

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**Departamento de Biología Vegetal I**



**ADAPTACIÓN Y TOLERANCIA DE LOS LÍQUENES A  
CONDICIONES ADVERSAS A TRAVÉS DE GRADIENTES  
AMBIENTALES.**  
**ADAPTATION AND TOLERANCE OF LICHENS TO  
ADVERSE CONDITIONS THROUGH ENVIRONMENTAL  
GRADIENTS.**

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

**Mercedes Vivas Rebuerta**

Bajo la dirección de los doctores

Leopoldo García Sancho  
Sergio Pérez Ortega  
Ana Pintado Valverde

**Madrid, 2013**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA VEGETAL I



ADAPTACIÓN Y TOLERANCIA DE LOS LÍQUENES A CONDICIONES  
ADVERSAS A TRAVÉS DE GRADIENTES AMBIENTALES

---

ADAPTATION AND TOLERANCE OF LICHENS TO ADVERSE  
CONDITIONS THROUGH ENVIRONMENTAL GRADIENTS

MEMORIA DE TESIS DOCTORAL  
PRESENTADA POR

MERCEDES VIVAS REBUelta

VºBº de los directores:

Dr. Leopoldo García Sancho

Dr. Sergio Pérez Ortega

Dra. Ana Pintado Valverde

MADRID  
2012



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA VEGETAL I



ADAPTACIÓN Y TOLERANCIA DE LOS LÍQUENES A CONDICIONES  
ADVERSAS A TRAVÉS DE GRADIENTES AMBIENTALES

---

ADAPTATION AND TOLERANCE OF LICHENS TO ADVERSE  
CONDITIONS THROUGH ENVIRONMENTAL GRADIENTS

Memoria para optar al grado de DOCTOR  
en CIENCIAS (Sección Biológicas) que  
presenta la Licenciada

**MERCEDES VIVAS REBUelta**

Este trabajo ha sido dirigido por:

LEOPOLDO GARCÍA SANCHO  
(Facultad de Farmacia, UCM)

SERGIO PÉREZ ORTEGA  
(MNCN, CSIC)

ANA PINTADO VALVERDE  
(Facultad de Farmacia, UCM).

MADRID  
2012





Don Leopoldo García Sancho, Doctor en Ciencias Biológicas y Catedrático de Botánica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, Don Sergio Pérez Ortega, Doctor en Ciencias Biológicas e Investigador del Departamento de Biología Ambiental del Museo Nacional de Ciencias Naturales (CSIC) y Dña. Ana Pintado Valverde, doctora en Farmacia y Profesora ayudante del Departamento de Biología Vegetal II de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid informan de que:

La memoria titulada “Adaptación y tolerancia de los líquenes a condiciones adversas a través de gradientes ambientales”, que presenta Mercedes Vivas Rebuerta, Licenciada en Biología, para optar al Grado de Doctor, ha sido realizada en el Departamento de Biología Vegetal II de la Facultad de Farmacia de la UCM bajo su dirección, reuniendo todas las condiciones exigidas a los trabajos de tesis doctoral.

Madrid, 20 de Septiembre de 2012

Fdo.: Leopoldo García Sancho

Fdo.: Sergio Pérez Ortega

Fdo.: Ana Pintado Valverde



## **RECONOCIMIENTOS**

Este trabajo se ha realizado gracias a la financiación proporcionada por una ayuda para la Formación de Personal Investigador del desaparecido Ministerio de Ciencia y Tecnología BES 2007-17323, asociada al proyecto CGL2006-12179-C02-01, que tuvo continuidad con el proyecto CTM2009-12838-C04-01, concedido por el también desaparecido Ministerio de Ciencia e Innovación del estado español. El mismo programa FPI financió dos estancias breves en la Technischer Universität de Kaiserslautern, Alemania y en la Sveriges Lantbruksuniversitet de Umeå, Suecia. En esta última, se contó además con la financiación para el material de laboratorio del programa Formas del estado sueco.

El departamento de Biología Vegetal II de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid proporcionó las instalaciones e infraestructura necesarias para el desarrollo de esta tesis.

La Agencia Estatal de Meteorología (AEMET) proporcionó amablemente los datos climáticos inéditos utilizados en el capítulo 4, y los datos públicos utilizados en los capítulos 2 y 3.



## AGRADECIMIENTOS

Intentaré ser breve, porque si no lo intentara, esta sección ocuparía más que el resto, tanto es lo que tengo que agradecer... Esta tesis es el fruto palpable del trabajo de muchos años y de muchas personas y ha tomado cuerpo por fin gracias al apoyo de esas personas y de muchas otras. Por tanto, es un placer para mí reconocer en estas páginas lo profundamente endeudada que me siento:

Con Leo, Ana y Sergio, por su guía constante, su apoyo, su sabiduría, y por su cariño. No creo que haya mucha gente que quiera a sus directores de tesis como yo os quiero a vosotros.

Con Allan, que tan desinteresadamente ha empleado tiempo infinito en discutir conmigo mis métodos y resultados y corregir lingüísticamente esta tesis.

Con todo el departamento de Biología Vegetal II de Farmacia, compañeros, amigos, casi familia, por tantas horas y risas compartidas, ratos buenos y menos buenos, pero nunca malos, gracias a vosotros.

Con Víctor, por tu disposición a enseñar todo lo que sabes.

Con todo el departamento de Biología Vegetal I de Biológicas, que también habéis sido compañeros y seguís siendo amigos. Con Carlos y M<sup>a</sup> Estrella, que me enseñasteis a amar la investigación. Con Blanca e Íñigo, Ana, Tere. Con Jesús (sí, sin ti, esta tesis sería otra).

Con todo el departamento de Farmacología, que tanto os habéis preocupado y me habéis animado durante estos años. Con los Drs. Rebuerta y Vivas, que revisaron el manuscrito en castellano (alguna ventaja tenía que tener...).

