epiphytic lichen. *Molecular*
690 *Ecology* **16**, 2807–2815

691 Werth S, Sork VL (2008) Local genetic structure in a north american epiphytic Lichen,
692 *Ramalina menziesii* (Ramalinaceae). *American Journal of Botany*, **95**, 568–576.

693 Werth S (2010) Population genetics of lichen-forming fungi – a review. *Lichenologist*,
694 **42**, 499–519.

695 White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor JW (1990) Amplification and direct sequencing of
696 fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR Protocols: A Guide to*

697 *Methods and Applications* (eds. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ), pp.
698 315-322. New York: Academic Press.

699 Williams JW, Post DM, Cwynar LC, Lotter AF, Levesque AJ (2002) Rapid and widespread
700 vegetation responses to past climate change in the North Atlantic region. *Geology*,
701 **30**, 971–974.

702 Yahr R, Vilgalys R, DePriest PT (2006) Geographic variation in algal partners of *Cladonia*
703 *subtenuis* (Cladoniaceae) highlights the dynamic nature of a lichen symbiosis. *New*
704 *Phytologist*, **171**, 847–860.

705

706

707

708

709

710

711

712

713

714

715

716

717

718

719

720

721

722

723

724

725

726

727

728

729 **Captions to the Figures**

730

731 **Figure 1.** 50% Majority-rule consensus tree from nuITS, mtLSU and EFA sequences of *P.*
732 *tiliacea* and *P. pastillifera*. Based on 9000 trees from B/MCMC tree sampling
733 procedure. Posterior probabilities in the Bayesian analysis are indicated above the
734 branches. Branches with significant support (≥ 0.95) are in bold. Vertical lines mark the
735 adscription of the 80 haplotypes (H1-H80) to the groups found in the population
736 structure analysis (see Figure 3): T1-T3 (*P. tiliacea*), P (*P. pastillifera*).

737

738 **Figure 2.** ITS, mtLSU, EFA, and combined haplotype networks of *P. tiliacea* and *P.*
739 *pastillifera*. Colours refer to the groups found in the population structure analysis (see
740 Figure 3). Haplotypes shared by *P. tiliacea* and *P. pastillifera* marked with an asterisk.

741

742 **Figure 3.** Proportion of membership of each locality in the 4 clusters inferred by
743 Structure. Collection sites numbered as in Table 2. Localities were only one individual
744 was studied are marked with number 1 inside the circle. Bottom: Inferred ancestry of
745 individuals of *P. tiliacea* and *P. pastillifera* from each locality. Localities of *P. tiliacea*
746 ordered by broad geographical ranges. Each individual is represented by a single
747 vertical line, broken into colored segments with lengths proportional to each of the
748 four inferred clusters. Red = T1, blue = T2, yellow = T3, brown = P.

749

750 **Figure 4.** Predicted probability of suitable conditions for each haplotype cluster
751 modeled by the MaxEnt program. Clusters T1-T3 (*Parmelina tiliacea*) and cluster P (*P.*
752 *pastillifera*).

753

754 **Figure 5.** Response curves to the main bioclimatic variables for each haplotype cluster
755 in the MaxEnt model.

756

757

758

759

760

761 **ELECTRONIC SUPPLEMENTARY MATERIAL**

762 **Suppl. Material 1.** Locality information with herbarium codes and GenBank accessions
 763 of individuals used in the present study.

764 **Suppl. Material 2.** Estimates of genetic variation parameters based on ITS, mtLSU, EFA,
 765 and the combined matrix in the 57 *P. tiliacea* (T) and 12 *P. pastillifera* (P) localities.
 766 N=number of individuals. H=number of haplotypes. S=number of polymorphic sites.
 767 GD=gene diversity. π =nucleotide diversity. SD= standard deviation. Highest values are
 768 in bold.

769 **Suppl. Material 2.** Proportion of membership of each locality in the clusters T1-T3 (*Parmelina*
 770 *tiliacea*) and P (*P. pastillifera*) inferred by Structure.

771

772 Table 1. Summary statistics for the molecular markers nuITS, mtLSU and EFA.

	ITS	mtLSU	EFA
Number of sequences	362	362	362
Number of sites	462	716	546
Polymorphic sites (S)	30	19	42
Number of haplotypes (H)	28	10	22
Haplotype diversity	0.8880 ± 0.0070	0.7400 ± 0.0100	0.8340 ± 0.0120
Nucleotide diversity (π)	0.0082 ± 0.0003	0.0070 ± 0.0003	0.0175 ± 0.0003
Tajima's D	-0.7060 (n.s.)	1.7485 (n.s.)	0.9539 (n.s.)
Fu's Fs statistic	-5.035	8.032	6.347

773

774 n.s.=no significant (P>0.10)

775

776

777

778

779

780

781

782

783

784

785

786

787

788

789

790

791

792 Table 2. Correspondence between the 80 multilocus haplotypes (3Genes) and the individual
 793 gene haplotypes, indicating the number and provenance of the individuals. Location numbers
 794 as in Supplementary Material 1.

3 genes	ITS	mtLSU	EFA	No. Ind.	Location
<i>P. tiliacea</i>					
1	5	5	5	1	3
2	5	4	5	20	3, 4, 5, 8
3	22	4	2	3	43, 48
4	6	4	2	8	19, 24, 43, 53
5	8	4	1	1	10
6	12	4	1	1	19
7	13	4	1	1	29
8	21	4	1	1	42
9	25	4	1	5	45, 47, 48
10	22	4	1	5	43, 47, 48, 53
11	28	4	1	1	58
12	6	4	1	46	15, 23, 24, 29, 30, 42, 43, 45, 47, 48, 49, 51, 53, 58, 59
13	1	1	1	1	1
14	25	1	1	1	49
15	3	2	1	1	49
16	6	2	1	1	45
17	19	3	1	1	33
18	6	6	6	1	3
19	3	2	3	2	1
20	3	2	14	1	22
21	2	2	14	5	20, 21, 24, 27
22	15	2	3	2	46
23	2	2	8	1	6
24	3	2	2	24	6, 7, 10, 14, 15, 19, 23, 28, 54
25	3	7	7	1	6
26	3	2	7	3	6, 10, 12
27	2	2	7	5	6, 10, 16, 25
28	2	7	2	1	7
29	11	2	2	1	19
30	2	2	11	4	10, 20
31	3	2	11	2	17, 22
32	3	2	13	3	17, 18, 19
33	2	2	15	1	24
34	3	2	15	2	25, 26
35	2	2	16	1	26
36	2	2	17	1	26
37	2	9	2	1	27
38	3	2	22	1	48
39	2	2	22	2	46, 48
40	2	2	2	41	1, 6, 7, 11, 14, 15, 16, 17, 21, 22, 26, 27, 28, 42, 50, 55, 56
41	15	2	7	1	30
42	24	2	7	1	56
43	15	2	2	7	41, 45, 46, 48
44	26	2	2	1	54
45	15	2	22	7	38, 45, 46, 58
46	24	2	22	3	45, 56
55	7	3	2	1	7
56	9	3	2	1	14
57	4	3	2	4	14
58	18	3	2	3	40
59	10	3	2	1	14
60	6	3	2	1	40
61	7	3	4	2	4, 6
62	7	3	10	1	4
63	7	3	9	2	7, 20
64	4	3	12	1	14

65	18	3	20	1	36
66	4	3	20	1	36
67	4	3	19	5	36
68	19	3	4	1	39
69	19	3	9	2	54, 57
70	4	3	9	3	34, 39
71	4	3	4	44	2, 3, 5, 9, 13, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 40
72	18	3	12	1	35
73	23	3	21	1	40
74	18	3	21	1	39
75	18	3	9	7	39, 40, 54
76	18	3	4	5	33, 40, 55, 56
77	6	3	12	1	25
78	6	3	9	2	39
79	6	3	4	3	7, 32, 55
80	20	3	19	1	36
<hr/>					
<i>P. pastillifera</i>					
47	17	10	18	1	31
48	16	8	2	2	41, 48
49	16	8	4	1	54
50	16	8	18	4	50, 55
51	16	10	18	11	31, 52
52	27	8	18	1	56
53	14	8	18	9	27, 28, 31, 44, 45, 56
54	14	8	2	13	41, 44, 48

795

796

797

798

799

800

801

802

803

804

805

806

807

808

809

810

811

812 Table 3. Number and percentage of individuals belonging to each cluster in the different geographic
 813 areas. Eight admixed individuals have been excluded.

Cluster	Canary Islands & Morocco	Iberian Peninsula	W and C Mediterr.	Central Europe	Northern Europe	Eastern Mediterr.	Total
T1	23 (28.0%)	18 (19.8%)	0 (0%)	31 (49.2%)	15 (50.0%)	8 (30.8%)	95 (26.8%)
T2	35 (42.7%)	57 (62.6%)	3 (4.8%)	18 (28.6%)	4 (13.3%)	8 (30.8%)	125 (35.3%)
T3	24 (29.3%)	7 (7.7%)	55 (88.7%)	0 (0%)	0 (0%)	7 (26.0%)	93 (26.23%)
P1	0 (0%)	9 (9.9%)	4 (6.5%)	14 (22.2%)	11 (36.7%)	3 (14.8%)	41 (11.5%)
Total	82	91	62	63	30	26	354

814

815 Table 4. Inferred ancestry of the 8 admixed individuals detected by Structure. Individuals with < 85%
 816 assignment to a cluster were considered admixed, and unassigned to any cluster.

Locality	Sample	T1	T2	T3	P
3	ESA1992_T	0.748	0.028	0.100	0.123
14	SAU2047_T	0.035	0.094	0.718	0.152
14	SAU2053_T	0.036	0.098	0.709	0.158
33	BAN1767_T	0.272	0.016	0.677	0.035
40	ANS1880_T	0.190	0.051	0.705	0.054
45	CAM1847_T	0.759	0.206	0.016	0.018
49	BAV1623_T	0.199	0.767	0.015	0.019
54	THA2387_P	0.129	0.012	0.013	0.846

817

818

819

820

821

822

823

824

825

826

827

828

829

830

831

832

833

834

835

836

837

838

839

840

841

842 Table 5. Hierarchical analyses of molecular variance (AMOVA) of *P. tilacea*-*P. pastillifera*. Three different
 843 hierarchical stratifications of the data sets were analysed: 1)
 844
 845

Source of variation	d.f.	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation	P	ϕ
Specific differentiation (Including all samples)						
Between <i>P. tilacea</i> and <i>P. pastillifera</i>	1	36.670	0.43549	27.42	0.0000	0.2742
Among localities/species	67	248.067	0.60740	38.25	0.0000	0.5270
Within localities	293	159.729	0.54515	34.33	0.0000	0.6567
Total	361	444.467	1.58804			
Specific differentiation (excluding redundant haplotypes)						
Between <i>P. tilacea</i> and <i>P. pastillifera</i>	1	149.807	4.28336	33.55	0.0000	0.3355
Among localities/species	67	819.358	2.25395	17.66	0.0000	0.2657
Within localities	115	716.264	6.22839	48.79	0.0000	0.5121
Total	183	1685.429	1.58804			
Clusters inferred by Structure, excluding unassigned individuals						
Among clusters	3	2295.293	8.85435	74.12	0.0000	0.7412
Among localities/clusters	88	674.659	1.67135	13.991	0.0000	0.5407
Within localities	262	371.873	141954	11.88	0.0000	0.8812
Total	353	3341.873	11.94525			

846

847 Table 6. Cluster genetic distances based on Fst values.

	Cluster T1	Cluster T2	Cluster T3
Cluster T1	-	-	-
Cluster T2	0.57540	-	-
Cluster T3	0.59841	0.57860	-
Cluster P	0.56398	0.51397	0.56635

848

849

850

851

852

853

854

855

856

857

858

859 Table 7. Estimate of the relative contribution of the five main bioclimatic variables to the MaxEnt
 860 prediction model of suitable environmental conditions for the clusters of *Parmelina tiliacea* (T1-T3)
 861 and *P. pastillifera* (P1). Values shown are averages over 15 replicate runs. Highest values are in
 862 bold. Eighth admixed individuals were excluded of the analysis

	T1	T2	T3	<i>P. tiliacea</i> (T1-T3)	<i>P. pastillifera</i> (P)
Variable*	% contribution	% contribution	% contribution	% contribution	% contribution
BIO3	36.8	30.5	20.4	27.6	1.5
BIO4	14.9	10.3	20.2	19.8	32.8
BIO8	0.5	2.9	6.5	1.4	10.7
BIO17	11.1	12.1	25.9	12.9	54.2
BIO19	36.7	44.5	27.1	38.3	0.8

863 * BIO3 = Isothermality (Mean diurnal range/ Temperature annual range), BIO4 = Temperature
 864 seasonality (standard deviation *100), BIO8 = Mean temperature of wettest quarter, BIO17 =
 865 Precipitation of driest quarter, BIO19 = Precipitation of coldest quarter

Table 8. Summary of variance partitioning analysis results.

2 explanatory tables: 5 climatic variables, geographical coordinates
 (longitude+ latitude). Total variation (SS): 32.677. Variance: 0.48054

Partition Table

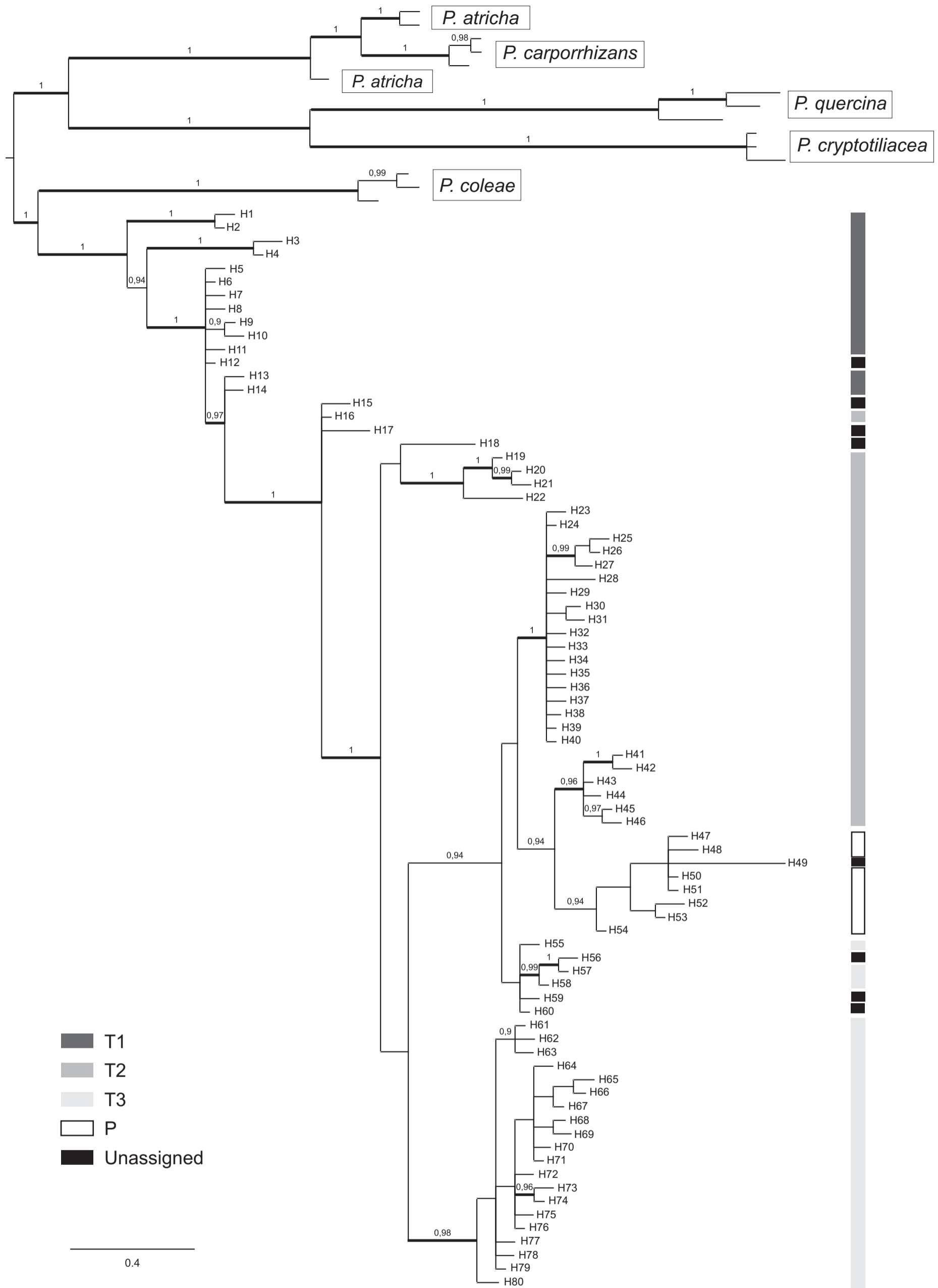
	d.f.	R ²	Adj R ²	Pr(>F)
Climate+Interaction	5	0.23495	0.17423	—
Geography+Interaction	2	0.07196	0.04384	—
Climate+Geography+Interaction	7	0.33129	0.25455	0.005**
Individual fractions				
Climate	5	—	0.21071	0.005**
Interaction	0	—	-0.03648	—
Geography	2	—	0.08032	0.005**
Residuals			0.74545	

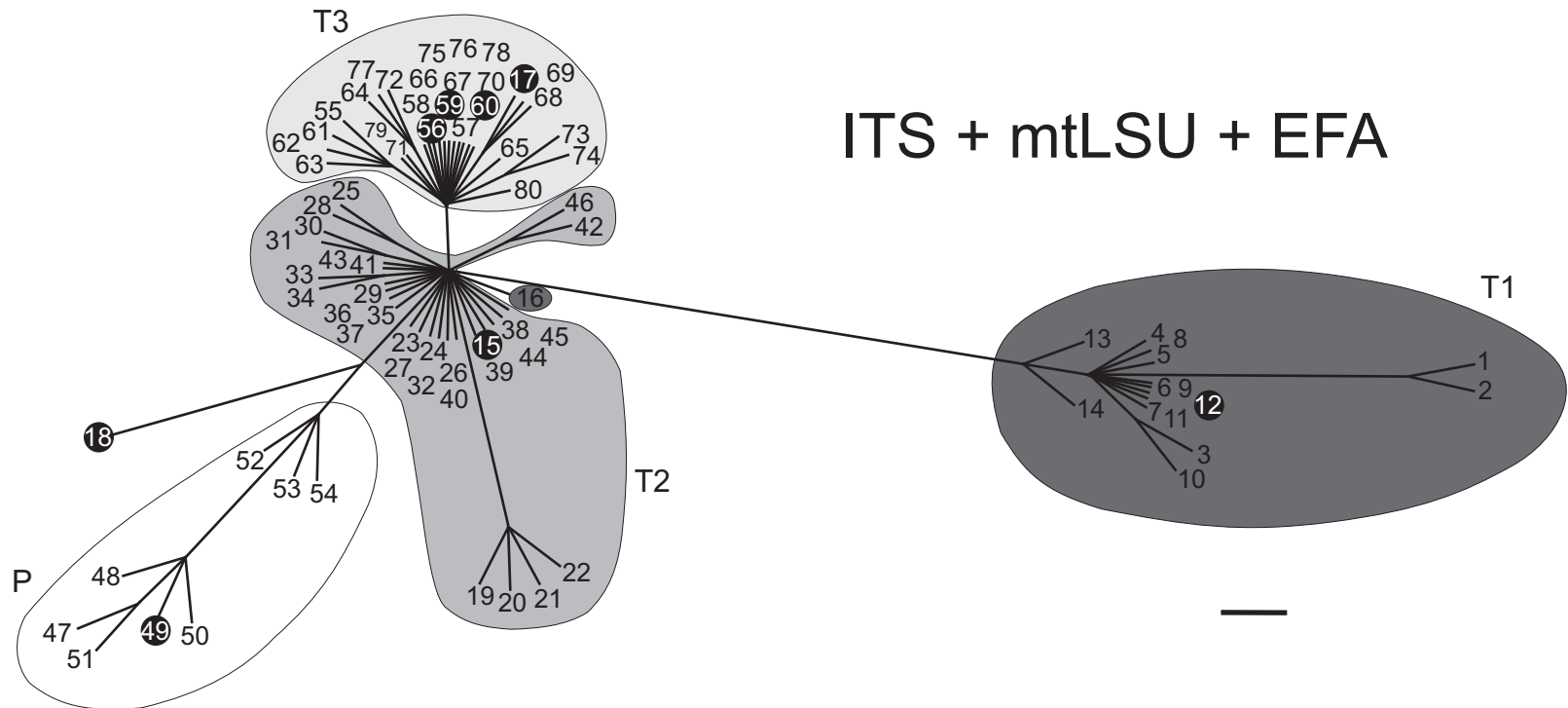
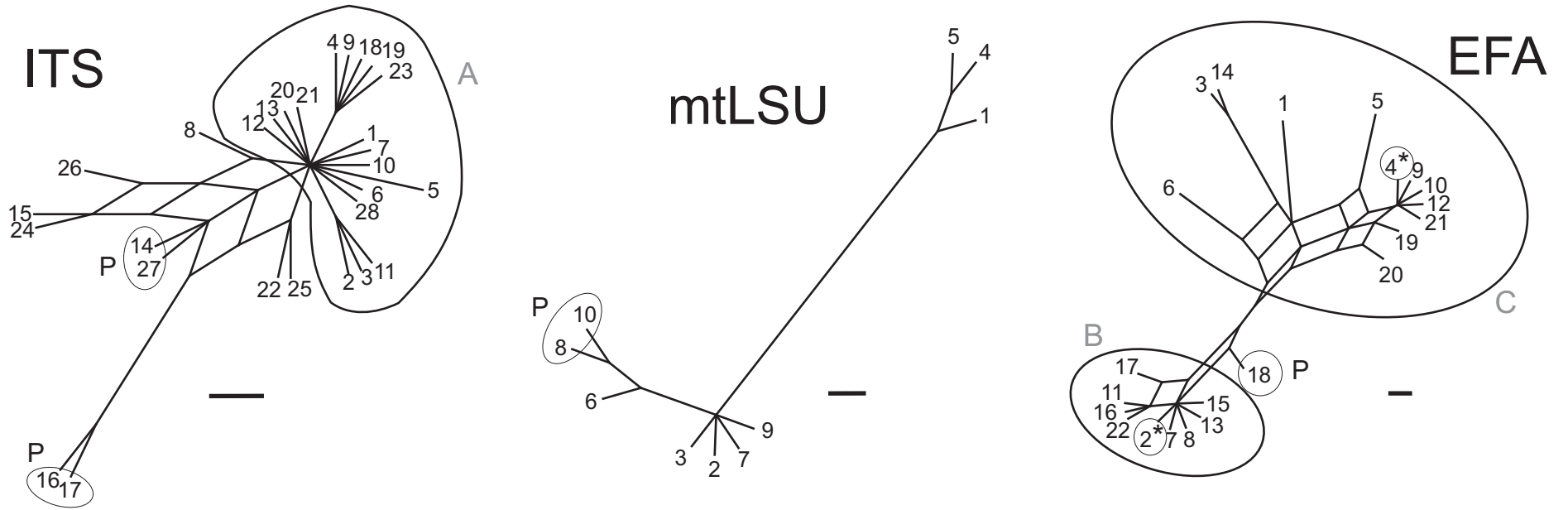
2 explanatory tables: 5 climatic variables, geographical coordinates (latitude).
 Total variation (SS): 32.677. Variance: 0.48054

Partition Table

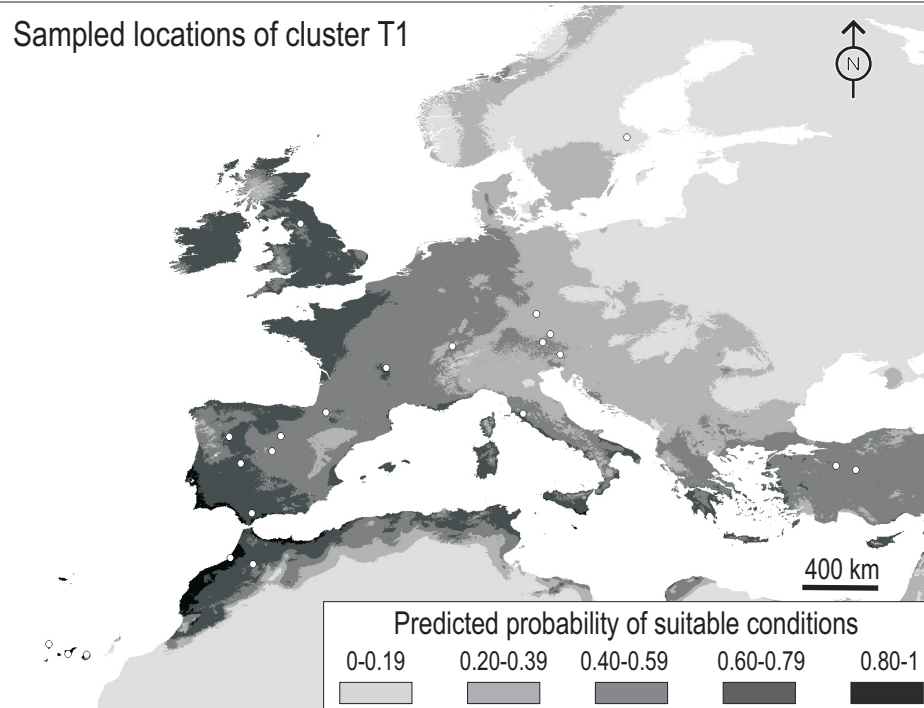
	d.f.	R ²	Adj R ²	Pr(>F)
Climate+Interaction	5	0.23495	0.17423	—
Latitude+Interaction	1	0.05583	0.04174	—
Climate+Latitude+Interaction	6	0.27219	0.20176	0.005**
Individual fractions				
Climate	5	—	0.16002	0.005**
Interaction	0	—	0.01421	—
Latitude	1	—	0.02753	0.028*
Residuals			0.79824	—

866

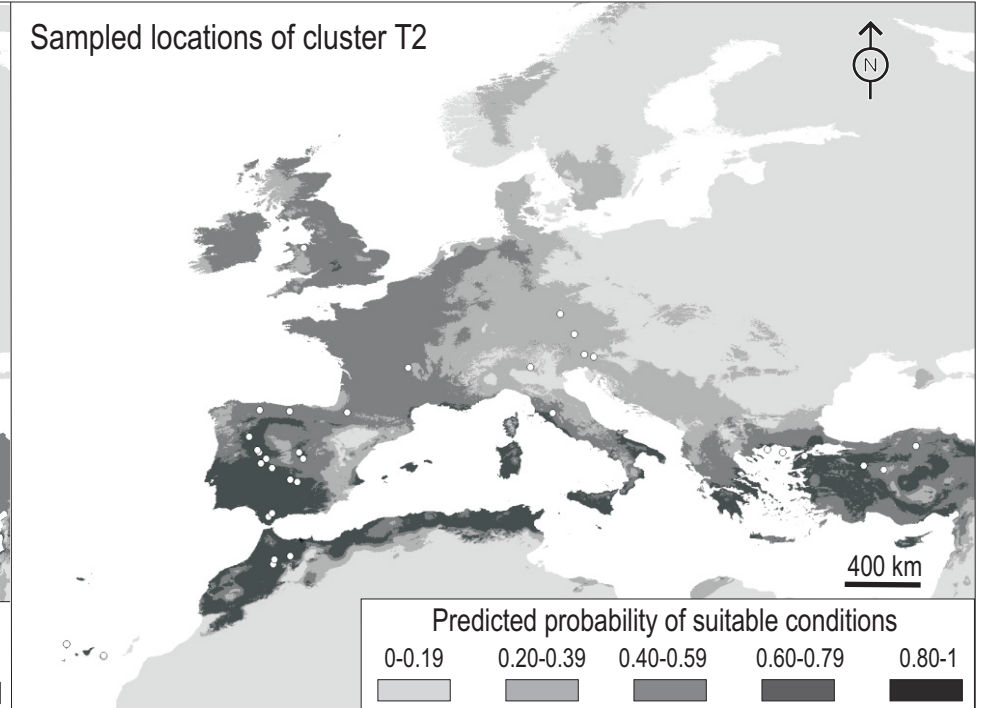




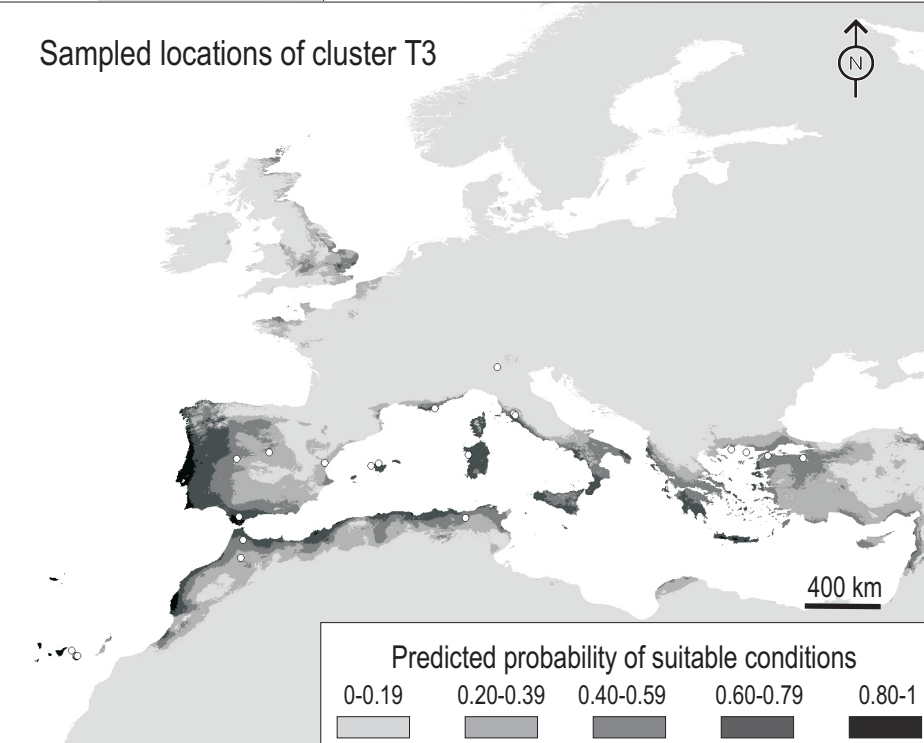
Sampled locations of cluster T1



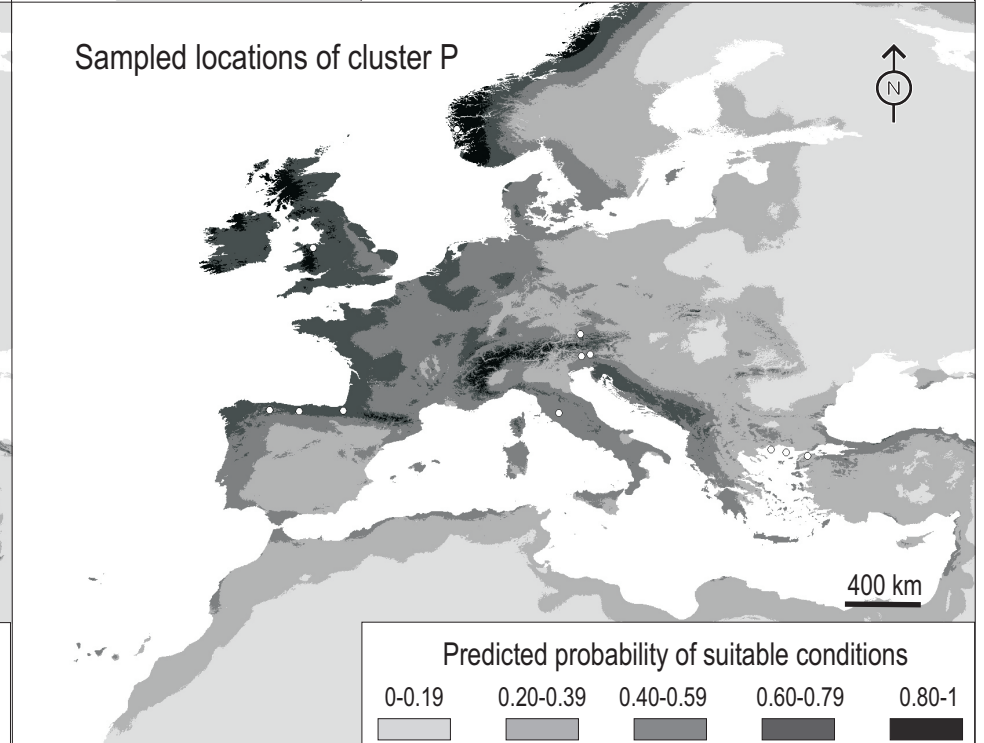
Sampled locations of cluster T2

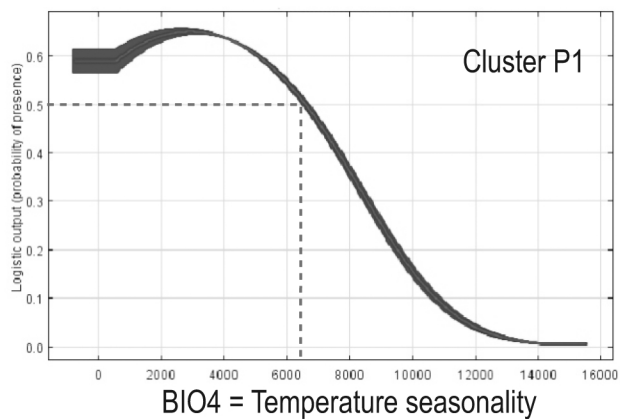
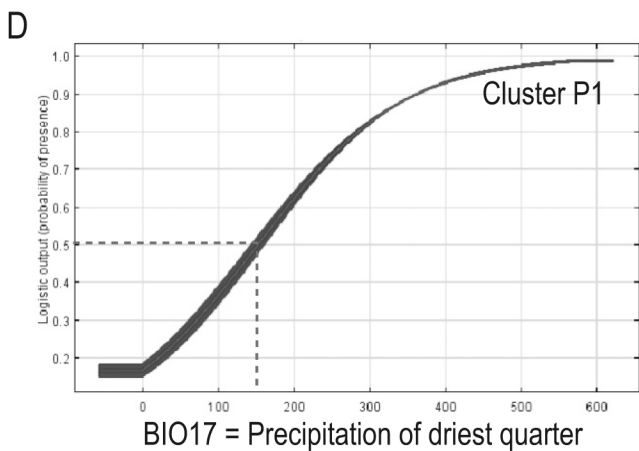
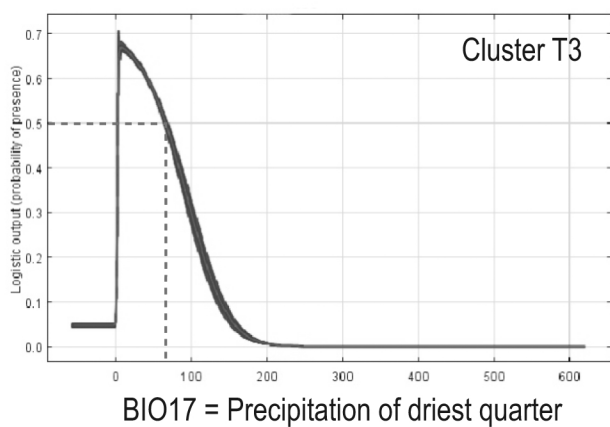
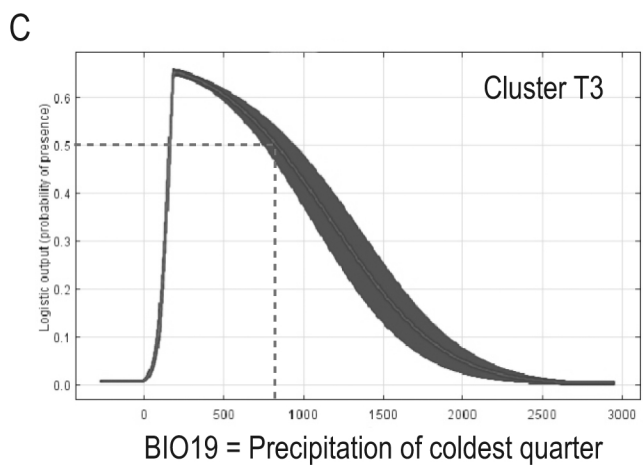
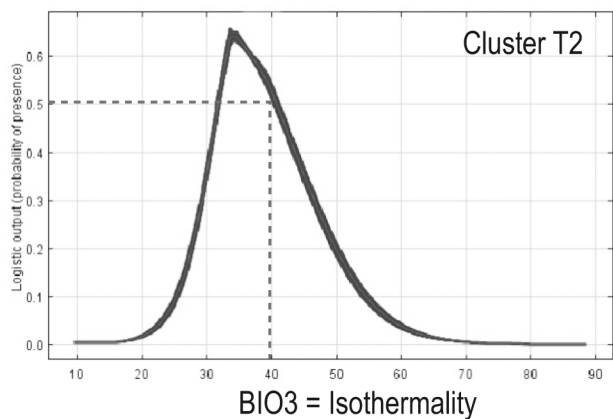
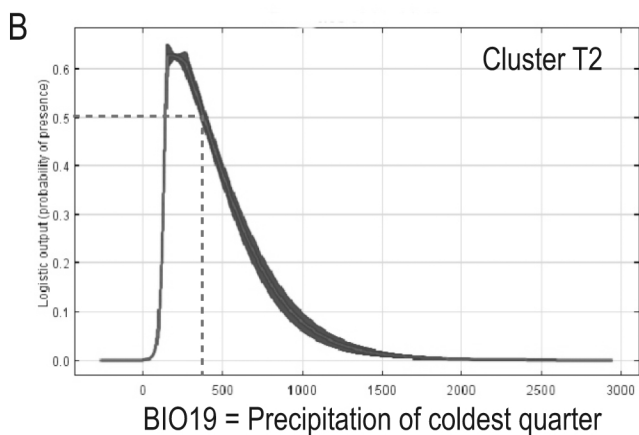
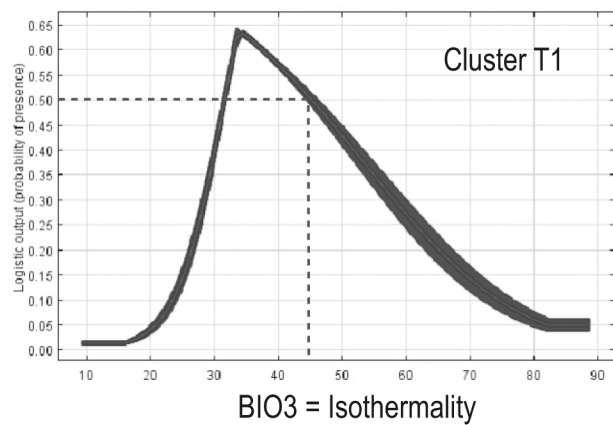
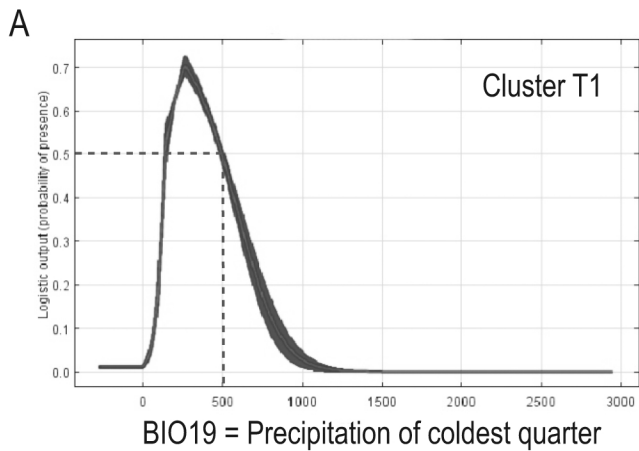


Sampled locations of cluster T3



Sampled locations of cluster P





Suppl. Mat. 1. Locality information with herbarium codes and GenBank accessions of individuals used in the present study.

