



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Phylogeny and species delimitation within the moss genus *Dicranum* Hedw.

Lang, A.S.

Citation

Lang, A. S. (2014, October 8). *Phylogeny and species delimitation within the moss genus *Dicranum* Hedw.* Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/28984>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/28984>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/28984> holds various files of this Leiden University dissertation

Author: Lang, Annick Séverine

Title: Phylogeny and species delimitation within the moss genus *Dicranum* Hedw.

Issue Date: 2014-10-08

Chapter 6

Summary and conclusions

Dicranum is a large genus essentially found in the Holarctic (Crosby *et al.* 1999; Frey & Stech 2009). With more than 90 accepted species, *Dicranum* is one of the largest genera of Dicranaceae (Missouri Botanical Garden; Frey & Stech 2009) and about 30 species are recorded for Europe (Hedenäs & Bisang 2004). *Dicranum* species grow in a broad range of habitats, forming dense, tomentose tufts or cushions (Crum & Anderson, 1981), and are easily recognized in the field by their typical « *Dicranum*-look »: acrocarpous stems and leaves that are lanceolate, gradually acuminate and sometimes secund. When fertile, sporophytes have long-rostrate opercula, cucullate calyptrae and 16 peristome teeth that are divided to half-way (Nyholm 1987; Hedenäs & Bisang 2004; Smith 2004; Ireland 2007). However, the taxonomy of this genus is controversial (Allen 1998; Ireland 2007). It has been divided into seven sections (Peterson 1979; Nyholm 1987) whose characteristics are not always distinctive. Moreover, many species are difficult to distinguish due to their morphological plasticity. Intergrading forms are often found, leading to frequent confusions and unclear taxonomy.

In this thesis, species delimitations of temperate and arctic *Dicranum* lineages were investigated using molecular phylogenetic reconstructions and barcoding methods. Four potential barcode markers (*rps4-trnT*, *trnL-F*, *psbA-trnH*, *rnlTS*) and two additional chloroplast markers (*rps19-rpl2* and *rpoB*) were sequenced for 90% of the species known in Europe. Molecular data were analysed with maximum parsimony, maximum likelihood and Bayesian inferences for phylogenetic investigations. Furthermore, Bayesian approaches were used for testing automated species delimitation methods (generalised mixed Yule coalescent (GMYC) and Poisson tree processes (PTP)). Morphological characters were re-addressed in the light of the molecular phylogenetic inferences. Finally, gametophytic characters were re-examined and scored for statistical analyses in order to evaluate their relevance for distinguishing closely related species.

What is the *Dicranum scoparium* complex? What are the morphological characters of *Dicranum scoparium* and how is it related to its morphologically close species?

Bryophytes have a limited number of morphological characters that are strongly influenced by the environment (Briggs 1965; Vanderpoorten & Goffinet 2006). Therefore, it can be difficult to define stable characters that are distinctive for each species. In this thesis, the problem of species delimitations was first investigated in a number of species of section *Dicranum* (Hedw.) Sull. (sensu Nyholm 1987; Bellolio-Trucco & Ireland 1990) whose morphological forms intergrade into one another (Lang & Stech 2014; **chapter 1**), with a focus on the widespread and polymorphic *D.*

scoparium. Molecular phylogenetic reconstructions indicated that molecular lineages are generally congruent with morphological species concepts in *Dicranum*. They further suggested a close relationship of the Holarctic *Dicranum scoparium* Hedw. and *D. bonjeanii* De Not. with the more narrowly distributed *D. howellii* Renauld & Cardot (North America), *D. lorifolium* Mitt., *D. japonicum* Mitt. and *D. nipponense* Besch. (Asia), which together could be regarded as the *D. scoparium* species complex. However, other species of section *Dicranum*, namely *D. majus* Turner and *D. polysetum* Sw. were separated from the *D. scoparium* complex, although frequent morphological confusion with *D. scoparium* are reported. The large sampling of *D. scoparium*, including North American, European and Asian specimens and covering the high degree of morphological trait variation, revealed a monophyletic lineage, defined as *D. scoparium* s.s., that corresponds to the morphological concept of this species: the leaves are straight to falcate-secund ending in a keeled apex, margins are serrate, the costa is percurrent with four serrate ridges on its dorsal side and several stereid bands can be seen in cross-sections, lamina cells are prosenchymatous and porose. Nonetheless, *D. crassifolium* Sérgio, Ochyra & Séneca also corresponded to *D. scoparium* s.s. despite its bistratose lamina and dentate margins (**chapter 5**). Furthermore, several *D. scoparium*-looking specimens from North America (*D. cf. scoparium*) were separated from *D. scoparium* s.s. and cluster with *D. leioneuron* Kindb. (**chapter 5**).