Con Gloria (Frutos). Sin ti, mis líos estadísticos habrían sido imposibles de desenredar.

Ich bin vollig dankbar mit der ganzen Botanik Abteilung, in TU Kaiserslautern. Vielen Dank, Burkhard, für die Gelegenheit mit Euch dort zu arbeiten. Vielen Dank für Deine Weisheit, Geduld, Vorbild und Freundlichkeit.

I am very much indebted with all the people that kindly went out of their way to help me in Umeå. Thanks so, so much, Torgny, for the opportunity to work with all of you there and for all the things I still learn from you. Thanks to Margareta, for your skillfull guidance. Thanks to Camila and Erich, for your hospitality (and your delicious jam!). Thanks to all the Nitrogen group.

Con todos mis profesores del colegio y de la carrera. Vuestros esfuerzos para formarme han hecho posible que este trabajo viera la luz.

Con mis profesores y compañeros del conservatorio, por vuestra paciencia hacia "la otra carrera" a la hora de cambiarme clases y ensayos.

Con Álvaro, corrector tipográfico de lujo. Go raibh maith agat!

Con Yolanda. Hubiera terminado igual, pero me habría costado más y no lo habría disfrutado tanto.

Con Tomás, Claudio, Bárbara, Juan, Luis, Francisco, Roberto, Félix, Fede, Antonio, Isaac, y un largo etcétera, por acompañarme todos estos años, ayudándome a mantener la cordura.

Con todos los gigantes sobre cuyos hombros me he apoyado, científicos y técnicos, cuyos esfuerzos han sido fundamentales para entender y facilitar mi trabajo.

Con mis amigos. ¡No puedo nombraros a todos! Afortunadamente, ¡sois muchísimos! Pero os agradezco profundísimamente todo vuestro apoyo y simpatía por una situación que no siempre ha hecho de mí una compañía agradable.

Con Eva. Por comprender y compartir.

Con Pepe, por todas las horas que hemos compartido dentro y fuera de la facultad hablando de la ciencia y de la vida, por enseñarme tanto y darme tanto. Más que primos. The Asians forever!

Con Sergio, por enseñarme cómo son las cosas y decirme las cosas como son. Y por todo.

Con mi familia. Con mis padres, por vuestro ejemplo y por apoyarme siempre, aunque a veces me costara entender vuestra manera de hacerlo. Con mis hermanos (y anejos), por infinitas cosas inefables.

Con Enrique. No es que no sea capaz de encontrar palabras para agradecerme todo lo que te tendría que agradecer, es que esas palabras no existen.



*A ti*



*Cuando el niño y su padre alcanzaron por fin aquellas cumbres de arena, después de mucho caminar, el mar estalló ante sus ojos. Y fue tanta la inmensidad del mar y tanto su fulgor, que el niño quedó mudo de hermosura. Y cuando por fin consiguió hablar, temblando, tartamudeando, pidió a su padre:  
¡Ayúdame a mirar!*

Eduardo Galeano: El libro de los abrazos (1989).





## ÍNDICE INDEX

1. Introducción .....	1
1. Introduction.....	23
2. Estudio de la plasticidad fenotípica de la especie polar y alpina <i>Umbilicaria decussata</i> basado en medidas ecofisiológicas de siete poblaciones de todo el mundo .....	41
2. Assessment of the phenotypic plasticity of the polar–alpine lichen species <i>Umbilicaria decussata</i> based on ecophysiological studies of seven populations worldwide .....	85
3. Respuesta ecofisiológica de dos especies simpátricas de <i>Lasallia</i> a gradientes altitudinales en las montañas mediterráneas .....	127
3. Ecophysiological response of two sympatric species of <i>Lasallia</i> to altitudinal gradients in a Mediterranean mountain .....	165
3A. Apéndice Appendix.....	201
4. Efectos de la estacionalidad en el comportamiento ecofisiológico de dos especies simpátricas de <i>Lasallia</i> .....	249
4. Effects of seasonality in the ecophysiological performance of two sympatric species of <i>Lasallia</i> .....	281
4A. Apéndice Appendix.....	313
5. Estudio de la variación estacional en la fluorescencia de la Chl a en poblaciones de <i>Lasallia hispanica</i> y <i>L. pustulata</i> mediante medidas de campo y de laboratorio .....	333

5. Comparison of chl <sub>a</sub> fluorescence in populations of <i>Lasallia hispanica</i> and <i>L. pustulata</i> in the field and under laboratory conditions along a seasonal gradient.....	345
Conclusiones .....	357
Conclusions .....	359
Bibliografía Literatura cited .....	361