Code	Locality	No. indiv.	Long.	Lat.	Herbarium	GenBank Accession		
						ITS	mtLSU	EFA
<i>Parmelina tiliacea</i>								
1	El Roque, La Palma, Canary Islands, Spain	9	-17.83	28.74	MAF-Lich 16469; 17231 - 17238	JX466130 - JX466138	JX466479 - JX466487	JX465753 - JX465761
2	Degollada del Teno Alto, Tenerife, Canary Islands, Spain	10	-16.86	28.34	MAF-Lich 17239 - 17248	JX466139 - JX466148	JX466488 - JX466497	JX465762 - JX465771
3	La Escalona, Tenerife, Canary Islands, Spain	9	-16.67	28.12	MAF-Lich 17249 - 17257	JX466149 - JX466157	JX466498 - JX466506	JX465772 - JX465780
4	Vega de San Mateo to Tenteniguada, Gran Canaria, Canary Islands, Spain	10	-15.53	28.00	MAF-Lich 17277 - 17286	JX466177 - JX466186	JX466526 - JX466535	JX465801 - JX465810
5	Galdar, Gran Canaria, Canary Islands, Spain	10	-15.51	28.09	MAF-Lich 16470; 17287 - 17295	JF756983; JX466187 - JX466195	JF757032; JX466536 - JX466544	JX465811 - JX465820
6	Degollada de la Becerra, Gran Canaria, Canary Islands, Spain	10	-15.59	27.99	MAF-Lich 17258 - 17267	JX466158 - JX466167	JX466507 - JX466516	JX465781 - JX465790
7	Valleseco, Gran Canaria, Canary Islands, Spain	10	-15.59	28.02	MAF-Lich 16482; 17268 - 17276	JF756984; JX466168 - JX466176	JF757033; JX466517 - JX466525	JX465791 - JX465800
8	Rabat, Rabat-Salé-Zemmour-Zaer, Morocco	1	-6.71	34.03	MAF-Lich 17296	JX466196	JX466545	JX465821
9	Mulay Idriss, Meknès-Tafilalet, Morocco	1	-5.48	34.03	MAF-Lich 17306	JX466206	JX466555	JX465832
10	Ifrane, Meknès -Tafilalet, Morocco	10	-5.33	33.63	MAF-Lich 16468; 17297 - 17305	JF756988; JX466197 - JX466205	JF757037; JX466546 - JX466554	JX465823 - JX465831
11	Ain Taoujdate, Meknès-Tafilalet, Morocco	1	-5.24	33.92	MAF-Lich 16486	JF756976	JF757025	JX465833
12	Taza, Taza-Al Hoceima-Taounate, Morocco	1	-4.28	34.12	MAF-Lich 17307	JX466207	JX466556	JX465834
13	Chauen, Tangier-Tetouan, Morocco	1	-5.36	35.14	MAF-Lich 17308	JX466208	JX466557	JX465835
14	La Saucedá, Andalucía, Spain	10	-5.59	36.53	MAF-Lich 17309 - 17318	JX466209 - JX466218	JX466558 - JX466567	JX465836 - JX465845
15	Grazalema, Andalucía, Spain	9	-5.38	36.76	MAF-Lich 17319 - 17327	JX466219 - JX466227	JX466568 - JX466576	JX465846 - JX465854
16	Puertollano, Castilla-La Mancha, Spain	3	-3.84	38.67	MAF-Lich 17328 - 17330	JX466228 - JX466230	JX466577 - JX466579	JX465855 - JX465857
17	San Quintín, Castilla-La Mancha, Spain	3	-4.28	38.82	MAF-Lich 16457; 17331 - 17332	JF756986; JX466231 - JX466232	JF757035; JX466580 - JX466581	JX465858 - JX465860
18	Navalvillar, Extremadura, Spain	1	-5.38	39.55	MAF-Lich17355	JX466256	JX466605	JX465884
19	Monfragüe, Extremadura, Spain	9	-6.06	39.83	MAF-Lich 17333 - 17341	JX466233 - JX466241	JX466582 - JX466590	JX465861 - JX465869
20	Cuacos de Yuste, Extremadura, Spain	5	-5.73	40.10	MAF-Lich 16465; 17342 - 17345	JX466242 - JX466246	JX466591 - JX466595	JX465870 - JX465874
21	Peña de Francia, Castilla y León, Spain	4	-6.16	40.51	MAF-Lich 17346 - 17349	JX466247 - JX466250	JX466596 - JX466599	JX465875 - JX465878
22	Morasverdes, Castilla y León, Spain	5	-6.28	40.64	MAF-Lich 17350 - 17354	JX466251 - JX466255	JX466600 - JX466604	JX465879 - JX465883
23	Braganza, Alto Trás-os-Montes, Portugal	2	-6.77	41.44	MAF-Lich 15243 - 15350	JF756981; JX466257	JF757030; JX466606	JX465885 - JX465886
24	El Escorial, Madrid, Spain	5	-4.15	40.57	MAF-Lich 16467; 17358 - 17361	JF756980; JX466260 - JX466263	JF757029; JX466609 - JX466612	JX465890 - JX465894
25	El Pardo, Madrid, Spain	3	-3.75	40.51	MAF-Lich 16452; 17356 - 17357	JF756979; JX466258 - JX466259	JF757028; JX466607 - JX466608	JX465887 - JX46589

26	Montejo de la Sierra, Madrid, Spain	5	-3.53	41.06	MAF-Lich 17362 - 17366	JX466264 - JX466268	JX466613 - JX466617	JX465895 - JX465899
27	Saliencia, Principado de Asturias, Spain	4	-6.12	43.08	MAF-Lich 16462; 17379 - 17381	JX466283 - JX466286	JX466632 - JX466635	JX465915 - JX465918
28	La Lomba, Cantabria, Spain	4	-4.30	43.02	MAF-Lich 17375 - 17378	JX466279 - JX466282	JX466628 - JX466631	JX465910 - JX465913
29	Moral de Hornuez, Castilla y León, Spain	10	-3.62	41.49	MAF-Lich 16459 - 16460; 17367 - 17374	JX466269 - JX466278	JX466618 - JX466627	JX465900 - JX465909
30	Belagua, Navarra, Spain	2	-0.82	42.96	MAF-Lich 17382 - 17383	JX466287 - JX466288	JX466636 - JX466637	JX465920 - JX465921
32	Castellón, Valencia, Spain	10	-0.32	39.85	MAF-Lich 17391 - 17400	JX466296 - JX466305	JX466645 - JX466654	JX465929 - JX465938
33	Banyalbufar, Mallorca, Balearic Islands, Spain	3	2.51	39.67	MAF-Lich 17401 - 17403	JX466306 - JX466308	JX466655 - JX466657	JX465939 - JX465941
34	Ufanes, Mallorca, Balearic Islands, Spain	4	2.96	39.81	MAF-Lich 16466; 17404 - 17406	JF756990; JX466309 - JX466311	JF757039; JX466658 - JX466660	JX465942 - JX465945
35	Al mawajin, Jendouba, Tunisia	2	8.31	36.49	MAF-Lich 16458; 17407	JF756987; JX466312	JF757036; JX466661	JX465946 - JX465947
36	Badde Orca, Sardinia, Italy	9	8.48	40.35	MAF-Lich 17408 - 17416	JX466313 - JX466321	JX466662 - JX466670	JX465948 - JX465956
37	Saint-Tropez, Provence-Alpes-Côte d'Azur, France	2	6.43	43.20	MAF-Lich 16464; 17417	JF756982; JX466322	JF757031; JX466671	JX465957 - JX465958
38	Lodrino, Lombardia, Italy	10	10.28	45.72	MAF-Lich 16483; 17455 - 17463	JF756985; JX466360 - JX466368	JF757034; JX466709 - JX466717	JX465996 - JX466005
39	Poggioferro, Toscana, Italy	10	11.35	42.69	MAF-Lich 17440 - 17449	JX466345 - JX466354	JX466694 - JX466703	JX465981 - JX465990
40	Ansedonia, Toscana, Italy	9	11.27	42.41	MAF-Lich 17431 - 17439	JX466336 - JX466344	JX466685 - JX466693	JX465972 - JX465980
41	Monte Amiatta, Toscana, Italy	1	11.60	42.90	MAF-Lich 17450	JX466355	JX466704	JX465991
42	Château de Cordès, Auvergne, France	4	2.85	45.70	MAF-Lich 17418 - 17421	JX466323 - JX466326	JX466672 - JX466675	JX465959 - JX465962
43	Neuchâtel, Neuchâtel, Switzerland	9	6.91	47.00	MAF-Lich 17422 - 17430	JX466327 - JX466335	JX466676 - JX466684	JX465963 - JX465971
45	Camporosso in Valcanale, Friuli-Venecia Julia, Italy	8	13.53	46.51	MAF-Lich 17474 - 17481	JX466379 - JX466386	JX466728 - JX466735	JX466016 - JX466023
46	Bled, Upper Carniola, Slovenia	9	14.11	46.37	MAF-Lich 16619; 17484 - 17491	JF756992; JX466389 - JX466396	JF757041; JX466738 - JX466745	JX466026 - JX466034
47	Mittersill, Salzburg, Austria	8	12.48	47.27	MAF-Lich 16618; 17492 - 17498	JF756991; JX466397 - JX466403	JF757040; JX466746 - JX466752	JX466035 - JX466042
48	Bad Reichenhall, Upper Bavaria, Germany	8	12.93	47.76	MAF-Lich 17499 - 17506	JX466404 - JX466411	JX466753 - JX466760	JX466043 - JX466050
49	Regensbrug, Bavaria, Germany	5	12.09	49.00	MAF-Lich 16485; 17509 - 17512	JF756989; JX466414 - JX466417	JF757038; JX466763 - JX466766	JX466053 - JX466057
50	Rhydlydan, Wales, United Kingdom	4	-3.47	53.04	MAF17528 - 17531	JX466443 - JX466446	JX466792 - JX466795	JX466085 - JX466088
51	Sandford, Cumbria, North West England, United Kingdom	5	-2.41	54.54	MAF-Lich 17535 - 17539	JX466450 - JX466454	JX466799 - JX466803	JX466092 - JX466096
53	Uppsala, Uppland, Sweden	10	17.63	59.85	MAF-Lich 17548 - 17557	JX466463 - JX466472	JX466812 - JX466821	JX466105 - JX466114
54	Maries, Thasos Island, Greece	4	24.62	40.68	B600183598; B600183667; B600183986; B600186705	JX466418 - JX466421	JX466767 - JX466770	JX466058 - JX466061
55	Daphnes, Samothraki Island, Greece	4	25.55	40.51	B600184168; B600185102; B600185118; B600186947	JX466423 - JX466426	JX466772 - JX466775	JX466063 - JX466066
56	Dumanli, Canakale, Turkey	2	26.88	40.28	MAF-Lich 17513 - 17514	JX466428 - JX466429	JX466777 - JX466778	JX466068 - JX466069
57	Bursa, Uludaj, Turkey	1	29.03	40.13	MAF-Lich 16456	JF756977	JF757026	JX466072
58	Asagi Caglan, Eskisehir, Turkey	3	30.48	39.68	MAF-Lich 17516 - 17518	JX466431 - JX466433	JX466780 - JX466782	JX466073 - JX466075

59	Sivrihisar Mountains, Eskisehir, Turkey	8	31.67	39.42	MAF-Lich 17519 -17526	JX466434 - JX466441	JX466783 - JX466790	JX466076 - JX466083
60	Inköyü, Cankiri, Turkey	1	33.63	40.88	MAF-Lich 17527	JX466442	JX466791	JX466084
<hr/>								
<i>Parmelina pastillifera</i>								
27	Saliencia, Principado de Asturias, Spain	1	-6.12	43.08	MAF-Lich 16472	JF756999	JF757021	JX465919
28	La Lomba, Cantabria, Spain	1	-4.30	43.02	MAF-Lich 16473	JF756998	JF757020	JX465914
31	Puerto de Velate, Navarra, Spain	7	-1.62	43.04	MAF-Lich 17384 - 17390	JX466289 - JX466295	JX466638 - JX466644	JX465922 - JX465928
41	Monte Amiatta, Toscana, Italy	4	11.60	42.90	MAF-Lich 17451 - 17454	JX466356 - JX466359	JX466705 - JX466708	JX465992 - JX465995
44	Fielis, Friuli-Venecia Julia, Italy	10	13.00	46.47	MAF-Lich 17464 - 17473	JX466369 - JX466378	JX466718 - JX466727	JX466006 - JX466015
45	Camporosso in Valcanale, Friuli-Venecia Julia, Italy	2	13.53	46.51	MAF-Lich 17482 - 17483	JX466387 - JX466388	JX466736 - JX466737	JX466024 - JX466025
48	Bad Reichenhall, Upper Bavaria, Germany	3	12.93	47.76	MAF-Lich 17507 - 17508	JX466412 - JX466413	JX466761 - JX466762	JX466051 - JX466052
50	Rhydlydan, Wales, United Kingdom	3	-3.47	53.04	MAF-Lich 17532 - 17534	JX466447 - JX466449	JX466796 - JX466798	JX466089 - JX466091
52	Bergen, Hordaland, Norway	8	5.37	60.35	MAF-Lich 17540 - 17547	JX466455 - JX466462	JX466804 - JX466811	JX466097 - JX466104
54	Maries, Thasos Island, Greece	1	24.62	40.68	B600183985	JX466422	JX466771	JX466062
55	Daphnes, Samothraki Island, Greece	1	25.55	40.51	B600185101	JX466427	JX466776	JX466067
56	Dumanli, Canakale, Turkey	2	26.88	40.28	MAF-Lich 16471; 17515	JF756997; JX466430	JF757019; JX466779	JX466070; JX466071
<hr/>								
Other <i>Parmelina</i> species:								
	<i>Parmelina atricha</i>	3			MAF-Lich 16634; 17558 - 17559	JX466473 - JX466475	JX466822 - JX466824	JX466115 - JX466117
	<i>Parmelina carporrhizans</i>	3			MAF-Lich 16474; 16476 - 16477	JF756994 - JF756996	JF757006 - JF757008	JX466118 - JX466120
	<i>Parmelina quercina</i>	3			MAF-Lich 16193 - 16194; 17560	JF757001 - JF757002; JX466478	JF7570023 - JF7570024; JX466827	JX466121 - JX466123
	<i>Parmelina cryptotiliacea</i>	3			MAF-Lich 16455; 17561 - 17562	JF756971; JX466476 - JX466477	JF757014; JX466825 - JX466826	JX466124 - JX466126
	<i>Parmelina coleae</i>	3			MAF-Lich 16479 - 16481	JF756966 - JF756968	JF757009 - JF757011	JX466127 - JX466129
<hr/>								

Supplementary Material 2. Estimates of genetic variation parameters based on ITS, mtLSU, EFA, and the combined matrix in the 57 *P. tiliacea* (T) and 12 *P. pastillifera* (P) localities. N=number of individuals. H=number of haplotypes. S=number of polymorphic sites. GD=gene diversity. π =nucleotide diversity. SD=standard deviation. Highest values are in bold.

No. Loc.	Code	ITS						mtLSU				EFA				3 Genes			
		N	H	S	GD	$\pi \pm SD$	H	S	GD	$\pi \pm SD$	H	S	GD	$\pi \pm SD$	H	S	GD \pm SD	$\pi \pm SD$	
1	ROQ_T	9	3	4	0.5556	0.0025 \pm 0.0020	2	9	0.2222	0.0028 \pm 0.0020	3	23	0.5556	0.0160 \pm 0.0093	3	36	0.44 \pm 0.34	0.0072 \pm 0.0041	
2	DEG_T	10	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	
3	ESA_T	9	3	5	0.6389	0.0057 \pm 0.0038	4	15	0.6944	0.0091 \pm 0.0054	3	16	0.6389	0.0107 \pm 0.0064	4	36	0.66 \pm 0.46	0.0086 \pm 0.0048	
4	MAT_T	10	2	4	0.3556	0.0031 \pm 0.0023	2	11	0.3556	0.0055 \pm 0.0034	3	8	0.3778	0.0050 \pm 0.0033	3	23	0.36 \pm 0.29	0.0047 \pm 0.0027	
5	GAL_T	10	2	5	0.2000	0.0022 \pm 0.0018	2	11	0.2000	0.0031 \pm 0.0021	2	7	0.2000	0.0026 \pm 0.0020	2	23	0.20 \pm 0.19	0.0027 \pm 0.0016	
6	DBE_T	10	3	4	0.6000	0.0023 \pm 0.0019	3	2	0.3778	0.0006 \pm 0.0006	4	16	0.7111	0.0072 \pm 0.0045	7	22	0.56 \pm 0.40	0.0031 \pm 0.0018	
7	VAL_T	10	4	4	0.7333	0.0036 \pm 0.0026	3	2	0.6000	0.0009 \pm 0.0009	3	15	0.3778	0.0098 \pm 0.0058	6	21	0.57 \pm 0.41	0.0043 \pm 0.0025	
8	RAB_T	1	1	0	-	-	1	0	-	-	1	0	-	-	1	0	0	0	
9	MUL_T	1	1	0	-	-	1	0	-	-	1	0	-	-	1	0	0	0	
10	IFR_T	10	3	4	0.6000	0.0023 \pm 0.0019	2	10	0.2000	0.0028 \pm 0.0020	4	20	0.7111	0.0080 \pm 0.0049	5	34	0.50 \pm 0.37	0.0045 \pm 0.0026	
11	AIN_T	1	1	0	-	-	1	0	-	-	1	0	-	-	1	0	0	0	
12	TAZ_T	1	1	0	-	-	1	0	-	-	1	0	-	-	1	0	0	0	
13	CHA_T	1	1	0	-	-	1	0	-	-	1	0	-	-	1	0	0	0	
14	SAU_T	10	5	7	0.7556	0.0060 \pm 0.0039	2	1	0.4667	0.0006 \pm 0.0007	2	15	0.2000	0.0057 \pm 0.0036	6	23	0.47 \pm 0.35	0.0036 \pm 0.0021	
15	GRA_T	9	3	3	0.4167	0.0018 \pm 0.0016	2	10	0.2222	0.0031 \pm 0.0022	2	17	0.2222	0.0063 \pm 0.0040	3	30	0.29 \pm 0.25	0.0040 \pm 0.0023	
16	PTO_T	3	1	0	0	0	1	0	0	0	2	2	0.6667	0.0024 \pm 0.0025	2	2	0.22 \pm 0.27	0.0008 \pm 0.0008	
17	SNQ_T	3	2	1	0.6667	0.0014 \pm 0.0018	1	0	0	0	3	3	1.0000	0.0037 \pm 0.0035	3	4	0.56 \pm 0.53	0.0015 \pm 0.0014	
18	NAV_T	1	1	0	-	-	1	0	-	-	1	0	-	-	1	0	0	0	
19	MON_T	9	4	4	0.5833	0.0027 \pm 0.0021	2	10	0.3889	0.0055 \pm 0.0034	3	18	0.4167	0.0067 \pm 0.0042	5	32	0.46 \pm 0.35	0.0051 \pm 0.0029	
20	CUA_T	5	2	4	0.4000	0.0035 \pm 0.0029	2	1	0.4000	0.0006 \pm 0.0007	3	25	0.7000	0.0226 \pm 0.0144	3	30	0.5 \pm 0.41	0.0082 \pm 0.0051	
21	PEF_T	4	1	0	0	0	1	0	0	0	2	17	0.5000	0.0152 \pm 0.0107	2	17	0.17 \pm 0.21	0.0047 \pm 0.0033	
22	MVD_T	5	2	1	0.6000	0.0013 \pm 0.0014	1	0	0	0	3	19	0.7000	0.0136 \pm 0.0090	3	20	0.43 \pm 0.37	0.0046 \pm 0.0030	
23	BRA_T	2	2	2	1.0000	0.0043 \pm 0.0053	2	10	1.0000	0.0141 \pm 0.0148	2	17	1.0000	0.0283 \pm 0.0292	2	29	1.00 \pm 1.10	0.0159 \pm 0.0162	

		ITS				mtLSU				EFA				3 Genes				
24	ESC_T	5	2	3	0.6000	0.0039 ± 0.0031	2	10	0.6000	0.0085 ± 0.0057	4	24	0.9000	0.0223 ± 0.0142	4	37	0.70 ± 0.54	0.0115 ± 0.0072
25	PAR_T	3	3	3	1.0000	0.0044 ± 0.0041	2	1	0.6667	0.0009 ± 0.0012	3	17	1.0000	0.0220 ± 0.0172	3	21	0.89 ± 0.78	0.0084 ± 0.0065
26	MOS_T	5	2	1	0.4000	0.0009 ± 0.0011	1	0	0	0	4	4	0.9000	0.0033 ± 0.0027	4	5	0.43 ± 0.37	0.0013 ± 0.0010
27	SAL_T	4	1	0	0	0	2	1	0.5000	0.0007 ± 0.0009	2	17	0.6667	0.0203 ± 0.0140	3	18	0.39 ± 0.36	0.0066 ± 0.0045
27	SAL_P	1	1	0	-	-	1	0	-	-	1	0	-	-	1	0	0	0
28	LOM_T	4	2	1	0.5000	0.0011 ± 0.0013	1	0	0	0	1	0	0	0	2	1	0.17 ± 0.20	0.0003 ± 0.0004
28	LOM_P	1	1	0	-	-	1	0	-	-	1	0	-	-	1	0	0	0
29	MHO_T	10	2	1	0.2000	0.0004 ± 0.0006	1	0	0	0	1	0	0	0	2	1	0.07 ± 0.10	0.0001 ± 0.0002
30	BEL_T	2	2	5	1.0000	0.0109 ± 0.0119	2	10	1.0000	0.0141 ± 0.0148	2	18	1.0000	0.0302 ± 0.0311	2	33	1.00 ± 1.10	0.0182 ± 0.0185
31	PVE_P	7	3	5	0.7143	0.0056 ± 0.0039	2	1	0.5714	0.0008 ± 0.0008	1	0	0	0	3	6	0.43 ± 0.34	0.0018 ± 0.0012
32	CAS_T	10	2	2	0.2000	0.0009 ± 0.0010	1	0	0	0	1	0	0	0	2	2	0.07 ± 0.10	0.0002 ± 0.0003
33	BAN_T	3	3	2	1.0000	0.0029 ± 0.0030	1	0	0	0	2	14	0.6667	0.0150 ± 0.0120	3	16	0.56 ± 0.53	0.0054 ± 0.0043
34	UFA_T	4	1	0	0	0	1	0	0	0	2	1	0.6667	0.0012 ± 0.0014	2	1	0.22 ± 0.25	0.0004 ± 0.0004
35	TUN_T	2	2	1	1.0000	0.0022 ± 0.0031	1	0	0	0	2	1	1.0000	0.0018 ± 0.0026	2	2	0.67 ± 0.78	0.0012 ± 0.0014
36	CER_T	9	3	3	0.4167	0.0018 ± 0.0016	1	0	0	0	3	2	0.5556	0.0011 ± 0.0011	5	5	0.32 ± 0.27	0.0008 ± 0.0006
37	PRV_T	2	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
38	LOD_T	10	2	6	0.3556	0.0047 ± 0.0032	2	1	0.3556	0.0005 ± 0.0006	2	15	0.3556	0.0101 ± 0.0060	2	22	0.36 ± 0.29	0.0046 ± 0.0026
39	POG_T	10	4	3	0.6444	0.0020 ± 0.0017	1	0	0	0	3	2	0.3778	0.0010 ± 0.0010	5	5	0.34 ± 0.28	0.0008 ± 0.0006
40	ANS_T	9	4	3	0.6944	0.0018 ± 0.0016	1	0	0	0	4	16	0.7500	0.0155 ± 0.0090	6	19	0.48 ± 0.36	0.0053 ± 0.0030
41	AMI_T	1	1	0	-	-	1	0	-	-	1	0	-	-	1	0	0	0
41	AMI_P	4	2	4	0.5000	0.0044 ± 0.0037	1	0	0	0	1	0	0	0	2	4	0.17 ± 0.20	0.0012 ± 0.0010
42	CCO_T	4	3	4	0.8333	0.0044 ± 0.0036	2	10	0.5000	0.0070 ± 0.0052	2	17	0.5000	0.0141 ± 0.0100	3	31	0.61 ± 0.51	0.0085 ± 0.0058
43	SUI_T	9	2	2	0.3889	0.0017 ± 0.0015	1	0	0	0	2	17	0.5000	0.0141 ± 0.0082	4	19	0.30 ± 0.26	0.0048 ± 0.0028
44	FIE_P	10	1	0	0	0	1	0	0	0	2	3	0.2000	0.0011 ± 0.0011	2	3	0.07 ± 0.10	0.0003 ± 0.0003
45	CAM_T	8	4	7	0.8214	0.0073 ± 0.0048	2	10	0.4286	0.0060 ± 0.0038	3	18	0.6786	0.0163 ± 0.0096	6	35	0.64 ± 0.46	0.0096 ± 0.0054
45	CAM_P	2	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
46	BLE_T	9	2	8	0.2222	0.0039 ± 0.0028	1	0	0	0	3	18	0.7222	0.0128 ± 0.0075	4	26	0.31 ± 0.27	0.0050 ± 0.0029
47	MIT_T	8	3	2	0.6786	0.0018 ± 0.0016	1	0	0	0	1	0	0	0	3	2	0.23 ± 0.22	0.0005 ± 0.0004
48	BRH_T	8	6	10	0.8929	0.0076 ± 0.0049	2	10	0.5357	0.0076 ± 0.0046	3	18	0.7500	0.0160 ± 0.0094	7	38	0.73 ± 0.51	0.0102 ± 0.0058

	ITS				mtLSU				EFA				3 Genes					
48	BRH_P	2	2	4	1.0000	0.0088 ± 0.0098	1	0	0	0	1	0	0	0	2	4	0.33 ± 0.46	0.0023 ± 0.0026
49	BAV_T	5	3	3	0.7000	0.0026 ± 0.0023	2	10	0.7000	0.0059 ± 0.0041	1	0	0	0	3	13	0.47 ± 0.39	0.0031 ± 0.0021
50	WAL_T	4	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
50	WAL_P	3	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
51	CUM_T	5	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
52	NRW_P	8	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
53	SWN_T	10	2	2	0.3556	0.0016 ± 0.0014	1	0	0	0	2	17	0.2000	0.0056 ± 0.0036	3	19	0.18 ± 0.18	0.0022 ± 0.0014
54	THA_T	4	4	8	1.0000	0.0098 ± 0.0073	2	1	0.6667	0.0009 ± 0.0010	2	15	0.6667	0.0189 ± 0.0131	4	24	0.78 ± 0.62	0.0089 ± 0.0060
54	THA_P	1	1	0	-	-	1	0	-	-	1	0	-	-	1	0	0	0
55	SAM_T	4	3	4	0.8333	0.0047 ± 0.0039	2	1	0.5000	0.0007 ± 0.0009	2	14	0.5000	0.0132 ± 0.0093	3	19	0.61 ± 0.51	0.0057 ± 0.0039
55	SAM_P	1	1	0	-	-	1	0	0.00	-	1	0	-	-	1	0	0	0
56	LAP_T	2	2	7	1.0000	0.0153 ± 0.0164	2	1	1.0000	0.0014 ± 0.0020	2	15	1.0000	0.0282 ± 0.0291	2	23	1.00 ± 1.10	0.0135 ± 0.0138
56	LAP_P	2	2	2	1.0000	0.0043 ± 0.0053	1	0	0	0	1	0	0	0	2	2	0.33 ± 0.46	0.0012 ± 0.0014
57	BUR_T	1	1	0	-	-	1	0	-	-	1	0	-	-	1	0	0	0
58	ASA_T	3	3	6	1.0000	0.0087 ± 0.0074	2	10	0.6667	0.0094 ± 0.0076	2	18	0.6667	0.0202 ± 0.0158	3	34	0.78 ± 0.69	0.0126 ± 0.0096
59	SIV_T	8	2	3	0.4286	0.0028 ± 0.0022	2	10	0.4286	0.0060 ± 0.0038	2	17	0.4286	0.0121 ± 0.0073	2	30	0.43 ± 0.34	0.0070 ± 0.0041
60	CAN_T	1	1	0	-	-	1	0	-	-	1	0	-	-	1	0	0	0

Supplementary Material 3 . Proportion of membership of each locality in the clusters T1-T3 (*Parmelina tiliacea*) and P (*P. pastillifera*) inferred by Structure.

Code	Locality	No of individuals	T1	T2	T3	P1
1	ROQ (Spain)	9	0.106	0.859	0.013	0.022
2	DEG (Spain)	10	0.010	0.010	0.969	0.011
3	ESA (Spain)	9	0.407	0.013	0.554	0.027
4	MAT (Spain)	10	0.777	0.011	0.198	0.015
5	GAL (Spain)	10	0.872	0.011	0.107	0.011
6	DBE (Spain)	10	0.012	0.863	0.108	0.017
7	VAL (Spain)	10	0.017	0.677	0.284	0.022
8	RAB (Morocco)	1	0.967	0.010	0.011	0.011
9	MUL (Morocco)	1	0.010	0.010	0.969	0.011
10	IFR (Morocco)	10	0.105	0.870	0.012	0.014
11	AIN (Morocco)	1	0.011	0.963	0.012	0.014
12	TAZ (Morocco)	1	0.011	0.966	0.011	0.012
13	CHA (Morocco)	1	0.010	0.010	0.969	0.011
14	SAU (Spain)	10	0.018	0.326	0.607	0.048
15	GRA (Spain)	9	0.117	0.858	0.011	0.013
16	PTO (Spain)	3	0.011	0.965	0.011	0.013
17	SNQ (Spain)	3	0.012	0.962	0.012	0.015
18	NAV (Spain)	1	0.013	0.958	0.012	0.017
19	MON (Spain)	9	0.218	0.748	0.014	0.021
20	CUA (Spain)	5	0.011	0.774	0.202	0.013
21	PEF (Spain)	4	0.011	0.964	0.011	0.013
22	MVD (Spain)	5	0.011	0.964	0.011	0.014
23	BRA (Spain)	2	0.490	0.487	0.011	0.012
24	ESC (Spain)	5	0.575	0.397	0.013	0.015
25	PAR (Spain)	3	0.044	0.646	0.293	0.017
26	MOS (Spain)	5	0.014	0.954	0.014	0.018
27	SAL (Spain)	4	0.015	0.943	0.014	0.028
27	SAL P (Spain)	1	0.010	0.010	0.010	0.969
28	LOM (Spain)	4	0.011	0.964	0.011	0.013
28	LOM P (Spain)	1	0.010	0.010	0.011	0.969
29	MHO (Spain)	10	0.966	0.011	0.011	0.011
30	BEL (Spain)	2	0.490	0.488	0.011	0.012
31	PVE P (Spain)	7	0.011	0.011	0.011	0.967
32	CAS (Spain)	10	0.015	0.010	0.964	0.011
33	BAN (Spain)	3	0.098	0.012	0.871	0.019
34	UFA (Spain)	4	0.010	0.010	0.969	0.011
35	TUN (Tunisia)	2	0.012	0.011	0.963	0.014
36	CER (Italy)	9	0.012	0.012	0.960	0.016
37	PRV (France)	2	0.010	0.010	0.969	0.011
38	LOD (Italy)	10	0.010	0.201	0.777	0.011
39	POG (Italy)	10	0.022	0.011	0.954	0.013
40	ANS (Italy)	9	0.034	0.027	0.907	0.032

Code	Locality	No of individuals	T1	T2	T3	P1
41	AMI (Italy)	1	0.012	0.961	0.011	0.016
41	AMI P (Italy)	4	0.012	0.021	0.012	0.955
42	CCO (France)	4	0.724	0.250	0.012	0.014
43	SUI (Switzerland)	9	0.930	0.030	0.015	0.024
44	FIE P (Italy)	10	0.012	0.020	0.012	0.956
45	CAM (Italy)	8	0.344	0.629	0.013	0.014
45	CAM P (Italy)	2	0.010	0.010	0.010	0.969
46	BLE (Slovenia)	9	0.012	0.962	0.012	0.015
47	MIT (Germany)	8	0.967	0.011	0.011	0.011
48	BRH (Germany)	8	0.588	0.378	0.013	0.021
48	BRH P (Germany)	2	0.013	0.021	0.012	0.954
49	BAV (Germany)	5	0.808	0.163	0.013	0.016
50	WAL (UK)	4	0.011	0.964	0.011	0.013
50	WAL P (UK)	3	0.010	0.010	0.011	0.969
51	CUM (UK)	5	0.968	0.010	0.011	0.011
52	NRW P (Norway)	8	0.011	0.010	0.011	0.969
53	SWN (Sweden)	10	0.963	0.013	0.011	0.012
54	THA (Greece)	4	0.014	0.472	0.490	0.024
54	THA P (Greece)	1	0.013	0.012	0.129	0.846
55	SAM (Greece)	4	0.022	0.249	0.717	0.012
55	SAM P (Greece)	1	0.011	0.011	0.010	0.969
56	LAP (Turkey)	2	0.012	0.484	0.490	0.014
56	LAP P (Turkey)	2	0.012	0.012	0.012	0.964
57	BUR (Turkey)	1	0.013	0.011	0.960	0.016
58	ASA (Turkey)	3	0.644	0.330	0.012	0.014
59	SIV (Turkey)	8	0.729	0.249	0.011	0.011
60	CAN (Turkey)	1	0.013	0.958	0.013	0.016

CAPÍTULO III

Filogenia, historia evolutiva y
biogeografía del género

Parmelina

CHAPTER III

Phylogeny, evolutionary history
and biogeography of *Parmelina*

genus

3.1 Abstract.

The genus *Parmelina* belongs to the parmelioid clade, the largest clade of the Parmeliaceae. *Parmelina* is mainly distributed in Europe and eastern North America and forms a monophyletic group sister to *Myelochroa*, both genera differing by chemistry and geographical distribution. Most of the species of *Parmelina* are monophyletic except *P. atricha* and *P. tiliacea* that are paraphyletic with *P. carporrhizans* and *P. pastillifera* nested inside, respectively. The species cannot be characterized by any particular morphological character, but for a combination of features and area of distribution. The dating analysis suggests that the *Parmelina-Myelochroa* divergence occurred during middle Oligocene, while diversification of *Myelochroa* started during the Oligocene-Miocene boundary, and that of *Parmelina* began later, during early Miocene. From middle Miocene to early Pliocene the separation of different groups shaped the main lineages of *Parmelina*. Intra-specific diversification of most of the *Parmelina* species during late Miocene to Pliocene could be correlated with appearance of Mediterranean climate in Europe. At present *Parmelina* species are widespread in Mediterranean regions in Europe. Biogeographic analysis indicated Europe as the ancestral area of *Parmelina*, and North and Central Asia as the ancestral area of *Myelochroa*.

Keywords: Phylogeny, biogeography, *Parmelina*, divergence times, species tree.

3.2 Introducción.

Los primeros estudios filogenéticos en hongos trataron de establecer las relaciones de parentesco entre los grandes clados. Diversas investigaciones mostraron que los hongos liquenizados se agrupaban en distintos órdenes e incluso en diferentes clases de hongos (Eriksson & Winka 1997, Lumbsch 2000, Lutzoni *et al.* 2001, James *et al.* 2006, Miadlikowska *et al.* 2006, Hibbet *et al.* 2007, Schoch *et al.* 2009), por lo que se consideró la liquenización como un carácter polifilético. Posteriormente se han llevado a cabo otros estudios con el objetivo de determinar las relaciones de parentesco entre taxones de menor rango, como por ejemplo en el seno de distintas familias como Collemataceae (Otálora *et al.* 2011), Verrucariaceae (Prieto *et al.* 2012), o Graphidaceae (Rivas Plata & Lumbsch 2011).