What are *D. bardunovii* and *D. septentrionale*? Are they separate species? Are their morphological characters adequate for distinguishing them from the closely related *D. acutifolium* and *D. brevifolium*?

Two new species have been recently described from Russia: *D. bardunovii* Tubanova & Ignatova and *D. septentrionale* Tubanova & Ignatova. These two species resemble in many characters to *D. acutifolium* and *D. brevifolium* and are easily overlooked. Thus, the four mentioned species are considered to belong to a complex of species named the *D. acutifolium* species complex. The discovery of *D. bardunovii* and *D. septentrionale* is based on phylogenies using only the nuclear spacer nrITS (Tubanova *et al.* 2010; Tubanova & Ignatova 2011). Although this marker is often considered as sufficient for species delimitation (Chen *et al.* 2010; Liu *et al.* 2011), species circumscription in *Dicranum* lacked support and resolution (Lang & Stech 2014, **chapter 1**) due to the generally low genetic variability in Dicranaceae (Stech 1999; La Farge *et al.* 2002). Hence, several markers were necessary for clearer species circumscriptions as shown in the previous study (Lang & Stech 2014). Therefore, we studied the molecular relationship of the *D. acutifolium* species complex and its close allies by combining additional chloroplast markers to the existing ITS phylogeny and analysed the relevance of morphological characters. The combined molecular analyses corroborated the results obtained by Tubanova *et al.* (2010) and Tubanova & Ignatova (2011). While the delimitation of *D. septentrionale* became strongly supported, the circumscription of *D. bardunovii* remained less clearly defined. Nevertheless, both of them could be recognized as species and were distinct from *D. brevifolium* and *D. acutifolium*. The molecular circumscription of *D. bardunovii*, *D. acutifolium* and *D. brevifolium* and especially *D. septentrionale* was in sharp contrast with their morphological resemblance because the characters differentiating the four species are minute and may be easily overlooked. The recognition of these species was moreover hampered by the occurrence of mixed collections, as exemplified by the holotype of *D. bardunovii*, which contained also individuals of *D. acutifolium*. In line with previous morphological and phylogenetic

analyses (e.g. Sukkharak *et al.* 2011; Carter, 2012; Medina, 2012; Stech *et al.* 2013; Lang & Stech, 2014) the present study highlighted the importance of molecular data for clarifying species circumscriptions.

Is barcoding a method that can be used for identifying Dicranum species? How do barcode markers perform in terms of species identification?

Correct species identification is important in various fields of biodiversity assessments, ecology and conservation (Cornelissen *et al.* 2007; Dinnage *et al.* 2012; Steele & Pires 2011; Winter *et al.* 2013) but morphological identification of organisms with reduced sizes such as bryophytes can be difficult, especially of arctic bryophytes species, whose gametophytic characters show extreme deviating morphologies and sporophytes are mostly absent (Bellolio-Trucco & Ireland 1990; Hedenäs & Bisang 2004; Hesse *et al.* 2012). DNA barcoding method is an alternative approach to investigate species delimitation. In **chapter 4**, we demonstrated that molecular circumscription of arctic *Dicranum* species using a high number of barcode markers was possible. However, analyses of each individual marker indicated that they tended to possess little interspecific variability. Moreover, the performance of ITS1 and ITS2 was overrated and failed at discriminating all *Dicranum* species. Interspecific genetic distances were generally small and overlapped with intraspecific genetic distances. Used in combinations, the most commonly used markers, *trnT-trnF*, *psbA-trnH* and *rnlTS*, did not contain a natural “barcode gap” either, meaning that some species remain difficult to circumscribe (**chapter 5**). However, since the overlap was reduced and in line with other barcode studies (Liu *et al.* 2011; Stech *et al.* 2013; Hassel *et al.* 2013), these four markers could be considered as potential barcode markers in *Dicranum*.

Is automated species delimitation congruent with the morphological concept of European species?