## 1. INTRODUCCIÓN



Los líquenes son el fascinante resultado de la simbiosis entre dos seres vivos muy diferentes: un hongo (el micobionte) y un alga verde, una cianobacteria o, en algunos casos, ambas (el fotobionte). El hongo, que es heterótrofo, proporciona al fotobionte protección frente a un ambiente no acuático, y el alga obtiene energía para ambos a través de la fotosíntesis. La simbiosis liquénica confiere a ambas partes características que no presentarían de vivir aislados y es, a menudo, condición imprescindible para la vida de algunas especies, es decir, muchas de las especies que se asocian en este tipo de simbiosis no son capaces de desarrollarse en vida libre. Al formar esta interacción simbiótica, el organismo puede colonizar nuevos nichos que le estarían vedados por la severidad de las condiciones climáticas. Por tanto, los líquenes son más competitivos que sus componentes en solitario y, de hecho, constituyen el grupo vegetal dominante en el 8% de los ecosistemas terrestres (Larson, 1987), como es el caso en regiones polares y ambientes alpinos (Kappen, 1988; Ahmadjian, 1993). La explicación a esta distribución no es que los líquenes prefieran las características climáticas de estos lugares, que podrían definirse como desiertos fríos, sino que aprovechan que la vegetación vascular no es capaz de soportarlas, dejando este nicho ecológico libre para los briófitos y líquenes. La ventaja que presentan en estos ecosistemas tan inhóspitos frente a plantas vasculares radica en su naturaleza poiquilohidra, que les permite soportar condiciones adversas cuando se encuentran inactivos a causa de la desecación. El inconveniente es que su crecimiento suele ser más lento en comparación con la mayoría de las plantas vasculares, pues tienen un tiempo de actividad más corto. Pero los líquenes no se reducen a estos ambientes, su diversidad ecológica es muy amplia. Aparecen en los lugares más opuestos de la superficie terrestre: desde desiertos cálidos hasta bosques tropicales siempre verdes. Es difícil encontrar ecosistemas sin líquenes. Sin embargo, la actividad humana cada vez reduce más su hábitat, a causa de la destrucción de bosques maduros y de la contaminación atmosférica (Hilmo, 2002). El cambio global, de causas controvertidas, pero cada vez más evidente (IPCC, 2007), también constituye una amenaza para la distribución y desarrollo de estos organismos, porque las regiones alpinas y polares cada vez retroceden más, proporcionando a la vegetación vascular la oportunidad de colonizar altitudes y latitudes mayores, al suavizarse las condiciones climáticas.

### **La simbiosis liquénica**

La liquenización puede interpretarse como una estrategia nutricional de los hongos (Honegger, 1991), donde el hongo vive en simbiosis obligada con fotobiontes algales o cianobacterianos, endohabitantes en el talo liquénico. En la mayoría de los casos la estructura aparente del liquen la proporciona el hongo, que alberga en su interior las células de alga en capas más o menos organizadas según el tipo de talo. Por esta razón, es también el hongo quien da nombre a la asociación (Eriksson & Winka, 1998). Por tanto, filogenéticamente los líquenes pertenecen al reino *Fungi*; la liquenización no es una característica monofilética, sino una convergencia adaptativa que apareció independientemente en distintas líneas evolutivas (Gargas *et al.*, 1995).



Se han descrito unas 13.500 especies de hongos liquenizados (Galun, 1988), pero se calcula que quedan muchas más por describir.

El 98% de los hongos que liquenizan pertenecen al orden *Ascomycota*. El 90% de los líquenes tienen como fotobionte algas verdes unicelulares eucariotas, de la división *Chlorophyta*, siendo los géneros *Trebouxia* y *Trentepohlia* los más comunes, aunque se han descrito unos 40 diferentes (Tschermak-Woess, 1988). En un 10-15% de las especies de líquenes, el hongo se asocia con una cianobacteria como fotobionte primario (en cianolíquenes) o secundario (en clorolíquenes con ficobiontes, pero con cefalodios: estructuras especiales para albergar cianobacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico).

Cuando están activos, los líquenes transforman la energía lumínica incidente en biomasa con la misma eficiencia que las plantas vasculares (Palmqvist & Sundberg, 2000).

### **La Fotosíntesis**

La fotosíntesis es el proceso mediante el cual los organismos autótrofos fijan el CO<sub>2</sub> atmosférico para sintetizar hidratos de carbono, utilizando energía lumínica para este proceso de reducción y obteniendo de este modo energía química para su supervivencia, crecimiento y reproducción. Muchos organismos heterótrofos, entre ellos los hongos liquenizados, se han aprovechado de esta capacidad para formar simbiosis con plantas, algas o bacterias autótrofas. A lo largo de la historia evolutiva, distintos grupos de hongos han formado simbiosis con algas verdes y/o cianobacterias de manera independiente, conformando talos estructurados y de apariencia homogénea, que a menudo se han considerado en su conjunto como organismos autótrofos (Gargas *et al.*, 1995). Por tanto, los líquenes tienen un proceso para obtener energía, la fotosíntesis, que depende exclusivamente del fotobionte, y un proceso de consumo de energía, la respiración, llevado a cabo en ambos biontes. Se ha sugerido, sin embargo, que la respiración total del talo refleja principalmente la actividad metabólica del micobionte, mucho más abundante en líquenes heterómeros (es decir, con capas diferenciadas) que el fotobionte, que puede suponer únicamente el 10% de la biomasa total del talo (Sundberg *et al.*, 1999).

### **El proceso fotosintético**

La fotosíntesis tiene lugar dentro del cloroplasto (Fig. 1.1) de las células vegetales eucarióticas y en las membranas tilacoides de las cianobacterias, que son de hecho el origen más probable de los cloroplastos, según la teoría de la endosimbiosis (Margulis, 1970; Cavalier-Smith, 1987).