Uno de los grupos de hongos liquenizados donde se han realizado más estudios de este tipo es la familia Parmeliaceae (Crespo & Cubero 1998, Mattsson & Wedin 1998, Thell *et al.* 2002, 2004, 2009; Blanco *et al.* 2005, 2006; Crespo *et al.* 1999, 2001, 2007, 2010b). Los

primeros objetivos que se abordaron fueron la delimitación de los géneros que pertenecen a la familia, el establecimiento de las relaciones de parentesco entre ellos, y la corroboración de si la caracterización de estos géneros se correspondía o no con la delimitación planteada mediante caracteres morfológicos y químicos. Diversos estudios realizados en la última década (Amo *et al.* 2010a, b, 2012; Blanco *et al.* 2004a, b; Crespo *et al.* 2004, 2007, 2010a, 2010b; Divakar *et al.* 2006, 2010a, b, 2012; Miadlikowska *et al.* 2011, Saag *et al.* 2011, Thell *et al.* 2006, Truong *et al.* 2011) han esclarecido en gran medida estos aspectos, principalmente en el grupo de los Parmelioides donde Crespo *et al.* (2010b) han obtenido una robusta filogenia del grupo.

Estos resultados han permitido abordar nuevos objetivos acerca de la historia evolutiva de esta familia y sus linajes, como por ejemplo determinar la edad de estos organismos o analizar la actual distribución de los linajes. Amo *et al.* (2011) realizaron una primera aproximación a la edad de los Parmelioides basada en datos fósiles y tasas de evolución de las regiones de ADN del micobionte, estimando el período en el cual se produjo la diversificación de los distintos linajes. Sus resultados indican que los clados principales de Parmelioides divergieron durante el Eoceno y el Oligoceno, mientras que la diversificación de los géneros ocurrió durante el Oligoceno tardío, el Mioceno y el Plioceno temprano. Este análisis fue contrastado con los diversos eventos geo-históricos que ocurrieron en el planeta, concluyendo que la dispersión transoceánica a larga distancia es el proceso más plausible que explicaría la actual distribución de los géneros del hemisferio sur. Sin embargo, no obtuvieron resultados concluyentes para los grupos holárticos, como *Parmelina*, señalando la necesidad de datos filogeográficos adicionales para poder contrastar hipótesis biogeográficas para estos grupos.

Algunos estudios en poblaciones de líquenes parmeliaceos con distribución holártica, como *Cavernularia hultenii* (Printzen & Ekman 2002) y dos especies de *Flavocetraria* (*F. cucullata* y *F. nivalis*; Geml *et al.* 2010), sugieren que la actual distribución de las especies, o sus poblaciones, se debe a eventos glaciares del Pleistoceno; sin embargo estudios recientes en otros géneros parmelioides como *Melanohalea* y *Montanelia* indicarían que dichos eventos no fueron propiamente delimitantes, ya que los procesos de especiación ocurrieron en épocas anteriores (Leavitt *et al.* 2012, Divakar *et al.* 2012). La adición de este tipo de estudios en líquenes con distribución en el hemisferio norte, como el género *Parmelina*, proporcionarán más luces sobre los patrones biogeográficos históricos de la familia Parmeliaceae y los líquenes en general.

Parmelina es un género compuesto por nueve especies, incluyendo las recientemente descritas *P. cryptotiliacea* (Núñez-Zapata *et al.* 2011) y *P. yalungana* (Nelson *et al.* 2012). Todas sus especies se distribuyen en el hemisferio norte, la mayoría se encuentra en Europa y solo dos de ellas en el occidente de Norte América, siendo escasos los registros en Asia (Park 1990, Kurokawa 2003, Divakar & Upreti 2005). En conjunto, se caracterizan principalmente por presentar un talo folioso con lóbulos sublineares de color gris, epicórtex porado, médula blanca, ácido lecanórico, y presencia de apotecios y/o isidios (Hale 1976b, Argüello *et al.* 2007, Clerc & Truong 2008, Crespo *et al.* 2010b). El grupo hermano más próximo es *Myelochroa* (Blanco *et al.* 2005, Crespo *et al.* 2010b), cuyas especies presentan cierta semejanza morfológica externa, pero que se diferencian por presentar médula amarilla, mayor diversidad de metabolitos secundarios (ac. secalónico, zeorina, ac. leucotílico, entre otros) y distribución principalmente asiática; otra curiosa diferencia entre ambos géneros es que éste último presenta soledios además de isidios como propágulos asexuales.

El género *Parmelina*, debido a su reducido número de especies, sus características morfológicas específicas (a excepción de *P. cryptotiliacea* y *P. yalungana*, que son crípticas), y patrones de distribución geográfica peculiares, constituye un grupo ideal para abordar el estudio global de sus procesos evolutivos, tiempos de diversificación y origen geográfico de los linajes. En este trabajo se aborda la delimitación de especies, filogenia, historia evolutiva y biogeografía; en particular, los objetivos específicos han sido: 1) determinar las relaciones filogenéticas que existen entre las especies del género *Parmelina* utilizando tres marcadores moleculares, 2) realizar una aproximación en el tiempo a los procesos de especiación y diferenciación de especies, y 3) inferir los procesos de colonización o dispersión de las especies que expliquen su distribución actual. En el estudio se incluyeron dos ejemplares de la recientemente descrita *Parmelina yalungana* (Nelson *et al.* 2012).

3.3 Material y métodos.

Material de estudio

El presente estudio se realizó utilizando secuencias de las regiones ITS, nuLSU, mtSSU, EFA y mtLSU del ADN del micobionte, procedentes de los estudios del grupo SYSTEMOL de la UCM y disponibles en el GenBank (Crespo *et al.* 2010a,b, Núñez-Zapata *et al.* 2011) así

como de nuevas ampliaciones de ejemplares del herbario MAF, realizadas para este trabajo. Los detalles de los ejemplares utilizados en los análisis genéticos del presente estudio así como sus países de procedencia se encuentran en la Tabla 18, las secuencias nuevas contienen el código de herbario MAF del individuo al que corresponde la secuencia.

Tabla 18. Localidad, y códigos de Genbank o Herbario (MAF) de los especímenes de *Parmelina* y *Myelochroa* incluidos en los análisis genéticos.

Especie	Origen	ITS	nuLSU	mtSSU	mtLSU	EFA
<i>P. atricha</i> 1	Francia	JX466473	MAF16634	MAF16634	JX466822	JX466115
<i>P. atricha</i> 2	España	JX466474	MAF17558	MAF17558	JX466823	JX466116
<i>P. atricha</i> 3	Francia	JX466475	MAF17559	MAF17559	JX466824	JX466117
<i>P. carporrhizans</i> 1	Turquía	JF756994	-	-	JF757006	JX466118
<i>P. carporrhizans</i> 1	España	-	DQ268547	DQ268567	JF757007	JX466119
<i>P. carporrhizans</i> 2	España	JF756995	DQ268548	DQ268568	JF757008	JX466120
<i>P. carporrhizans</i> 3	España	JF756996	-	-	-	-
<i>P. carporrhizans</i> 3	Portugal	-	DQ268550	DQ268570	-	-
<i>P. coleae</i> 1	EE.UU.	JF756966	DQ268553	DQ268573	JF757009	JX466121
<i>P. coleae</i> 2	EE.UU.	JF756967	DQ268554	DQ268574	JF757010	JX466122
<i>P. coleae</i> 3	EE.UU.	JF756968	GU942439	GU979828	JF757011	JX466123
<i>P. cryptotiliacea</i> 1	España	JF756971	MAF16455	MAF16455	JF757014	JX466125
<i>P. cryptotiliacea</i> 2	España	JX466477	MAF17562	MAF17562	JX466826	JX466126
<i>P. cryptotiliacea</i> 3	España	JX466476	MAF16454	MAF16461	JX466825	JX466124
<i>P. pastillifera</i> 1	Alemania	JX466412	-	-	JX466761	JX466051
<i>P. pastillifera</i> 1	España	-	AY607817	EU562697	-	-
<i>P. pastillifera</i> 2	Noruega	JX466457	-	-	JX466806	JX466099
<i>P. pastillifera</i> 2	España	-	DQ268558	DQ268578	-	-
<i>P. pastillifera</i> 3	España	JX466293	JN939629	AY611163	JX466642	JX465926
<i>P. quercina</i> 1	Turquía	JF757001	-	-	JF757023	JX466127
<i>P. quercina</i> 1	España	-	DQ268540	DQ268560	-	-
<i>P. quercina</i> 2	Turquía	JF757002	-	-	JF757024	JX466128
<i>P. quercina</i> 2	España	-	DQ268545	DQ268565	-	-
<i>P. quercina</i> 3	España	JX466478	DQ268546	DQ268566	JX466827	JX466129
<i>P. tiliacea</i> 1	España	JX466265	AY578950	AF351173	JX466614	JX465896
<i>P. tiliacea</i> 2	Italia	JX466320	-	-	JX466669	JX465955
<i>P. tiliacea</i> 2	España	-	DQ268559	DQ268579	-	-
<i>P. tiliacea</i> 3	España	JX466324	MAF16618	MAF16618	JX466673	JX465960
<i>P. tiliacea</i> 4	España	JF756978	MAF16484	MAF16484	JF757027	MAF16484
<i>P. yalungana</i> 1	EE.UU.	GU979823	GU942440	GU979826	-	-
<i>P. yalungana</i> 2	EE.UU.	GU979824	GU942441	GU979827	-	-
<i>M. aurulenta</i> 1	China	DQ279530	EF042917	EF025484	-	-
<i>M. crassata</i> 1	Japón	MAF17780	MAF17780	MAF17780	-	-

<i>M. crassata</i> 2	Japón	MAF17781	MAF17781	MAF17781	-	-
<i>M. aff. crassata</i>	Japón	MAF17779	MAF17779	MAF17779		
<i>M. entotheiochroa</i> 1		DQ394384	GU994612	GU994658	-	-
<i>M. galbina</i> 1		DQ279531	MAF17782	DQ287840	MAF10414	-
<i>M. hayachinensis</i>	Japón	MAF17784	MAF17784	MAF17784	-	-
<i>M. homogens</i> 1	Japón	MAF17787	MAF17787	MAF17787	-	-
<i>M. homogens</i> 2	Japón	MAF17788	MAF17788	MAF17788	-	-
<i>M. aff. irrugans</i>	Japón	MAF17786	MAF17786	MAF17786	-	-
<i>M. leucotiliza</i> 1	Japón	MAF17783	2460	MAF17783	-	-
<i>M. aff. metarevoluta</i>	China	AY611102	AY607814	AY611159	MAF10208	-
<i>M. metarevoluta</i>	Japón	MAF17785	MAF17785	MAF17785	-	-
<i>M. subaurulenta</i>	China	AY611103	AY607815	AY611160	-	-
<i>Melanelixia glabra</i>	España	AY581064	AY578927	AY582300	-	-
<i>Melanelixia subargentifera</i>	España	AY581065	AY578928	AY582301	-	-
<i>Melanelixia fuliginosa</i>	España	AY611084	AY607796	AY611141	-	-

Extracción y amplificación de regiones de ADN

Para la extracción, amplificación y alineamiento de secuencias se utilizaron los protocolos indicados en el apartado “METODOLOGÍAS COMUNES A LOS ESTUDIOS REALIZADOS”.

Arboles filogenéticos

El estudio filogenético se realizó utilizando la inferencia bayesiana (BB/MCMC) y la máxima verosimilitud (ML). Se llevaron a cabo dos análisis, en el primero se incluyeron ejemplares de *Parmelina* y *Myelochroa* para corroborar su relación como grupos hermanos, mientras que en el segundo análisis sólo se incluyeron especímenes de *Parmelina*. Para el primer análisis se construyó una matriz con las regiones ITS, nuLSU, y mtSSU utilizando 17 ejemplares de *Parmelina*, 14 ejemplares de *Myelochroa*, y 3 especies de *Melanelixia* (*M. fuliginosa*, *M. glabra* y *M. subargentifera*) que fueron utilizados como grupo externo. Para el segundo análisis se utilizó una matriz con las regiones ITS, mtLSU y EFA, que demostraron establecer mejor las relaciones filogenéticas entre las especies de *Parmelina* (Cap. II), incluyendo solo las especies de *Parmelina* (a excepción de *P.*

yalungana de la cual no se disponían secuencias de las regiones mtLSU y EFA), más dos especies de *Myelochroa* (*M. metarevoluta* y *M. galbina*) que fueron utilizadas como grupo externo.

Los análisis ML de las matrices combinadas de tres loci (ITS+nuLSU+mtSSU e ITS+mtLSU+EFA) se realizaron a través de una versión en línea del programa RaxML v7.0.4 (<http://phylobench.vital-it.ch/raxml-bb/>; Stamatakis 2006, Stamatakis *et al.* 2008). Se utilizó el modelo GTRGAMMA, que incluye un parámetro (Γ) para la tasa de heterogeneidad entre los sitios, y se optó por no incluir un parámetro para estimar la proporción de sitios invariables (Stamatakis 2006, Stamatakis *et al.* 2008.). Todos los loci fueron tratados como particiones separadas. El apoyo en cada nodo se evaluó usando 1000 seudoréplicas de *bootstrap*, considerándose valores ≥ 70 estadísticamente significativos.

El análisis bayesiano (B/MCMC) fue realizado, para ambas matrices, con el programa MrBayes 3.1.1 (Huelsenbeck & Ronquist 2001). Las matrices se particionaron por genes, utilizando para cada gen el modelo de sustitución nucleotídica (Nylander *et al.* 2004) de mejor ajuste, estimado por el programa JModelTest (Posada 2008). No se asumió ningún reloj molecular. Las probabilidades posteriores se aproximaron, utilizando una variante del método de muestreo de la cadena de Markov Monte Carlo (MCMC). Se llevaron a cabo dos análisis independientes de 5 millones de generaciones, y con muestreo de un árbol cada 1000 generaciones, empezando con la elección de un árbol al azar y utilizando ocho cadenas simultáneas. Los resultados de las probabilidades logarítmicas de los puntos de muestreo fueron trazados en función del número de generaciones utilizando el programa TRACER 1.5 (Rambaut & Drummond 2009) para asegurar que los valores de probabilidad registrados alcanzaron un valor de equilibrio estable (Huelsenbeck & Ronquist 2001). Los primeros 1000 árboles fueron descartados en cada análisis y un árbol consenso se construyó a partir de los 8000 árboles restantes, utilizando la opción *sumt* de MrBayes. Se obtuvieron las probabilidades posteriores para cada rama del árbol, y solo las ramas con probabilidades posteriores ≥ 0.95 fueron consideradas estadísticamente significativas. Los árboles se visualizaron con el programa Figtree v.1.3.1 (Rambaut 2009) utilizando las especies de *Melanelixia* o *Myelochroa*, según correspondiera, como grupo externo.

Datación

La estimación de la edad de divergencia de *Parmelina* y de diversificación de sus linajes y especies se realizó en dos etapas.

En primer lugar, se estimó la edad de divergencia de *Parmelina* y *Myelochroa* y el comienzo de la diversificación de ambos géneros a partir de una matriz particionada de los genes ITS, nuLSU y mtSSU con 19 ejemplares de *Parmelina*, 14 ejemplares de *Myelochroa* y 89 especies diferentes de Parmelioides pertenecientes a 19 géneros. Las secuencias de los tres genes de los otros Parmelioides fueron obtenidas de trabajos previos publicados por el grupo Systemol de la UCM (Crespo *et al.* 2010a, b) y las de *Parmelina* y *Myelochroa* se obtuvieron en el presente estudio (Tabla 18). Dos especies del género *Usnea* (*U. antarctica* y *U. trachycarpa*) fueron utilizadas como grupo externo.

Se construyó un árbol inicial utilizando el programa Garli 0.96 (Zwickl 2006) y siguiendo el método de máxima verosimilitud (ML), que fue convertido en ultramétrico utilizando la opción *nonparametric rate smoothing* (NPRS) con el programa TreeEdit v. 10a10 (Rambaut 2007), fijando el nodo de divergencia de los parmelioides en 60.28 millones de años (Amo de Paz *et al.* 2011).

Para el análisis de datación se empleó el programa BEAST v.1.7.4 (Drummond *et al.* 2012), partiendo del árbol inicial ultramétrico, con modelos de sustitución (GTR+I+G) independientes para cada loci, un modelo de reloj flexible (*uncorrelated lognormal*) para cada partición y el modelo *Yule* (*Yule tree*) de ramificación.

El nodo raíz, correspondiente al nodo de diversificación de los parmelioides, fue calibrado con una distribución uniforme (*prior*) entre 49.81 y 73.55 Ma. (Amo *et al.* 2011), mientras que al nodo interno de diversificación de *Parmelia* se le asignó la edad de un fósil de ámbar dominicano (*Parmelia ambra*, 15–45 Ma, Poinar *et al.* 2000), con una distribución *lognormal* para forzar que al menos la edad mínima del fósil se mantuviera dentro de los límites de distribución (Magallón 2010).

Se llevaron a cabo dos análisis MCMCs independientes de 10 millones de generaciones, y con muestreo de un árbol cada 1000 generaciones. Con el programa TRACER v1.5 (Rambaut & Drummond 2009) se evaluó cada análisis, y se descartaron los primeros 1000 árboles de cada uno (*burn-in*). Los 18000 árboles restantes se combinaron con los programas LogCombiner v1.6.2 y TreeAnnotator v1.6.2 (Drummond & Rambaut 2007) para obtener un árbol de máxima credibilidad con las probabilidades posteriores, la edad

media de los nodos de divergencia y el rango que agrupa el 95% de la densidad *a posteriori* (HPD, *highest posterior density*).

Dado que el análisis filogenético global basado en las regiones ITS, nuLSU y mtSSU apoyó la monofilia de *Parmelina* como género, pero no resolvió con apoyo estadístico las relaciones entre los linajes internos, se realizó un segundo análisis para estimar la edad de los nodos internos del clado *Parmelina*. Para ello, se utilizó la matriz particionada de las regiones ITS, mtLSU y EFA de las especies de *Parmelina* y su árbol consenso que mostraba todas las ramas con probabilidades posteriores superiores al 95%. Este árbol se calibró utilizando la tasa de sustitución de la región ITS (3.10×10^{-9} sustituciones x sitio⁻¹ x año⁻¹) estimada a partir del análisis anterior. La utilización de tasas de sustitución de regiones de DNA ha demostrado ser un método congruente en la estimación de edades, y es sugerido en aquellos casos donde no se cuenta con registros fósiles (Baldwin & Sanderson 1998, Takamatsu & Matsuda 2004, Divakar *et al.* 2012, Leavitt *et al.* 2012).

El análisis se realizó con el programa BEAST v1.7.4, seleccionando modelos de sustitución (GTR+I+G) independientes para cada loci, un modelo de reloj flexible (*uncorrelated lognormal*) para cada partición, y el modelo *Yule* (*Yule tree*) de ramificación. Se llevaron a cabo también dos análisis MCMCs independientes de 10 millones de generaciones siguiendo los mismos pasos descritos en el análisis anterior. Se estimaron la edad media de cada nodo, el 95% HPD y las tasas de sustitución para cada gen con sus respectivos intervalos (95% HPD).

Los resultados obtenidos se contrastaron con los de otros dos análisis análogos pero utilizando la tasa de sustitución de la región ITS del género *Melanelixia* (2.43×10^{-9} sustituciones x sitio⁻¹ x año⁻¹) estimada por Leavitt *et al.* (2012) y la de los hongos del orden Erysiphales (2.52×10^{-9} sustituciones x sitio⁻¹ x año⁻¹) estimada por Takamatsu & Matsuda (2004).

Reconstrucción del Área Ancestral

El área ancestral de los clados *Parmelina* y *Myelochroa* fue inferida a partir de árboles filogenéticos y de la actual distribución de sus especies. Los árboles fueron elaborados partiendo de una matriz que contenía las regiones ITS, nuLSU y mtSSU, considerando sólo un ejemplar por especie. Basados en la distribución de las especies de *Parmelina* y *Myelochroa* en el hemisferio norte se delimitaron 5 áreas biogeográficas: Norte y Centro

América (A), Europa y Norte de África (B), India (C), Norte y Centro de Asia (D), y Sureste Asiático (E). Se utilizaron tres métodos para reconstruir el área ancestral: el de la inferencia biogeográfica desarrollado por Ronquist (1997), el de la inferencia de verosimilitud desarrollado por Ree y colaboradores (Ree *et al.* 2005, Ree & Smith 2008), y el de la inferencia bayesiana desarrollado por Huelsenbeck & Bollback (2001).

Para la inferencia biogeográfica se utilizó el análisis S-DIVA implementado en el programa RASP (*Reconstruct Ancestral State in Phylogenies*, Yu *et al.* 2010). El análisis S-DIVA (*Statistical dispersal-vicariance analysis*) complementa el análisis de Dispersión-Vicarianza (DIVA), desarrollado por Ronquist (1996, 1997) el cual optimiza las distribuciones de cada nodo admitiendo supuestos de vicarianza y minimizando los supuestos de dispersión y extinción, con los métodos de Nylander *et al.* (2008) y Harris & Xiang (2009) para determinar el soporte estadístico en la reconstrucción del área ancestral (Li *et al.* 2010, Yu *et al.* 2010, Givnish *et al.* 2011). Este análisis se realizó a partir de 5001 árboles estimados previamente con el programa MrBayes y posteriormente condensados por el programa RASP. Se asignaron las áreas de distribución a cada uno de los taxones asumiendo que el rango de las áreas ancestrales no fue mayor que la de los descendientes actuales (Sanmartín 2003), el número máximo de áreas ancestrales fue restringido a 4, utilizando el resto de parámetros por defecto. Este programa también infirió los eventos de dispersión, vicarianza y extinción para cada nodo.

La inferencia de verosimilitud utiliza el modelo de Dispersión-Extinción-Cladogénesis (DEC) que especifica las tasas instantáneas de transición entre estados discretos (rangos) a lo largo de las ramas filogenéticas y los aplica a la estimación de probabilidades de los estados ancestrales (rango de escenarios heredados) en eventos de cladogénesis (Ree & Smith 2008). Para este análisis se construyó un árbol inicial según el método de máxima verosimilitud (ML) utilizando el programa Garli 0.96 (Zwickl 2006); éste árbol fue convertido en ultramétrico con el programa TreeEdit v. 10a10 (Rambaut 2007), e importado en el programa LaGrange 2.0 (Ree & Smith 2008) utilizando el módulo de configuración LaGrange (<http://www.reelab.net/lagrange/configurator/index>). Las áreas de distribución se delimitaron considerando la presencia/ausencia de los taxones en cada una de las cinco regiones delimitadas anteriormente.

Finalmente, la inferencia bayesiana fue realizada con el programa SIMMAP v1.5 (Bollback 2006), el cual utiliza una aproximación indirecta que integra la combinación de la incertidumbre de los árboles, de las longitudes de las ramas y de los modelos de

sustitución utilizando la cadena de Markov Monte Carlo, y con ello intenta reconstruir el estado ancestral de un carácter (Huelsenbeck & Bollback 2001), en nuestro caso la distribución geográfica. Para este análisis, se utilizó la opción ASR (*Ancestral State Reconstruction*) sobre una matriz de distribución, siguiendo la delimitación de las 5 regiones; a cada una se les asignó un carácter binario discreto de presencia/ausencia (0/1) con la misma probabilidad, y una submuestra de los últimos 1000 árboles derivados del análisis bayesiano de las especies de *Parmelina* y *Myelochroa*.

3.4 Resultados

Se obtuvieron 47 nuevas secuencias de ADN de especies de *Parmelina* y *Myelochroa*: 9 de la región ITS de *Myelochroa*, 8 de nuLSU de *Parmelina* y 10 de *Myelochroa*, 8 de mtLSU de *Parmelina* y 9 de *Myelochroa*, 2 de mtLSU de *Myelochroa* y 1 de EFA de *Parmelina*. Las regiones ITS y EFA presentaron mayor número de sitios polimórficos y parsimónico informativos, así como una mayor diversidad nucleotídica, en comparación con las regiones nuLSU, mtLSU y mtSSU (Tabla 19).

Tabla 19. Variabilidad genética de los loci utilizados en el análisis filogenético de las especies de *Parmelina*. Número de especímenes (N), longitud de secuencias (L), número de sitios polimórficos (S), número mutaciones (Eta), Sitios parsimonio informativos (PI), diversidad nucleotídica (π) y el modelo de sustitución nucleotídica según el programa JModel Test.

	N	L	S	Eta	PI	π	Modelo
ITS	21	448	49	57	46	0.04817	K80 +G
nuLSU	21	847	32	34	26	0.01136	GTR+I+G
mtSSU	21	832	20	21	19	0.01171	GTR+I+G
mtLSU	21	686	20	21	19	0.01470	F81
EFA	21	535	67	72	62	0.04945	Trnef+G

El árbol consenso de las regiones ITS, nuLSU y mtSSU (Fig 18) apoyó la separación de *Parmelina* y *Myelochroa* como dos géneros monofiléticos. Todas las especies de *Parmelina* formaron clados monofiléticos, excepto *P. atricha* que no tuvo soporte estadístico. Con los marcadores utilizados no se resolvieron las relaciones de parentesco entre todas las especies de *Parmelina*, sin embargo, sí se observó la relación entre *P. tiliacea* y *P. pastillifera*, *P. carporrhizans* y *P. atricha*, así como entre *P. quercina*, *P. yalungana* y *P. cryptotiliacea*. En *Myelochroa*, las ramas internas mostraron probabilidades $\geq 95\%$, mientras que las externas mostraron la proximidad entre algunas especies, como es el caso de *M. leucotiliza*, *M. homogens*, *M. aff. irrugans* y *M. aurulenta*, entre *M. galbina* y *M. aff. metarevoluta*, y entre *M. metarevoluta* y *M. hayachinensis*.

El análisis ML de la matriz particionada de las regiones ITS, mtLSU y EFA dio un valor de verosimilitud $\ln L = -4174.315832$. Los parámetros de verosimilitud del análisis B/MCMC mostraron los siguientes valores promedio de las tres particiones [\pm desviación estándar (DE)]: verosimilitud ($\ln L$) = -4398.542 (0.1835), frecuencias de base $\pi(A) = 0.215$ (2.5994E-4), $\pi(C) = 0.281$ (2.7971E-4), $\pi(G) = 0.246$ (2.706E-4), $\pi(T) = 0.258$ (2.7067E-4); tasa de matrices $r(AC) = 0.108$ (4.9262E-4), $r(AG) = 0.232$ (7.1782E-4), $r(AT) = 0.068$ (4.1696E-4), $r(CG) = 0.063$ (4.3553E-4), $r(CT) = 0.376$ (8.3225E-4), $r(GT) = 0.153$ (6.1229); y el parámetro de forma $\gamma = 0.138$ (1.2816E-3).

El segundo árbol (Fig. 19) mostró también que las especies del género *Parmelina* forman un clado monofilético; *P. carporrhizans*, *P. coleae*, *P. pastillifera*, *P. cryptotiliacea* y *P. quercina* formaron a su vez clados monofiléticos, mientras que *P. atricha* y *P. tiliacea* se mostraron como especies parafiléticas. Las relaciones entre especies fueron congruentes con las de la Fig. 18, y mejor resueltas, con valores $\geq 95\%$ que apoyaron la separación de los clados internos y permitieron establecer las relaciones filogenéticas entre todas las especies. Dos grandes grupos se apreciaron en el árbol consenso de *Parmelina*, el primer grupo conformado por las especies *P. quercina* y *P. cryptotiliacea* (+*P. yalungana*), mientras que el segundo grupo lo conformaron las otras cinco especies; en este segundo grupo, *P. carporrhizans* y *P. atricha* formaron un clado que se separa de las otras tres especies; finalmente, *P. tiliacea* y *P. pastillifera* forman un clado monofilético con *P. coleae* como linaje hermano.

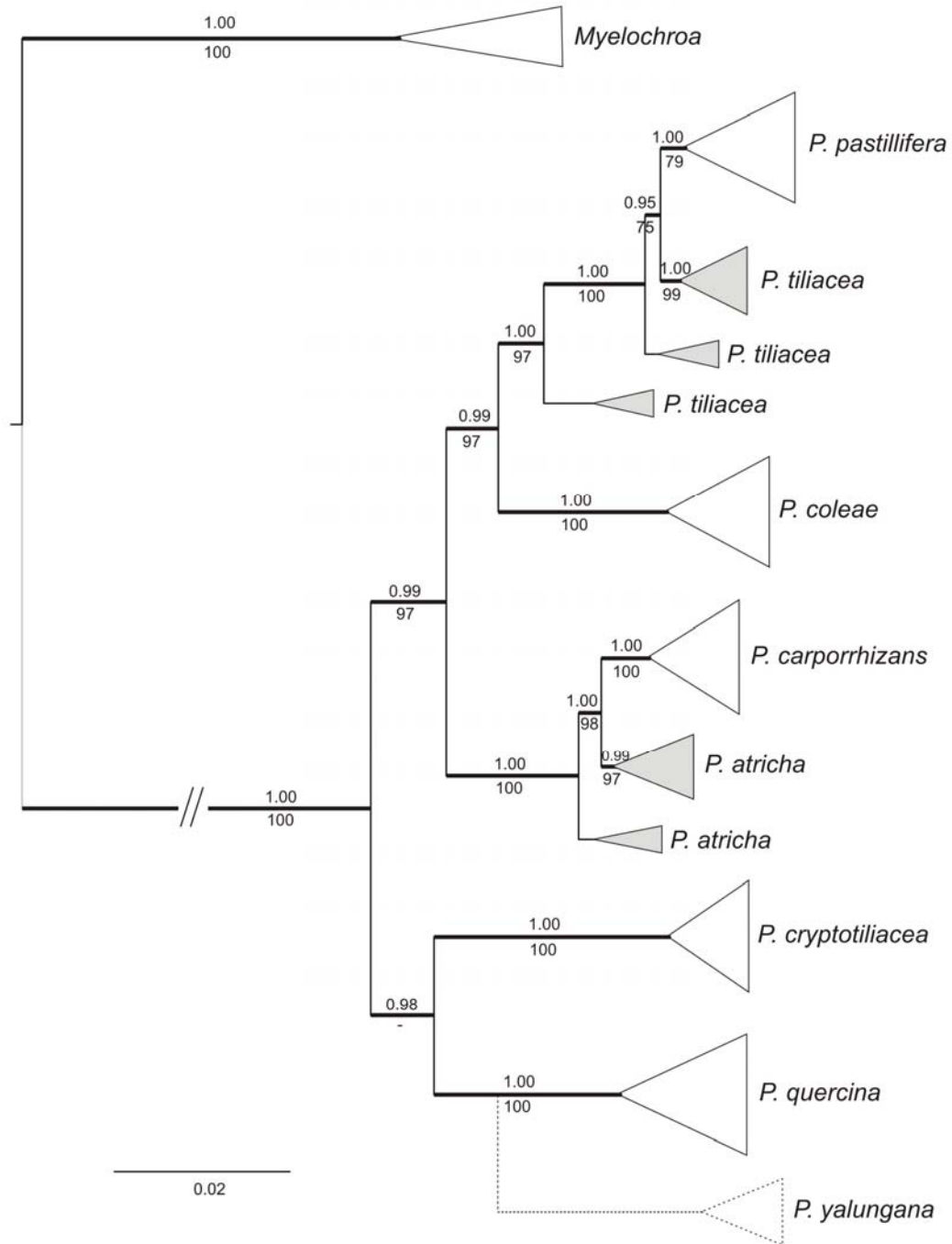


Fig. 19. Árbol filogenético de las especies de *Parmelina* estimado a partir de una matriz particionada de las regiones ITS, mtLSU y EFA, siguiendo el método B/MCMC y ML. Las probabilidades posteriores ≥ 0.95 se indican sobre las ramas y los valores de bootstrap ≥ 70 por debajo. Las ramas con apoyo estadístico en cualquiera de los dos análisis (B/MCMC y ML) aparecen resaltadas. Los triángulos en gris hacen referencia a las especies parafiléticas. Se hipotetizó la posición de *P. yalungana* basado en el análisis de la Fig. 18.

Datación

La edad de diversificación de los Parmelioides se estimó en 58.4 Ma (Fig. 20), correspondiendo al Paleoceno (primera época geológica del Paleógeno). *Parmelina* se separó de *Myelochroa* durante el Oligoceno, hace aproximadamente 28.5 Ma. La primera diversificación de *Parmelina* ocurrió en el Mioceno temprano hace aproximadamente 16.7 Ma, mientras que en *Myelochroa* la diversificación empezó poco antes, aunque también durante el Mioceno temprano, hace aproximadamente 20.7 Ma (Tabla 20). Los eventos de diversificación tanto en *Parmelina* como en *Myelochroa* se iniciaron durante el Mioceno y se prolongaron hasta el Plioceno y Pleistoceno. La estimación de las edades de diversificación de los linajes internos se realizó en un segundo análisis.

Tabla 20. Edad media y rango de los puntos de divergencia estimados para el género *Parmelina* y *Myelochroa* a partir de una matriz particionada (ITS, LSU y mtSSU) usando dos puntos de calibración. Heigh 95% HPD (*Highest probability density interval*) = rango donde se encuentra el 95% de probabilidades posteriores.

Nodo MRCA	Edad (Ma)	Heigh 95% HPD	Época
Parmelioides	59.09	49.81 – 71.48	Paleoceno
<i>Parmelina-Myelochroa</i>	28.52	19.35 – 38.53	Oligoceno
<i>Parmelina</i>	16.69	10.22 - 24.19	Mioceno
<i>Myelochroa</i>	22.04	14.97 – 30.20	Mioceno

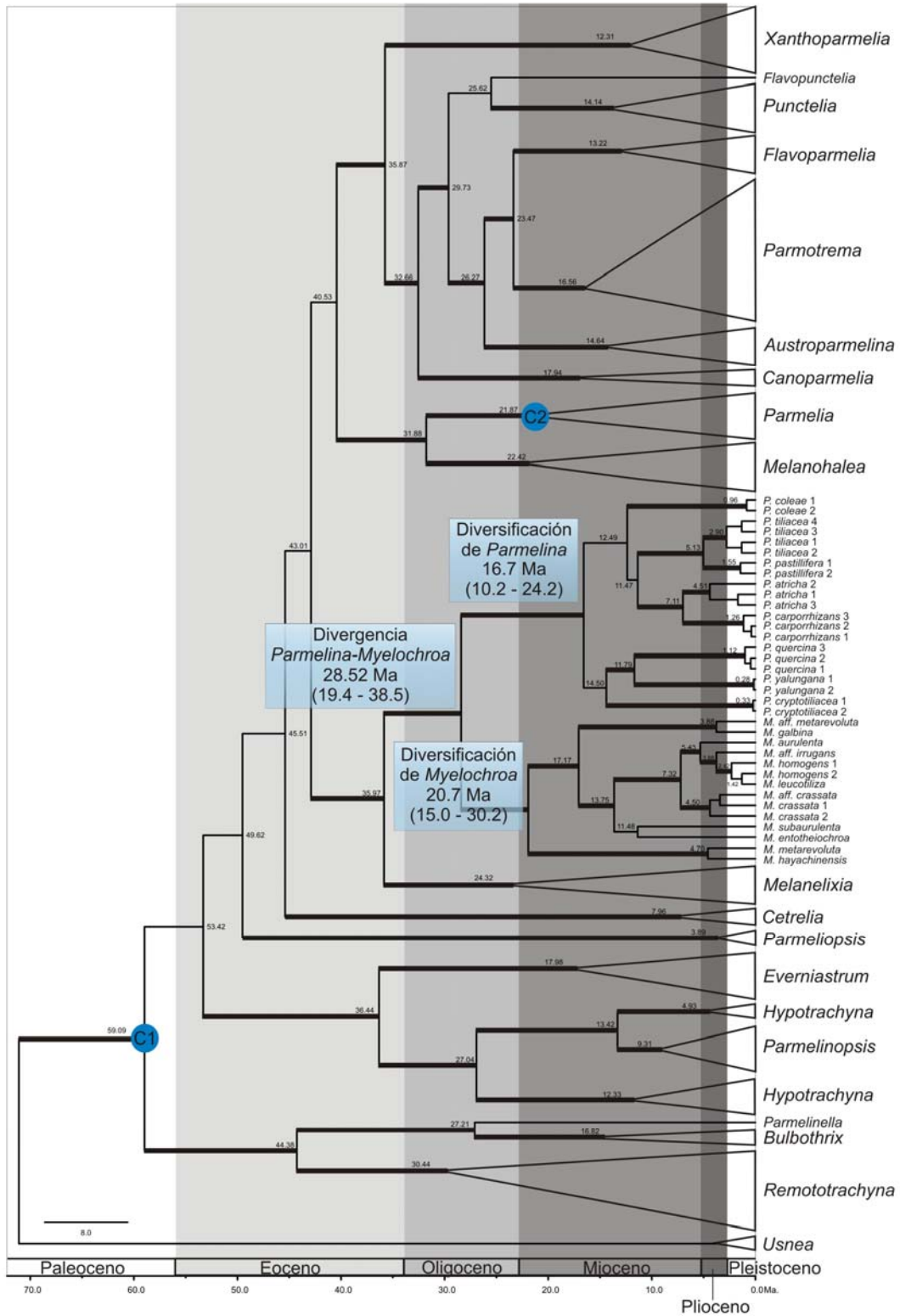


Fig. 20. Estimación de las edades de separación de parmelioides, especialmente de la separación de los géneros *Parmelina* y *Myelochroa* a partir de una matriz particionada (ITS, nuLSU y mtSSU). El cronograma se estimó con dos puntos de calibración (C1: Parmelioides y C2: *Parmelia* s.s.) basados en Amo *et al.* (2011). La edad promedio se muestra por encima de los nodos. Las ramas en negrita presentan una probabilidad posterior $\geq 95\%$.

Las edades del nodo de divergencia de *Parmelina* obtenidas con la matriz particionada de las regiones ITS, mtLSU y EFA, y las tasas de sustitución del ITS de *Parmelina*, *Melanelixia* y de los Erysiphales, mostraron valores muy próximos al valor estimado en el análisis anterior (Fig. 21 y Tabla 21), lo que corroboró la validez del procedimiento.