Generalized mixed Yule coalescent approach (GMYC) or Poisson tree processes (PTP) are species delimitation methods based on likelihood (ML) phylogenetic inferences (Pons *et al.* 2006; Monaghan *et al.* 2009). While GMYC requires a time-calibrated tree, PTP also works on standard phylogenetic trees. Nevertheless, both methods calculate a number of entities that represent theoretical species. Based on a phylogenetic reconstruction that included 28 of the 30 *Dicranum* species found in Europe, the number of entities recovered by the GMYC methods varied between 34 and 58 and 37 estimated entities were recovered by PTP approaches (**chapter 5**). When considering the single threshold GMYC model and the ML tree obtained from the PTP, both methods were relatively congruent with 34 and 37 species, respectively. These estimations, however, were slightly higher than the number of morphological species. The overestimations concerned *D. scoparium* but also *D. viride*, *D. fragilifolium*, *D. fuscescens* and *D. polysetum*. Simulations have shown that an unbalanced dataset and low intraspecific genetic variability are likely to increase the estimates of haplotypes of the oversampled species (Bergsten *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2013). In such cases, each specimen of a species with small sampling might be counted as a separate entity (Zhang *et al.* 2013). In our study, analyses on a reduced dataset did not decrease the number of potential species. Therefore, the effect of unbalanced sampling probably had less impact on species delimitations than the generally low genetic variability within the genus *Dicranum*.

Despite the overestimated number of species obtained with automated estimation methods, phylogenetic clades were delimiting species that were generally congruent with the actual morphological circumscriptions. Molecular phylogenetic inferences also brought useful insights in several morpho-species such as *D. leioneuron*, *D. crassifolium*, *D. scottianum* and *D. canariense*, *D. angustum* and *D. laevidens* or species of the *D. acutifolium* complex (**chapter 3, 4, 5**), whose taxonomy was until now unclear. Furthermore, the division of the genus into sections had no biological means, as depicted from the phylogenetic tree in **chapter 5**.

Future studies

In this thesis, we show that molecular methods enabled us to clarify the molecular circumscription of a subset of *Dicranum* species and to examine the relationship within species complexes. Although most of the studied taxa were statistically strongly supported, three European species were indistinguishable from other species (*D. crassifolium* from *D. scoparium*, *D. scottianum* from *D. canariense*, *D. elongatum* from *D. fragilifolium*). Additionally, *D. leioneuron* grouped with North American specimens of *D. scoparium* despite clear morphological differences between the two species. A detailed re-interpretation of morphological differences and possibly re-examination of diagnostic characters should be carried out. Moreover, the delimitation of three European species, *D. fulvum*, *D. muehlenbeckii* and *D. transylvanicum*, could not be included in the study. Morpho-molecular analyses of these species would allow us to better understand their genetic affiliation.

The sampling of this thesis represent roughly a third of the known *Dicranum* species. The missing taxa are mainly found in Asia and America. A complete revision of *Dicranum*, including all the species, would allow us to complete our knowledge of this species-rich genus.

Furthermore, the inclusion of additional variable markers and studies of microsatellites loci would help to understand the relationship between the different taxa and to explore the influence of male dwarfism on species reproduction as well as to help us answering the question whether hybridization event occurs in *Dicranum*.

Samenvatting en Conclusies

Dicranum (Gaffeltandmos) is een groot geslacht dat hoofdzakelijk voorkomt in het holarctisch gebied (Crosby *et al.* 1999; Frey & Stech 2009). Met meer dan 90 geaccepteerde soorten is *Dicranum* één van de grotere genera in de Dicranaceae (Frey & Stech 2009) en ongeveer 30 soorten zijn geregistreerd voor Europa (Hedenäs & Bisang 2004). *Dicranum* soorten worden in veel verschillende habitats aangetroffen en vormen dichte viltige polletjes of kussentjes (Crum & Anderson, 1981). Ze zijn in het veld aan hun typische « *Dicranum*-habitus » gemakkelijk te herkennen: acrocarpe stengels en eirond-lancetvormige bladeren die geleidelijk zijn toegespitst en soms homotroop gekromd zijn. De sporenkapsels hebben lang-snavelvormige opercula, kapvormige calyptra's en 16 peristoomtanden die halverwege in tweeën gedeeld zijn (Nyholm 1987; Hedenäs & Bisang 2004; Smith 2004; Ireland 2007). Niettemin is de taxonomie van dit genus controversieel (Allen 1998; Ireland 2007). Het genus is verdeeld in zeven secties (Peterson 1979; Nyholm 1987) waarvan de kenmerken niet altijd onderscheidend zijn. Bovendien zijn veel soorten moeilijk van elkaar te onderscheiden vanwege hun morfologische plasticiteit.