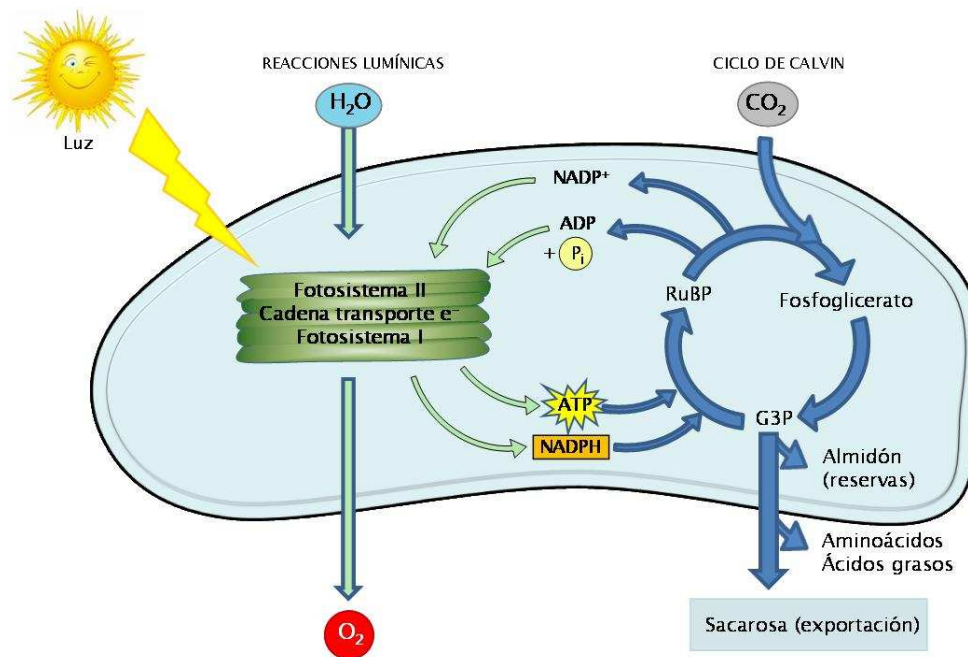


Fig. 1.1: Proceso fotosintético dentro de un cloroplasto (J.M. Vivas).

La fotosíntesis se puede dividir en dos amplios procesos. En el primero, la fase lumínica, la energía lumínica de los fotones es capturada y transferida para hacerla metabólicamente utilizable, casi siempre mediante la reducción de moléculas acumuladoras de energía (ATP). El segundo es la denominada fase oscura, en la que se utiliza la energía obtenida en la fase lumínica para fijar  $\text{CO}_2$  y producir hidratos de carbono. Esta fase se llama así porque no requiere luz y, sin embargo, normalmente sucede en iluminación y la fijación de  $\text{CO}_2$  se interrumpe en ausencia de luz. El proceso fotosintético encuentra limitaciones en casi todas las etapas de las fases lumínica y oscura. Tales limitaciones, sin embargo, son interesantes porque pueden determinar la ecología de los líquenes. Existe también la posibilidad de que los propios líquenes muestren limitaciones intrínsecas, que pueden estar relacionadas con el crecimiento general y el equilibrio de carbono, y no tan estrechamente ligadas al ambiente.

En la Fig. 1.2 se puede observar un resumen de la fase lumínica de la fotosíntesis. Los receptores de luz son las moléculas de clorofila (Chl) *a* y *b*. Ambos tipos tienen picos de absorción máxima en el rojo y el azul, pero difieren ligeramente en la longitud de onda de máxima absorción. También pueden encontrarse otros pigmentos accesorios, como los carotenos y las xantofilas. Éstos absorben principalmente en el azul y el ultravioleta. Las cianobacterias carecen de Chl*b*, pero contienen ficocianina y ficoeritrina dentro de los ficobilisomas (complejos de pigmentos situados en la superficie de las membranas tilacoidales). Todos estos pigmentos están asociados con complejos proteicos para la captación de luz, constituyendo los fotosistemas. Dentro de ellos las clorofilas forman complejos antena que absorben luz y que están conectados con los centros de reacción, formados éstos por moléculas de Chl*a* con máximos de absorción más hacia el rojo que las clorofilas de los complejos antena, asegurando, de este modo, que todos los fotones absorbidos

terminarán en los centros de reacción. En el cloroplasto conviven dos tipos de fotosistema. El fotosistema I (FS I) fue el primero en aparecer en la evolución y su principal pigmento antena es la Chl<sub>a</sub>. El centro de reacción (P700) es un complejo Chl<sub>a</sub>-proteína con un pico de absorción a 700 nm. El fotosistema II (FS II) contiene un complejo Chl<sub>a</sub>-proteína con máxima absorción a 680 nm (P680), y contiene una mayor proporción de Chl<sub>b</sub> y xantofilas en su antena. Estos dos últimos pigmentos desempeñan un papel fundamental en los procesos de disipación de exceso de energía.

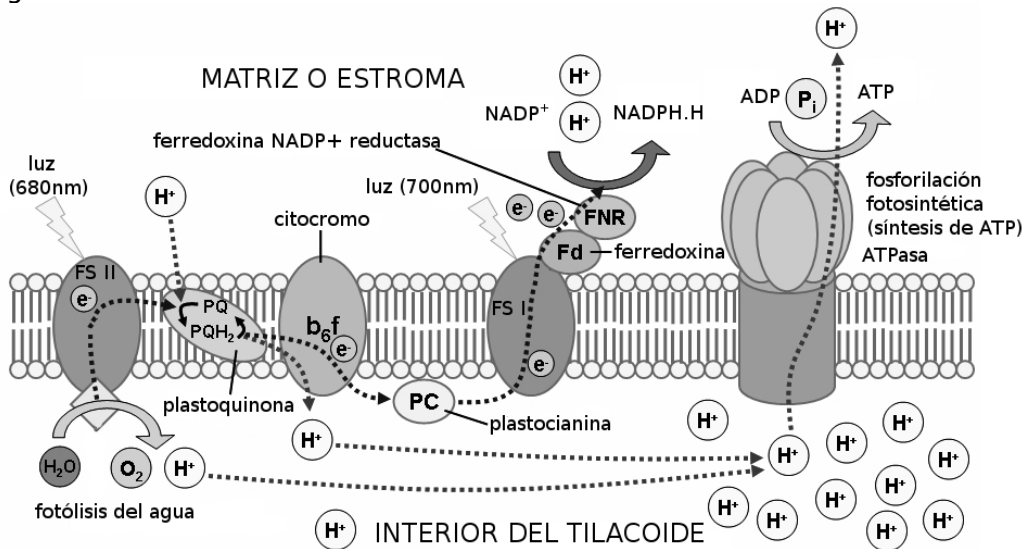


Fig. 1.2: Reacciones lumínicas en el cloroplasto (Fuente: Wikimedia Commons).