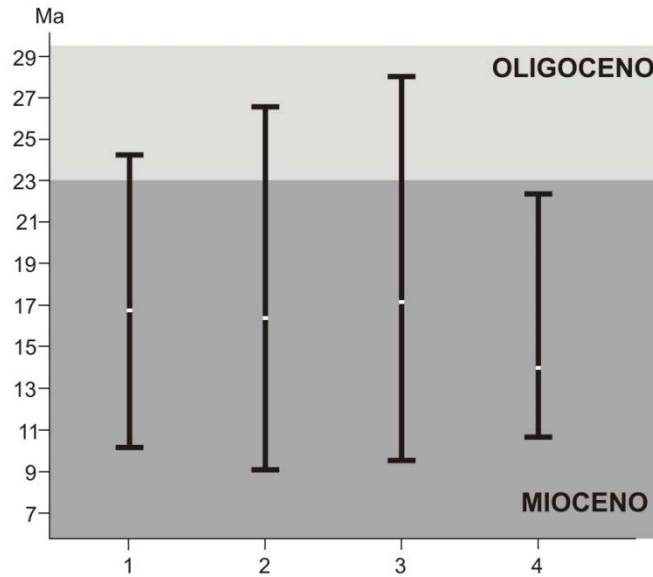


Fig. 21. Comparación de los rangos y edades estimados para el clado *Parmelina*. (1): utilizando las regiones ITS, nuLSU y mtSSU y dos puntos de calibración; [2 a 4]: regiones ITS, mtLSU y EFA y tasas de sustitución de ITS de los Erysiphales (2), *Melanelixia* (3) y *Parmelina* (4).

Tabla 21. Edades estimadas (Ma) y tasas de sustitución (sustituciones x sitio⁻¹ x año⁻¹ x 10⁻⁹) de los nodos de divergencia en el clado *Parmelina*, obtenidos con los análisis BEAST particionado de las regiones ITS, mtLSU y EFA usando la tasa de sustitución del ITS como punto de calibración. 95% HPD (highest probability density interval) = rango que agrupa el 95% de probabilidades.

Nodo MRCA	Edad Ma	Heigh 95% HPD	tasa ITS	tasa ITS 95% HPD	tasa mtLSU	tasa mtLSU 95% HPD	tasa EFA	tasa EFA 95% HPD
<i>ITS Erisiphales</i>								
Nodo A	16.35	9.04 – 26.55	3.03	0.04 – 8.58	2.36	0.00 – 8.68	2.53	0.24 – 4.99
Nodo B	13.23	5.98 – 21.73	1.66	0.04 – 3.95	1.32	0.00 – 3.76	2.70	0.41 – 5.37
Nodo C	11.18	6.29 – 18.58	2.02	0.34 – 4.49	0.97	0.01 – 2.52	2.83	0.53 – 5.68
Nodo D	7.95	4.18 – 12.71	1.59	0.02 – 3.53	0.39	0.00 – 1.12	3.18	0.89 – 6.69
Nodo E	5.50	2.65 – 9.64	5.26	0.78 – 12.65	0.49	0.00 – 1.46	2.06	0.36 – 3.72
Nodo F	2.43	1.13 – 4.38	1.42	0.25 – 2.75	0.65	0.08 – 1.44	3.1	1.25 – 5.83
<i>ITS Melanelixia</i>								
Nodo A	17.13	9.48 – 28.06	2.91	0.04 – 8.15	2.66	0.00 – 11.02	2.41	0.30 – 4.66
Nodo B	13.91	6.52 – 23.78	1.57	0.01 – 3.79	1.20	0.00 – 3.59	2.55	0.48 – 5.18
Nodo C	11.42	6.51 – 19.27	1.97	0.20 – 4.23	0.96	0.00 – 2.46	2.71	0.58 – 5.36
Nodo D	8.02	4.39 – 13.20	1.56	0.04 – 3.40	0.33	0.00 – 1.02	3.02	0.89 – 6.49
Nodo E	5.61	2.73 – 9.85	5.02	0.74 – 12.16	0.43	0.00 – 1.39	2.00	0.33 – 3.62
Nodo F	2.55	1.18 – 4.67	1.39	0.26 – 2.74	0.59	0.07 – 1.34	3.00	1.14 – 5.68
<i>ITS Parmelina</i>								
Nodo A	13.91	7.68 – 22.33	3.72	0.03 – 10.27	3.26	0.00 – 12.74	3.00	0.32 – 5.83
Nodo B	11.34	5.54 – 19.03	2.06	0.04 – 4.91	1.51	0.00 – 4.53	3.17	0.61 – 6.31
Nodo C	9.24	5.15 – 15.17	2.50	0.24 – 5.32	1.22	0.01 – 3.14	3.45	0.68 – 7.23
Nodo D	6.51	3.58 – 10.75	1.99	0.07 – 4.37	0.41	0.00 – 1.32	3.76	0.87 – 7.86
Nodo E	4.54	2.12 – 7.94	6.09	0.84 – 14.83	0.54	0.00 – 1.71	2.48	0.47 – 4.65
Nodo F	2.05	0.92 – 3.65	1.74	0.38 – 3.48	0.74	0.08 – 1.70	3.75	1.33 – 6.93

Este segundo análisis (Fig. 22) mostró que las primeras diversificaciones en *Parmelina* tuvieron lugar durante el Mioceno, la primera diversificación de linajes (nodo A) ocurrió en el Mioceno Medio hace aproximadamente 13.91 Ma, la separación de *P. cryptotiliacea* de *P. quercina* (y posiblemente también *P. yalungana* - nodo B) aconteció un poco después, hace aproximadamente 11.34 Ma, en el Mioceno Tardío sucedió la separación del clado *P. atricha*-*P. carporrhizans* (nodo C, 9.24 Ma) así como la separación de *P. coleae* de las especies isidiadas (6.51 Ma). La diferenciación de *P. tiliacea* también empezó a finales del Mioceno, y la separación de *P. pastillifera* acaeció durante el Pleistoceno, hace aproximadamente 1.29 Ma. En esta misma época empezó la diversificación de *P. atricha* (2.05 Ma) con la posterior diferenciación y separación de *P. carporrhizans*, hace aproximadamente 1.41 Ma.

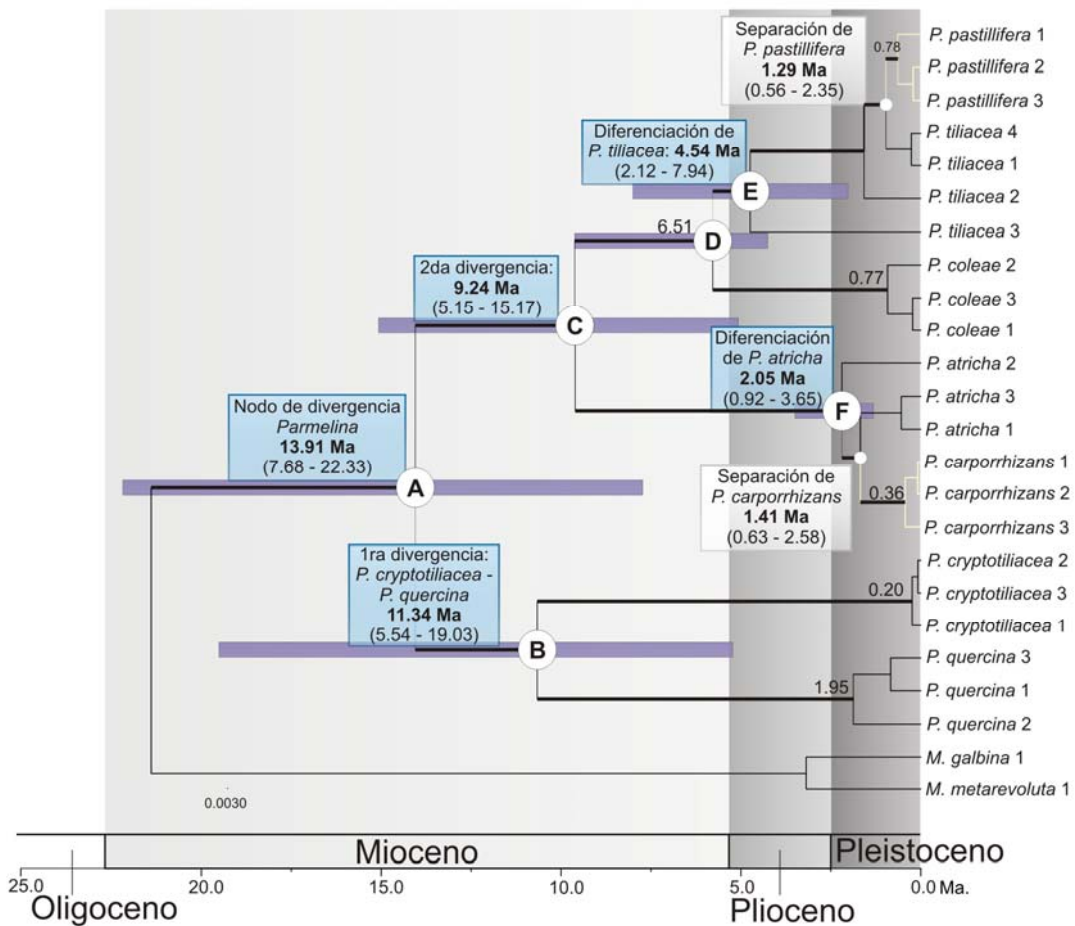


Fig. 22. Cronograma de *Parmelina* obtenido con el análisis BEAST particionado de las regiones ITS, mtLSU y EFA, usando la tasa de sustitución del ITS de *Parmelina*.

Áreas geográficas ancestrales

La reconstrucción obtenida con S-DIVA (Fig. 23) mostró que el área ancestral del clado *Parmelina-Myelochroa* (nodo 16) fue el continente eurasiático, separándose por vicarianza el clado *Parmelina* (nodo 7) en Europa y el clado *Myelochroa* (nodo 15) en el norte y centro de Asia. En *Parmelina* se detectaron tres eventos de dispersión posteriores, hacia Norte y Centro América (nodo 4), hacia el Norte y Centro de Asia (nodo 6) y hacia la India (nodo 1), y dos eventos de vicarianza, uno de los cuales separó a *P. coleae* del ancestro del clado *P. tiliacea – P. pastillifera* (nodo 2) y el otro separó a *P. quercina* de *P. yalungana* (nodo 5). En *Myelochroa* solo se detectaron cuatro eventos posteriores de dispersión desde el Norte y Centro de Asia hacia Norte y Centro América (nodo 13 y 14), Europa (nodo 11 y 14) y Sudeste Asiático (nodo 8 y 11). Los resultados obtenidos para *Myelochroa* son preliminares, debido a lo limitado de la muestra en cuanto a número de especies analizadas.

Los resultados del análisis de Lagrange también mostraron que Europa presenta la mayor probabilidad de ser el área ancestral de *Parmelina* (nodo 7), y para *Myelochroa* (nodo 15) indican el Norte y Centro de Asia, pero con un bajo apoyo. Las probabilidades en los nodos de *Parmelina* son similares a las presentadas por S-DIVA, excepto en los nodos 2 y 5 donde Lagrange seleccionó Europa (B) como el área ancestral más probable para estos nodos.

El análisis de SIMMAP da mayores posibilidades a Europa (0.76) como área ancestral del clado *Parmelina-Myelochroa* (nodo 16, Tabla 22), aunque no descarta las otras áreas (excepto SE Asiático que presenta una probabilidad marginal de 0.02). Europa presentó un 0.94 de probabilidad marginal de ser el área ancestral del clado *Parmelina* (nodo 7), mientras que para el clado *Myelochroa* (nodo 15) el área ancestral más probable fue el norte y centro de Asia (0.86), aunque no se pudo descartar Europa (probabilidad marginal 0.49) ni el N y C de América (probabilidad marginal 0.35). A diferencia de los otros dos análisis, SIMMAP no establece áreas ancestrales conjuntas, sino que otorga un valor probabilístico a cada una de las áreas consideradas.

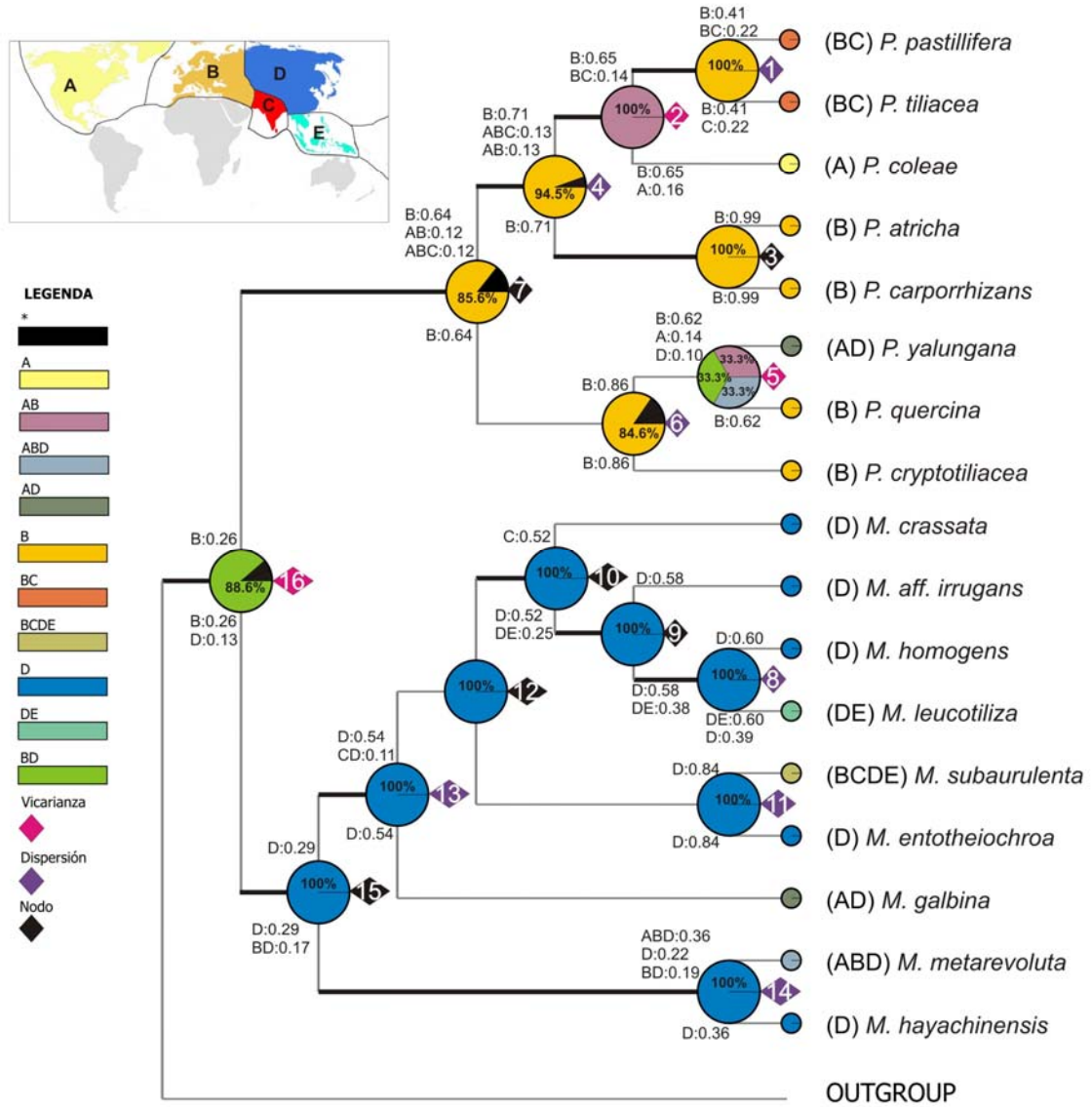


Fig. 23. Áreas ancestrales de *Parmelina* y *Myelochroa*. Estimado a partir de 5001 árboles filogenéticos generados a partir de una matriz combinada de las regiones ITS, nuLSU y mtSSU. En cada nodo se representa la probabilidad del área de acuerdo a la leyenda de colores, según el programa S-DIVA. Las ramas en negrita presentan una probabilidad posterior $\geq 95\%$ según S-DIVA (*=otras áreas con probabilidad $\leq 10\%$). Los valores fuera de las circunferencias son las probabilidades de los rangos heredados por cada rama descendiente según Lagrange.

Tabla 22. Probabilidad del área ancestral de los clados internos del árbol *Parmelina/Myelochroa* (Fig. 23), según el programa SIMMAP. Las probabilidades ≥ 0.70 aparecen resaltadas.

Nodo	N y C Amer.	Eur y N Afr.	India	N. y C. Asia	SE. Asia	
1	0.01	0.99	0.99	0.00	0.00	P a r m e l i n a
2	0.06	0.94	0.78	0.00	0.00	
3	0.02	0.98	0.05	0.01	0.01	
4	0.02	0.98	0.33	0.00	0.00	
5	0.32	0.68	0.07	0.32	0.07	
6	0.09	0.91	0.08	0.05	0.01	
7	0.06	0.94	0.13	0.03	0.00	
8	0.00	0.00	0.00	1.00	0.76	M y e l c h r o a
9	0.00	0.00	0.01	0.99	0.33	
10	0.02	0.02	0.26	0.80	0.22	
11	0.10	0.30	0.39	0.92	0.39	
13	0.24	0.12	0.17	0.94	0.20	
14	0.63	0.60	0.02	0.99	0.03	
15	0.35	0.49	0.00	0.86	0.05	
16	0.27	0.76	0.20	0.31	0.02	

3.5 Discusión

Relaciones filogenéticas

El género *Parmelina* es un clado monofilético, grupo hermano del género *Myelochroa*, y que está conformado actualmente por nueve especies, aunque en el presente estudio solo se han incluido ocho al no disponerse de ejemplares de *P. gyrophorica*. Trabajos anteriores han mostrado que *Myelochroa* es el grupo hermano de *Parmelina*, lo que está apoyado no solo por los caracteres moleculares sino también por las semejanzas morfológicas que presentan ambos géneros (Blanco *et al.* 2006, Crespo *et al.* 2007, Crespo *et al.* 2010b), hasta el punto que anteriormente habían sido consideradas pertenecientes al mismo género (Hale 1976b). La principal diferencia entre ambos géneros está basada en caracteres químicos, con distintos compuestos presentes en uno y otro género, que se reflejan a simple vista por la diferente coloración de la médula.

Myelochroa presenta ácido secalónico y tripterpenos, y la médula aparece casi siempre amarillenta. Al contrario, *Parmelina* presenta una médula blanca y ácido lecanórico (Elix & Hale 1987).

Nuestra investigación respalda que todas las especies estudiadas y consideradas fenotípicamente como *Parmelina* forman un clado monofilético. Estudios previos ya indicaban la monofilia del género pero solo se habían incluido en dichas filogenias dos o tres especies (Blanco *et al.* 2006, Argüello *et al.* 2007, Crespo *et al.* 2007, 2010a, b, Divakar *et al.* 2010a). El árbol filogenético presentado en la Fig. 19 muestra todas las ramas con probabilidades posteriores superiores al 95%, aclarando las relaciones filogenéticas entre todas las especies estudiadas. La adición hipotética de *P. yalungana* como especie hermana de *P. quercina* se basa en los análisis de los marcadores ITS, nuLSU y mtSSU (Fig. 18).

Tres clados destacan del árbol filogenético de *Parmelina*, el primero formado por *P. coleae*, *P. tiliacea* y *P. pastillifera*, el segundo por *P. carporrhizans* y *P. atricha*, y el tercero formado por *P. quercina*, *P. yalungana* y *P. cryptotiliacea*.

Parmelina tiliacea y *P. pastillifera* habían sido previamente consideradas como linajes hermanos (Blanco *et al.* 2006, Argüello *et al.* 2007). Sin embargo nuestros resultados indican que *P. tiliacea* no es una especie monofilética, sino por el contrario se muestra como una especie parafilética, siendo *P. pastillifera* un linaje derivado que presenta una importante y neta diferencia morfológica (forma del isidio) y también diferencias ecológicas (Dobson & Hawksworth 1976, Hale 1976b, Capítulo 2 de esta tesis). La especie más cercana a este clado es *P. coleae*, geográficamente aislada, carente de estructuras de reproducción asexual (isidios o soralios), pero compartiendo con las dos especies la presencia de máculas muy finas en la superficie superior del talo (Clerc & Truong 2008).

En el segundo clado, *P. atricha* también aparece como especie parafilética con *P. carporrhizans* como linaje derivado. Ambas especies comparten áreas de distribución aunque sus nichos ecológicos parecen no solaparse, ya que crecen sobre diferentes sustratos. *Parmelina atricha* es exclusivamente saxícola mientras *P. carporrhizans* es cortícola. También presentan caracteres morfológicos que distinguen a ambas especies, como las máculas en la superficie superior del talo (*P. carporrhizans*) y la presencia de pequeños lóbulos secundarios en la parte más longeva del talo (*P. atricha*), entre otros rasgos más difíciles de apreciar que permiten su identificación morfológica (Clerc & Truong 2008).

Las especies que corresponden al tercer clado forman, cada una, clados monofiléticos. La recientemente descrita *P. yalungana* (considerada antes como *P. quercina*) sería la especie más próxima a *P. quercina* y se diferencia de ella por el tamaño de las ascosporas, así como por su distinta distribución y condiciones ecológicas, muy distintas al clima mediterráneo que prefiere *P. quercina* (Nelson *et al.* 2012). La descripción de *P. yalungana* como un taxón diferente sugiere la conveniencia de una nueva revisión de los ejemplares de *P. quercina* provenientes de Asia para determinar si corresponden o no al mismo taxón. El linaje más próximo a estas dos especies es *P. cryptotiliacea*, la cual presenta una morfología similar a *P. tiliacea* pero con marcada distancia genética (Núñez-Zapata *et al.* 2011); *P. cryptotiliacea* se diferencia de *P. quercina* y *P. yalungana* por la presencia de isidios y máculas de muy escasas dimensiones.

Nuestros resultados indican que las estructuras morfológicas externas no caracterizan a ninguno de los clados establecidos, estando los caracteres estudiados hasta la fecha distribuidos indistintamente en todos estos linajes. La hipótesis de que *P. quercina* está cercanamente emparentada con *P. tiliacea* y *P. pastillifera* (Hale 1976b, Argüello *et al.* 2007) ha sido descartada, y estudios adicionales serían necesarios para encontrar nuevos caracteres fenotípicos que se pudieran asociar a las diferentes especies de *Parmelina*.

Parafilia

Tanto *P. tiliacea* como *P. atricha* aparecen en los árboles como especies parafiléticas, es decir, cumplen el criterio establecido por Henning (1966) que designó así a aquellos grupos de organismos que descienden de un ancestro común pero no incluyen todos sus descendientes. La diferenciación de alguno de sus descendientes (*P. pastillifera* y *P. carporrhizans*, respectivamente) pudo haberse originado por eventos climáticos (ej. glaciaciones) que provocaron algún tipo de aislamiento o proceso de dispersión/colonización (Coyn & Orr 2004), aunque afectando sólo a unas pocas poblaciones (Rieseberg & Brouillet 1994, Hörandl 2006). La red de haplotipos multilocus (Fig. 12 del Capítulo 2) apoyaría esta hipótesis, ya que muestra cómo los haplotipos de *P. pastillifera* se distancian del resto de haplotipos de *P. tiliacea*, aunque no llegan a separarse del todo, posiblemente por ser un proceso evolutivo reciente o inacabado (Hörandl & Stuessy 2010); un estudio poblacional de las especies *P. carporrhizans* y *P. atricha*, ayudaría a contrastar esta hipótesis. La parafilia no es algo que ocurra esporádica o aleatoriamente en los procesos evolutivos, este evento ya ha sido anteriormente descrito en otros hongos liquenizados de la familia Parmeliaceae a nivel de género, como

en *Usnea* e *Hypotrachyna* (Wirtz *et al.* 2006, Divakar *et al.* 2010b), de especie como en *Parmelia squarrosa* (Molina *et al.* 2004), así como en otras familias de hongos liquenizados (Williams & Tibell 2008, Davydov *et al.* 2010), sin embargo se hace necesario su reconocimiento y confirmación utilizando más de un gen.

Datación

Nuestros resultados indican que la separación de los linajes de *Myelochroa* y *Parmelina* posiblemente ocurriera en el Oligoceno Superior, hace unos 28 Ma, aunque la diversificación de *Parmelina* empezó más tarde, hace unos 13 Ma en el Mioceno Medio; esta estimación da una edad superior a la estimada por Amo *et al.* (2011) que indicaban una edad de comienzo de la diversificación de unos 8 Ma. Nuestro estudio se basa en distintos marcadores y puntos de calibración, y sobre todo incluye una muestra más amplia y representativa del género, lo que puede causar estas diferencias, dado el amplio rango de las estimaciones. Los procesos de diversificación entre los primeros descendientes del primitivo *Parmelina* sucedieron durante distintas etapas del Mioceno Medio y Superior. En el occidente europeo esta época, que comprende cerca de 10 Ma, estuvo caracterizado por ecosistemas diversos que presentaban vegetación desde semidesértica a muy húmeda influenciada por el Paratethys, entre ellos algunos bosques mixtos perennifolios y caducifolios de *Quercus*, *Fagus* y *Acer* (Barron y Diéguez 2001, Jiménez-Moreno & Suc 2007, Jiménez-Moreno *et al.* 2010) que pudieron servir como sustratos para las primitivas *Parmelina*. La temperatura anual media oscilaba 16-21 °C durante el Langhiense, y tuvo un ligero descenso durante el Tortoniense, producto del enfriamiento del clima global y de eventos paleogeográficos (Bruch *et al.* 2007). A finales del Mioceno, Europa presentó un clima más árido, producto de la desecación del Mediterráneo (Fauquette *et al.* 2006), y para ese entonces algunas especies de *Parmelina* ya se habrían diferenciado (*P. coleae*, *P. cryptotiliacea* y *P. quercina*). En el Plioceno empezaron los eventos de diferenciación de *P. tiliacea*, mientras que para el resto de especies esta diferenciación empezó apenas en el Pleistoceno. Nuestros análisis apuntan a que en este período también ocurrió la diferenciación de *P. pastillifera* y *P. carporrhizans*; la cercanía geográfica con las especies de las cuales derivan (*P. tiliacea* y *P. atricha*, respectivamente) sugiere que ambas especies fueron producto de un proceso de especiación parapátrica influenciada posiblemente por los cambios climáticos y de vegetación que sucedieron en esta época, y que conllevaron a su diferenciación genética y ecológica.

Biogeografía histórica

Parmelina es un género cuya historia evolutiva discurrió principalmente en Europa. La separación de *Myelochroa* hacia finales del Oligoceno y principios del Mioceno, no solo se vio marcada por la divergencia genética sino también por la distribución geográfica y que se refleja claramente en la Fig. 23 (nodos de *Parmelina* anaranjados y nodos de *Myelochroa* azules). Las especies de *Parmelina* se distribuyen principalmente en Europa y oeste de América del Norte (Poelt 1969, Hale 1976b, Argüello *et al.* 2007, Clerc & Truong 2008, Nelson *et al.* 2012), mientras que las de *Myelochroa* predominan en el continente asiático (Hale 1976b, Elix 1994, Park 1990, Brodo *et al.* 2001, Divakar *et al.* 2001a, Wang *et al.* 2001, Hur *et al.* 2004, Marcelli & Canêz 2008), aunque en este último también han sido descritas algunas especies de *Parmelina* (Park 1990, Kurokawa 2003, Nelson *et al.* 2012).

Los resultados obtenidos por S-DIVA sugieren la existencia de amplias áreas de distribución en el pasado para los ancestros de las especies que hoy muestran distribución disyunta (AB, ABD o BD para *P. quercina* y *P. yalungana*; AB para *P. coleae* y *P. tiliacea*). Los cambios climáticos en Eurasia habrían favorecido la separación por vicarianza de *P. quercina* y *P. yalungana* (posiblemente durante el Mioceno, Fig. 20) a través de eventos como la continentalización del clima en Europa producto de la desecación del Paratetis (Ramstein *et al.* 1997), y que habrían influenciado en la adaptación de *P. quercina* a las regiones templadas de Europa, y de *P. yalungana* al clima boreal del este asiático y noroeste de América del Norte. La distribución disyunta de *P. yalungana* se explicaría por la similitud florística entre el Este Asiático y el Noroeste de América del Norte (Wen 1999, Qian & Ricklefs 2001); pese a que durante esta época las principales barreras oceánicas ya estaban formadas, algunos registros fósiles de plantas sugieren que existía conexión entre el este de Asia y el oeste de América del Norte (Liu & Leopold 1994, Pigg *et al.* 2004), donde los bosques caducifolios templados y que posteriormente fueron reemplazados por bosques de coníferas en el Plioceno (Tiffney & Manchester 2001) habrían favorecido la conexión entre ambos continentes.

Por otro lado, *P. coleae* y las especies isidiadas *P. tiliacea* y *P. pastillifera* son especies adaptadas al clima mediterráneo presente en el oeste de América del Norte y el oeste de Eurasia (Hohmann *et al.* 2006). La separación por vicarianza de estos linajes podría ser una prueba adicional de la dispersión a larga distancia que presentan los líquenes, como

ha sido sugerido por otros autores (Shaw *et al.* 2003, Meyers & Liston 2004, Amo *et al.* 2011).

Sin embargo, los resultados del análisis Lagrange contradicen estas hipótesis. Estos resultados muestran que la presencia de *P. yalungana* y *P. coleae* en el continente americano son producto de eventos migratorios, o de dispersión, con origen en el continente europeo. Los datos con que contamos hoy en día no nos permiten aceptar ni rechazar ninguna hipótesis.

CAPÍTULO IV

Sistemática del género
Parmelina basada en
caracteres morfológicos y
químicos

CHAPTER IV

Systematics of *Parmelina* genus
based on morphological and
chemical characters

4.1 Abstract

In this chapter, a description of morphological and chemical characters of species of *Parmelina* and *Myelochroa* is summarized and a comparison of *Parmelina* species is compiled, including an anatomical comparison of apothecia and ascospores. A taxonomic key is proposed to differentiate species of *Parmelina* using morphological and ecological characters, and geographic distribution.

Keywords: *Parmelina*, *Myelochroa*, taxonomy.

4.2 Introducción

El género *Parmelina* está compuesto por nueve especies, incluyendo las recientemente descritas *P. cryptotiliacea* (Núñez-Zapata *et al.* 2011) y *P. yalungana* (Nelson *et al.* 2012), que se distribuyen en el hemisferio norte. *Parmelina* junto con *Remototrachyna*, *Bulbothrix*, *Parmelinella*, y *Myelochroa*, conforman el que ha sido denominado clado *Parmelina* (Crespo *et al.* 2010b). Estos géneros comparten ciertas características fenotípicas como la presencia de isoliquenana en la pared celular, el epicórtex porado, la ausencia de pseudocifelas, y la presencia de atranorina o ácido úsnico en el córtex, aunque también presentan claras diferencias morfológicas y químicas, además de distinta distribución geográfica (Hale, 1974, 1976a 1976b, Elix & Hale 1987, Argüello *et al.* 2007, Divakar *et al.* 2010b, Benatti 2012, Flakus *et al.* 2012). De estos cuatro géneros, *Myelochroa* es el más cercano a *Parmelina*, por su parentesco morfológico y proximidad genética (Blanco *et al.* 2006, Crespo *et al.* 2007, 2010b, ver también Capítulo III); la principal diferencia entre ambos viene dada por el color de la médula siendo amarilla en *Myelochroa* debido a la presencia de derivados del ácido secalónico, mientras que en *Parmelina* es blanca y carece de triterpenos hopánicos (Hale 1976b, Elix & Hale 1987, Crespo *et al.* 2010b).

Las especies de *Parmelina* también poseen una combinación de caracteres macro-morfológicos, ecológicos y geográficos que permiten su fácil identificación en campo (Hale 1976b, Dobson & Hawksworth 1976). Los marcadores genéticos han complementado la sistemática del género ayudando a disgregar taxones, crípticos o no, que se consideraban de amplia distribución (Argüello *et al.* 2007, Nelson *et al.* 2012), a sacar a la luz la existencia de especies crípticas (Nuñez *et al.* 2011), y a confirmar la separación de taxones que se consideraban sinónimos (Clerc & Truong 2008), por lo cual su uso en sistemática hoy en día se hace imprescindible. Pese a ello, una clave taxonómica basada en los

caracteres morfológicos, ecológicos y geográficos puede resultar útil para la identificación de las especies de *Parmelina* en el campo o en el laboratorio.

En el presente capítulo se pretende resumir y unificar los caracteres no genéticos que caracterizan a cada una de las especies del género *Parmelina*. Los objetivos que se persiguen son: 1) comparar especies de los géneros *Myelochroa* y *Parmelina* para confirmar las diferencias morfológicas ya conocidas en trabajos previos y buscar otros posibles caracteres discriminantes particularmente en los tejidos generativos, 2) comparar morfológicamente las especies de *Parmelina*, especialmente sus estructuras de reproducción sexual, y 3) elaborar una clave dicotómica de las especies de *Parmelina*.

4.3 Material y métodos

Para el presente estudio se utilizaron especímenes de *Parmelina* y *Myelochroa* incluidos en el herbario MAF, seleccionando principalmente ejemplares que presentaban apotecios.

Los caracteres morfológicos externos fueron observados con la ayuda de un estereoscopio Leica L2. Para el estudio del ascocarpo, se realizaron cortes a mano de secciones longitudinales en la parte media del apotecio, utilizando una hoja de afeitar. Las preparaciones se montaron en agua destilada y luego se tiñeron con azul de lactofenol y se dejaron en reposo durante un día para que el colorante penetrara en el tejido. Posteriormente se observaron los diferentes tejidos del ascocarpo utilizando microscopios ópticos (Leitz DMRB y Nikon Eclipse 80i).

La observación de ascósporas se realizó en preparaciones en fresco, a partir de secciones perpendiculares al disco del apotecio. Para determinar la dimensión de las ascósporas, se midió la longitud y el ancho en 20 ascósporas bien desarrolladas utilizando un microscopio óptico (Leitz DMRB) a 1000x de aumento. Las observaciones se realizaron en tres ejemplares diferentes por especie, a excepción de las muestras de *Myelochroa* de las cuales solo se midió un ejemplar con apotecios por especie. Para la descripción de la forma de las esporas, se siguieron las propuestas de Kirk *et al.* (2008). Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software Statgraphics Plus 5.1. El test químico se realizó utilizando el hidróxido de potasio 10% (K) y el hipoclorito de sodio (C). El resto de atributos morfológicos y químicos se complementó con datos de la literatura.

4.4 Resultados

Caracteres diferenciales entre Parmelina y Myelochroa

La principal diferencia entre las especies de *Parmelina* y las de *Myelochroa* está dada por los caracteres químicos. *Parmelina* presenta en la médula generalmente ácido lecanórico como componente principal, mientras que *Myelochroa* presenta diferentes tipos de metabolitos como ácido secalónico, ácido leucotínico, ácido stictico, entre otros (Tabla 16). Los test de reacción de la médula al K y C también son diferentes, *Parmelina* tiene reacción K (-) y C (+) mientras que *Myelochroa* da K (+ o -) y C (-). La única excepción a la homogeneidad química de *Parmelina* la constituye *P. gyrophorica* que presenta, además de ácido lecanórico, otros componentes como ácido girofórico y cloroatranorina, aunque las reacciones medulares al K y C son iguales. Otro carácter que diferencia a ambos géneros es la distribución geográfica. Las especies de *Parmelina* predominan en Europa y Norte de África mientras que las de *Myelochroa* se concentran en el este del continente asiático; en América la distribución de ambos géneros no muestra un límite geográfico, aunque las especies de *Parmelina* solo han sido descritas para el occidente de Norte América.

La morfología externa de ambos géneros proporciona pocos caracteres diferenciales. La longitud de los talos y lóbulos no muestran patrones característicos de los géneros; las máculas y estructuras reproductoras también están presentes en diferentes especies de ambos géneros, a excepción de los soledios que solo han sido observados en especies de *Myelochroa*. Un carácter determinante es el color de la médula, amarillenta en *Myelochroa* y blanca en *Parmelina*, aunque algunas especies de *Myelochroa* también presentan médula blanca.

La morfología interna de los apotecios de *Parmelina* y *Myelochroa* mostró diferencias notables. La mayoría de las especies de *Parmelina* pueden llegar a desarrollar una mancha negra en la base del apotecio (cuello). Es frecuente en varias especies (*P. carporrhizans*, *P. quercina*, *P. atricha*, *P. coleae*) que sobre esa mancha se formen rizinas que pueden llegar a ser abundantes y bien desarrolladas, especialmente en especímenes de *P. carporrhizans*. Las secciones transversales de los apotecios de ambos géneros mostraron una distribución y longitud similar de las diferentes capas del apotecio. Sin embargo, todas las especies de *Parmelina* presentan un anillo periférico en el disco himenial que es perceptible casi siempre, al menos en apotecios maduros. Este cuello corresponde a una mancha carbonácea que se encuentra en el ápice de las hifas de la parte interior del

excípulo. El tamaño de las ascósporas también es similar, aunque algunas especies de *Myelochroa* presentan esporas de mayor tamaño (Fig. 22) que *Parmelina*.

Tabla 23. Características geográficas, morfológicas y químicas de especies de *Myelochroa* y *Parmelina*. Color de médula: N: anaranjado, B: blanco, A: amarillo. Color de reacciones químicas: A: amarillo, R: rojo, N: anaranjado.