In dit proefschrift is de soortomgrenzing van gematigde en Arctische *Dicranum* soorten onderzocht met behulp van moleculaire fylogenetische reconstructies en DNA-barcodering. Vier potentiële barcode merkers (*rps4-trnT*, *trnL-F*, *psbA-trnH*, *rnlTS*) en twee aanvullende chloroplast merkers (*rps19-rpl2* en *rpoB*) zijn gesequenced voor 90% van de soorten bekend uit Europa. Moleculaire data werden geanalyseerd met maximale parsimonie, maximum likelihood en Bayesiaanse methodes voor fylogenetisch onderzoek. Bovendien zijn Bayesiaanse methodes gebruikt om automatische soortsbegrenzing-methodes te testen. De bruikbaarheid van morfologische kenmerken werd geëvalueerd in het licht van de moleculaire fylogenetische resultaten. Om de toepasbaarheid van gametofytenkenmerken te evalueren, zijn deze heronderzocht en gescoord om statische analyses uit te voeren.

Wat is het Dicranum scoparium complex? Wat zijn de morfologische kenmerken van Dicranum scoparium en hoe is D. scoparium gerelateerd aan de morfologisch meest verwante soorten?

Bryofyten hebben een beperkt aantal morfologische kenmerken die sterk worden beïnvloed door de milieufactoren (Briggs 1965; Vanderpoorten & Goffinet 2006). Daarom kan het moeilijk zijn om stabiele kenmerken te definiëren die onderscheidend zijn voor elke soort. In dit proefschrift zijn de problemen van soortsbegrenzing eerst onderzocht in een aantal soorten van de sectie *Dicranum* (Hedw.) Sull. (sensu Nyholm 1987; Bellolio-Trucco & Ireland 1990) waarvan de morfologische vormen met elkaar overlappen (Lang & Stech 2014; **hoofdstuk 1**) met een focus op de wijdverspreide polymorfe soort *Dicranum* Hedw. *scoparium*. Moleculaire fylogenetische reconstructies wijzen erop dat de moleculaire lijnen meestal congruent zijn met het morfologische soortconcept in *Dicranum*. Zij suggereren verder een nauwe verwantschap tussen de holarctische *D. scoparium*. en *D. bonjeanii* De Not. met de meer beperkt verspreide *D. howellii* Renauld &

Cardot (Noord-Amerika), *D. lorifolium* Mitt., *D. japonicum* Mitt. en *D. nipponense* Besch. (Azië) die gezamenlijk kunnen worden beschouwd als het *D. scoparium* soortencomplex. Echter, andere soorten uit de sectie *Dicranum*, namelijk *D. majus* Turner en *D. polysetum* Sw. zijn gescheiden van het *D. scoparium* complex hoewel morfologische verwarring met *D. scoparium* vaak voorkomt. Onze uitgebreide geografische bemonstering van *D. scoparium*, inclusief Noord-Amerikaanse, Europese en Aziatische exemplaren, en tevens uitgebreide bemonstering van de morfologische kenmerkvariatie onthulde een monofyletische groep, gedefinieerd als *D. scoparium* s.s., die overeenkomt met het morfologische concept van deze soort: de bladeren zijn recht tot homotroop gekromd en eindigen in een gekielde apex, de bladranden zijn gezaagd, de bladnerf is percurrent met vier gezaagde lamellen op de dorsale zijde en verscheidene stereïde banden zijn zichtbaar in dwarsdoorsnede, de bladcellen zijn prosenchymatisch en poraat. Echter, *D. crassifolium* Sérgio, Ochyra & Séneca komt ook overeen met *D. scoparium* s.s. ondanks het tweelagige blad en getande bladranden (**hoofdstuk 5**). Bovendien zijn verscheidene *D. scoparium*-achtige exemplaren uit Noord-Amerika (*D. cf. scoparium*) gescheiden van *D. scoparium* s.s. en clusteren ze met *D. leioneuron* Kindb. (**hoofdstuk 5**).

Wat zijn *D. bardunovii* en *D. septentrionale*? Zijn het aparte soorten? Zijn hun morfologische kenmerken voldoende om ze te onderscheiden van de nauwverwante soorten *D. acutifolium* en *D. brevifolium*?