El FS II tiene alto potencial oxidante y es capaz de romper la molécula de agua de manera que ésta es la primera fuente de electrones del proceso, donándolos al centro de reacción. El FS I es un oxidante débil y recibe electrones del FS II, pero es a la vez un fuerte reductor, por lo que puede reducir la molécula aceptora NADP. El NADPH reducido (poder reductor) y el ATP procedente de la cadena de transporte electrónico son utilizados para la fijación de CO<sub>2</sub>.

El proceso comienza cuando un fotón de luz es absorbido por los pigmentos, provocando la excitación de los electrones en las moléculas de clorofila de los complejos antena del FS II, que se reúnen en el centro de reacción y pasan al primer aceptor de electrones, la feofitina, y consecutivamente a toda la cadena de transporte electrónico. Los electrones necesarios para la reducción de la Chl provienen en la mayoría de organismos de la fotólisis del agua. En esta fotólisis también se liberan protones y oxígeno. Los protones se acumulan en el interior de las membranas tilacoides de los cloroplastos, generando un gradiente que proporciona energía para la formación de ATP gracias al funcionamiento de una ATP sintasa de membrana. Los electrones excitados son transferidos al FS I, que utiliza los fotones absorbidos en sus propios complejos antena para re-excitar a los electrones. Éstos son finalmente transferidos a la enzima ferredoxin-NADP<sup>+</sup>-reductasa, que los utiliza para convertir al aceptor final, NADP<sup>+</sup>, en NADPH<sub>2</sub>. Para alcanzar una tasa de fotosíntesis óptima es crucial un flujo de electrones constante y regular. Este proceso se denomina también fotofosforilación no cíclica. La fotofosforilación cíclica, por su parte, ocurre en el FS I.

Los electrones excitados se reciclan de nuevo en el FS I, pero generan un gradiente de protones dentro de las tilacoides, que se utiliza para producir más ATP. Es un proceso en el que no existe fotólisis del agua y donde no se produce ni O<sub>2</sub> ni NADPH<sub>2</sub>. Su objetivo es compensar el déficit de ATP producido en el proceso no cíclico.

Estas moléculas de ATP y NADPH<sub>2</sub> se utilizan para la reducción de CO<sub>2</sub> a hidratos de carbono, de mayor valor energético, vía la ruta reductiva de las pentosas-fosfato o ciclo de Calvin-Benson, que comienza con la carboxilación de la ribulosa 1,5-bisfosfato (RuBP) por acción de la enzima RuBP-carboxilasa-oxigenasa (Rubisco). Esta proteína puede representar hasta un 50% del total de proteínas solubles cloroplásticas, siendo de esta manera el mayor sumidero de nitrógeno de la biosfera (Chapin *et al.*, 1987). La eficiencia de la carboxilación se ve limitada por la cantidad y actividad de la Rubisco, así como por la disponibilidad de CO<sub>2</sub>. Cuanto mayor es la concentración de este gas en el ambiente, más eficiente es la actividad carboxilante de la Rubisco. Por esta razón, muchos líquenes han desarrollado un mecanismo concentrador de CO<sub>2</sub> (CCM).

#### **Fluorescencia de la clorofila *a***

Sólo una pequeña parte de la radiación absorbida sigue la vía fotosintética, el resto se disipa en forma de calor y mediante la emisión de fluorescencia. La emisión de fluorescencia, la vía fotoquímica (atenuación o apagamiento fotoquímico) y la disipación por calor (atenuación no fotoquímica o NPQ) son procesos competitivos (Fig. 1.3).

El apagamiento no fotoquímico (NPQ, por sus siglas en inglés) es un mecanismo fotoprotector para disipar el exceso de energía por medio de la pérdida de calor. El ciclo de las xantofilas tiene mucha importancia en este proceso. Bajo condiciones desfavorables, el ciclo se activa y en él, la violaxantina se convierte en anteraxantina y posteriormente en zeaxantina. Esta última molécula es la responsable de la disipación por calor (Demmig-Adams & Adams, 1996). Otro mecanismo de protección de las xantofilas es la inmovilización de las especies reactivas de oxígeno, muy nocivas para la célula (Havaux & Niyogi, 1999; Gasulla, 2009). Se ha demostrado que la cantidad total de moléculas del ciclo de la xantofila (VAZ: violaxantina, anteraxantina y zeaxantina) aumenta en condiciones desfavorables por exceso de luz, bajas temperaturas y/o falta de nutrientes (Demmig-Adams & Adams, 1996; Calatayud *et al.*, 1997; Vrábliková *et al.*, 2006).

El hecho de que estos tres procesos ocurran simultáneamente en las moléculas de Chl*a* ha permitido el desarrollo de métodos de medida no intrusivos para la evaluación *in vivo* de la actividad del FS II como aproximación a la fotosíntesis. Al ser procesos competitivos, cualquier incremento en la eficiencia de uno de los tres resulta en el decremento de la de los otros dos. En la actualidad la fluorescencia de la Chl*a* se utiliza ampliamente como indicador del transporte electrónico en plantas superiores. Aunque la cantidad total de fluorescencia de la Chl es sólo el 1 o 2% del total de luz absorbida, al medir los cambios en fluorescencia es posible obtener información

acerca de las atenuaciones fotoquímica y no fotoquímica. Es necesario distinguir entre estos procesos con el fin de obtener información completa acerca del estado del FS II. El método del pulso de luz saturante se desarrolló con este propósito (Fig. 1.4).