Especie	Distribución	Talo (cm)	Lóbulos (mm)	Máculas	Apotecios	Esporas (µm)	Isidios	Soralios	Médula	Química	K	C	P	Referencia
<i>M. amagiensis</i>	Japón	4-8	2-3	(+)	(+)	9-11 x 6-7	(-)	(-)	N	zeorina, leucotilina, ac. secalónico A	(+) A			Hale 1976b
<i>M. aurulenta</i>	América, África, Asia	4-10	2-4	(-)	raros	12 x 7		(+)	B/N	zeorina, ac. leucotílico, ac. secalónico A	(+) A			Hale 1976b, Park 1990, Jayalal et al. 2012
<i>M. coreana</i>	Malasia, Corea del Sur	3-5	0.5-2.0	(+)	(-)		(-)	(+)	A	atranorina, zeorina, leucotilina, ac. secalónico A				Park 1990, Jayalal et al. 2012
<i>M. crassata</i>	Japón	15	3-6	(-)	(+)	14-15 x 6-8	(-)	(-)	N	zeorina, leucotilina, ac. secalónico A	(+) A			Hale 1976b, Park 1990
<i>M. degelii</i>	Australia	6-8	2-3		(-)		(+)	(-)	A	zeorina, ac. leucotílico, ac. secalónico A	(+) A			Hale 1976b
<i>M. denegans</i>	India, Sri Lanka, Sabah	5-9	1-3	(+)	(+)	7-9 x 5-7		(+)	N	zeorina, leucotilina, ac. secalónico A	(+) A			Hale 1976b, Jayalal et al. 2012
<i>M. entotheiochroa</i>	Corea, Japón	8-10	2-3	(-)	raros	10-11 x 5	(-)	(-)	A	zeorina, leucotilina, ac. secalónico A	(+) A			Hale 1976b, Park 1990, Jayalal et al. 2012
<i>M. galbina</i>	Japón, E. de N. América	3-10	1-2		(+)	10-13 x 7-9			B/A	ac. galbínico, zeorina, ac. salazínico, leucotilina, ac. secalónico A	(+) A	(-) o (+) A	(+) N	Hale 1976b, Park 1990, Jayalal et al. 2012
<i>M. hayachinensis</i>	Japón	5-8	1.5-3.0	(+)	(-)		(-)	(-)	B	ac. galbínico, leucotilina, ac. secalónico A	(+) A->R	(-)	(+) N	Hale 1976b, Park 1990, Jayalal et al. 2012
<i>M. immiscens</i>	México	5-10	2-6		(+)	7-12 x 4-6			A		(+) A	(+) A	(-)	Hale 1976b
<i>M. indica</i>	India	2-3	0.8-1.2		(-)		(+)		B	zeorina, leucotilina	(-)	(-)	(-)	Hale 1976b, Jayalal et al. 2012

<i>M. irrugans</i>	China, Japón	4-10	2-5		(+)	12-15 x 8-10			A	ac. leucotílico, zeorina, ac. secalónico	(+) A	(+) A		Hale 1976b, Park 1990, Jayalal et al. 2012
<i>M. leucotyliza</i>	Japón, Malasia	8-12	2-4		raro	11-12 x 6		(-)	N	leucotilina, zeorina, ac. secalónico A	(+) A	(+) A		Hale 1976b, Park 1990, Jayalal et al. 2012
<i>M. macrogalbinica</i>	India	8	2-6	(+)	(+)	14-25 x 9-13	(-)	(-)	A	atranorina, ac. galbínico, leucotilina, ac. salazínico, ac. secalónico R-W-C, zeorina, ac. ursólico	(+) A->R	(-)	(+) N	Divakar et al. 2001a
<i>M. metarevoluta</i>	E. de EE.UU., Japón, China	2-6	1-4	(-)	muy raro	12-15 x 7-10		(+)	N	ac. galbínico, leucotilina, ac. secalónico A, ac. constíctico, ac. salazínico, zeorina	(+) A	(-)	(+) N	Hale 1976b, Jayalal et al. 2012
<i>M. nothofagi</i>	Papúa Nueva Guinea	5-6	0.2-0.8	(+)	(-)		(-)	(-)	A	atranorina, zeorina, ac. secalónico A, leucotilina	-	(-)	(-)	Elix 1996
<i>M. obsessa</i>	Este de EE.UU.	3-6	1-2		(+)	6-10 x 4-5	(+)		B/A	zeorina, ac. galbínico, leucotilina, ac. secalónico A, ac. salazínico	(+) A	(+) A		Hale 1976b
<i>M. perisidians</i>	India, SE Asiático, Japón	3-6	0.5-2.0		(+)	7-11 x 5-7	(+)		A	leucotilina, zeorina, ac. secalónico A	(+) A	(+) A	(-)	Hale 1976b, Jayalal et al. 2012
<i>M. rhytidodes</i>	Japón, Nepal	8-12	2-4		(+)	12-14 x 9-11			N	ac. leucotílico, zeorina, ac. secalónico	(+) A	(+) A		Hale 1976b, Park 1990
<i>M. salazinic</i>	China	5-6	2-8	(+)	(-)		(-)	(+)	B/A	atranorina, ac. galbínico, ac. salazínico, ac. consalazínico, ac. leucotílico, zeorina,	(+) R	(-)	(+) amarillo	Wang et al. 2001
<i>M. sayanensis</i>	Siberia	0.3-1.2	0.1-1.2	(-)	(+)	8-12 x 5-8	(-)	(+)	B	pigmentosin B atranorina, cloroatranorina, ac. galbínico, ac. salazínico, ac.	(+) A->R	(-)	(+) A	Otnyukova et al. 2009

<i>M. sibirica</i>	Rusia, Siberia	1-4	1-5	(+)	(+)	10-12 x 6-8	(-)	(+)	B	norstístico, as. secalónico W, ac. leucotílico, zeorina atranorina, cloroatranorina, ac. galbínico, ac. salazínico, ac. norstístico, as. secalónico W, ac. leucotílico, zeorina atranorina, ac. secalónico A, xantholepinona A-D, zeorina, leucotilina atranorina, cloroatranorina, ac. secalónico A y C, leucotilina zeorina, leucotilina, ac. secalónico A atranorina, zeorina, ac. leucotílico, ac. secalónico A atranorina, ac. galbínico, ac. norstístico, ac. salazínico, pigmentosin B, ac. secalónico R-W-C, zeorina, ac. ursólico	(+) A->R	(+)	(+) A	Otnyukova et al. 2009
<i>M. sikkimensis</i>	India	8	2-6	(-)	(-)		(-)	(-)	A	zeorina, ac. secalónico A, xantholepinona A-D, zeorina, leucotilina atranorina, ac. secalónico A atranorina, zeorina, ac. leucotílico, ac. secalónico A atranorina, zeorina, ac. leucotílico, ac. secalónico A atranorina, ac. galbínico, ac. norstístico, ac. salazínico, pigmentosin B, ac. secalónico R-W-C, zeorina, ac. ursólico	(+) A	-	(-)	Divakar et al. 2001b
<i>M. sinica</i>	China	1.5-2.5	0.5-1.2	(-)	(-)		(-)	(-)	A	zeorina, ac. secalónico A atranorina, zeorina, ac. leucotílico, ac. secalónico A atranorina, zeorina, ac. leucotílico, ac. secalónico A atranorina, ac. galbínico, ac. norstístico, ac. salazínico, pigmentosin B, ac. secalónico R-W-C, zeorina, ac. ursólico	(+) A	(+) A	(+) A	Wang et al. 2001
<i>M. subaurulenta</i>	India, SE Asiático, Japón	4-10	2-4	(+)	(+)	8-14 x 6-10	(-)	(-)	N	zeorina, ac. secalónico A atranorina, zeorina, ac. leucotílico, ac. secalónico A atranorina, zeorina, ac. leucotílico, ac. secalónico A atranorina, ac. galbínico, ac. norstístico, ac. salazínico, pigmentosin B, ac. secalónico R-W-C, zeorina, ac. ursólico	(+) A	(+) A		Hale 1976b, Park 1990
<i>M. supraflava</i>	Brasil	9	0.5-3.0	(+)	(-)		(-)	(+)	A	zeorina, ac. leucotílico, ac. secalónico A atranorina, zeorina, ac. leucotílico, ac. secalónico A atranorina, ac. galbínico, ac. norstístico, ac. salazínico, pigmentosin B, ac. secalónico R-W-C, zeorina, ac. ursólico	(+) A	(+) A	(-)	Marcelly & Canez 2008
<i>M. upretii</i>	India	11	2-10	(-)	(-)		(-)	(+)	B/A	zeorina, ac. secalónico A atranorina, ac. galbínico, ac. norstístico, ac. salazínico, pigmentosin B, ac. secalónico R-W-C, zeorina, ac. ursólico	(+) A->R	-	(+) N	Divakar et al. 2001a
<i>M. xantholepis</i>	India, Nepal, SE Asiático	4-15	1-3	(+)	(+)	9-13 x 6-8	(-)	(-)	A	zeorina, ac. secalónico A atranorina, zeorina, ac. leucotílico, ac. secalónico A atranorina, ac. galbínico, ac. norstístico, ac. salazínico, pigmentosin B, ac. secalónico R-W-C, zeorina, ac. ursólico	(+) A	(+) A	(-)	Hale 1976b, Jayalal et al. 2012
<i>P. atricha</i>	Europa	3-10	2-3	(-)	(+)	8-11 x 5-7	(-)	(-)	B	ac. lecanórico	(-)	(+) R	(-)	Clerc & Truong 2008
<i>P. carporrhizans</i>	Europa	3-10	2-3	(+)	(+)	8-11 x 5-7	(-)	(-)	B	ac. lecanórico	(-)	(+) R	(-)	Clerc & Truong 2008
<i>P. coleae</i>	O. EE.UU.	3-6	2-6	(+)	(+)	10.6 x 4.9	(-)	(-)	B		(-)	(+) R		Argüello et al. 2007

<i>P. cryptotiliacea</i>	España	3-10	3-8	(+)	(+)	9-13 x 3-5	(+)	(-)	B	ac. lecanórico	(-)	(+) R	(-)	Nuñez-Zapata et al. 2011
<i>P. gyrophorica</i>	China	3-5	2-5	(-)	raro		(-)	(-)	B	atranorina, ac. girofórico, cloroatranorina, ac. lecanórico, ac. orselínico, orcinol	(-)	(+) R	(-)	Wang et al. 2000
<i>P. pastillifera</i>	Europa, India	3-8	2-6	(+)	muy raro		(+)	(-)	B	ac. lecanórico	(-)	(+)	(-)	Hale 1976b
<i>P. quercina</i>	Europa, M. Oriente, E. Asiático	5-10	1.5-4.5	(-)	(+)	6-10 x 5-7	(-)	(-)	B	ac. lecanórico	(-)	(+)	(-)	Hale 1976b
<i>P. tiliacea</i>	Europa, N. África, E. India	5-15	3-8	(+)	raro	8-11 x 5-6	(+)	(-)	B	ac. lecanórico	(-)	(+) R	(-)	Hale 1976b
<i>P. yalungana</i>	E. Rusia, Alaska	2-8	1-4	(-)	(+)	6-10 x 4-6	(-)	(-)	B	ac. lecanórico	(-)	(+) R	(-)	Nelson et al. 2012

Diferenciación morfológica entre las especies de Parmelina

El tamaño del talo y de los lóbulos no mostró diferencias significativas entre las especies de *Parmelina*, algunas de ellas poseen un rango mayor que otras (por ejemplo *P. tiliacea*), pero los tamaños mínimos y máximos se solapan. La presencia de máculas si constituye un carácter diferencial, cinco especies (*P. carporrhizans*, *P. coleae*, *P. cryptotiliacea*, *P. pastillifera*, *P. tiliacea*) presentaron máculas mientras que las otras cuatro, no. Los isidios sólo fueron observados en tres especies: *P. cryptotiliacea*, *P. tiliacea* y *P. pastillifera*, esta última con notorias diferencias morfológicas externas (isidios apastillados), mientras que los de las dos primeras presentaron morfología similar (cilíndricos y/o ramificados). Los apotecios han sido observados en todas las especies, aunque la frecuencia de los mismos disminuye notoriamente en las especies isidiadas, especialmente en *P. pastillifera* donde solo rara vez se observaron individuos apoteciados. Ninguna especie de *Parmelina* presentó soralios.

Aparte de la especial coloración de las hifas del excípulo más interno, la anatomía interna de los ascocarpos no mostró diferencias notorias entre las distintas especies de *Parmelina*. La forma de las ascósporas (Fig. 24) fue semejante entre todas las especies, presentando con una alta frecuencia una acusada deformación de la gran vacuola central que prácticamente ocupa el contenido del protoplasma de la célula. El vacuoma tiene cierta semejanza a la disposición araquiforme que adquiere en el género *Xanthoparmelia*. Sin embargo, no es tan constante. El tamaño de las ascósporas de *Parmelina* (Fig. 25) varió entre 7-12 μm de longitud y 4-7 μm de ancho, siendo *P. tiliacea* y *P. cryptotiliacea* las que presentaron las ascósporas más largas (9-12 μm) y *P. quercina* las más cortas (7-10 μm), *P. cryptotiliacea* también presentó ascósporas claramente más estrechas (4-5 μm).

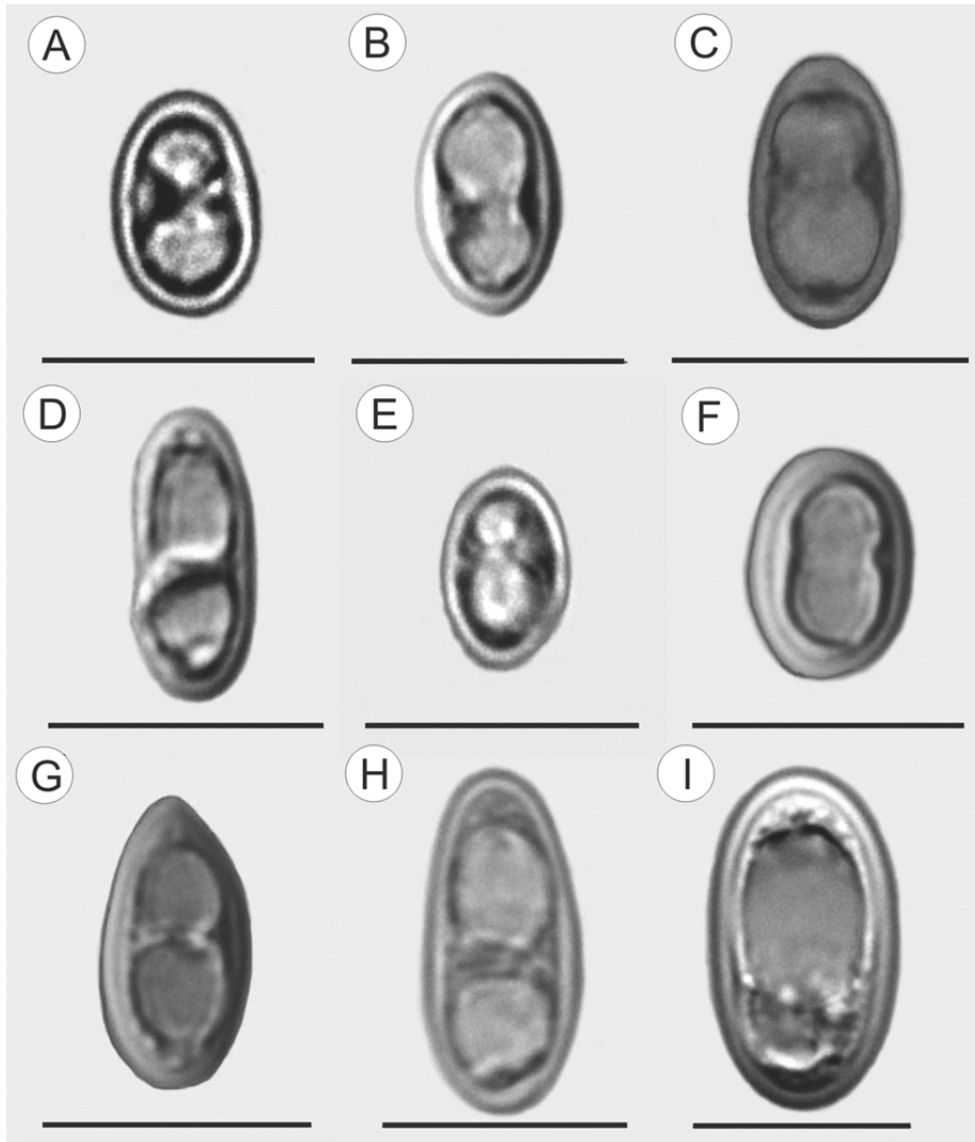
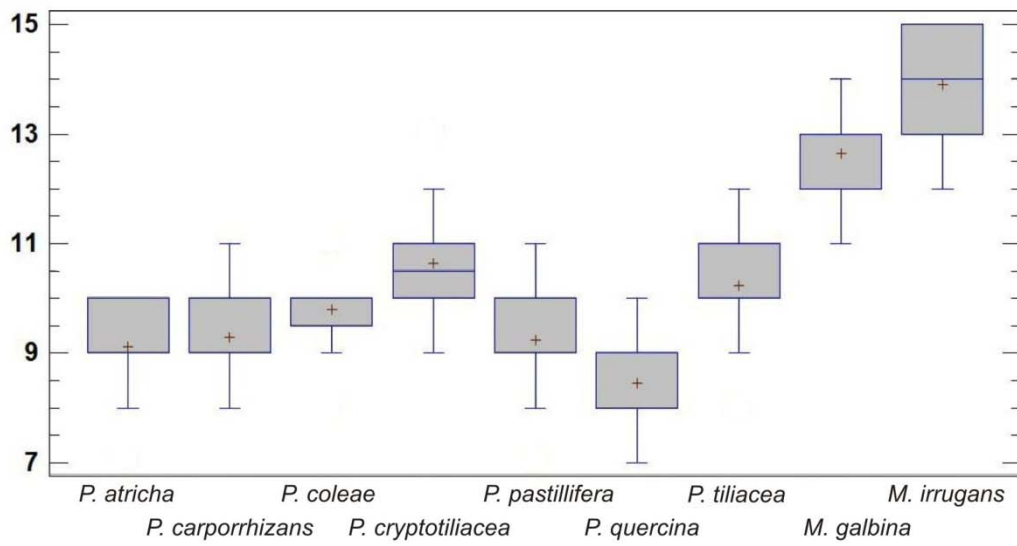


Fig. 24. Ascósporas de las especies de *Parmelina*. A) *P. atricha* (MAF 15524), B) *P. carporrhizans* (MAF 13953), C) *P. coleae* (MAF 16480), D) *P. cryptotiliacea* (MAF 16454), E) *P. pastillifera* (MAF 17453), F) *P. quercina* (MAF 16197), G) *P. tiliacea* (MAF 16468), H) *Myelochroa galbina* (MAF 17782), y I) *Myelochroa irrugans*. (MAF 16932). (Escala = 10 μ m).

Medidas de esporas

Largo



Ancho

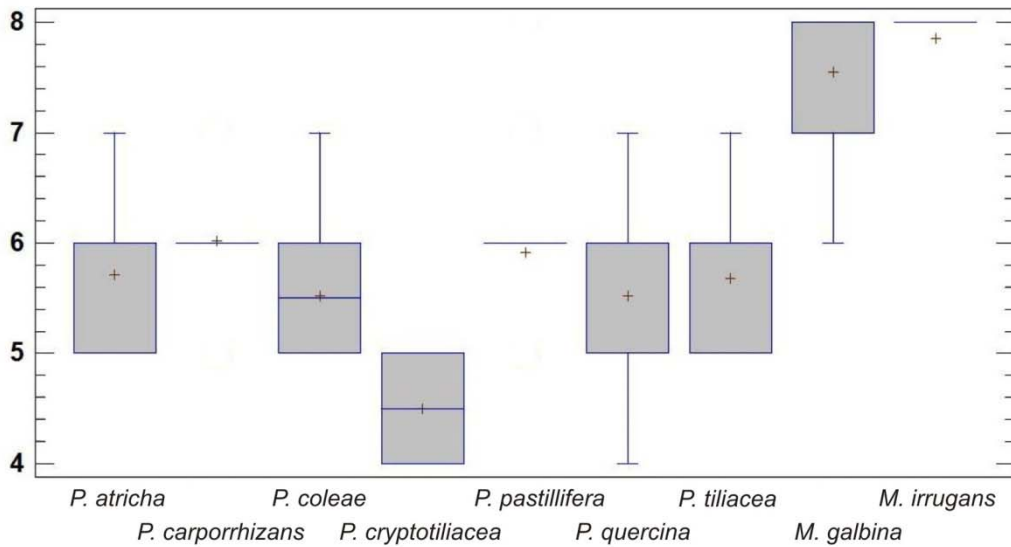


Fig. 25. Diagrama comparativo de la longitud y ancho de las ascósporas de las especies de *Parmelina* y *Myelochroa*.

Clave taxonómica de *Parmelina*

Considerando los caracteres estudiados, se propone la siguiente clave taxonómica para las nueve especies de *Parmelina*:

1. Médula color amarillo, amarillo-anaranjado o blanco. Médula
K (+) amarillo..... *Myelochroa*
Médula color blanco. Médula K (-), C (+) rojo..... *Parmelina*
2. Talo con isidios, con o sin apotecios..... 3
Talo sin isidios, con o sin apotecios..... 5
3. Talo gris azulado, con cierta frecuencia con débil
tonalidad azulada, bordes truncados e isidios apastillados..... *P. pastillifera*
Talo gris a gris verdoso, bordes redondeados e isidios
± cilíndricos, simples o ramificados..... 4
4. Ascósporas de 3-5 µm de anchura (hasta ahora en el centro
y occidente de la Península Ibérica)..... *P. cryptotiliacea*
Ascósporas de 5-7 µm de anchura..... *P. tiliacea*
5. Superficie superior con máculas blanquecinas..... 6
Superficie superior sin máculas..... 7
6. Distribución en Europa..... *P. carporrhizans*
Distribución en el oeste de Norte América..... *P. coleae*
7. Exclusivamente saxícola..... *P. atricha*
Preferentemente cortícola..... 8
8. Lóbulos redondeados. Distribución en Europa y Norte
de África..... *P. quercina*
Lóbulos sublineares y dicotómicos. Distribución en Alaska
y noreste de Asia..... *P. yalungana*

A continuación se presenta una descripción de las especies, indicando sus sinónimos (fuente bibliográfica), descripción morfológica, reacciones químicas, distribución y ecología, así como unas observaciones donde se anotan diferencias con otras especies semejantes o particularidades.

Parmelina atricha (Nyl.) P. Clerc
Sauteria 15: 175-194, 2008.

Syn. *Parmelia atricha* Nylander; *Parmelia quercina* var. *convoluta* Zahlbruckner; *Parmelina quercina* f. *saxicola* Zahlbruckner.

Tipo: [Francia], Pirénées orientales, ad saxa granitica mox supra La Preste, alt. 1190 m, 12.07.1872, W. Nylander No 16 [H (!), holotype].

Descripción. Talo folioso de color gris mineral claro a gris amarillento (en especímenes de herbario), de 3-10 cm de diámetro, fuertemente a libremente adnado, más o menos formando rosetas, la parte central o a veces todo el talo llega a ser panniforme, cubierto por numerosos y superpuestos lobulos pequeños de 2-3 mm de ancho, dicotómicos o irregularmente ramificados, por lo general largos y profundamente incisos, planos o ligeramente cóncavos, con extremos voluminosos y crenados, sin pruina y con cilios negros; superficie superior lisa y frecuentemente brillante, sin máculas; médula blanca, superficie inferior negra y brillante, parduzca hacia los extremos de los lóbulos, densamente rizinada, con rizinas largas, delgadas, simples y negras. Apotecios frecuentes, de 1-4 mm de diámetro, con los discos marrón rojizos y los márgenes gruesos, con el lado inferior arrugado, con rizinas ausentes o escasas. Ascas con 8 ascósporas simples, hialinas y elipsoides, 7-10 x 5-7 μm . Picnidios usualmente numerosos.

Química. Corteza superior K+ (amarillo); médula K-, C+ (rojo), KC+ (rojo), P-, UV-. Presenta atranorina, ácido lecanórico, y ácido girofórico en trazas.

Distribución y ecología. *Parmelina atricha* se conoce hasta ahora de la parte oriental de los Pirineos, sur de Francia, norte de Italia y sur de Suiza y parece tener una distribución propia del clima submediterráneo-mediterráneo. Es una especie exclusivamente saxícola, creciendo en rocas silíceas en áreas más o menos expuestas y secas, principalmente entre los 1100-1500 m.

Observaciones. *Parmelina atricha* podría ser confundida con especímenes saxícolas de *P. quercina*, las diferencias en la superficie inferior y las rizinas la diferenciarían de la primera. Sin embargo, la especie más próxima a ella es *P. carporrhizans* que se diferencia por la ausencia de máculas.

Especímenes examinados. España: Gerona, MAF-Lich 16633, 17558. Francia: Languedoc-Rosellón MAF-Lich 15524, 16634, 17028, 17029, 17559, 17563.

Parmelina carporrhizans (Taylor) Poelt & Vezda
Bibliotheca Lich. 9: 183, 1977.

Syn. *Parmelia carporrhizans* Taylor; *Parmelia quercina* var. *carporrhizans* Wirth.

Tipo: [España] Islas Canarias, Lemann [FH-Tayl, holotipo, G (!) isotype].

Descripción. Talo folioso de color gris mineral claro a gris débilmente azulado, de 3-10 cm de diámetro, fuertemente a laxamente adnado, en forma de roseta pero nunca arrugado en el centro; lóbulos de 2-4 mm de ancho, dicotómica o irregularmente ramificados, por lo general largos y profundamente incisos, contiguos, extremos de los grandes lóbulos, claramente crenados, ligeramente enrollados hacia abajo, frecuentemente no pruinosos, con cilios negros similares a las rizinas; la superficie superior es lisa y más o menos brillante, con máculas punctiformes o efiguradas; médula blanca; superficie inferior negra y brillante, parduzca hacia los extremos, densamente rizinada, rizinas largas, negras, delgadas y simples que se desarrollan horizontalmente dando una apariencia ciliada en los márgenes. Apotecios comunes, 3-12 mm de diámetro, discos marrón rojizos con los márgenes gruesos, pocas veces desarrollan rizinas en la cara inferior; ascas con 8 ascósporas simples, hialinas y elipsoides, 8-11 x 5-7 µm. Picnidios presentes.

Química. Corteza superior K+ (amarillo); médula K-, C+ (rojo), KC+ (rojo), P-, UV-. Presenta atranorina, ácido lecanórico, y ácido girofórico en trazas.

Distribución y ecología. Principalmente Europa, aunque también han sido descritos algunos ejemplares de Irán (Herbario de Berlín B136874) o la federación rusa (Herbarium Senckenbergianum GLM30129); de distribución mediterránea-atlántica, más frecuente en el oeste de Europa. No llega tan al norte como *P. quercina*. Cortícola sobre cortezas lisas o rugosas de diversos forófitos.

Observaciones. *Parmelina carporrhizans* parece ser exclusivamente cortícola, lo que la diferencia de *P. atricha*, que es exclusivamente saxícola, aunque ambas especies están filogenéticamente muy próximas y tienen áreas de distribución semejante; *P. quercina* es otra especie similar, de la que se diferencia por la presencia de máculas en la superficie superior.

Especímenes examinados. España: Albacete MAF-Lich 5601, 5481; Ávila MAF-Lich 6909; Cáceres MAF-Lich 7060; Cádiz MAF-Lich 2443; Castellón MAF-Lich 13011, 13069, 13072, 13082, 13091, 13137, 13197, 13953, 13954; Gran Canaria MAF-Lich 16477; Guadalajara MAF-Lich 13957; Jaén MAF-Lich 5898, 7739, 7740, 7741, 7742, 7743, 7744, 7745, 7747;

Madrid MAF-Lich 6057; Málaga MAF-Lich 2385; Tenerife MAF-Lich 13952, 16474; Teruel MAF-Lich 16849. Marruecos: Chauen MAF-Lich 16199. Portugal: Portalegre MAF-Lich 13955, 13956. Turquía: Çanakkale MAF-Lich 16476.

Parmelina coleae Argüello & A. Crespo
Biol. J. Linn. Soc. 91: 455-467, 2007.

Tipo: [EE.UU.], California, ad *Quercus kelloggii*. Steahan Bar river access, alt. 1269 m, 22.06.2002, Mariette S. Cole no. 9741, MAF-Lich 13959 [H (!), holotype].

Descripción. Talo folioso de color gris mineral, de 2-10 cm de diámetro, estrechamente adnado y en forma de roseta; lóbulos dicotómica o irregularmente ramificados, contiguos o imbricados en el centro, 1-5 mm de ancho, frecuentemente pruinosos, extremos de los lóbulos redondeados y rara vez crenados; superficie superior lisa y brillante, algunas veces rugoso, con máculas, no presenta isidios ni soledios; médula blanca; superficie inferior negra, parduzca hacia los extremos de los lóbulos, densamente rizinada, rizinas simples o rara vez dicotómicas, cortas (0.5-1 mm); con apotecios, 1-5 mm de diámetro, discos marrón rojizos y márgenes gruesos, cara inferior lisa y con pocas o numerosas rizinas; ascas con 8 ascósporas simples y hialinas, 7-10 x 4-7 μm . Presenta picnidios.

Química. Corteza superior K+ (amarillo); médula K-, C+ (rojo), KC+ (rojo), P-, UV-. Presenta atranorina y ácido lecanórico.

Distribución y ecología. Oeste de América del Norte, en la zona de California, donde también predomina el clima mediterráneo. Crece principalmente sobre especies de *Quercus*. No se han descrito especímenes saxícolas.

Observaciones. Especie muy parecida a *P. quercina*, *P. atricha*, *P. carporrhizans* y *P. yalungana* de las cuales se diferencia principalmente por la distribución geográfica, así como la presencia de máculas en la superficie superior. *Parmelina yalungana* también ha sido descrita para el oeste de América del Norte, sin embargo se distribuye más al norte (Alaska) y además carece de máculas.

Especímenes examinados. Estados Unidos: California MAF-Lich 6501, 13958, 13959 (holotipo), 13960, 13961, 16479, 16481.

Parmelina cryptotiliacea A. Crespo & Núñez-Zapata
The Lichenologist 43: 603 – 616, 2011.

Tipo: [España], Extremadura, ad *Quercus ilex* subsp. *ballota*. Parque Nacional de Monfragüe, alt. 207 m, 06.2005, H. T. Lumbsch, A. Green, P. K. Divakar & A. Argüello (MAF-Lich 16454). [H (!), holotype].

Descripción. Talo adpreso a las cortezas, de color gris mineral pálido a gris mineral; lóbulos irregularmente ramificados, sublineares a alargados, a menudo imbricados, con ápices redondeados, 2-7 mm de ancho, márgenes más o menos crenados y ondulados, no ciliados; superficie superior más o menos brillante, con máculas, por lo general pruinosa, irregularmente agrietada, densamente isidiada; médula blanca; superficie inferior de color negro con borde marrón, con moderada a alta densidad de rizinas negras, simples, y 1-2 mm de longitud. Isidios cilíndricos, cortos 0.5 – 1.5 mm, rara vez ramificados, por lo general con las puntas ennegrecidas. Apotecios frecuentes y adpresos, hasta 4 mm de diámetro. Ascas con 8 ascósporas de forma cilíndrica o ramificada, 9-13 x 3-5 μm .

Química. Corteza superior K+ (amarillo); médula K-, C+ (rojo), KC+ (rojo), P-. Contiene atranorina y ácido lecanórico, pero no ácidos grasos.

Distribución y ecología. En la actualidad la especie se conoce solo en cinco localidades de España: el Parque Nacional de Monfragüe y Navalvillar (Extremadura), El Pardo (Madrid), y Puertollano y las minas de San Quintín (Ciudad Real, Castilla - La Mancha). Crece en los troncos de los árboles y sobre rocas en altitudes relativamente bajas (alt. 250 - 700 msnm) con escasa precipitación de verano. Es simpátrica con *P. tiliacea*.

Observaciones. *Parmelina cryptotiliacea* es una especie críptica cuya morfología es muy similar a *P. tiliacea* de la que sin embargo está filogenéticamente bien separada. Cuando los ejemplares presentan apotecios, *P. cryptotiliacea* puede ser diferenciada de *P. tiliacea* por sus ascósporas más estrechas (ancho 3 - 5 μm , en comparación con 5 - 7 μm en *P. tiliacea*) así como por las paredes más delgadas de las células del excípulo. Sin embargo, para ejemplares que carecen de apotecios, la comparación de secuencias de ITS es la manera más fiable de distinguir esta especie críptica. Su distribución está restringida al centro sur occidental de la Península Ibérica.

Especímenes examinados. España: Cáceres MAF-Lich 16453, 16454 (*holotipo*), 16455, Ciudad Real MAF-Lich 16449, 16461, Madrid MAF-Lich 16450, 16451.

Parmelina gyrophorica Elix, Sheng L. Wang & J.B. Chen
Mycotaxon 76: 297, 2000

Vease: Wang S. L., Chen J. B. & Elix J. A. 2000. New species of Parmeliaceae (lichenized Ascomycotina) from China. Mycotaxon 76: 293–298.

Parmelina pastillifera (Harm.) Hale
Smithson. Contr. bot. 33:39, 1976.

Syn. *Parmelia scorteae* var. *pastillifera* Harmand; *Parmelia pastillifera* Schubert & Klement.

Tipo: Francia, Vosgos, Bussang, cortícola, J. Harmand [Claudel & Harmand, Lich. Gall. Exs. no. 491]. [H (!)—lectotipo; BM, BPI (!)—isolectotipo].

Descripción. Talo folioso de color gris mineral a gris azulado, de 2-8 cm de diámetro, lóbulos estrechos, dicotómicos o irregularmente ramificados, truncados en los ápices, de 2-6 mm de ancho, márgenes más o menos crenados u ondulados, y a veces con los bordes negros; superficie superior lisa y brillante, a veces pruinosa o con máculas, densamente isidiada; isidios de color negro azabache, cortos con la parte superior aplanada discoidal con el borde desarrollando un margen elevado irregular, a veces confluentes, escasamente ramificados, sésiles o con pie corto dando una apariencia apastillada; medula blanca; superficie inferior negra, densamente rizinada, rizinas negras, simples, de 1-2 mm de longitud. Apotecios poco frecuentes, algunos con rizinas en la cara inferior; ascas con 8 ascósporas 7-11 x 5-8 µm. Muy rara vez presenta picnidios.

Química. Corteza superior K+ (amarillo); médula K-, C+ (rojo), KC+ (rojo), P-, UV-. Presenta atranorina y ácido lecanórico.

Distribución y ecología. Islas Británicas, Europa, oeste asiático e India. Se encuentra preferentemente en bosques de *Fagus sylvatica* o bosques húmedos, siendo considerada una especie oceánica en Europa Central.

Observaciones. Muy similar a *P. tiliacea*, aunque las diferencias en la forma del isidio, así como en las preferencias bioclimáticas (capítulo II), son notorias. Suele encontrarse más en ramas que en el tronco.

Especímenes examinados. Alemania: Bad Reichenhall MAF-Lich 17507, 17508. Austria: Niederösterreich Türk 20584. España, Asturias MAF-Lich 16472; Burgos MAF-Lich 13963; Cádiz MAF-Lich 6058; Cantabria MAF-Lich 16473; La Rioja MAF-Lich 12534; Navarra MAF-Lich 17387, 17388, 17389, 17390, 17384, 17385, 17386. Italia: Friuli-Venecia-Julia MAF-

Lich 17464, 17465, 17466, 17467, 17468, 17469, 17470, 17471, 17472, 17473, 17482, 17483; Toscana MAF-Lich 17451, 17452, 17453, 17454. Noruega: Bergen MAF-Lich 17540, 17541, 17542, 17543, 17544, 17545, 17546, 17547. Reino Unido: Gales MAF-Lich 17532, 17533, 17534. Turquía: Çanakkale MAF-Lich 16471, 17515.

Parmelina quercina (Willd.) Hale

Phytologia 28: 483. 1974.

Syn. *Lichen quercinus* Willdenow; *Imbricaria quercina* Lamarck & de Candolle; *Parmelia carporrhizans* Taylor; *Parmelia sinuosa* var. *hypothrix* Nylander; *Parmelia atricha* Nylander; *Parmelia tiliacea* var. *hypothrix* Müller; *Parmelia revoluta* var. *granulata* Harmand; *Parmelia quercina* Vainio; *Parmelia budapestinensis* Gyelnik; *Parmelia carporrhizans* f. *malicola* Gyelnik.

Tipo: Alemania, Baden, Südlicher Schwarzwald, Fahrstrasse zwischen dem Jugendheim, c. 1050 m, 14 July 1926, J. Hillmann [B 60 0033509, neotipo (ver Argüello *et al.* 2007)].

Descripción. Talo folioso de color gris mineral a gris azulado, de 2-10 cm de diámetro, estrechamente adnado y en forma de roseta, a menudo arrugado a cerebriforme en el centro; lóbulos dicotómicamente o irregularmente ramificados, contiguos o llegan a ser rápidamente imbricados en el centro, 0.8 – 4.5 mm de ancho, frecuentemente pruinosos en la periferia, extremos de los lóbulos redondeados y rara vez crenados, con cilios negros; superficie superior lisa y brillante, sin máculas; médula blanca; superficie inferior negra, parduzca hacia los extremos de los lóbulos, densamente rizinada, rizinas simples, cortas (0.5-1 mm); con apotecios, 1.5-5 mm de diámetro, discos marrón rojizos y márgenes gruesos, cara inferior lisa y con pocas o numerosas rizinas; ascas con 8 ascósporas simples y hialinas, 7-10 x 4-7 µm. Presenta picnidios.

Química. Corteza superior K+ (amarillo); médula K-, C+ (rojo), KC+ (rojo), P-, UV-. Presenta atranorina, ácido lecanórico, y ácido girofórico en trazas.

Distribución y ecología. Principalmente en Europa. Es una especie que se encuentra principalmente en troncos de *Quercus*, *Fraxinus* y otros árboles de corteza ácida, rara vez sobre rocas.

Observaciones. Esta especie es muy similar a *P. atricha* que también se distribuye por Europa aunque en zonas más restringidas. La diferencia entre ambas está dada principalmente por el sustrato, *P. quercina* es frecuentemente cortícola, mientras *P. atricha* es exclusivamente saxícola. Otro taxón similar es *P. yalungana* del cual se

diferenciaría por la distribución geográfica. Existen ejemplares citados como *P. quercina* en China (Wei 1991), Japón (Kurokawa 2003) y este de Rusia (Chabanenko 2002), dada la reciente descripción de *P. yalungana*, se recomienda una nueva revisión de dichos ejemplares para ver a qué taxón pertenecen, sería necesario también utilizar marcadores moleculares para ver si se trata de alguna de las dos especies o si corresponde a otro taxón diferente.