Twee nieuwe soorten zijn recentelijk beschreven uit Rusland: *D. bardunovii* Tubanova & Ignatova en *D. septentrionale* Tubanova & Ignatova. Deze twee soorten lijken in veel kenmerken op *D. acutifolium* en *D. brevifolium* en worden gemakkelijk over het hoofd gezien. De vier genoemde soorten worden daarom beschouwd als een complex van soorten, namelijk het *D. acutifolium* soortcomplex. De ontdekking van *D. bardunovii* en *D. septentrionale* is gebaseerd op fylogenieën die alleen gebruik maken van de nucleaire spacer nrITS regio (Tubanova et al. 2010; Tubanova & Ignatova 2011). Hoewel deze merker vaak als geschikt wordt beschouwd voor soortsbegrenzing (Chen et al. 2010; Liu et al. 2011), ontbraken bij de soortomschrijvingen in *Dicranum* ondersteuning en resolutie (Lang & Stech 2014, **hoofdstuk 1**) door de doorgaans lage genetische variabiliteit in de Dicranaceae (Stech 1999; La Farge et al. 2002). Verdere merkers zijn bijgevolg noodzakelijk voor het verkrijgen van duidelijkere soortomschrijvingen (Lang & Stech 2014). Daarom onderzochten wij de moleculaire verwantschappen van het *D. acutifolium* soortcomplex en zijn naaste verwanten door aanvullende chloroplast merkers met de bestaande ITS-fylogenie te combineren; ook analyseerden wij de relevante morfologische kenmerken. De gecombineerde moleculaire analyse bevestigt de resultaten van Tubanova et al. (2010) en Tubanova & Ignatova (2011). Hoewel de begrenzing van *D. septentrionale* nu significant ondersteund is, blijft de omgrenzing van *D. bardunovii* minder duidelijk. De kenmerken die de soorten *D. bardunovii*, *D. acutifolium* en *D. brevifolium* en vooral *D. septentrionale* onderscheiden zijn onopvallend en worden gemakkelijk over het hoofd gezien. De herkenning van deze soorten wordt bovendien bemoeilijkt door het bestaan van mengcollecties, zoals geïllustreerd bij het holotype van *D. bardunovii*, dat ook individuen van *D. acutifolium* bevat. In overeenkomst met eerdere morfologische en fylogenetische analyses (e.g. Sukkharak et al. 2011; Carter, 2012; Medina, 2012; Stech et al. 2013; Lang & Stech, 2014) benadrukt dit onderzoek het belang van moleculaire data om soortomschrijvingen te verduidelijken.

Is barcodering een methode die gebruikt kan worden om *Dicranum* soorten te identificeren? Hoe presteren barcode markers in termen van soortidentificatie?

Soorten correct op naam te kunnen brengen is belangrijk in biodiversiteitsevaluaties, ecologie en natuurbescherming (Cornelissen *et al.* 2007; Dinnage *et al.* 2012; Steele & Pires 2011; Winter *et al.* 2013), maar morfologische identificatie van organismes met gereduceerde maten zoals bryofyten kan zeer moeilijk zijn. Dit geldt in het bijzonder voor Arctische mossoorten, waarvan de kenmerken van de gametofyten extreem afwijkende morfologieën laten zien en waar de sporofyten bijna altijd afwezig zijn (Bellolio-Trucco & Ireland 1990; Hedenäs & Bisang 2004; Hesse *et al.* 2012). Het gebruik van DNA-barcodes is een alternatieve methode om soortsgrenzen te onderzoeken. In **hoofdstuk 4** tonen wij aan dat de moleculaire omschrijving van Arctische *Dicranum* soorten moleculair omschreven kunnen worden door een combinatie van een aantal barcode markers. Analyses van elke individuele merker tonen echter aan dat zij weinig interspecifieke variabiliteit bezitten. Bovendien faalt de nrITS regio in het onderscheiden van de bestudeerde *Dicranum* soorten. De combinatie van de meest-gebruikte markers, *trnT*-*rps4*, *trnL-F*, *psbA-trnH* en nrITS, heeft duidelijk het grootste potentieel als barcode merker in *Dicranum*.

Is geautomatiseerde soortsgrenzen congruent met het morfologische concept van de Europese soorten?