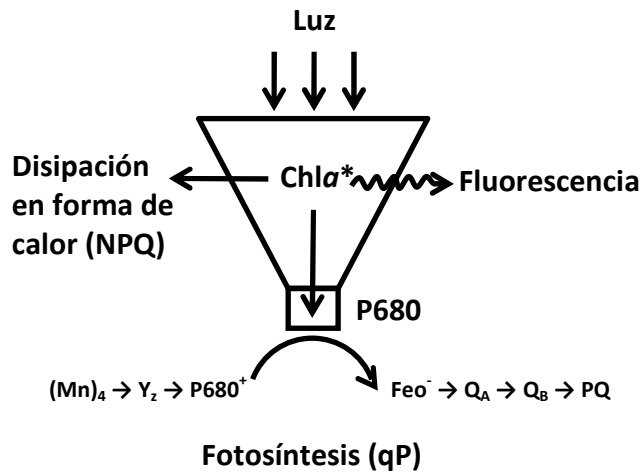


Fig. 1.3: Competencia entre los rendimientos de la fluorescencia, de la disipación por calor y de la fotosíntesis (J.M. Vivas).

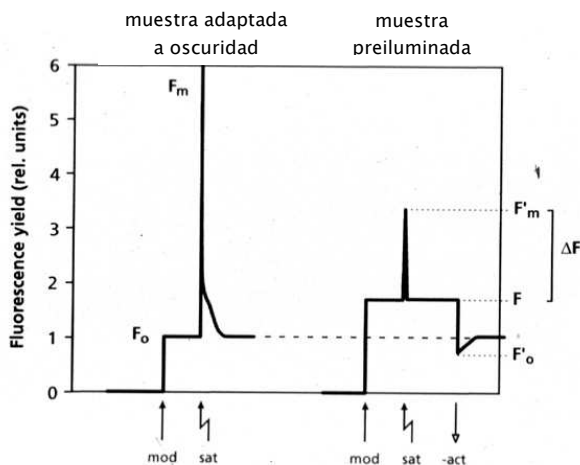


Fig.1.4: Medida de la fluorescencia de la Chl a través del método del pulso de luz saturante.

Cuando una muestra fotosintética se mantiene en oscuridad todos los centros de reacción están abiertos, es decir, completamente oxidados. Si se expone la muestra a una luz débil no actínica ( $0.1 \mu\text{moles} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , insuficiente para desencadenar la fotosíntesis) se obtiene un valor mínimo de fluorescencia basal ( $F_0$ ). Entonces se aplica un pulso de luz de corta duración y alta intensidad (varios miles de  $\mu\text{moles}$  de fotones  $\cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  durante un segundo o menos), que provoca el cierre inmediato de todos los centros de reacción del FS II y el primer aceptor de electrones (tras la feofitina), la plastoquinona  $Q_A$ , se reduce completamente, incapaz de disipar energía por la vía fotosintética, que es un proceso más lento. Además, la disipación por calor no está activa en muestras pre-adaptadas a la oscuridad. Por tanto, en este momento se observa el máximo nivel de fluorescencia,  $F_m$ . La diferencia entre  $F_m$  y  $F_0$  se define como la fluorescencia variable,  $F_v$  ( $F_v = F_m - F_0$ ). La proporción  $F_v/F_m$  es una

estimación del máximo rendimiento cuántico del FS II, es decir, la máxima reducción de  $Q_A$  potencial. La fluorescencia medida por los fluorímetros procede únicamente del FS II.

En hojas sanas  $F_v/F_m$  se acerca normalmente al máximo teórico de 0'83. Un valor más bajo se interpreta como indicador de daño del FS II, lo que provoca una transferencia de energía menos eficiente. Como este daño se debe habitualmente a luz intensa, se denomina fotoinhibición y normalmente es reversible, por ejemplo, durante la noche. En musgos y líquenes los valores observados son mucho menores. Estos valores no indican fotoinhibición, sino que son el resultado de su mayor fotoprotección.

Si en ese momento se aplica una luz actínica, capaz de producir fotosíntesis y disipación por calor, se obtiene un valor de fluorescencia basal ( $F_t$ ), que es mayor que  $F_0$ . La aplicación de un nuevo pulso de saturación provoca un incremento transitorio de la fluorescencia hasta un valor máximo ( $F_m'$ ). La diferencia entre  $F_t$  y  $F_m'$  es la fluorescencia variable en condiciones de iluminación,  $\Delta F$  ( $\Delta F = F_m' - F_t$ ), y es la atenuación fotoquímica.  $F_m'$  es menor que  $F_m$  en la medida en oscuridad y la diferencia son los electrones aceptados por las moléculas de los sistemas de protección que disipan esa energía en forma de calor, es decir, la atenuación no fotoquímica (Fig. 1.5). Se puede calcular un nuevo rendimiento con los valores obtenidos en iluminación:  $(F_m' - F_t)/F_m'$ , el llamado rendimiento cuántico efectivo del FS II ( $\Phi_{FSII}$ ). Este rendimiento es una medida de la proporción de electrones absorbidos que son transportados a través del FS II y quedan finalmente inmovilizados en NADPH que se utilizará para la fijación de  $CO_2$ . Es posible obtener una medida del número de electrones que pasan a través del FS II, la tasa relativa del transporte de electrones (ETR), multiplicando la luz incidente por este rendimiento:

$$ETR = [(F_m' - F_t)/F_m'] * PPF\text{D} (\mu\text{mol e}^- \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}),$$

donde PPF<sub>D</sub> es la luz fotosintéticamente activa, en  $\mu\text{moles}$  de fotones  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . El valor obtenido se denomina así, tasa relativa del transporte de electrones, porque la tasa real sólo se puede calcular conociendo la PPF<sub>D</sub> en el complejo antena del cloroplasto.

Teóricamente, debería haber una fuerte correlación entre la ETR y la tasa de fijación de  $CO_2$ , pues los electrones medidos por el fluorómetro son aquéllos que se usarán para esta fijación. Pese a ello, a menudo la relación es compleja, especialmente si hay procesos consumidores de electrones tras el paso por el FS II, de manera que no contribuyen a la fotosíntesis. En plantas superiores uno de esos procesos es la fotorrespiración, que implica que la fotosíntesis de las plantas C<sub>3</sub> no está correctamente predicha por la ETR. En musgos y líquenes hay indicios de que la existencia de sumideros de electrones alternativos, posiblemente el oxígeno, pueden oxidar el NADPH, y esto provoca la falta de correlación entre ETR y fotosíntesis (Green *et al.* 1997; Proctor & Smirnoff, 2011).