Especímenes examinados. España: Álava MAF-Lich 3014; Madrid MAF-Lich 778, 779, 2319, 2758, 2893, 2894, 3013, 3560, 11675, 11680, 13945, 13946, 13947, 13948, 13949, 13951, 14176; Salamanca MAF-Lich 7080; Teruel MAF-Lich 16849. Turquía: Eikisehir MAF-Lich 16193.

Parmelina tiliacea (Hoffm.) Hale
Phytologia 28: 479-490. 1974.

Syn. *Lichen tiliaceus* Hoffman; *Lichen scorteus* Acharius; *Parmelia tiliacea* Acharius; *Imbricaria tiliacea* Koerber; *Parmelia quercifolia* var. *scortea* f. *microphylla* Massalongo; *Parmelia scortea* var. *papillosa* Gyelnik; *Parmelia scortea* var. *ramifica* Gyelnik; *Parmelia scortea* f. *visegradensis* Gyelnik.

Tipo: Europa, *sine loc.*, *op. cit.*: tab. 16 fig. 2 (—lectotype designated by Jørgensen 1972); Alemania, Baviera, Oberfranken, Kteis Forchheim, Ehrenburg, alt. 450 m, on *Tilia platyphyllos*, 27.09.2009, W.&G. Brachel (MAF-Lich 16485). [Hoffm., holotipo, MAF-Lich (!) epitipo].

Descripción. Talo adpreso a las cortezas, de color gris mineral pálido a gris mineral; lóbulos irregularmente ramificados, sublineares a alargados, a menudo imbricados, con ápices redondeados, 2-7 mm de ancho, márgenes más o menos crenados y ondulados, no ciliado; superficie superior más o menos brillante, con máculas, por lo general pruinosa, irregularmente agrietada, densamente isidiada; médula blanca; superficie inferior de color negro con borde marrón, de moderada a alta densidad de rizinas negras, simples, y 1-2 mm de longitud. Isidios cilíndricos, cortos 0.5 – 1.5 mm, frecuentemente ramificados, por lo general presentan las puntas ennegrecidas. Apotecios frecuentes y adpresos, hasta 4 mm de diámetro. Ascas con 8 ascósporas de forma alargada, 9-13 x 5-7 µm. Picnidios poco frecuentes.

Química. Corteza superior K+ (amarillo); médula K-, C+ (rojo), KC+ (rojo), P-. Contiene atranorina y ácido lecanórico, pero no ácidos grasos.

Distribución y Ecología. Europa, norte de Africa, Islas Canarias, oeste asiático e India.

Observaciones. Especie caracterizada por la presencia de isidios globosos a cilíndricos, y frecuentemente ramificados; no se han encontrado diferencias morfológicas externas con *P. cryptotiliacea*, por lo que su diferenciación sería verificable por el tamaño de las ascósporas y comparando secuencias de la región ITS nuclear del ADN ribosómico del hongo. *Parmelina tiliacea* también tiene una distribución más amplia que *P. cryptotiliacea* (ver cap. 1).

Especímenes examinados. Alemania: Bad Reichenhall MAF-Lich 17499, 17500, 17501, 17502, 17503, 17504, 17505, 17506; Baviera MAF-Lich 16485, 17509, 17510, 17511, 17512. Austria: Salzburgo MAF-Lich 16618, 17492, 17493, 17494, 17495, 17496, 17497, 17498. Eslovenia: Bled MAF-Lich 16619, 17484, 17485, 17486, 17487, 17488, 17489, 17490, 17491. España: Andalucía MAF-Lich 17309, 17310, 17311, 17312, 17313, 17314, 17315, 17316, 17317, 17318; Cantabria MAF-Lich 17375, 17376, 17377, 17378; Castilla-La Mancha MAF-Lich 16457, 17328, 17329, 17330, 17331, 17332; Castilla y León MAF-Lich 17346, 17347, 17348, 17349, 17350, 17351, 17352, 17353, 17354; Extremadura MAF-Lich 16465, 17333, 17334, 17335, 17336, 17337, 17338, 17339, 17340, 17341, 17342, 17343, 17344, 17345, 17355; Gran Canaria MAF-Lich 17277, 17278, 17279, 17280, 17281, 17282, 17283, 17284, 17285, 17286; Islas Baleares MAF-Lich 16466, , 17401, 17402, 17043, 17404, 17405, 17406; La Palma MAF-Lich 16469, 17231, 17232, 17233, 17234, 17235, 17236, 17237, 17238; Madrid MAF-Lich 16452, 16467, 17356, 17357, 17358, 17359, 17360, 17361, 17362, 17363, 17364, 17365, 17366; 16462; 17379, 17380, 17381; Navarra MAF-Lich 17382, 17383; Tenerife MAF-Lich 17239, 17240, 17241, 17242, 17243, 17244, 17244, 17245, 17246, 17248, 17248; Valencia MAF-Lich 17391, 17392, 17393, 17394, 17395, 17396, 17397, 17398, 17399, 17400. Italia: Cerdeña MAF-Lich 17408, 17409, 17410, 17411, 17412, 17413, 17415, 17416; Friuli-Venecia-Julia MAF-Lich 17474, 17475, 17476, 17477, 17478, 17479, 17480, 17481; Lombardía MAF-Lich 17455, 17456, 17457, 17458, 17459, 17460, 17461, 17462, 17463; Toscana MAF-Lich 17440, 17441, 17442, 17443, 17444, 17445, 17446, 17447, 17448, 17449. Francia: Auvernia MAF-Lich 17418, 17419, 17420, 17421; Provence-Alpes-Côte d'Azur MAF-Lich 16464, 17417. Grecia: Isla Thasos B600183598, B600183667, B600183986, B600186705; Isla de Samotracia B600184168, B600185102, B600185118, B600186947. Marruecos: Mequinez-Tafilalet MAF-Lich 17306, 16468, 16486, 17297, 17298, 17299, 17300, 17301, 17302, 17303, 17304, 17305; Rabat MAF-Lich 17296; Tánger MAF-Lich 17308; Taza MAF-Lich 17307. Portugal: Braganza MAF-Lich 15243, 15350. Reino Unido: Gales MAF17528, 17529, 17530,

17531; Noroeste Inglaterra MAF-Lich 17535, 17536, 17537, 17538, 17539. Suecia: MAF-Lich 17548, 17549, 17550, 17551, 17552, 17553, 17554, 17555, 17556, 17557. Suiza: Neuchâtel MAF-Lich 17422, 17423, 17424, 17425, 17426, 17427, 17428, 17429, 17430. Túnez: Jendouba MAF-Lich 16458, 17407. Turquía: Çanakale: MAF-Lich 17513, 17514; Eskisehir MAF-Lich 17516, 17517, 17518, 17519, 17520, 17521, 17522, 17523, 17524, 17525, 17526; Uludaj MAF-Lich 16456.

Parmelina yalungana Zahlbr.
Hedwigia 74: 206. 1934.

Syn. *Parmelia yalungana* Zahlbruckner

Tipo: China: Provincia de Sichuan. Montañas entre los ríos Litang y Yalung, entre Muli Gomba y Baurong y Wa-Erh-Dje, sobre Picea, alt. 4250 m., Jul. 1928, J.F. Rock 16720 (W).

Descripción. Talo folioso, adpreso débilmente a la corteza en los extremos, de color gris mineral pálido; lóbulos sublineares a alargados, ramificados dicotómicamente, con extremos de los lóbulos truncados, 1-4 mm de ancho, márgenes más o menos paralelos, divergentes y ciliados; superficie superior débilmente brillante, sin máculas, ligeramente agrietada; médula blanca; superficie inferior de color negro, alta densidad de rizinas negras, simples, y 0.5-1.5 mm de longitud. Isidios y soredios ausentes. Apotecios frecuentes y adpresos, hasta 3.5 mm de diámetro, ocasionalmente con rizinas. Ascas con 8 ascósporas elipsoidales a subglobosas, 6.3-10 x 3.8-6.5 μm . Picnidios poco frecuentes.

Química. Corteza superior K⁺ (amarillo); médula K⁻, C⁺ (rojo), KC⁺ (rojo). Contiene ácido lecanorico y ácido stictico.

Distribución y Ecología. Este de Asia y Alaska. Bosques lluviosos hipermarítimos y muy fríos.

Observaciones. Especie de morfología completamente diferente al resto de especies de *Parmelina* por la forma y ramificación de sus lóbulos. Anteriormente había sido considerada como *P. quercina* por no presentar tampoco máculas, pero de la cual se diferencia por la forma y tamaño de los lóbulos, así como por su distribución geográfica.

Especímenes examinados. Alaska: P. R. Nelson 07-804B, T. Spribille & F. Fernandez s.n.

4.5 Discusión

La consideración de *Myelochroa* como un género distinto de *Parmelina* ya se había establecido con anterioridad. La presencia de triterpenos en la médula de las especies de *Myelochroa* (Elix & Hale 1987) fue el carácter más influyente para distinguirlo de *Parmelina*, además de otros como el tamaño de las ascósporas, forma de los conidios, presencia de cilios en las axilas de los lóbulos, y distribución geográfica. Los caracteres moleculares apoyan su separación como dos taxones distintos pero filogenéticamente próximos, y han ayudado a reorganizar las especies que pertenecen a estos linajes (Blanco *et al.* 2006, Argüello *et al.* 2007, Crespo *et al.* 2007, Crespo *et al.* 2010a, b). Con la actual delimitación de especies para ambos géneros, observamos que dicha diferenciación se mantiene, aunque algunos de los caracteres mencionados no son del todo fiables para diferenciar especies de ambos géneros (color de la médula, tamaño de lóbulos).

La composición química de la médula es el principal carácter diferencial entre ambos géneros. Las especies de *Parmelina* presentan generalmente ácido lecanórico, que confiere una coloración blanca a la médula; ninguna especie de *Myelochroa* presenta este ácido, por el contrario, son los triterpenos los componentes más frecuentes y los que le dan una coloración amarillenta a la médula (Elix & Hale 1987, Park *et al.* 1990, Brodo *et al.* 2002, Divakar & Upreti 2005). Otro de los caracteres diferenciales es la distribución geográfica, el cual ya se discutió en el capítulo III.

La dimensión de las ascósporas y forma de los conidios no son caracteres diferenciales. La recopilación de datos acerca del tamaño de las ascósporas muestra que *Myelochroa* tiene un rango ligeramente más amplio que *Parmelina*, llegando a tener algunas de sus especies (*M. crassata*, *M. irrugans*) ascósporas más grandes, sin embargo otras especies poseen ascósporas de tamaño similar a las que encontramos en *Parmelina* (*M. amagiensis*, *M. denegans* o *M. galbina*), por lo que este carácter no sería útil taxonómicamente. Una diferencia parcial estaría dada por la ultraestructura de la pared de la ascóspora, en *Myelochroa* se diferencian cuatro capas, mientras que en *Parmelina* solo se aprecian tres (Ferencova 2012). Aunque en el presente estudio no se hicieron estudios de los conidios, la descripción que se tiene de los tamaños y formas muestra que existe poca diferenciación entre ambos géneros, en *Parmelina* son cilíndricos y subfusiformes mientras que en *Myelochroa* son cilíndricos y bifusiformes (Elix & Hale 1987).

Algunas especies de *Myelochroa* comparten caracteres similares a *Parmelina*. Pese a la diferenciación química de la médula, algunas especies presentan caracteres, como el color

blanco de la médula (*M. hayachinensis*) o la reacción negativa de la médula al KOH (*M. nothofagi*), similares en *Parmelina* que podrían confundir la identificación del género. Sin embargo, la descripción en conjunto de los caracteres macromorfológicos, químicos y geográficos permite diferenciar ambos géneros. A nivel microscópico, la anatomía del apotecio tampoco muestra diferencias fácilmente apreciables. Ambos géneros poseen apotecios lecanorinos con presencia de un excípulo talino y un excípulo propio, este último característico del apotecio lecanorino tipo parmeliaceo (Crespo *et al.* 2001, Ferencova 2012). Sin embargo, Ferencova (2012) encuentra una diferencia en las células que componen el excípulo propio del ascocarpo, resaltando que en *Myelochroa* la capa hialina y la capa media son más estrechas que en *Parmelina*.

Parmelina es un género con un número reducido de especies, cuya distribución se restringe al hemisferio norte. Desde la descripción del género por Hale (1974) hasta el presente estudio, diferentes especies que inicialmente fueron descritas como *Parmelina* han sido transferidas a otros géneros como *Canomaculina*, *Myelochroa*, *Parmelinella*, *Parmelinopsis*, *Parmotremopsis* (Elix & Hale 1987), y *Austroparmelina* (Crespo *et al.* 2010a).

El uso de marcadores moleculares ha permitido la delimitación y descripción de nuevas especies de *Parmelina* (Argüello *et al.* 2007, Núñez-Zapata *et al.* 2011, Nelson *et al.* 2012). Estas especies tienen predominantemente caracteres morfológicos y químicos en común, diferenciándose entre ellas principalmente por la presencia de estructuras como máculas o isidios, así como en la distribución geográfica y ecológica. La única excepción a la caracterización química la constituye *P. gyrophorica* que presenta ácido girofórico en la médula, aunque este ácido es un tridépsido relacionado con el ácido lecanórico (White & James 1985, Elix *et al.* 1987, Orange *et al.* 2001).

La clave taxonómica presentada en este estudio pretende facilitar la identificación de especies basada solo en caracteres morfológicos, ecológicos y geográficos. Sin embargo, hoy en día se hace necesario complementar dicha información con marcadores moleculares, los cuales podrían delimitar especies o desvelar nuevas especies crípticas.

DISCUSIÓN

GENERAL

GENERAL

DISCUSSION

Marcadores moleculares y variabilidad genética

Los diversos estudios moleculares llevados a cabo en la presente tesis se basan en la variabilidad genética que presentan los diferentes loci. Sin embargo, no todos los marcadores proporcionan la misma información, y el empleo de unos u otros suele depender de los objetivos concretos que se persigan en un trabajo. Para nuestros estudios se han utilizado cinco marcadores, los cuales se diferencian en dos grupos, el primero conformado por las regiones ITS y EFA1- α , que presentan mayor número de sitios polimórficos, sitios parsimónicamente informativos, y mayor diversidad nucleotídica; y el segundo conformado por las regiones nuLSU, mtLSU y mtSSU, que pese a tener un mayor número de pares de bases, son regiones con menor variabilidad genética (Tabla 12). Todos fueron utilizados en estudios filogenéticos pero solo tres de ellos (ITS, mtLSU y EFA1- α) fueron utilizados en estudios poblacionales.

En líquenes parmelioides, diversos estudios filogenéticos han utilizado mayoritariamente la combinación de las regiones ITS, nuLSU y mtSSU (Blanco *et al.* 2004a, 2005, 2006, Divakar *et al.* 2006, 2010a, b, Amo de Paz *et al.* 2010a, b) para establecer el grado de parentesco entre géneros y para diferenciar especies dentro de los géneros. Sin embargo en *Parmelina* estos marcadores, aunque diferencian especies, no llegan a resolver las relaciones entre ellas (Fig. 18), solo asociaron especies filogenéticamente próximas dejando sin esclarecer el resto de relaciones. Esta falta de resolución posiblemente se deba a la poca variabilidad genética que presentan las regiones nuLSU y mtSSU (Tabla 12) en *Parmelina*, lo que ocurre igualmente con la región mtLSU, a pesar de que esta región ha sido recomendada para estudios de variabilidad infraespecífica y niveles sistemáticos inferiores en hongos liquenizados (Printzen 2002).

Por otro lado, en *Parmelina* el ITS ha mostrado mayor variabilidad genética que nuLSU, mtLSU y mtSSU, con un número mayor de sitios polimórficos y parsimónicamente informativos. Nuestros resultados apoyan la propuesta de su uso como marcador universal de hongos (Bellemain *et al.* 2010, Schoch *et al.* 2012) aunque algunos autores sugieren la utilización en paralelo de otros marcadores ya que no ha mostrado la misma resolución en todos los grupos (Nilsson *et al.* 2008, Sadowska-Des *et al.* 2013).

La región EFA1- α también presenta una alta variabilidad en *Parmelina*, aunque nunca se había utilizado en parmelioides para estudios filogenéticos. Su utilidad filogenética ya se conocía para otros grupos de hongos liquenizados e.g. *Mycoblastus* (Mycoblastaceae, Ascomycota; Spribille *et al.* 2011) y *Lobaria* (Lobariaceae, Ascomycota; Cornejo & Scheidegger 2010), así

como otros organismos (Roger *et al.* 1999, Jordal 2002, Helgason *et al.* 2003), aunque siempre en combinación con otras regiones como ITS, MCM7 o RPB2.

Otras regiones de DNA (RPB1 y MCM7) que se están utilizando recientemente en filogenia (Crespo *et al.* 2007, 2010b, Leavitt *et al.* 2011, Lumbsch & Wirtz 2011), ya que presentan mayor o similar variabilidad que el ITS, son difícilmente amplificables en *Parmelina* con los actuales protocolos y primers, por lo que no se han empleado en este trabajo.

En genética de poblaciones, los análisis de polimorfismos (por ejemplo RFLP, AFLP o microsatélites) y secuencias de ADN han ido reemplazando a las técnicas basadas en polimorfismos de enzimas debido a su mayor sensibilidad, fácil reproducción, carácter haploide, y herencia uniparental en el caso de marcadores mitocondriales (Ouborg *et al.* 1999, Hajibabaei *et al.* 2007). En nuestro caso, utilizamos secuencias de ADN ya que encontramos suficiente variabilidad para explorar la estructura genética de *P. tiliacea* y determinar las relaciones filogenéticas. Este tipo de estudios requieren marcadores que presenten una gran diversidad intraespecífica, razón por la cual se seleccionaron las regiones ITS y EFA que además ya habían sido utilizadas en otros estudios poblacionales de líquenes (Werth & Sork 2008, Geml *et al.* 2010, Fernández *et al.* 2011); estas regiones amplificaron con facilidad y no se detectó la presencia de secuencias parálogas, aunque esta última característica ha sido observada en la región EFA de otros organismos (*Apis mellifera*, Danforth & Ji 1998). La región mtLSU también ha sido utilizada en estudios poblacionales (Printzen & Ekman 2002, Fernández *et al.* 2011), y dada su fácil amplificación también fue incluida en nuestros estudios. Esta región produjo una estructura genética más simple que las generadas por las regiones ITS y EFA (Cap. II: Fig. 12), diferenciando los clados principales de *P. tiliacea*, y consolidando la separación de *P. pastillifera* como un taxón derivado al combinarse con las otras dos regiones.

Especies crípticas

¿Qué es y qué no es una especie críptica? La definición de especies crípticas hace referencia a aquellos linajes que son, o han sido, clasificados como una sola especie nominal, debido a que al menos superficialmente son indistinguibles (Bickford *et al.* 2007, Crespo & Lumbsch 2010). Algunos autores lo consideran sinónimo de especies hermanas (*sibling species*) aunque éste término es más utilizado cuando los taxones implicados muestran una ascendencia común (Knowlton 1986, Crespo & Pérez Ortega 2009). Las herramientas moleculares son las que han permitido conocer esta biodiversidad oculta, y que se refleja en más de un marcador genético

(Colborn *et al.* 2001, Dawson & Jacobs 2001, Amato *et al.* 2007); algunos autores han sugerido la existencia de linajes crípticos a partir de árboles filogenéticos de un solo marcador (Hebert *et al.* 2007, Arup & Sandler Berlin 2011, Del-Prado *et al.* 2011), aunque esto podría considerarse intuitivo mas no definitivo.

Distintos árboles filogenéticos donde se describen especies crípticas muestran no solo la relación distante entre taxones sino también un camino evolutivo distinto (Molina *et al.* 2004, 2011b, Argüello *et al.* 2007, Divakar *et al.* 2005a, 2010b, Spribille *et al.* 2011). Esto también se refleja en nuestros estudios de *P. cryptotiliacea* (Fig. 19, Capítulo I) donde, además de emparentarse con otras especies (*P. quercina* y *P. yalungana*), muestra una ascendencia totalmente distinta a la que siguió *P. tiliacea*. La pertenencia a un linaje distinto podría constituir un carácter adicional para diferenciar especies crípticas, pero siempre basado en árboles de especies y no en árboles de genes.

Teniendo en cuenta el número de especies crípticas que han sido descritas en los últimos años sólo en líquenes parmelioides (Molina *et al.* 2004, 2011a, b, Argüello *et al.* 2007, Divakar *et al.* 2005a, 2010b, Núñez-Zapata *et al.* 2011) podemos inferir que existe un significativo número de especies de hongos ocultas dentro de las especies tradicionalmente reconocidas bajo los caracteres fenotípicos (MSC). Aunque en algunos casos los estudios moleculares han verificado las hipótesis tradicionales para separar especies, al día de hoy cada vez más estudios muestran que nuestra actual interpretación de los caracteres morfológicos (y químicos) es inadecuada para caracterizar con precisión la biodiversidad (Crespo & Lumsch 2010, Lumsch & Leavitt 2011).

El caso de *P. cryptotiliacea* plantea además una nueva incógnita acerca del material identificado como *P. tiliacea* en las colecciones científicas, principalmente en la región central de la Península Ibérica donde es posible encontrar ambas especies creciendo en el mismo hábitat. Por los materiales analizados hasta el momento, parece que *P. cryptotiliacea* tiene un área notablemente restringida en la Península Ibérica, pero esto debe confirmarse con un muestreo más amplio. La dificultad de amplificar regiones de ADN en especímenes de *Parmelina* con más de 8 años de antigüedad ha limitado nuestro estudio al material fresco colectado durante el desarrollo de la presente investigación, por lo que se espera que posteriores estudios y recolecciones ayuden a delimitar mejor el área geográfica de *P. cryptotiliacea*.

El reconocimiento de especies crípticas está planteando en la actualidad la necesidad de una revisión profunda de la estimación de la diversidad y taxonomía en hongos liquenizados.

Existen aproximadamente más de 16000 hongos liquenizados en el mundo (Feuerer & Hawksworth 2007, Kirk *et al.* 2008, Lumsch & Leavitt 2011), sin embargo el reconocimiento de nuevas especies crípticas, tal como apuntan los estudios detallados realizados en algunos grupos, incrementaría esta cifra. Al margen de los números, los estudios moleculares realizados hasta la fecha indican que la identificación basada sólo en caracteres morfológicos y químicos es insuficiente (Crespo & Lumsch 2010), siendo los marcadores moleculares, de momento, la vía más fiable para el descubrimiento y diferenciación de nuevo linajes, es decir de nuevas especies crípticas.

Patrones biogeográficos

La distribución geográfica parece haber jugado un papel importante en la diversificación de *Parmelina*. En la actualidad es un género del hemisferio Norte, con su mayor representación en Europa y norte de África y que se ha extendido hacia el subcontinente indio, este de Asia y oeste de Norte América. A nivel de género, muestra una clara diferencia con *Myelochroa*, su grupo hermano, que presenta una distribución mundial más amplia, aunque con marcada presencia en el continente asiático (Hale 1976b, Elix 1994, Park 1990, Brodo *et al.* 2001, Divakar *et al.* 2001a, Wang *et al.* 2001, Marcelli & Canêz 2008, Jayalal *et al.* 2012). Nuestros estudios sugieren un posible evento de vicarianza entre estos dos géneros a finales del Oligoceno, constituyendo un claro ejemplo de divergencia genética asociada a la separación geográfica. Pocos estudios en líquenes han comparado la distribución geográfica de especies de dos géneros filogenéticamente tan próximos; en líquenes parmelioides sólo existe un estudio entre *Remototrachyna* y *Bulbothrix* (Divakar *et al.* 2010b) que trata de asociar su diferenciación genética a la distribución geográfica de ambos géneros, pero sin resultados concluyentes por la amplia distribución y dispersión de sus especies. En otros líquenes parmelioides se están describiendo nuevos géneros apoyados no sólo en datos moleculares, sino también con respaldo de los caracteres geográficos, algunos ejemplos lo constituyen *Nipponoparmelia*, *Emodomelanelia* (Crespo *et al.* 2010b), y *Montanelia* (Divakar *et al.* 2012).

A nivel de especies, las descripciones de *P. coleae* (Argüello *et al.* 2007) y *P. yalungana* (Nelson *et al.* 2012) muestran que la separación geográfica parece guardar estrecha relación con la diferenciación de especies. Nuestros resultados sugieren eventos de vicarianza durante el Mioceno que conllevaron a una evolución en paralelo entre las especies americanas y euroasiáticas. Otros estudios son necesarios para determinar qué factores influyeron en esta divergencia de linajes, sin embargo este tipo de disyunción de taxones filogenéticamente

próximos entre Norteamérica y el continente euroasiático también ha sido observado en plantas (Nie *et al.* 2005, Hohmann *et al.* 2006, Guzmán & Vargas 2009) y durante distintas etapas del Cenozoico (Wen & Ickert-Bond 2009, Mao *et al.* 2010).

En algunos grupos de líquenes se está demostrando que especies consideradas con amplia distribución, realmente encubren a otro taxón distinto, posiblemente críptico como en el caso de *Leptogium furfuraceum* y *L. pseudofurfuraceum* (Otálora *et al.* 2010). En *Parmelina*, el ejemplo más claro lo constituye *P. quercina*, la cual era considerada de amplia distribución (Culberson 1961, Hale 1976b); sin embargo la descripción de *P. coleae* y *P. yalungana*, desveladas como especies crípticas independientes con distribución geográfica propia, ha reducido su actual distribución descartando su presencia en Norteamérica y quedando por confirmar su presencia en Asia. Algunos ejemplos en líquenes parmelioides lo constituyen *Melanelixia californica* (Divakar *et al.* 2010a) y *Parmelia mayi* (Molina *et al.* 2011b) que se separan molecular y geográficamente de las especies *M. glabra* y *P. saxatilis*, respectivamente, donde antes estaban incluidas. Otros estudios sin embargo, sí apoyan la existencia de especies de amplia distribución como *Cetraria aculeata* (Fernandez *et al.* 2011), *Flavocetraria cucullata* y *F. nivalis* (Geml *et al.* 2010), *Parmelia sulcata* (Molina *et al.* 2011b) o *Rhizocarpon geographicum* (Roca-Valiente 2013).

Distintos estudios en poblaciones de líquenes muestran cierto grado de asociación entre la geografía y la estructura genética como es el caso de *Cetraria aculeata* (Fernández *et al.* 2011) o *Lobaria pulmonaria* (Walser *et al.* 2005, Widmer *et al.* 2012). Sin embargo, no es solo el carácter geográfico el que modela una distribución geográfica, este viene asociado muy estrechamente, y fácilmente se confunde, con los caracteres ecológicos como la temperatura, humedad, exposición a la luz, y disponibilidad de sustratos adecuados (MacFarlane & Kershaw 1978, Kershaw 1985, Armstrong 1988, Kappen 1988, Shirazi *et al.* 1996, Canters *et al.* 1991). Estos factores ecológicos también han mostrado tener influencia en la estructura genética de algunos líquenes como *Xanthoria parietina* (Lindblom & Ekman 2006, 2007) o *Hypogymnia physodes* (Mattson *et al.* 2009). En *Parmelina*, los trabajos de Dobson & Hawksworth (1987), Argüello *et al.* (2007), Nelson *et al.* (2012) y nuestro estudio poblacional de *P. tiliacea* y *P. pastillifera* muestran que las condiciones ecológicas y climáticas –asociadas al área geográfica– han influido en la diferenciación de especies.

Perspectivas futuras

Al finalizar la redacción del presente manuscrito, aún quedan preguntas acerca de la historia evolutiva de *Parmelina*. Los análisis llevados a cabo con los cinco marcadores moleculares utilizados en nuestros estudios nos han dado una aproximación al proceso evolutivo que siguió este linaje, cómo divergieron sus especies, cómo se están diferenciando sus poblaciones y qué factores están influyendo en su estructuración. Sin embargo creemos que esta historia aún está inconclusa.

La presencia de *P. yalungana* en Rusia y China, así como la observación de especímenes de *Parmelina* en el Museo Nacional de Naturaleza y Ciencias de Japón con unos caracteres morfológicos distintos (Ana Crespo, comm. pers, marzo 2013) sugieren la posibilidad de encontrar otros linajes de *Parmelina* en el continente asiático. De la misma forma, también queda pendiente la incorporación de secuencias de ADN de *P. gyrophorica*, y determinar con qué taxones está más emparentado.

El uso de otros marcadores moleculares (MCM7, RPB1 o microsatélites) podría también ser útil para corroborar nuestros planteamientos filogenéticos, así como profundizar los estudios de la estructura genética de *P. tiliacea*. Además esto podría complementarse con el estudio molecular de los fotobiontes para evaluar su biodiversidad y variabilidad, que aún es desconocido en líquenes parmelioides; en este sentido nuestro grupo de investigación ya ha tomado la iniciativa. Los diversos procesos de interacción genética que pueden existir entre los hongos liquenizados y sus respectivos fotobiontes, y los procesos evolutivos y biogeográficos que involucren a ambos simbioses podrían mejorar nuestro entendimiento sobre estos organismos y su proceso de diferenciación.

Nuestros estudios de *Parmelina* se realizaron buscando diferenciaciones a nivel morfológico y molecular; sin embargo, dada la importancia de los microclimas en la distribución y diferenciación de líquenes, puede que algunas de las respuestas que buscamos se encuentren analizando el nicho ecológico. Estudios en una área geográfica reducida podrían ayudarnos a caracterizar las diferencias ecológicas entre *P. tiliacea* y *P. cryptotiliacea*, de las cuales sabemos solamente que son especies simpátricas en la región central de la Península Ibérica. También se hace necesario intensificar la recolección de estos taxones, principalmente para determinar el área geográfica que ocupa *P. cryptotiliacea*. En este sentido nuestro grupo de investigación ya está realizando nuevos muestreos.

Por otro lado, la inclusión de algunas especies de *Myelochroa* a nuestro estudio también ha generado curiosidad acerca de lo que pasa filogenéticamente en este grupo hermano de *Parmelina*. *Myelochroa* es un género que comprende aproximadamente 25 especies cuya distribución mundial es más amplia que en *Parmelina*, llegando incluso a estar presente en el hemisferio sur. Dentro de este género aún no se han profundizado los estudios filogenéticos ni la delimitación de sus especies, desconociéndose la existencia - o no - de especies crípticas, o si existe congruencia entre los caracteres moleculares y los morfoquímicos. La identificación actual de sus especies está basada en caracteres morfológicos y químicos, que han mostrado ser insuficientes en otros grupos. También sería interesante analizar los patrones de migración, dispersión o colonización que han seguido algunas de sus especies, como por ejemplo *M. aurulenta*, corroborando si se trata de una especie de amplia distribución o si se esconde algún linaje críptico.

CONCLUSIONES



CONCLUSIONS

- El concepto de especie utilizado en la presente tesis muestra que la combinación de caracteres morfológicos, moleculares, químicos, geográficos y ecológicos delimitan con precisión los taxones, y permite desvelar especies crípticas.
- *Parmelina cryptotiliacea* es una especie críptica, morfológicamente similar a *P. tiliacea* pero con diferente composición génica (ITS, mtLSU y EFA), con distribución restringida a la región central de la Península Ibérica y derivada de un linaje distinto.
- Refrendamos la posición filogenética de dos especies, recientemente descritas, que anteriormente se incluían dentro de *P. quercina*. *Parmelina coleae* –con distribución en el oeste mediterráneo de Norteamérica – es el linaje más próximo a las especies isidiadas europeas *P. tiliacea* y *P. pastillifera*, mientras que *P. yalungana*, del noroeste de Norteamérica lo es de *P. quercina*.
- No todas las especies de *Parmelina* forman clados monofiléticos. *Parmelina tiliacea* y *P. atricha* son especies parafiléticas, que dieron lugar a *P. pastillifera* y *P. carporrhizans*, respectivamente.
- La estructura genética interna de *P. tiliacea* muestra que está conformada por tres conjuntos de haplotipos (clusters), cuya diferenciación genética tiene cierto grado de influencia climática y geográfica. Uno de estos grupos (T3) está restringido al área perimediterránea.
- *Parmelina pastillifera* es una especie derivada de *P. tiliacea*, su proceso de diferenciación es muy reciente y posiblemente inacabado, pero muestra claras diferencias moleculares, morfológicas y distintos requerimientos ecológicos.
- *Parmelina* es un género que comprende nueve especies, con distribución en el hemisferio norte, y cuyo género más próximo es *Myelochroa*, del cual se diferencia principalmente por caracteres químicos y geográficos.
- *Parmelina* se separó de *Myelochroa* en el Mioceno, y sus principales eventos de divergencia y especiación ocurrieron en Europa desde donde debieron colonizar otras regiones como el este de Asia y oeste de Norteamérica.
- La combinación de caracteres morfológicos, ecológicos y geográficos permite identificar y separar las especies de *Parmelina* conocidas hasta hoy. La mayor dificultad la constituyen *P. tiliacea* y *P. cryptotiliacea* que son especies simpátricas en la región central de la Península Ibérica y, que si se encuentran estériles, requieren el uso de marcadores moleculares. Quedan por establecer las relaciones filogenéticas y la delimitación precisa de *P. gyrophorica*.

- The species concept used in this thesis shows that a combination characters (morphological, molecular, chemical, geographical and ecological) provides a better solution for delimiting taxa in this group of lichenized fungi.
- *Parmelina cryptotiliacea* is a cryptic species, morphologically similar to *P. tiliacea* but with a different genetic composition (ITS, mtLSU and EFA), and restricted to the central region of the Iberian Peninsula.
- *Parmelina coleae* – with a distribution in the western Mediterranean in North America – is the nearest lineage to the European species *P. tiliacea* and *P. pastillifera*; whereas *P. yalungana* is the nearest lineage to *P. quercina*.
- While most of the traditionally circumscribed *Parmelina* species form monophyletic clusters, *Parmelina tiliacea* and *P. atricha* are paraphyletic, their descendants including *P. pastillifera* and *P. carporrhizans*, respectively.
- The internal genetic structure of *P. tiliacea* consists of three internal clusters whose genetic differentiation has some degree of geographical and environmental influence. Only one of these clades (T3) shows a clear preference for the environmental conditions of the peri-mediterranean area.
- *Parmelina pastillifera* is a species most probably derived from *P. tiliacea*. Its differentiation is very recent and possibly incomplete, although it shows clear morphological differences and has different ecological requirements.
- *Parmelina* is a genus present only in the northern hemisphere. It currently comprises nine species that differ primarily in their molecular, chemical and geographical characteristics. *Myelochroa* is the closest relative.
- *Parmelina* is a genus that appeared in the Miocene. Its main divergence and speciation events occurred in Europe with subsequent colonization of other regions such as East Asia and western North America.
- Morphological, ecological and geographic characters were sufficient to identify and largely separate the *Parmelina* species known to date. The greatest difficulty is presented by *P. tiliacea* and *P. cryptotiliacea* which are sympatric in the central region of the Iberian Peninsula.

BIBLIOGRAFÍA

LITERATURE

CITED

-
- Amato A., Kooistra W. H. C. F., Ghiron J. H. L., Mann D. G., Pröschold T. & Montresor M. 2007. Reproductive isolation among sympatric cryptic species in marine diatoms. *Protist* 158: 193-207.
- Amo de Paz G., Lumbsch H. T., Cubas P., Elix J. A., & Crespo A. 2010a. The genus *Karoowia* (Parmeliaceae, Ascomycota) includes unrelated clades nested within *Xanthoparmelia*. *Australian Systematic Botany* 23: 173–184.
- Amo de Paz G., Lumbsch H. T., Cubas P., Elix J. A. & Crespo A. 2010b. The morphologically deviating genera *Omphalodiella* and *Placoparmelia* belong to *Xanthoparmelia* (Parmeliaceae). *The Bryologist* 113: 376–386.
- Amo de Paz G., Cubas P., Divakar P. K., Lumbsch H. T. & Crespo A. 2011. Origin and diversification of major clades in parmelioid lichens (Parmeliaceae, Ascomycota) during the Paleogene Inferred by bayesian analysis. *PLoS ONE* 6(12), e28161. doi:10.1371/journal.pone.002816.
- Amo de Paz G., Cubas P., Crespo A., Elix J. A. & Lumbsch H. T. 2012. Transoceanic dispersal and subsequent diversification on separate continents shaped diversity of the *Xanthoparmelia pulla* group (Ascomycota). *PLoS ONE* 7(6): e39683
- Armstrong R. A. 1988. Substrate colonization, growth and competition, pp 3-16. In M. Galun (ed.), *Hand-book of Lichenology*, Vol. II. CRC Press: Boca Raton, Florida.
- Aptroop A., Schumm F. & Caceres M. 2012. Six new species of *Pirenula* from the tropics. *Lichenologist* 44: 611–618.
- Argüello A., Del Prado R., Cubas P. & Crespo A. 2007 *Parmelina quercina* (Parmeliaceae, Lecanorales) includes four phylogenetically supported morphospecies. *Biological Journal of the Linnean Society* 91: 455-467.
- Arnerup J., Högborg N. & Thor G. 2004. Phylogenetic analysis of multiple loci reveal the population structure within *Letharia* in the Caucasus and Morocco. *Mycological Research* 108: 311-316.
- Arup U. & Grube M. 1998. Molecular systematics of *Lecanora* subgenus *Placodium*. *Lichenologist* 30: 415–25.
- Arup U. & Sandler Berlin E. 2011. A taxonomic study of *Melanelixia fuliginosa* in Europe. *The Lichenologist* 43: 89-97.