Gegeneraliseerde 'mixed Yule coalescent' methodes (GMYC) of 'Poisson tree' processen (PTP) soortbegrenzingmethodes die gebaseerd zijn op 'likelihood' (ML) fylogenetische inferenties (Pons *et al.* 2006; Monaghan *et al.* 2009). Terwijl GMYC een tijd-gekalibreerde stamboom nodig heeft, werkt PTP ook met standaard fylogenetische stambomen. Gebaseerd op een fylogenetische reconstructie die 28 van de 30 *Dicranum* soorten van Europa omvat, is het aantal entiteiten teruggevonden met GMYC en PTP methodes tussen de 34 en 58, respectievelijk 37 entiteiten (**hoofdstuk 5**). Als men het GMYC model met enkele drempelwaarden en de ML stamboom verkregen met PTP in beschouwing neemt, dan zijn beide methodes relatief congruent met respectievelijk 34 en 37 species. Deze schattingen zijn echter hoger dan het aantal morfologische soorten. De overschattingen betreffen *D. scoparium* maar ook *D. viride*, *D. fragilifolium*, *D. fuscescens* en *D. polysetum*. Simulaties tonen aan dat een ongebalanceerde dataset en een lage intraspecifieke genetische variabiliteit waarschijnlijk het aantal haplotypen van overbemonsterde soorten zullen laten toenemen (Bergsten *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2013). In die gevallen zal elk exemplaar van een soort met een kleine steekproef kunnen worden beschouwd als een aparte entiteit (Zhang *et al.* 2013). In ons onderzoek verminderden analyses op een gereduceerde dataset niet het aantal potentiële soorten. Daarom heeft het effect van ongebalanceerde bemonstering waarschijnlijk minder invloed op soortsgrenzen dan de normaalgesproken lage genetische variabiliteit binnen het geslacht *Dicranum*.

Ondanks het overschatte aantal soorten verkregen met de geautomatiseerde schattingsmethoden, bakenen de verkregen clades soorten af die meestal congruent zijn met de actuele morfologische omschrijvingen. Moleculaire fylogenetische analyses brengen ook nuttige inzichten in verscheidene morfologische soorten zoals *D. leioneuron*, *D. crassifolium*, *D. scottianum*, *D. canariense*, *D. angustum*, *D. laevidens* of soorten van het *D. acutifolium* complex (**hoofdstuk 3, 4, 5**), waarvan de taxonomie tot nu toe onduidelijk was. Bovendien heeft de verdeling van het genus

in secties geen biologische betekenis, zoals aangetoond wordt in de fylogenetische stamboom in hoofdstuk 5.

Toekomstige studies

In dit proefschrift hebben wij aangetoond dat moleculaire methodes geschikt zijn om moleculaire omgrenzingen van een aantal *Dicranum* soorten op te helderen en om de verwantschappen binnen soortcomplexen te onderzoeken. Hoewel de moleculaire clades van de meeste van de onderzochte taxa significant werden ondersteund, waren drie Europese soorten niet te onderscheiden van andere soorten (*D. crassifolium* van *D. scoparium*, *D. scottianum* van *D. canariense*, *D. elongatum* van *D. fragilifolium*). Verder groepeerde *D. leioneuron* met Noord-Amerikaanse exemplaren van *D. scoparium* ondanks duidelijke morfologische verschillen tussen de twee soorten. Een gedetailleerde herinterpretatie van de morfologische verschillen en een heronderzoek van diagnostische kenmerken dient te worden uitgevoerd. Bovendien moet de soortomgrenzing van drie Europese soorten, *D. fulvum*, *D. muehlenbeckii* en *D. transylvanicum*, verder worden onderzocht waarvan geen materiaal ter beschikking stond voor moleculaire analyses. Morfo-moleculaire analyses van de drie ontbrekende soorten zou ons in staat stellen om hun genetische verwantschap beter te begrijpen.

De bemonstering van dit proefschrift representeert ruwweg een derde van de bekende *Dicranum* soorten. De ontbrekende taxa komen voornamelijk voor in Azië en Amerika. Een complete revisie van alle *Dicranum* soorten omvat, zou ons in staat stellen om onze kennis van dit soortenrijke genus te voltooien.

Bovendien, zou de analyse van meer variabele merkers en van microsatellieten kunnen helpen om de relaties tussen de verschillende taxa te begrijpen, om de invloed van mannelijke dwerggroei op de reproductie van de soorten te onderzoeken, en de vraag te beantwoorden in hoeverre hybridisatie in *Dicranum* voorkomt.