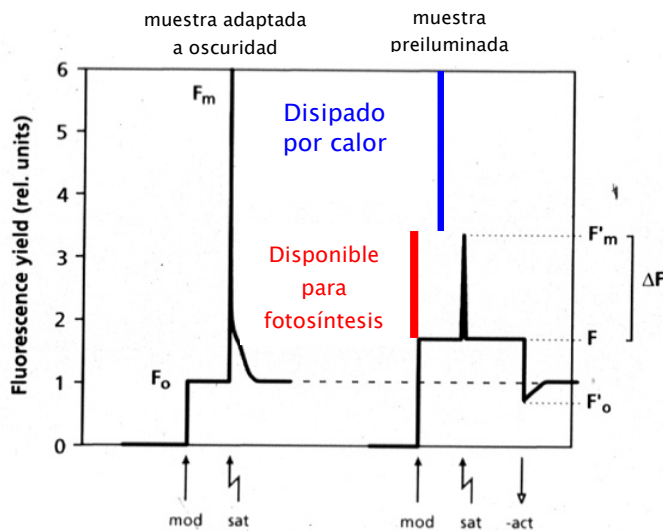


Fig. 1.5: Deducción de los valores de atenuación fotoquímica y no fotoquímica a partir de la fluorescencia.

Actualmente, la mayoría de los fluorímetros se basan en el sistema de modulación por amplitud de pulsos (PAM). En estos fluorímetros la fuente de luz utilizada para medir la fluorescencia es modulada, es decir, encendida y apagada a una alta frecuencia, y el detector de fluorescencia se calibra para que detecte solamente la fluorescencia provocada por la luz de medida. Este sistema tiene la gran ventaja de que permite realizar medidas bajo luz ambiental, y no sólo en muestras en oscuridad.

#### Factores que condicionan la ganancia de carbono en líquenes

Al ser organismos poiquilohidros, el estado de hidratación de los líquenes es completamente dependiente del ambiente, a diferencia de las plantas vasculares, que al ser homeohidras son capaces de controlar activamente su estado de hidratación. Los organismos poiquilohidros terrestres deben ser capaces de tolerar la desecación en la mayoría de los casos, pues muchos de ellos se secan completamente al menos en alguna ocasión. Por tanto, la naturaleza poiquilohidra afecta a la ecofisiología de la función fotosintética. Las restricciones ambientales para la fotosíntesis en líquenes son las mismas que en otras plantas: concentración de  $\text{CO}_2$ , luz y temperatura, pero a ellas se suma la respuesta fotosintética al contenido hídrico del talo. Hay además, restricciones adicionales que pueden limitar la tasa fotosintética, como son el contenido en clorofila, en minerales (especialmente nitrógeno y fosfato) y también la estructura del talo, a causa de la interacción entre el agua y la difusión del  $\text{CO}_2$ .

Las tasas máximas de fotosíntesis neta en líquenes y en briófitos, también organismos poiquilohidros, son más bajas que las de otras plantas terrestres, tanto si se calculan en función de peso seco como de superficie. Se ha considerado responsable de esta diferencia al menor contenido en clorofila de los líquenes (Green & Lange, 1994). Por ello, la elección de unidades de referencia para expresar el rendimiento fotosintético puede invalidar las comparaciones entre diferentes organismos, así como afectar a la interpretación de resultados dentro de un mismo género o especie. Las grandes diferencias encontradas en fotosíntesis neta (FN) en base a peso seco para talos de *Umbilicaria* de distintos tamaños desaparecieron cuando las tasas se calcularon en función de superficie (Larson, 1979, 1984).



Asimismo, al calcular las tasas en función del contenido en clorofila, los líquenes y briófitos son incluso más eficientes que las plantas vasculares si se tiene en cuenta la fotosíntesis bruta ( $FB = FN + \text{respiración en oscuridad, RO}$ ), pues tienen una FN similar, pero una mayor RO.

### **Concentración de CO<sub>2</sub> ambiental**

Se ha demostrado que los niveles de CO<sub>2</sub> normales en el ambiente (actualmente, unas 380 ppm) son limitantes para la fotosíntesis de plantas superiores (Stitt, 1991), de briófitos (Coxson & Mackey, 1990) y de líquenes (Cowan *et al.*, 1992). La causa subyacente es el alto valor de la constante de Michaelis-Menten ( $K_M$ ) para el CO<sub>2</sub> de la Rubisco, que no se satura hasta que la concentración es cinco veces superior a la ambiental; además, esta enzima tiene una función oxigenasa que disminuye la eficiencia del proceso de fijación. En todos los organismos fotosintéticos con metabolismo C3 un incremento de CO<sub>2</sub> en el ambiente causaría un funcionamiento más eficiente de la Rubisco, al potenciar su actividad carboxilasa frente a la oxigenasa. En líquenes, algunos ficobiontes como *Trebouxia* y todos los cianobiontes tienen bombas de CO<sub>2</sub> que conforman un mecanismo de concentración de carbono (CCM), capaz de incrementar la concentración de CO<sub>2</sub> alrededor de la Rubisco. El CCM también puede disminuir los niveles internos de CO<sub>2</sub> a niveles cercanos a cero, lo cual ayuda a superar la alta resistencia a la difusión que puede ocurrir en líquenes, especialmente a altos contenidos hídricos (Cowan *et al.*, 1992).