-
- Avise J. C. 2009. Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of Biogeography* 36: 3–15.
- Avise J. C., Arnold J., Martin Ball R., Bermingham E., Lamb T., Neigel J. E., Reeb C. & Saunders N. C. 1987. Intraespecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 18: 489–522.
- Awasthi D. D. 2007. A compendium of the macrolichens from India, Nepal and Sri Lanka. DehraDun: Bishen Singh & Mahendra Pal Singh.
- Baldwin B. G. & Sanderson M. J. 1998. Age and rate of diversification of the Hawaiian silversword alliance (Compositae). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 9402–9406.
- Bandelt H. J., Forster P., Sykes B. C. & Richards M. B. 1995. Mitochondrial portraits of human population using median networks. *Genetics* 141: 743-53.
- Barkman J. J. 1958. *Phytosociology and ecology of cryptogamic epiphytes*. Assen, Netherlands.
- Barreno E & Pérez-Ortega S. 2003. *Líquenes de la Reserva Natural Integral de Muniellos, Asturias*. Oviedo, Consejería de Medio Ambiente, Ordenación del Territorio e Infraestructura del Principado de Asturias y KRK ediciones.
- Barrón E. & Diéguez C. 2001. Estudio macroflorístico del Mioceno Inferior lacustre de la Cuenca de Rubielos de Mora (Teruel, España). *Boletín Geológico y Minero* 112: 13-56.
- Bellemain E., Carlsen T., Brochmann C., Coissac E., Taberlet P. & Kausserud H. 2010. ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an *in silico* approach reveals potential PCR biases. *BMC Microbiology* 10:189.
- Benatti M. N. 2012. *Canoparmelia cinerascens* belongs in the genus *Parmelinella* (Parmeliaceae, lichenized Ascomycota). *Opuscula Philolichenum* 11: 26-30.
- Bickford D., Lohman D. J., Sodhi N. S., Ng P. K. L., Meier K., Winker K., Ingram K. K. & Das I. 2007. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology and Evolution* 22: 148-155.
- Blanco O. 2004. Filogenia de *Parmelia* s. lat. (Parmeliaceae, Lecanorales) basada en caracteres moleculares. Análisis comparado con los caracteres morfológicos. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid, Madrid.

-
- Blanco O., Crespo A., Elix J. A., Hawksworth D. L. & Lumbsch H. T. 2004a. A new classification of parmelioid lichens containing Xanthoparmelia-type lichenan (Ascomycota: Lecanorales) based on morphological and molecular evidence. *Taxon* 53: 959–975.
- Blanco O., Crespo A., Divakar P. K., Esslinger T., Hawksworth D. L. & Lumbsch H. T. 2004b. *Melanelixia* and *Melanohalea*, two new genera segregated from *Melanelia* (Parmeliaceae) based on molecular and morphological data. *Mycological Research* 108: 873-884.
- Blanco O., Crespo A., Divakar P. K., Elix J. A. & Lumbsch H. T. 2005. Molecular phylogeny of parmotreoid lichens (Ascomycota, Parmeliaceae). *Mycologia* 97: 150-159.
- Blanco O., Crespo A., Ree R. H. & Lumbsch H. T. 2006. Major clades of parmelioid lichens (Parmeliaceae, Ascomycota) and the evolution of their morphological and chemical diversity. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 39: 52-69.
- Bollback J. P. 2006. SIMMAP: Stochastic character mapping of discrete traits on phylogenies. *BMC Bioinformatics* 7: 88.
- Brodo I. M., Sharnoff S. D. & Sharnoff S. 2001. *Lichens of North America*. New Haven (CT): Yale University Press.
- Bruch A., Uhl D. & Mosbrugger V. 2007. Miocene climate in Europe - patterns and evolution. A first synthesis of NECLIME. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 253: 1-7.
- Buckley T. R., Arensburger P., Simon C. & Chambers G. K. 2002. Combined data, Bayesian phylogenetics, and the origin of the New Zealand cicada genera. *Systematic Biology* 51: 4-18.
- Buschbom J. 2007 Migration between continents: geographical structure and long-distance gene flow in *Porpidia flavicunda* (lichen-forming Ascomycota). *Molecular Ecology* 9: 1835-1846.
- Canters K. J., Scholler H., Ott S. & Jahns H. M. 1991. Microclimatic influences on lichen distribution and community development. *Lichenologist* 23: 237-252.
- Clauzade G. & Roux C. 1985 Likenoj de okcidenta Europo, ilustrita determinlibro. *Bull. Soc. Bot. Centre-Ouest, nouv. série* 7: 1-893.

-
- Clerc P. & Truong C. 2008. The non-soresidate and non-isidiate *Parmelina* species (lichenized ascomycetes, Parmeliaceae) in Switzerland. *Parmelina atricha* (Nyl.) P. Clerc reinstated in the European lichen flora. *Sauteria* 15: 175-194.
- Colborn J., Crabtree R. E., Shaklee J. B., Pfeiler E. & Bowenb. W. 2001. The evolutionary enigma of bonefishes (*Albula spp.*): cryptic species and ancient separations in a globally distributed shorefish. *Evolution* 55: 807–820.
- Corander J. & Marttinen P. 2006. Bayesian identification of admixture events using multi-locus molecular markers. *Molecular Ecology* 15: 2833-2843.
- Corander J. & Tang J. 2007. Bayesian analysis of population structure based on linked molecular information. *Mathematical Biosciences* 205: 19-31.
- Corander J., Waldmann P. & Sillanpää M. 2003. Bayesian analysis of genetic differentiation between populations. *Genetics* 163: 367–374.
- Cornejo C. & Scheidegger C. 2010. *Lobaria macaronesica sp. nov.*, and the phylogeny of *Lobaria* sect. *Lobaria* (Lobariaceae) in Macaronesia. *The Bryologist* 113: 590–604.
- Coyne J. A. & Orr H. A. 2004. *Speciation*. Sunderland, Massachusetts: Sinauer.
- Crespo A. & Cubero O. F. 1998. A molecular approach to the circumscription and evaluation of some genera segregated from *Parmelia* s. lat. *Lichenologist* 30: 369-380.
- Crespo A. & Perez-Ortega S. 2009. Cryptic species and species pairs in lichens: A discussion on the relationship between molecular phylogenies and morphological characters. *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 66: 71-81.
- Crespo A. & Lumbsch H. T. 2010. Cryptic species in lichen-forming fungi. *IMA Fungus* 1: 167–170.
- Crespo A., Manrique E., Barreno E. & Serriñá E. 1977. Valoración de la contaminación atmosférica del área urbana de Madrid mediante bioindicadores (líquenes epífitos). *Anales del Instituto Botánico Cavanilles* 34: 71-94.
- Crespo A., Bridge P. D., Hawksworth D. L., Grube M. & Cubero O. F. 1999. Comparison of rRNA genotype frequencies of *Parmelia sulcata* from long established and recolonizing sites following sulphur dioxide amelioration. *Plant Systematics and Evolution* 217: 177–183.

-
- Crespo A., Blanco O. & Hawksworth D. L. 2001. The potential of mitochondrial DNA for establishing phylogeny and stabilising generic concepts in the parmelioid lichens. *Taxon* 50: 807-819.
- Crespo A., Divakar P. K., Argüello A., Gasca C. & Hawksworth D. L. 2004. Molecular studies on *Punctelia* species in the Iberian Peninsula, with an emphasis on specimens newly colonizing Madrid. *Lichenologist* 36: 299-308.
- Crespo A., Lumbsch H. T., Mattsson J. E., Blanco O., Divakar P. K., Articus K., Wiklund E., Bawingan P. A. & Wedin M. 2007. Testing morphology-based hypotheses of phylogenetic relationships in Parmeliaceae (Ascomycota) using three ribosomal markers and the nuclear RPB1 gene. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 44: 812–824.
- Crespo A., Ferencova Z., Perez-Ortega S., Elix J. A. & Divakar P. K. 2010a. *Austroparmelina*, a new Australasian lineage in parmelioid lichens (Parmeliaceae, Ascomycota). *Systematics and Biodiversity* 8: 209-221.
- Crespo A., Kauff F., Divakar P. K., Amo de Paz G., Argüello A., et al. 2010b. Phylogenetic generic classification of parmelioid lichens (Parmeliaceae, Ascomycota) based on molecular, morphological and chemical evidence. *Taxon* 59: 1735–1753.
- Culberson W. L. 1961. The *Parmelia quercina* group in North America. *American Journal of Botany* 48: 168–174.
- Culberson C. F. 1972. Improved conditions and new data for the identification of lichen products by a standardized thin-layer chromatographic method. *Journal of Chromatography* 72: 113-125.
- Danforth B. N. & Ji S. 1998. Elongation factor-1 α occurs as two copies in bees: implications for phylogenetic analysis of EF-1 α sequences in insects. *Molecular Biology and Evolution* 15: 225–235.
- Davydov E. A., Peršoh D. & Rambold G. 2010. The systematic position of *Lasallia caroliniana* (Tuck.) Davydov, Peršoh & Rambold comb. nova and considerations on the generic concept of *Lasallia* (Umbilicariaceae, Ascomycota). *Mycological Progress* 9: 261-266.
- Dawson M. N. & Jacobs D. K. 2001. Molecular evidence for cryptic species of *Aurelia aurita* (Cnidaria, Scyphozoa). *The Biological Bulletin* 200: 92–96.

-
- De Queiroz K. 2005. A unified concept of species and its consequences for the future of taxonomy. *Proceedings of the California Academy of Sciences* 56: 196-215.
- De Queiroz K. 2007. Species concepts and species delimitation. *Systematic Biology* 56: 879-886.
- DePriest P. T. 2004. Early molecular investigations of lichen-forming symbionts: 1986–2001*. *Annual Review of Microbiology* 58: 273–301.
- Del-Prado R., Cubas P., Lumbsch H. T., Divakar P. K., Blanco O., Amo de Paz G., 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.
- Del-Prado R., Divakar P. K. & Crespo A. 2011. Using genetic distances in addition to ITS molecular phylogeny to identify potential species in the *Parmotrema reticulatum* complex: a case study. *Lichenologist* 43: 569–583.
- Diaz-Guerra D. & Manrique E. 1984. Sustancias liquenicas en taxones de la provincia de Madrid, *Evernia prunastri* (L.) Ach. y *Parmelina tiliacea* (Hoffm.) Hale. *Lazaroa* 6: 267-268.
- Divakar P. K. & Upreti D. K. 2005. *Parmelioid lichens in India (A Revisionary Study)*. Dehra Dun: Bishen Singh and Mahendra Pal Singh.
- Divakar P. K., Upreti D. K. & Elix J. A. 2001a. New species and new records in the lichen family Parmeliaceae (Ascomycota) from India. *Mycotaxon* 80: 355-362.
- Divakar P. K., Upreti D. K., Sinha G. P. & Elix J. A. 2001b. A new species of *Myelochroa* and new records in the lichen family Parmeliaceae (Ascomycota) from Sikkim, India. *Mycotaxon* 79: 247-251.
- Divakar P. K., Molina M. C., Lumbsch H. T. & Crespo A. 2005a. *Parmelina barrenoae*, a new lichen species related to *Parmelia sulcata* (Parmeliaceae) based on molecular and morphological data. *Lichenologist* 37: 37-46.
- Divakar P. K., Blanco O., Hawksworth D. L. & Crespo A. 2005b. Molecular phylogenetic studies on the *Parmotrema reticulatum* (syn. *Rimelia reticulata*) complex, including the confirmation of *P. pseudoreticulatum* as a distinct species. *Lichenologist* 37: 55–65.

-
- Divakar P. K., Crespo A., Blanco O. & Lumbsch H. T. 2006. Phylogenetic significance of morphological characters in the tropical *Hypotrachyna* clade of parmelioid lichens (Parmeliaceae, Ascomycota). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 40: 448–458.
- Divakar P. K., Amo de Paz G., del Prado R., Esslinger T. L. & Crespo A. 2007. Upper cortex anatomy corroborates phylogenetic hypothesis in species of *Physconia* (Ascomycota, Lecanoromycetes). *Mycological Research* 111: 1311–1320.
- Divakar P. K., Figueras G., Hladun N. L. & Crespo A. 2010a. Molecular phylogenetic studies reveal an undescribed species within the North American concept of *Melanelixia glabra* (Parmeliaceae). *Fungal Diversity* 42: 47-55.
- Divakar P. K., Lumbsch H. T., Ferencova Z., Del-Prado R. & Crespo A. 2010b. *Remototrachyna*, a new tropical lineage in hypotrachynoid lichens (Parmeliaceae, Ascomycota) originated in India. *American Journal of Botany* 97: 579-590.
- Divakar P. K., Del-Prado R., Lumbsch H. T., Wedin M., Esslinger T. L., Leavitt S. D. & Crespo A. 2012. Diversification of the newly recognized lichen-forming fungal lineage *Montanelia* (Parmeliaceae, Ascomycota) and its relation to key geological and climatic events. *American Journal of Botany* 99: 2014-2026.
- Dobson F. S. & Hawksworth D. L. 1976. *Parmelia pastillifera* (Harm.) Schub. and Klem. and *P. tiliacea* (Hoffm.) Ach. in the British Isles. *Lichenologist* 8: 47-59.
- Drummond A. J. & Rambaut A. 2007. Beast: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* 7: 214.
- Drummond A. J., Suchard M. A., Xie D. & Rambaut A. 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution* <http://mbe.oxfordjournals.org>
- Earl D. A. & vonHoldt B. M. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* 4: 359-361.
- Edwards S. V., Liu L. & Pearl D. K. 2007. High-resolution species trees without concatenation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 5936-5941.
- Elith J., Steven J., Phillips S. J., Hastie T., Dudík M., Chee Y. E. & Yates. C. J. 2011. A statistical explanation of MaxEnt for ecologists. *Diversity and Distributions* 17: 43-57.

-
- Elix J. A. 1993. Progress in the generic delimitation of *Parmelia* sensu lato lichens (Ascomycotina: Parmeliaceae) and a synoptic key to the Parmeliaceae. *The Bryologist* 96: 359-383.
- Elix J. A. 1994. Lichens: Lecanorales 2, Parmeliaceae. *Flora of Australia* 55: 66-67.
- Elix J. A. 1996. New species in the lichen family Parmeliaceae (Ascomycotina) from Australasia and Oceania. *Mycotaxon* 59: 407-417.
- Elix J. A. & Hale M. E. 1987. *Canomaculina*, *Myelochroa*, *Parmelinella*, *Parmelinopsis* y *Parmotremopsis*, five new genera in the Parmeliaceae (lichenized Ascomycotina). *Mycotaxon* 29: 233-244.
- Elix J. A. & Ernst-Russell K. D. 1993. A catalogue of standardized thin layer chromatographic data and biosynthetic relationships for lichen substances. 2nd edn. Canberra: Australian National University.
- Elix J. A., Johnston J. & Parker J. L. 1987. A catalogue of standardized thin layer: chromatographic data and biosynthetic relationships for lichen substances. Canberra: Australian National University.
- Eriksson O. E. & Winka K. 1997. Supraordinal taxa of Ascomycota. *Myconet* 1:1-16.
- Evanno G., Regnaut S. & Goudet J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14:2611-2620.
- Ewens W. J. 1979. *Mathematical population genetics*. Springer Berlin.
- Excoffier L., Smouse P. E., & Quattro J. M. 1992 Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.
- Excoffier L., Laval G. & Schneider S. 2005. ARLEQUIN ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary bioinformatics* 1: 47-50.
- Fauquette S., Suc J.-P., Bertini A., Popescu S.-M., Warny S., Taoufiq N. B., Perez Villa M.-J., Chikhi H., Feddi N., Subally D., Clauzon G. & Ferrier J. 2006. How much did climate force the Messinian salinity crisis? Quantified climatic conditions from pollen records in the Mediterranean region. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 238: 281-301.

-
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Ferencova Z. 2012. Estudio morfológico comparado de los caracteres generativos en relación con linajes monofiléticos de la familia Parmeliaceae (Lecanorales, Ascomycota). Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- Fernández-Mendoza F., Domaschke S., García M. A., Jordan P., Martín M. P. & Printzen C. 2011. Population structure of mycobionts and photobionts of the widespread lichen *Cetraria aculeata*. *Molecular Ecology* 20: 1208-1232.
- Feuerer T. & Thell A. 2002. *Parmelia ernstiae*, a new macrolichen from Germany. *Mitteilungen aus dem Institut der Allgemeine Botanik, Hamburg* 30-32: 49-60.
- Feuerer T. & Hawksworth D. L. 2007. Biodiversity of lichens, including a world-wide analysis of checklist data based on Takhtajan's floristic regions. *Biodiversity and Conservation* 16: 85-98.
- Flakus A., Elix J. A., Rodriguez P. & Kukwa M. 2011. New species and records of *Lepraria* (Stereocaulaceae, lichenized Ascomycota) from South America. *Lichenologist* 43: 57-66.
- Flakus A., Rodriguez P. & Kukwa M. 2012. A new species and new combinations and records of *Hypotrachyna* and *Remototrachyna* from Bolivia. *Mycotaxon* 119: 157-166.
- Fu Y.-X. & Li W.-H. 1993. Statistical test of neutrality of mutations. *Genetics* 133: 693-709.
- Gardes M. & Bruns T. D. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2: 113-118.
- Gargas A., DePriest P. T., Grube M. & Tehler A. 1995. Multiple origins of lichen symbioses in fungi suggested by SSU rDNA phylogeny. *Science* 268: 1492-1495.
- Geiser D. M., Klich M. A., Frisvad J. C., Peterson S. W., Varga J. & Samson R. A. 2007. The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. *Studies in Mycology* 59: 1-10.
- Geml J., Kauff F., Brochmann C. & Taylor D. L. 2010. Surviving climate changes: high genetic diversity and transoceanic gene flow in two arctic-alpine lichens, *Flavocetraria cucullata* and *F. nivalis* (Parmeliaceae, Ascomycota). *Journal of Biogeography* 37: 1529-1542.

-
- Givnish T. J., Barfuss M. H. J., Van Ee B., Riina R., Schulte K., Horres R., Gonsiska P. A., et al . 2011. Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in Bromeliaceae: Insights from an eightlocus plastid phylogeny. *American Journal of Botany* 98: 872-895.
- Grivet D. & Petit R. J. 2002. Phylogeography of the common ivy (*Hedera sp.*) in Europe: genetic differentiation through space and time. *Molecular Ecology* 11: 1351-1362.
- Grube M. & Kroken S. 2000. Molecular approaches and the concept of species and species complexes in lichenized fungi. *Mycological Research* 104: 1284-1294.
- Guillot G. 2005. Geneland: a computer package for landscape genetics. Contributed R package. <http://www2.imm.dtu.dk/gigu/Geneland/Geneland-Doc.pdf>.
- Guzmán B. & Vargas P. 2009. Historical biogeography and character evolution of Cistaceae (Malvales) based on analysis of plastid *rbcl* and *trnL-trnF* sequences. *Organisms, Diversity & Evolution* 9: 83–99.
- Hale M. E. 1965. A monograph of *Parmelia* subgenus *Amphigymnia*. *Contributions from the United States National Herbarium* 36: 193–358.
- Hale M. E. 1974. *Bulbothrix*, *Parmelina*, *Relicina*, and *Xanthoparmelia*, four new genera in the Parmeliaceae. *Phytologia* 28: 479–490.
- Hale M. E. 1975. A revision of the lichen genus *Hypotrachyna* (Parmeliaceae) in tropical America. *Smithsonian Contributions to Botany* 25: 1–73.
- Hale M. E. 1976a. A monograph of the lichen genus *Bulbothrix* Hale (Parmeliaceae). *Smithsonian Contributions to Botany* 32: 1-29.
- Hale M. E. 1976b. A monograph of the lichen genus *Parmelina* Hale (Parmeliaceae). *Smithsonian Contributions to Botany* 33: 1-60.
- Hale M. E. 1976c. A monograph of the lichen genus *Pseudoparmelia* Lyngé (Parmeliaceae). *Smithsonian Contributions to Botany* 31: 1–62.
- Hale M. E. 1976d. Synopsis of a new lichen genus *Everniastrum* Hale (Parmeliaceae). *Mycotaxon* 3: 345–353.
- Hale M. E. 1986. *Flavoparmelia*, a new genus in the lichen family Parmeliaceae (Ascomycotina). *Mycotaxon* 25: 603–605.

-
- Hale M. E. 1990. A synopsis of the lichen genus *Xanthoparmelia* (Vainio) Hale (Ascomycotina: Parmeliaceae). *Smithsonian Contributions to Botany* 74: 1–250.
- Hale M. E. & Kurokawa S. 1964. Studies on *Parmelia* subgenus *Parmelia*. *Contributions from the United States National Herbarium* 36: 121–191.
- Hall T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95–98.
- Harris A. J. & Xiang Q.-Y. 2009. Estimating ancestral distributions of lineages with uncertain sister groups: A statistical approach to dispersal – vicariance analysis and a case using *Aesculus* L. (Sapindaceae) including fossils. *Journal of Systematics and Evolution* 47: 349–368.
- Hasegawa M., Kishino H. & Yano T. 1985. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution* 22: 160–174.
- Hawksworth D. L. 2005. Lifestyle choices in lichen-forming and lichen-dwelling fungi. *Mycological Research* 109: 135–136.
- Hebert P. D. N., Penton E. H., Burns J. M., Janzen D. H. & Hallwachs W. 2004. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 14812–14817.
- Helgason T., Watson I. J. & Young J. P. W. 2003. Phylogeny of the Glomerales and Diversisporales (Fungi: Glomeromycota) from actin and elongation factor 1-alpha sequences. *FEMS Microbiology Letters* 229: 127–132.
- Hennig W. 1962. Veränderungen am phylogenetischen System der Insekten seit 1953. Pp. 29–42 in: Sachtleben, H. (comp.), Bericht über die 9. Wanderversammlung Deutscher Entomologen, 6.–8. Juni 1961 in Berlin. Tagungsberichte Deutsche Akademie der Landwirtschaftswissenschaften 45. Berlin: Deutsche Akademie der Landwirtschaftswissenschaften.
- Henning W. 1966. *Phylogenetic Systematics*. Univ. Illinois Press, Urbana.
- Hey J. & Machado C. A. 2003. The study of structured populations—new hope for a difficult and divided science. *Nature Reviews Genetics* 4: 535–543.

-
- Hibbett D. S., Binder M., Bischoff J. F., Blackwell M., et al. 2007. A higher level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research* 111: 509-547.
- Hickerson M. J., Carstens B. C., Cavender-Bares J., Crandall K. A., Graham C. H., Johnson J. B., Rissler L., Victoriano P. F. & Yoder A. D. 2010. Phylogeography's past, present, and future: 10 years after *Avice* 2000. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 54: 291–301.
- Hijmans R. J., Cameron S. E., Parra J. L., Jones P. G. & Jarvis A. 2005. Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology* 25: 1965-1978.
- Hillis D. M. & Bull J. J. 1993. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Systematic Biology* 42: 182-192.
- Hoffmann G. F. 1784. *Enumeratio Lichenum*. Erlangen.
- Högberg N., Kroken S., Thor G. & Taylor J. W. 2002. Reproductive mode and genetic variation suggest a North American origin of European *Letharia vulpina*. *Molecular Ecology* 11: 1191-1196.
- Hohmann S., Kadereit J. W. & Kadereit G. 2006. Understanding Mediterranean-Californian disjunctions: molecular evidence from Chenopodiaceae-Betoideae. *Taxon* 55: 67-78.
- Honegger R. 1987. Isidium formation and the development of juvenile thalli in *Parmelia pastillifera* (Lecanorales, lichenized ascomycetes). *Botanica Helvetica* 97: 147-152.
- Hörandl E. 2006. Paraphyletic versus monophyletic taxa — evolutionary versus cladistic classifications. *Taxon* 55: 564–570.
- Hörandl E. & Stuessy T. F. 2010. Paraphyletic groups as natural units of biological classification. *Taxon* 59: 1641-1653.
- Hubisz M., Falush D., Stephens M. & Pritchard J. 2009. Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular Ecology Resources* 9: 1322-1332.
- Hudson R. R. 1983. Testing the constant-rate neutral model with protein sequence data. *Evolution* 37: 203-217.
- Huelsenbeck J. P., Rannala B. & Masly J. P. 2000. Accommodating phylogenetic uncertainty in evolutionary studies. *Science* 288: 2349-2350.

-
- Huelsenbeck J. P. & Bollback J. P. 2001 Empirical and hierarchical Bayesian estimation of ancestral states. *Systematic Biology* 50: 351–366.
- Huelsenbeck J. P. & Ronquist F. 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17: 754–755.
- Hur J.-S., Harada H., Oh S.-O., Lim K.-M., Kang E.-S., Mi Lee S., Kahng H.-Y., Kim H.-W., Jung J.-S. & Jin Koh Y. 2004. Distribution of Lichen Flora on South Korea. *Journal of Microbiology* 42: 163-167.
- Huson D. H. & Bryant D. 2006. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Molecular Biology and Evolution* 23: 254-267.
- Huson D. H., Rupp R. & Scornavacca C. 2010. Phylogenetic networks. Concepts, algorithms and applications. Cambridge University Press.
- Huzefa A. R., Schoch C. L., Hustad V. P., Shearer C. A. & Miller A. N. 2011. Testing the phylogenetic utility of MCM7 in the Ascomycota. *MycKeys* 1: 63–94.
- Ihaka R. & Gentleman R. 1996. R: a language for data analysis and graphics. *Journal of Computational and Graphical Statistics* 5: 299–314.
- James T. Y., Kauff F., Schoch C. L., Matheny P. B., Hofstetter V., Cox C. J., Celio G., Gueidan C., Fraker E., Miadlikowska J., et al. 2006. Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature* 443: 818–822.
- Jayalal U., Joshi S., Oh S.-O., Koh Y. J. & Hur J.-S. 2012. A taxonomic study of the genus *Myelochroa* in South Korea. *Mycobiology* 40: 217-224.
- Jiménez-Moreno G. & Suc J. P. 2007. Middle Miocene latitudinal climatic gradient in Western Europe: Evidence from pollen records. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 253: 224–241.
- Jiménez-Moreno G., Fauquette S. & Suc J. P. 2010. Miocene to Pliocene vegetation reconstruction and climate estimates in the Iberian Peninsula from pollen data. *Review of Paleobotany and Palinology* 162: 403–415.
- Johannesson H. S., Johannesson K. H. P. & Stenlid J. 2000. Development of primer sets to amplify fragments of conserved genes for use in population studies of the fungus *Daldinia loculata*. *Molecular Ecology Notes* 9: 375–377.

-
- Jordal B. H. 2002. Elongation Factor 1 α resolves the monophyly of the haplodiploid ambrosia beetles *Xyleborini* (Coleoptera: Curculionidae). *Insect Molecular Biology* 11: 453–465.
- Kappen L. 1988. Ecophysiological relationships in different climate regions, pp. 37-100. In M. Galun (ed.), *Hand-book of Lichenology*, Vol. II. CRC Press. Boca Raton, Florida.
- Kershaw. K. A. 1985. *Physiological Ecology of Lichens*. Cambridge University Press. Cambridge.
- Kirk P. M., Cannon P. F., David J. C. & Stalpers J. A. 2001. *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi*, 9th edn. CABI Publishing, Wallingford.
- Kirk P. M., Cannon P. F., Minter D. W. & Stalpers J. A. 2008. *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi*. 10th edn. Wallingford: CAB International.
- Knowlton N. 1986. Cryptic and sibling species among the decapod crustacean. *Journal of Crustacean Biology* 6: 356-363.
- Kubatko L. S., Carstens B. C. & Knowles L. L. 2009. STEM: species tree estimation using maximum likelihood for gene trees under coalescence. *Bioinformatics*. 25:971–973.
- Kurokawa S. 2003. *Checklist of Japanese lichens*. Tokyo: National Science Museum.
- Larget B. & Simon D. 1999. Markov chain Monte Carlo algorithms for the Bayesian analysis of phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 16: 750-759.
- Lawrey J. D., Lücking R., Sipman H. J. M., Chaves J. L., Redhead S. A., Bungartz F., Sikaroodi M & Gillevet P. M. 2009. High concentration of basidiolichens in a single family of agaricoid mushrooms (Basidiomycota: Agaricales: Hygrophoraceae). *Mycological research* 113: 1154-1171.
- Le Gac M., Hood M. E., Fournier E. & Giraud T. 2007. Phylogenetic evidence of host-specific cryptic species in the anther smut fungus. *Evolution* 61: 15–26.
- Leavitt S. D., Johnson L. & St Clair L. L. 2011. Species delimitation and evolution in morphologically and chemically diverse communities of the lichen-forming genus *Xanthoparmelia* (Parmeliaceae, Ascomycota) in western North America. *American Journal of Botany* 98: 175–188.
- Leavitt S. D., Esslinger T. L., Divakar P. K. & Lumbsch H. T. 2012. Miocene divergence, cryptic lineages, and contrasting distribution patterns in common camouflage lichen fungi (Parmeliaceae, Ascomycota). *Biological Journal of the Linnean Society* 107: 920–937.

-
- Li Q.-Q., Zhou S.-D., He X.-J., Yu Y., Zhang Y.-C. & Wei X.-Q. 2010. Phylogeny and biogeography of *Allium* (Amaryllidaceae: Allieae) based on nuclear ribosomal internal transcribed spacer and chloroplast rps16 sequences, focusing on the inclusion of species endemic to China. *Annals of Botany (Lond.)* 106: 709–733.
- Librado P. & Rozas J. 2009 DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
- Lindblom L. & Ekman S. 2006. Genetic variation and population differentiation in the lichen-forming ascomycete *Xanthoria parietina* on the island Storfosna, central Norway. *Molecular Ecology* 15: 1545–1559.
- Lindblom L. & Ekman S. 2007. New evidence corroborates population differentiation in *Xanthoria parietina*. *Lichenologist* 39: 259–271.
- Liška J., Palice Z., Dětinský R. & Vondrák J. 2006. Changes in distribution of rare and threatened lichens in the Czech Republic II. In *Central European Lichens: Diversity and Threat* (A. Lackovicova, A. Guttova, E. Lisicka & P. Lizon., eds): 241-258. Ithaca, New York: Mycotaxon Ltd.
- Liu G. & Leopold E. B. 1994. Climatic comparison of Miocene pollen floras from northern East-China and south-central Alaska, USA. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 108: 217–228.
- Lohtander K., Myllys L., Sundin R., Kallersjo M. & Tehler A. 1998. The species pair concept in the lichen *Dendrographa leucophaea* (Arthoniales) analyses based on ITS sequences. *The Bryologist* 101: 404-411.
- López de Heredia U., Carrión J. S., Jiménez P., Collada C. & Gil L. 2007. Molecular and palaeoecological evidence for multiple glacial refugia for evergreen oaks on the Iberian Peninsula. *Journal of Biogeography* 34: 1505–1517.
- Lowhoff S. H. J. J. 2009. *Parmelina* Hale. In: *The lichens of Great Britain and Ireland* (eds. Smith, C. W., Aptroot, A., Coppins, B. J., Fletcher, A., Gilbert, O. L., James, P. W. & Wolseley, P. A.), pp. 657-658. British Lichen Society.
- Lumbsch H. T. 2000. Phylogeny of filamentous ascomycetes. *Naturwissenschaften* 87: 335–42.
- Lumbsch T. H. & Leavitt S. D. 2011. Goodbye morphology? A paradigm shift in the delimitation of species in lichenized fungi. *Fungal Diversity* 50: 59-72.

-
- Lumbsch H. T. & Wirtz N. 2011. Phylogenetic relationships of the neuropogonoid core group in the genus *Usnea* (Ascomycota: Parmeliaceae). *Lichenologist* 43: 553–559.
- Lutzoni F. M. 1997. Phylogeny of lichen- and non-lichen-forming omphalinoid mushrooms and the utility of testing for combinability among multiple datasets. *Systematic Biology* 46: 373–406.
- Lutzoni F. M., Pagel M., Reeb V. 2001. Major fungal lineages are derived from lichen symbiotic ancestors. *Nature* 411: 937–940.
- MacFarlane J. D. & Kershaw K. A. 1978. Thermal sensitivity in lichens. *Science* 201: 739-741.
- Magallón S. 2010. Using fossils to break long branches in molecular dating: A comparison of relaxed clock applied to the origin of angiosperms. *Systematic Biology* 59: 384-399.
- Mangold A., Martín M. P., Lücking R. & Lumbsch H. T. 2008. Molecular phylogeny suggests synonymy of Thelotremaaceae within Graphidaceae (Ascomycota: Ostropales). *Taxon* 57: 476-486.
- Mao K., Hao G., Liu J., Adams R. P. & Milne R. I. 2010. Diversification and biogeography of *Juniperus* (Cupressaceae): variable diversification rates and multiple intercontinental dispersals. *New Phytologist* 188: 254–272.
- Marcelli M. P. & Canêz L. S. 2008. Novelties in Southern brazilian Parmeliaceae. *Mycotaxon* 105: 225-234.
- Martin D. P., Lemey P., Lott M., Moulton V., Posada D. & Lefevre P. 2010. RDP3: a flexible and fast computer program for analyzing recombination. *Bioinformatics* 26: 2462-2463.
- Mattsson J.-E. & Wedin M. 1998. Phylogeny of the Parmeliaceae—DNA data versus morphological data. *Lichenologist* 30: 463–472.
- Mattsson J.-E., Hansson A.-C. & Lindblom L. 2009. Genetic variation in relation to substratum preferences of *Hypogymnia physodes*. *Lichenologist* 41: 547–555.
- Mayden R. L. 1997. A hierarchy of species concepts: The denouement in the saga of the species problem. Pages 381-424 in *Species: The units of biodiversity* (M. F. Claridge, Dawah H. A. & Wilson M. R., eds.). Chapman and Hall, London.
- Mayr E. & Bock W. J. 2002. Classifications and other ordering systems. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 40: 169-194.

-
- Médail F. & Diadema K. 2009. Glacial refugia influence plant diversity patterns in the Mediterranean Basin. *Journal of Biogeography* 36: 1333-1345.
- Mende M., Biström O., Meichssner E. & Kölsch G. 2010. The aquatic leaf beetle *Macrolea mutica* (Coleoptera: Chrysomelidae) in Europe: Population structure, postglacial colonization and the signature of passive dispersal. *European Journal of Entomology* 107: 101-113.
- Meyers S. R. & Hinnov L. A. 2010. Northern Hemisphere glaciation and the evolution of Plio-Pleistocene climate noise. *Paleoceanography* 25: PA3207.
- Meyers S. & Liston A. 2004. The biogeography of *Plantago ovata* Forssk. (Plantaginaceae). Pp. 132 in: *Botany 2004, Scientific Meeting Abstracts, 31 Jul–5 Aug 2004*. Snowbird, Utah. <http://www.botany2004.org/>
- Miadlikowska J., Kauff F., Hofstetter V., Fraker E., Grube M., Hafellner J., Reeb V., Hodkinson B.P., Kukwa M., Lücking R., Hestmark G., Garcia-Otalora M., Rauhut A., Büdel B., Scheidegger C., Timdal E., Stenroos S., Brodo I., Perlmutter G.B., Ertz D., Diederich P., Lendemer J.C., Tripp E., Yahr R., May P., Gueidan C., Spatafora J.W., Schoch C., Arnold A.E., Robertson C. & Lutzoni F. 2006. New insights into classification and evolution of the Lecanoromycetes (Pezizomycotina, Ascomycota) from phylogenetic analyses of three ribosomal RNA and two protein-coding genes. *Mycologia* 98: 1088–1103.
- Miadlikowska J., Schoch C. L., Kageyama S. A., Molnar K., Lutzoni F. & McCune B. 2011. *Hypogymnia* phylogeny, including *Cavernularia*, reveals biogeographic structure. *The Bryologist* 114: 392–400.
- Molina M. C., Crespo A., Blanco O., Lumbsch H. T. & Hawksworth D. L. 2004. Phylogenetic relationships and species concepts in *Parmelia* s. str. (Parmeliaceae) inferred from nuclear ITS rDNA and beta-tubulin sequences. *Lichenologist* 36: 37-54.
- Molina M. C., Divakar P. K., Millanes A. M., Sanchez E., Del-Prado R., Hawksworth D. L. & Crespo A. 2011a. *Parmelia sulcata* (Ascomycota: Parmeliaceae), a sympatric monophyletic species complex. *Lichenologist* 43: 585–601.
- Molina M. C., Del-Prado R., Divakar P. K., Sanchez-Mata D. & Crespo A. 2011b. Another example of cryptic diversity in lichen-forming fungi: the new species *Parmelia mayi* (Ascomycota: Parmeliaceae). *Organisms Diversity & Evolution* 11: 331–342.

-
- Mücher C. A., Hennekens S. M., Bunce R. G. H., Schaminée J. H. J. & Schaepman M. E. 2009. Modelling the spatial distribution of Natura 2000 habitats across Europe. *Landscape and Urban Planning* 92: 148–159.
- Muggia L., Zellnig G., Rabensteiner J. & Grube M. 2010. Morphological and phylogenetic study of algal partners associated with the lichen-forming fungus *Tephromela atra* from the Mediterranean region. *Symbiosis* 51:149–160.
- Myllys L., Lohtander K., Kallersjö M. & Tehler A. 1999. Sequence insertions and ITS data provide congruent information on *Roccella canariensis* and *R. tuberculata* (Arthoniales, Euascomycetes) phylogeny. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 12: 295-309.
- Nash T. H. III. 2008. *Lichen Biology*. 2nd ed. Cambridge University Press, Cambridge.
- Nelsen M. P., Lücking R., Mbatchou J. S., Andrew C. J., Spielmann A. A., Lumbsch H. T. 2011. New insights into relationships of lichen-forming Dothideomycetes. *Fungal Diversity* 51: 155–62.
- Nie Z.-L., Wen J., Sun H. & Bartholomew B. 2005. Monophyly of *Kelloggia* Torrey ex benth. (Rubiaceae) and evolution of its intercontinental disjunction between western North America and eastern Asia. *American Journal of Botany* 92: 642–652.
- Nelson P. R., Kepler R., Walton J., Fankhauser J., Nelson L. & Li Song W. 2012. *Parmelina yalungana* resurrected and reported from Alaska, China and Russia. *The Bryologist* 115: 557-565.
- Nie Z.-L., Wen J., Sun H. & Bartholomew B. 2005. Monophyly of *Kelloggia* Torrey ex benth. (Rubiaceae) and evolution of its Intercontinental disjunction between western North America and Eastern Asia. *American Journal of Botany* 92: 642–652.
- Nilsson R. H., Kristiansson E., Ryberg M., Hallenberg N. & Larsson K.-H. 2008. Intraspecific ITS variability in the Kingdom Fungi as expressed in the international sequence databases and its implications for molecular species identification. *Evolutionary Bioinformatics* 4: 193–201.
- Nimis P. L. 1993. *The Lichens of Italy. An Annotated Catalogue*. [Monografia no. XII.] Torino: Museo Regionale di Scienze Naturali.
- Nylander J. A. A., Ronquist F., Huelsenbeck J. P. & Nieves-Aldrey J. L. 2004 Bayesian phylogenetic analysis of combined data. *Systematic Biology* 53: 47-67.

-
- Nylander J. A. A., Olsson U., Alström P. & Sanmartín I. 2008. Accounting for phylogenetic uncertainty in biogeography: a Bayesian approach to Dispersal–Vicariance Analysis of the thrushes (Aves: Turdus). *Systematic Biology* 57: 257–268.
- Núñez-Zapata J., Divakar P. K., Del-Prado R., Cubas P., Hawksworth D. L. & Crespo A. 2011. Conundrums in species concepts: the discovery of a new cryptic species segregated from *Parmelina tiliacea* (Ascomycota: Parmeliaceae). *Lichenologist* 43: 603–616.
- Oksanen J., Blanchet F. G., Kindt R., Legendre P., Minchin P. R., O'Hara R. B., Simpson G. L., Solymos P., Henry M., Stevens H. & Wagner H. 2012. *Vegan: Community Ecology Package*. R package version 2.0-5. <http://CRAN.R-project.org/package=vegan>
- Olalde M., Herrán A., Espinel S. & Goicoechea P. G. 2002. White oaks phylogeography in the Iberian Peninsula. *Forest Ecology and Management* 156: 89–102.
- Oliver J.C. 2008. AUGUST: inferring species trees while accounting for gene tree uncertainty. *Bioinformatics*. 24: 2932.
- Orange A., James P. W. & White F. J. 2001. *Microchemical Methods for the Identification of Lichens*. London: British Lichen Society.
- Otálora M. A. G., Martínez I., Aragon G. & Molina M. C. 2010. Phylogeography and divergence date estimates of a lichen species complex with a disjunct distribution pattern. *American Journal of Botany* 97: 216–223.
- Otálora M. A. G., Aragon G., Molina M. C. & Martínez I. 2011. Disentangling the *Collema-Leptogium* complex through a molecular phylogenetic study of the Collemataceae (Peltigerales, lichen-forming Ascomycota). *Mycologia* 102: 279–290.
- Otnyukova T. N., Stepanov N. V. & Elix J. A. 2009. Three new species of Parmeliaceae (Ascomycota) from Siberia. *Mycotaxon* 108: 249–256.
- Ouborg N. J., Piquot Y. & Van Groenendael J. M. 1999. Population genetics, molecular markers and the study of dispersal in plants. *Journal of Ecology* 87: 551–568.
- Page R. D. M. 1996. TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applied Biosciences* 12: 357–358.
- Park Y. S. 1990. The macrolichen flora of South Korea. *The briologist* 93: 105–160.

-
- Pearson L. C. 1969. Influence of temperature and humidity on distribution of lichens in a Minnesota bog. *Ecology* 50: 740-746.
- Petit R. J., Csaikl U. M., Bordács S., Burg K., Coart E., Cottrell J., van Dam B., Deans J. D., Glaz I., Dumolin-Lapègue S. et al. 2002a. Chloroplast DNA variation in European white oaks: phylogeography and patterns of diversity based on data from over 2600 populations. *Forest Ecology and Management* 156: 5-26.
- Petit R. J., Brewer S., Bordács S., Burg K., Cheddadi R., Coart E., Cottrell J., Csaikl U. M., van Dam B., Deans J. D. et al. 2002b. Identification of refugia and post-glacial colonisation routes of European white oaks based on chloroplast DNA and fossil pollen evidence. *Forest Ecology and Management* 156: 49-74.
- Phillips S. J., Dudik M. & Schapire R. E. 2004. A maximum entropy approach to species distribution modeling. In: *Proceedings of the 21st International Conference on Machine Learning*, pp. 655-662. ACM Press, New York.
- Phillips S. J., Anderson R. P. & Schapire R. E. 2006. Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecological Modelling* 190: 231-259.
- Piercey-Normore M. D. 2006. The lichen-forming ascomycete *Evernia mesomorpha* associates with multiple genotypes of *Trebouxia jamesii*. *New Phytologist* 169: 331-344.
- Piercey-Normore M. D. & Deduke C. 2011. Fungal farmers or algal escorts: lichen adaptation from the algal perspective. *Molecular Ecology* 20: 3708-3710.
- Pigg K. B., Ickert-Bond S. M. & Wen J. 2004. Anatomically preserved *Liquidambar* (Altingiaceae) from the Middle Miocene of Yakima Canyon, Washington State, USA and its biogeographic implications. *American Journal of Botany* 91: 499-509.
- Poelt J. 1969. *Bestimmungsschlüssel Europäischer Flechten*. J. Cramer, Lehre.
- Poelt J. & Vezda A. 1977. *Bestimmungsschlüssel Europäischer Flechten*. *Erganzungsheft I*. [Bibliotheca Lichenologica no. 9.] Vaduz: J. Cramer.
- Posada D. 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25: 1253-1256.

-
- Prieto M., Martinez I., Aragon G., Gueidan C. & Lutzoni F. 2012. Molecular phylogeny of *Heteroplacidium*, *Placidium*, and related catapyrenioid genera (Verrucariaceae, lichen-forming Ascomycota). *American Journal of Botany* 99: 23–35.
- Pringle A., Baker D. M., Platt J. L., Wares J. P., Latgé J. P. & Taylor J. W. 2005. Cryptic speciation in the cosmopolitan and clonal human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. *Evolution* 59: 1886–1899.
- Printzen C. 2002. Fungal specific primers for PCR amplification of mitochondrial LSU in lichens. *Molecular Ecology Notes* 2: 130-132.
- Printzen C. 2008 Uncharted terrain: the phylogeography of arctic and boreal lichens. *Plant Ecology & Diversity* 1: 265-271.
- Printzen C. & Ekman S. 2002. Genetic variability and its geographical distribution in the widely disjunct *Cavernularia hultenii*. *Lichenologist* 34: 101–111.
- Printzen C., Lumbsch H. T., Schmitt I. & Feige G. B. 1999. A study on the genetic variability of *Biatora helvola* Körb. ex Hellb. using RAPD markers. *Lichenologist* 31: 491-499.
- Printzen C., Ekman S. & Tønsberg T. 2003. Phylogeography of *Cavernularia hultenii*: evidence of slow genetic drift in a widely disjunct lichen. *Molecular Ecology* 12: 1473–1486.
- Pritchard, J. K., Stephens, M. & Donnelly, P. 2000 Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945–959.
- Pritchard J. K., Wena X. & Falush D. 2010 Documentation for structure software: Version 2.3. <http://pritch.bsd.uchicago.edu/structure.html>.
- Purvis O. W., Coppins B. J. & James P. W. 1993. Checklist of lichens of Great Britain and Ireland. British Lichen Society, London.
- Qian H & Ricklefs R. E. 2001. Diversity of temperate plants in east Asia. *Nature* 413: 129-130.
- Rambaut A. 2007. TreeEdit v.1.0a10. [computer program] <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/treededit/>.
- Rambaut A. 2009 FigTree v1.3.1. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh, Edinburgh.

-
- Rambaut A. & Drummond A. J. 2009. Tracer version 1.5 [computer program] <http://beast.bio.ed.ac.uk>.
- Ramstein G., Fluteau F. F., Besse J. & Joussaume S. 1997. Effect of orogeny, plate motion, and land-sea distribution on Eurasian climate change over the past 30 million years. *Nature* 286: 788–95.
- Rannala B. & Yang Z. 1996. Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference. *Journal of Molecular Evolution* 43: 304-311.
- Ree R. H. & Smith S. A. 2008. Maximum-likelihood inference of geographic range evolution by dispersal, local extinction, and cladogenesis. *Systematic Biology* 57: 4–14.
- Ree R. H., Moore B. R., Webb C. O. & Donoghue M. J. 2005. A likelihood framework for inferring the evolution of geographic range on phylogenetic trees. *Evolution* 59: 2299–2311.
- Rehner S. A. & Samuels G. J. 1994. Taxonomy and phylogeny of *Gliocladium* analyzed by large subunit ribosomal DNA sequences. *Mycol. Res.* 98:625-634.
- Richards R. A. 2010. *The Species Problem: A Philosophical Analysis*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Rieseberg L. & Brouillet L. 1994. Are many plant species paraphyletic?. *Taxon* 43: 21–32.
- Rivas Plata E. & Lumbsch H. T. 2011. Parallel evolution and phenotypic divergence in lichenized fungi: A case study in the lichen-forming fungal family Graphidaceae (Ascomycota: Lecanoromycetes: Ostropales). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 61: 45–63.
- Roca Valiente B. 2013. Estudio filogenético del grupo de *Rhizocarpon geographicum* (Líquenes, Rhizocarpaceae, Ascomycota). Análisis contrastado de los caracteres morfológicos y los patrones biogeográficos. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid, Madrid.
- Rodríguez F., Oliver J. F., Marin A. & Medina J. R. 1990. The general stochastic model of nucleotide substitution. *Journal of Theoretical Biology* 142: 485-501.
- Rodríguez-Sánchez F., Hampe A., Jordano P. & Arroyo J. 2010. Past tree range dynamics in the Iberian Peninsula inferred through phylogeography and palaeodistribution modelling: A review. *Review of Palaeobotany and Palynology* 162: 507–521.

-
- Roger A. J., Sandblom O., Doolittle W. F. & Philippe H. 1999. An evaluation of elongation factor 1a as a phylogenetic marker for eukaryotes. *Molecular Biology and Evolution* 16: 218–233.
- Romeike J., Friedl T., Helms G. & Ott S. 2002. Genetic diversity of algal and fungal partners in four species of *Umbilicaria* (lichenized ascomycetes) along a transect of the Antarctic Peninsula. *Molecular Biology and Evolution* 19: 1209–1217.
- Ronquist F. 1996. DIVA 1.1. User's Manual. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University. Available at <http://www.ebc.uu.se/systzoo/research/diva/diva.html>.
- Ronquist F. 1997. Dispersal-vicariance analysis: A new approach to the quantification of historical biogeography. *Systematic Biology* 46: 195–203.
- Saag L., Tõrra T., Saag A., Del-Prado R. & Randlane T. 2011. Phylogenetic relations of European shrubby taxa of the genus *Usnea*. *Lichenologist* 43: 427–444.
- Sadowska-Des A. D., Bálint M., Otte J. & Schmitt I. 2013. Assessing intraspecific diversity in a lichen-forming fungus and its green algal symbiont: Evaluation of eight molecular markers. *Fungal Ecology*. IN PRESS. <http://dx.doi.org/10.1016/j.funeco.2012.12.001>
- Sambrook J., Fritsch E. F. & Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd Ed. New York: Cold Spring Harbor laboratory Press.
- Sanmartín I. 2003. Dispersal vs. vicariance in the Mediterranean: historical biogeography of the Palearctic Pachydeminae (Coleoptera, Scarabaeoidea). *Journal of Biogeography* 30: 1883–1897.
- Schauer T. 1965. Ozeanische Flechten in Nordalenraum. *Portugaliae Acta Biologica (B)* 8: 17–229.
- Schmidt H. A., Strimmer K., Vingron M. & von Haeseler A. 2004. TREE-PUZZLE Version 5.2: maximum likelihood phylogenetic analysis using quartets and parallel computing. *Bioinformatics* 18: 502–504.
- Schmitt I., Crespo A., Divakar P. K., Frankhauser J. D., Herman-Sackett E., Kalb K., Nelsen M. P., Nelson N. A., Rivas-Plata E., Shimp A. D., Widhalm T., Lumbsch H. T. 2009. New primers for promising single-copy genes in fungal phylogenetics and systematics. *Persoonia* 23: 35–40.

-
- Schoch C. L., Crous P. W., Groenewald J. Z., Boehm E. W. A., Burgess T. I. et al. 2009. A class-wide phylogenetic assessment of Dothideomycetes. *Studies in Mycology* 64: 1–15.
- Schoch C. L., Seifert K. A., Huhndorf S., Robert V., Spouge J. L., André Levesque C., Wen Chen W. & Fungal Barcoding Consortium. 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: 6241-6246.
- Shaw A. J., Werner O. & Ros R. M. 2003. Intercontinental Mediterranean disjunct mosses: morphological and molecular patterns. *American Journal of Botany* 90: 540–550.
- Shimodaira H. & Hasegawa M. 1999. Multiple comparisons of log-likelihoods with applications to phylogenetic inference. *Molecular Biology and Evolution* 16: 1114-1116.
- Shirazi A. M., Muir P. S. & McCune B. 1996. Environmental factors influencing the distribution of the lichens *Lobaria oregana* and *L. pulmonaria*. *The Bryologist* 99: 12-18.
- Smith C. W., Aptroot A., Coppins B. J., Fletcher A., Gilbert O. L., James P. W. & Wolseley P. A. (eds). 2009. *The Lichens of Great Britain and Ireland*. British Lichen Society. 1046 pp.
- Šoun J., Vondrák J., Sjøchting U., Hrouzek P., Khodosovtsev A. & Arup U. 2011. Taxonomy and phylogeny of the *Caloplaca cerina* group in Europe. *Lichenologist* 43: 113–135.
- Spribile T., Klug B. & Mayrhofer H. 2011. A phylogenetic analysis of the boreal lichen *Mycoblastus sanguinarius* (Mycoblastaceae, lichenized Ascomycota) reveals cryptic clades correlated with fatty acid profiles. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 59: 603–614.
- Stamatakis A. 2006. RAxML-VI-HPC: Maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22: 2688 – 2690.
- Stamatakis A., Hoover P. & Rougemont J. 2008. A rapid bootstrap algorithm for the RAxML web-servers. *Systematic Biology* 75: 758-771.
- Strimmer K. & Rambaut A. 2002. Inferring confidence sets of possibly misspecified gene trees. *Proceedings of the Royal Society of London, Biological Sciences* 269: 137-142.
- Stuessy T. F. 2009. *Plant Taxonomy. The systematic evaluation of the comparative data*. 2^o Ed. Columbia Univ. Press, New York.

-
- Swofford D. L. 2003. PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.
- Taberlet P., Fumagalli L., Wust-Saucy A. G. & Cosson J. F. 1998. Comparative phylogeographic and postglacial colonization in Europe. *Molecular Ecology* 7: 453-464.
- Tajima F. 1983. Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics* 105: 437-460.
- Tajima F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585-595.
- Takamatsu S. & Matsuda A. 2004. Estimation of molecular clocks for ITS and 28S rDNA in Erysiphales. *Mycoscience* 45: 340-344.
- Taylor J. W., Jacobson D. J., Kroken S., Kasuga T., Geiser D. M., Hibbett D. S. & Fisher M. C. 2000. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genetics and Biology* 31: 21-32.
- Thell A., Stenroos S., Feuerer T., Kärnefelt I., Myllys L. & Hyvönen J. 2002. Phylogeny of cetrarioid lichens (Parmeliaceae) inferred from ITS and β -tubulin sequences, morphology, anatomy and secondary chemistry. *Mycological Progress* 1: 335-354.
- Thell A., Feuerer T., Kärnefelt I., Myllys L. & Stenroos S. 2004. Monophyletic groups within the Parmeliaceae identified by ITS rDNA, β -tubulin and GAPDH sequences. *Mycological Progress* 3: 297-314.
- Thell A., Feuerer T., Elix J. A. & Kärnefelt I. 2006. A contribution to the phylogeny and taxonomy of *Xanthoparmelia* (Ascomycota, Parmeliaceae). *Journal of the Hattori Botanical Laboratory* 100: 797-807.
- Thell A., Högnabba F., Elix J. A., Feuerer T., Kärnefelt I., Myllys L., Randle T., Saag A., Stenroos S., Ahti T. & Seaward M. 2009. Phylogeny of the cetrarioid core Parmeliaceae based on five genetic markers. *Lichenologist* 41: 489-511.
- Thompson J. D., Higgins D. G. & Gibson T. J. 1994 Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weigh matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680.

-
- Truong C., Bungartz F. & Clerc P. 2011. The lichen genus *Usnea* (Parmeliaceae) in the tropical Andes and the Galapagos: species with a red-orange cortical or subcortical pigmentation. *The Bryologist* 114: 477-503.
- Tiffney B. H. & Manchester S. R. 2001. The use of geological and paleontological evidence in evaluating plant phylogeographic hypotheses in the Northern Hemisphere Tertiary. *Int. Journal of Plant Sciences* 162: 3–17.
- Vilgalys R. & Hester M. 1990. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of Bacteriology* 172: 4238–4246.
- Wakeley J. 2008. *Coalescent Theory: An Introduction*. Roberts & Company Publishers.
- Walser J. C., Holderegger R., Gugerli F., Hoebee S. E. & Scheidegger C. 2005. Microsatellites reveal regional population differentiation and isolation in *Lobaria pulmonaria*, an epiphytic lichen. *Molecular Ecology* 14: 457–467.
- Wang S.-L., Chen J.-B. & Elix J. A. 2000. New species of Parmeliaceae (lichenized Ascomycotina) from China. *Mycotaxon* 76: 293-298.
- Wang S.-L., Chen J.-B. & Elix J. A. 2001. Two new species of the lichen genus *Myelochroa* (Parmeliaceae, Ascomycota) from China. *Mycotaxon* 77: 25-30.
- Wei J. C. 1991. *An enumeration of lichens in China*. Beijing: International Academic Publishers.
- Wen J. 1999. Evolution of eastern Asian and eastern North American disjunct distributions in flowering plants. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 30: 421-455.
- Wen J. & Ickert-Bond S. M. 2009. Evolution of the Madrean–Tethyan disjunctions and the North and South American amphitropical disjunctions in plants. *Journal of Systematics and Evolution* 47: 331–348.
- Werth S. & Sork V. L. 2008. Local genetic structure in a North American epiphytic lichen, *Ramalina menziesii* (Ramalinaceae). *American Journal of Botany* 95: 568-576.
- Werth S. 2010. Population genetics of lichen-forming fungi – a review. *Lichenologist* 42: 499–519.
- White F. J. & James P. W. 1985. A new guide to microchemical techniques for the identification of lichen substances. *British Lichen Society Bulletin* 57 (suppl.): 1-41.

-
- White T. J., Bruns T., Lee S. & Taylor J. W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (eds. Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White), pp. 315-322. New York: Academic Press.
- Widmer I., Dal Grande F., Excoffier L., Holderegger R., Keller C., Mikryukov V. S. & Scheidegger C. 2012. European phylogeography of the epiphytic lichen fungus *Lobaria pulmonaria* and its green algal symbiont. *Molecular Ecology* 21: 5827-5844.
- Wiens J. J. 1998. Combining data sets with different phylogenetic histories. *Systematic Biology* 47: 568-581.
- Williams C. B. & Tibell L. 2008. *Calicium sequoiae*, a new lichen species from north-western California, USA. *Lichenologist* 40: 185-194.
- Williams J. W., Post D. M., Cwynar L. C., Lotter A. F. & Levesque A. J. 2002. Rapid and widespread vegetation responses to past climate change in the North Atlantic region. *Geology* 30: 971-974.
- Wirth V. 1994. Checkliste der Flechten und flechtenbewohnenden Pilze Deutschlands – eine Arbeitshilfe.- *Stuttgarter Beiträge zur Naturkunde A* 517: 1-63.
- Wirtz N., Printzen C., Sancho L. G. & Lumbsch H. T. 2006. The phylogeny and classification of *Neuropogon* and *Usnea* (Parmeliaceae, Ascomycota) revisited. *Taxon* 55: 367-376.
- Yahr R., Vilgalys R. & DePriest P. T. 2006 Geographic variation in algal partners of *Cladonia subtenuis* (Cladoniaceae) highlights the dynamic nature of a lichen symbiosis. *New Phytologist* 171: 847-860.
- Yu Y., Harris A. J. & He X. 2010. S-DIVA (Statistical Dispersal –Vicariance Analysis): A tool for inferring biogeographic histories. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 56: 848–850.
- Zoller S., Scheidegger C. & Sperisen C. 1999. PCR primers for the amplification of mitochondrial small subunit ribosomal DNA of lichen-forming ascomycetes. *Lichenologist* 31: 511–516.
- Zwickl D. J. 2006. Genetic algorithm approaches for the phylogenetic analysis of large biological sequence datasets under the maximum likelihood criterion. Ph.D. dissertation. The University of Texas at Austin, Austin.

APÉNDICE



APPENDIX

APÉNDICE I. Localidades donde fueron colectados los distintos especímenes de *Parmelina* y *Myelochroa* que se utilizaron en los análisis moleculares. Se incluye el número de individuos recolectados, datos de localización, herbario y colectores.

Localidad	No indiv	Long.	Lat.	Herbarium	Colectores
<i>Parmelina atricha</i>					
Mérens-les-Vals, Hautes Pyrénées, Francia	1	1.82	42.11	MAF-Lich 15524	A. Argüello
La Preste, Pyrénées-Orientales, Francia	2	2.41	42.42	MAF-Lich 16634, 17559	A. Crespo, J. Nuñez-Zapata, N. Hladum & C. Ruibal
Espinavell, Gerona, España	1	2.39	42.38	MAF-Lich 17558	A. Crespo, J. Nuñez-Zapata, N. Hladum & C. Ruibal
<i>Parmelina carporrhizans</i>					
El Sauzal, Tenerife, Islas Canarias, España	1	16.42	28.45	MAF-Lich 16474	A. Crespo, P.K. Divakar, P. Cubas & A. Santo
Uludaj, Bursa, Turquía	1	29.03	40.13	MAF-Lich 16475	A. Crespo, P. K. Divakar, M. Candam & T. H. Lumbsch
Karadaj, Canakale, Turquía	1	26.42	40.15	MAF-Lich 16476	A. Crespo, P. K. Divakar, M. Candam & T. H. Lumbsch
Degollada de Besera, Gran Canaria, Islas Canarias, España	1	15.59	27.99	MAF-Lich 16477	A. Crespo, P.K. Divakar, P. Cubas & A. Santo
<i>Parmelina coleae</i>					
Lago Sonoma, California, EEUU	1	-122.49	38.10	MAF-Lich 16479	A. Crespo, P.K. Divakar, R. del Prado & F. Fernandez
Mendocino, California, EEUU	2	-122.91	39.25	MAF-Lich 16480, 16481	A. Crespo, P.K. Divakar, R. del Prado & F. Fernandez
<i>Parmelina cryptotiliacea</i>					
San Quintin, Castilla-La Mancha, España	1	-4.28	38.82	MAF-Lich 16449	A. Crespo, P.K. Divakar, P. Cubas & J. Nuñez-Zapata
El Pardo, Madrid, España	3			MAF-Lich 16450, 16451, 17562	A. Crespo & J. Nuñez-Zapata
P. N. Monfragüe, Cáceres, España	3	6.06	39.85	MAF-Lich 16453, 16454, 16455	H. T. Lumbsch, A. Green, P. K. Divakar & A. Argüello
Puertollano, Castilla-La Mancha, España	2	-3.84	38.67	MAF-Lich 16461, 17561	A. Crespo, P.K. Divakar, P. Cubas & J. Nuñez-Zapata
<i>Parmelina pastillifera</i>					
La Lomba, Cantabria, España	1	-4.30	43.02	MAF-Lich 16473	A. Crespo & J. Nuñez-Zapata
Saliencia, Principado de Asturias, España	1	-6.12	43.08	MAF-Lich 16472	S. Perez-Ortega
Puerto de Velarde, Navarra, España	7	-1.62	43.04	MAF-Lich 17384 - 17390	A. Crespo
Monte Amiatta, Toscana, Italia	4	11.60	42.90	MAF-Lich 17451 - 17454	J. Nuñez, M. Tretiach & T. Craighero
Fielis, Friuli-Venecia Julia, Italia	10	13.00	46.39	MAF-Lich 17464 - 17473	J. Nuñez-Zapata & F. Candotto
Camporosso in Valcanale, Friuli-Venecia Julia, Italia	2	13.53	46.51	MAF-Lich 17482 - 17483	J. Nuñez-Zapata & F. Candotto
Bad Reichenhall, Alta Baviera, Alemania	3	12.93	47.76	MAF-Lich 17507 - 17508	J. Nuñez-Zapata & F. Candotto
Maries, Isla Thasos, Grecia	1	24.62	40.68	B600183985	H. Sipman & T. Raus
Daphnes, Isla Samothraki, Grecia	1	25.55	40.51	B600185101	H. Sipman & T. Raus
Dumanli, Canakale, Turquía	2	26.88	40.28	MAF-Lich 16471; 17515	A. Crespo, P.K. Divakar, M. Candam & H.T. Lumbsch
Rhydlydan, Gales, Reino Unido	3	-3.47	53.04	MAF-Lich 17532 - 17534	J. Nuñez-Zapata & C. Ruibal
Bergen, Hordaland, Noruega	8	5.37	60.35	MAF-Lich 17540 - 17547	L. Lindblom
<i>Parmelina quercina</i>					
Tandir, Eskisehir, Turquía	1	30.69	39.92	MAF-Lich 16193	A. Crespo, P. K. Divakar, M. Candam & T. H. Lumbsch
Uludaj, Bursa, Turquía	1	29.03	40.13	MAF-Lich 16194	A. Crespo, P. K. Divakar, M. Candam & T. H. Lumbsch

Biga, Canakale, Turquía	1	27.08	40.21	MAF-Lich 16197	A. Crespo, P. K. Divakar, M. Candam & T. H. Lumbsch
San Quintin, Castilla-La Mancha, España	1	-4.28	38.82	MAF-Lich 17560	A. Crespo, P.K. Divakar, P. Cubas & J. Nuñez-Zapata
<i>Parmelina tiliacea</i>					
El Roque, La Palma, Islas Canarias, España	9	-15.83	28.74	MAF-Lich 16469; 17231 - 17238	A. Crespo, P.K. Divakar, P. Cubas & A. Santo
Degollada del Teno Alto, Tenerife, Islas Canarias, España	10	-15.86	28.34	MAF-Lich 17239 - 17248	A. Crespo, P.K. Divakar, P. Cubas & A. Santo
La Escalona, Tenerife, Islas Canarias, España	9	-16.67	28.12	MAF-Lich 17249 - 17257	A. Crespo, P.K. Divakar, P. Cubas & A. Santo
Degollada de la Becerra, Gran Canaria, Islas Canarias, España	10	-15.59	27.99	MAF-Lich 17258 - 17267	A. Crespo, P.K. Divakar, P. Cubas & A. Santo
Valleseco, Gran Canaria, Islas Canarias, España	10	-15.59	28.02	MAF-Lich 16482; 17268 - 17276	A. Crespo, P.K. Divakar, P. Cubas & A. Santo
San Mateo de Tenteniguada, Gran Canaria, Islas Canarias, España	10	-15.53	28.00	MAF-Lich 17277 - 17286	A. Crespo, P.K. Divakar, P. Cubas & A. Santo
Galdar, Gran Canaria, Islas Canarias, España	10	-15.51	28.09	MAF-Lich 16470; 17287 - 17295	A. Crespo, P.K. Divakar, P. Cubas & A. Santo
Rabat, Rabat-Salé-Zemmour-Zaer, Marruecos	1	-6.71	34.03	MAF-Lich 17296	Crespo, Divakar, Tahiri, Dahmani, Amo
Ifrane, Mequinez-Tafilalet, Marruecos	10	-5.33	33.63	MAF-Lich 16468; 17297 - 17305	A. Agudo
Mulay Idriss, Mequinez-Tafilalet, Marruecos	1	-5.48	34.03	MAF-Lich 17306	A. Crespo, P.K. Divakar, G. Tahiri, Dahmani, G. Amo
Ain Taoujdate, Taza-Alhucemas-Taunat, Marruecos	1	-5.24	33.92	MAF-Lich 16486	A. Crespo, P.K. Divakar, G. Tahiri, Dahmani, G. Amo
Taza, Taza-Alhucemas-Taunat, Marruecos	1	-4.28	34.12	MAF-Lich 17307	A. Crespo, P.K. Divakar, G. Tahiri, Dahmani, G. Amo
Chauen, Tánger-Tetuán, Marruecos	1	-5.36	35.14	MAF-Lich 17308	A. Crespo, P.K. Divakar, G. Tahiri, Dahmani, G. Amo
La Saucedá, Andalucía, España	10	-5.59	36.53	MAF-Lich 17309 - 17318	A. Crespo & J. Nuñez-Zapata
Grazalema, Andalucía, España	9	-5.38	36.76	MAF-Lich 17319 - 17327	A. Crespo & J. Nuñez-Zapata
Puertollano, Castilla-La Mancha, España	3	-3.84	38.67	MAF-Lich 17328 - 17330	A. Crespo, P.K. Divakar, P. Cubas & J. Nuñez-Zapata
San Quintin, Castilla-La Mancha, España	3	-4.28	38.82	MAF-Lich 16457; 17331 - 17332	A. Crespo, P.K. Divakar, P. Cubas & J. Nuñez-Zapata
Monfragüe, Extremadura, España	9	-6.06	39.83	MAF-Lich 17333 - 17341	A. Crespo, J. Nuñez-Zapata & C. Ruibal
Cuacos de Yuste, Extremadura, España	5	-5.73	40.10	MAF-Lich 16465; 17342 - 17345	A. Argüello
Peña de Francia, Castilla y Leon, España	4	-6.16	40.51	MAF-Lich 17346 - 17349	A. Lumbreras & B. Roca
Morasverdes, Castilla y Leon, España	5	-6.28	40.64	MAF-Lich 17350 - 17354	A. Lumbreras & B. Roca
Navalvillar, Extremadura, España	1	-5.38	39.55	MAF-Lich17355	P. Cubas & R. Oyarzun
Braganza, Alto Trás-los-Montes, Portugal	2	-6.78	41.44	MAF-Lich 15243 - 15350	V. J. Rico
El Pardo, Madrid, España	3	-3.75	40.51	MAF-Lich 16452; 17356 - 17357	A. Crespo & J. Nuñez-Zapata
El Escorial, Madrid, España	5	-4.15	40.57	MAF-Lich 16467; 17358 - 17361	J. Nuñez-Zapata
Montejo de la Sierra, Madrid, España	5	-3.49	40.11	MAF-Lich 17362 - 17366	A. Argüello & P.K. Divakar
Moral de Hornuez, Castilla y Leon, España	10	-3.62	41.49	MAF-Lich 16459 - 16460; 17367 - 17374	A. Crespo & J. Nuñez-Zapata
La Lomba, Cantabria, España	4	-4.30	43.02	MAF-Lich 17375 - 17378	A. Crespo & J. Nuñez-Zapata
Saliencia, Principado de Asturias, España	4	-6.12	43.08	MAF-Lich 16462; 17379 - 17381	S. Perez-Ortega
Belagua, Navarra, España	2	-0.82	42.96	MAF-Lich 17382 - 17383	S. Perez-Ortega
Castellon, Valencia, España	10	-0.32	39.85	MAF-Lich 17391 - 17400	E. Barreno, G. Salva, N. Sanchez, S. Chiva
Banyalbufar, Mallorca, Islas Baleares, España	3	2.51	39.67	MAF-Lich 17401 - 17403	A. Crespo, P.K. Divakar, G. Amo, J. Nunez-Zapata & S. Pina
Ufanes, Mallorca, Islas Baleares, España	4	2.96	39.81	MAF-Lich 16466; 17404 - 17406	A. Crespo, P.K. Divakar, G. Amo, J. Nunez-Zapata & S. Pina
Al mawajin, Jendouba, Tunes	2	8.31	36.49	MAF-Lich 16458; 17407	A. Quintanar & al.

Badde Orca, Sardinia, Italia	9	8.48	40.35	MAF-Lich 17408 - 17416	J. Nuñez-Zapata
Sainz Tropez, Provence-Alpes-Côte d'Azur, Francia	2	6.43	43.20	MAF-Lich 16464; 17417	A. Argüello
Chateau de Cordes, Auvergne, Francia	4	2.85	45.70	MAF-Lich 17418 - 17421	P. Cubas & R. Oyarzun
Neuchâtel, Neuchâtel, Suiza	9	6.91	47.00	MAF-Lich 17422 - 17430	C. Truong
Ansedonia, Toscana, Italia	9	11.27	42.88	MAF-Lich 17431 - 17439	J. Nuñez, M. Tretiach & T. Craighero
Poggioferro, Toscana, Italia	10	11.35	42.76	MAF-Lich 17440 - 17449	J. Nuñez, M. Tretiach & T. Craighero
Monte Amiatta, Toscana, Italia	1	11.60	42.90	MAF-Lich 17450	J. Nuñez, M. Tretiach & T. Craighero
Lodrino, Lombardia, Italia	10	10.28	45.72	MAF-Lich 16483; 17455 - 17463	A. Crespo & P. K. Divakar
Camporosso in Valcanale, Friuli-Venecia Julia, Italia	8	13.53	46.51	MAF-Lich 17474 - 17481	J. Nuñez-Zapata & F. Candotto
Bled, Upper Carniola, Eslovenia	9	14.11	46.37	MAF-Lich 16619; 17484 - 17491	J. Nuñez-Zapata
Mittersill, Salzburg, Austria	8	12.48	47.27	MAF-Lich 16618; 17492 - 17498	J. Nuñez-Zapata & F. Candotto
Bad Reichenhall, Alta Baviera, Alemania	8	12.93	47.76	MAF-Lich 17499 - 17506	J. Nuñez-Zapata & F. Candotto
Regensbrug, Baviera, Alemania	5	12.09	49.00	MAF-Lich 16485; 17509 - 17512	W. v. Brachel
Maries, Isla Thasos, Grecia	4	24.62	40.68	B600183598; B600183667; B600183986; B600186705	H. Sipman & T. Raus
Daphnes, Isla Samothraki, Grecia	4	25.55	40.51	B600184168; B600185102; B600185118; B600186947	H. Sipman & T. Raus
Dumanli, Canakale, Turquía	2	26.88	40.28	MAF-Lich 17513 - 17514	A. Crespo, P.K. Divakar, M. Candan & H.T. Lumbsch
Bursa, Uludaj, Turquía	1	29.03	40.13	MAF-Lich 16456	A. Crespo, P.K. Divakar, M. Candan & H.T. Lumbsch
Asagi Caglan, Eskisehir, Turquía	3	30.48	39.68	MAF-Lich 17516 - 17518	Mehmet Candan
Sivrihisar Mountains, Eskisehir, Turquía	8	31.67	39.42	MAF-Lich 17519 - 17526	Mehmet Candan
Inköyü, Cankiri, Turquía	1	33.63	40.88	MAF-Lich 17527	A. Crespo, P.K. Divakar, M. Candan & H.T. Lumbsch
Rhydlydan, Gales, Reino Unido	4	-3.47	53.04	MAF17528 - 17531	J. Nuñez-Zapata & C. Ruibal
Sandford, Cumbria, Noroeste Inglaterra, Reino Unido	5	-2.41	54.54	MAF-Lich 17535 - 17539	J. Nuñez-Zapata & C. Ruibal
Uppsala, Uppland, Suecia	10	17.63	59.85	MAF-Lich 17548 - 17557	M. Wedin
<i>Parmelina yalungana</i>					
P. N. Denali, Alaska, EEUU	1	151.85	62.4	P.R. Nelson-07-804B	P: R. Nelson
Alaska, EEUU	1			L.L. Lasselle-07-101	L. L. Lasselle
<i>Myelochroa crassata</i>					
Chichibu, Honshu, Japón	2	138.9	35.94	MAF-Lich 17779, 17780	A. Crespo. P. K. Divakar & Y. Ohmura
Yamanashi, Honshu, Japón	1	138.75	35.9	MAF-Lich 17781	A. Crespo. P. K. Divakar & Y. Ohmura
<i>Myelochroa entotheiochroa</i>					
Tsukuba, Honshu, Japón	1	140.10	36.21	MAF-Lich 16937	A. Crespo & P. K. Divakar
<i>Myelochroa galbina</i>					
Lijiang, Yunnan, China	1	100.18	26.96	MAF-Lich 10414	A. Crespo et al.
Chichibu, Honshu, Japón	1	138.9	35.94	MAF-Lich 17782	A. Crespo. P. K. Divakar & Y. Ohmura
<i>Myelochroa hayachinensis</i>					
Yamanashi, Honshu, Japón	1	138,75	35.9	MAF-Lich 17784	A. Crespo. P. K. Divakar & Y. Ohmura
<i>M. homogens</i>					
Chichibu, Honshu, Japón	2	138.9	35.94	MAF-Lich 17787, 17788	A. Crespo. P. K. Divakar & Y. Ohmura
<i>M. aff. irrugans</i>					
Yamanashi, Honshu, Japón	1	138.75	35.9	MAF-Lich 17786	A. Crespo. P. K. Divakar & Y. Ohmura

<i>M. leucotiliza</i>					
Chichibu, Honshu, Japón	1	138.9	35.94	MAF-Lich 17783	A. Crespo. P. K. Divakar & Y. Ohmura
<i>M. metarevoluta</i>					
Shi Bao Shan Park, Yunnan, China	1	99.84	26.36	MAF-Lich 10208	A. Crespo et al.
Yamanashi, Honshu, Japón	1	138.75	35.9	MAF-Lich 17785	A. Crespo. P. K. Divakar & Y. Ohmura
<i>M. subaurulenta</i>					
Jianchian, Yunnan, China	1	99.73	26.52	MAF-Lich 10207	A. Crespo et al.