### **Agua**

Como los líquenes son incapaces de regular su estado de hidratación, éste es uno de los determinantes más importantes de su fotosíntesis. El contenido hídrico del talo puede variar desde el equilibrio con el aire (un 10% del peso seco aproximadamente) hasta la completa saturación (que puede llegar a ser el 400% del peso seco en clorolíquenes y el 1000% en cianolíquenes) y esto está altamente influido por la morfología y estructura del talo. Muchos estudios han subrayado la importancia del contenido hídrico y han descrito el comportamiento de la fotosíntesis a distintos niveles hídricos (v.gr., Coxson *et al.*, 1983; Lange *et al.*, 1995, 1996, 2001).

Los líquenes están, por tanto, sometidos a procesos más o menos frecuentes de desecación-rehidratación. La frecuencia de estos procesos puede ser limitante para muchas especies en hábitats concretos, pues afecta profundamente a su balance de carbono. Periodos de actividad demasiado cortos e infrecuentes pueden conllevar tasas de respiración muy altas, haciendo imposible la obtención de un balance de carbono positivo. La dinámica de absorción y pérdida de agua es muy variable y depende del ambiente que rodea al talo, de la propia capacidad máxima de retención de agua de éste, y del estado hídrico. Estos dos últimos parámetros dependen estrechamente de la morfología del talo, la anatomía y el color (Rundel, 1982; Lange *et al.*, 1993, 1999).

Una de las razones que explican la efectividad de estos organismos a bajos contenidos hídricos es la capacidad de los líquenes con algas verdes para reactivar su actividad fotosintética en presencia de vapor de agua (v.gr., Lange & Kilian, 1985;



Scheidegger *et al.*, 1995; Pintado & Sancho, 2002). Esta capacidad puede ser clave para el establecimiento y la supervivencia de muchas especies en situaciones ecológicas en las que la actividad metabólica está limitada por la disponibilidad de agua líquida. Hay muchos ambientes en que ésta es escasa o incluso ausente, pero en los que sí existen altos niveles de humedad de manera frecuente o periódica, como en algunos desiertos áridos (Lange *et al.*, 1970; Lange & Tenhunen, 1982; Lange & Redón, 1983). Los líquenes con cianobiontes son mucho menos eficientes o completamente incapaces de reactivar su fotosíntesis mediante la hidratación procedente del vapor de agua, necesitan agua líquida (Lange *et al.*, 1986; Schlenzog *et al.*, 2000).

A altos contenidos hídricos del talo, por encima de la cantidad de agua a la que se alcanza la FN óptima, la tasa fotosintética puede verse poco afectada o puede mostrar diversos grados de depresión (Fig. 1.6). Se han llevado a cabo estudios con mezclas de helox (helio/oxígeno) que han demostrado que la causa de esa depresión es el incremento de la resistencia a la difusión del CO<sub>2</sub> a altos contenidos hídricos (Cowan *et al.*, 1992). El grado de depresión es específico de cada especie, pero puede variar notablemente incluso dentro de la misma especie en muestras de diferente procedencia (Lange & Green, 2006). Esta depresión significa que la ganancia fotosintética puede verse sustancialmente reducida a altos contenidos hídricos. Este problema no ocurre en briófitos, que son capaces de separar el almacenamiento de agua de las rutas de difusión de CO<sub>2</sub> (Green *et al.*, 2011a).

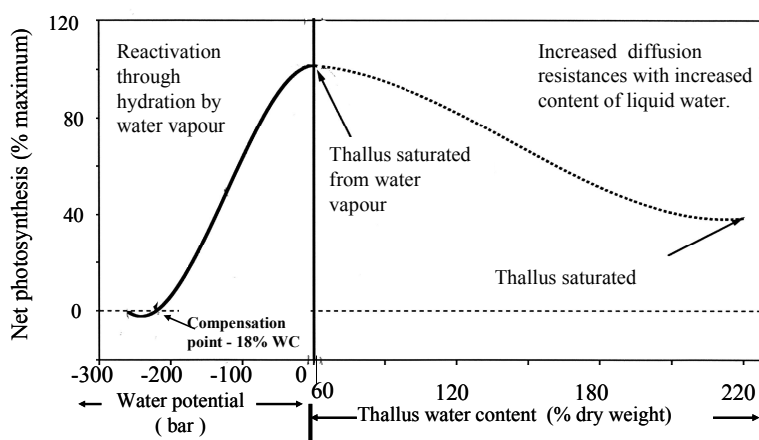


Fig. 1.6: Respuesta de la FN al contenido hídrico del talo en *Ramalina maciformis* (a partir de Schulze *et al.*, 2002).

Pintado *et al.* (1997) describieron dos estrategias diferentes en cuanto a la dinámica de captación y retención de agua en poblaciones de *Ramalina capitata* en exposición norte y sur. Las de la cara sur tenían una mayor capacidad de acumulación de agua y su tiempo de retención era también mayor, así como su contenido en clorofila. La explicación que proporcionaban es que ello era consecuencia de los periodos de actividad más cortos en la cara sur de las rocas en comparación con la norte, donde las fuerzas de evaporación son menores, indicando que en ese caso el principal factor que induce diferencias ecofisiológicas entre las dos poblaciones no es la irradiación, sino la eficiencia en la utilización de la luz durante los breves periodos en los que las condiciones de hidratación son adecuadas. En un estudio posterior,

Pintado *et al.* (2005) mostraron una capacidad similar de retención de agua para ecotipos de sol y sombra de *Diploschistes diacapsis*, cuando se hacía el cálculo en función del peso seco, pero los talos de sol tenían un valor más bajo si el cálculo se refería a superficie, mostrando por tanto periodos de hidratación más cortos combinados con tasas de FN más altas. Valladares *et al.* (1993, 1997) demostraron que la capacidad de retención de agua incrementaba al aumentar la densidad del talo en especies de Umbilicariáceas.

### Luz

La respuesta de la fotosíntesis de los líquenes a la luz se muestra en la Fig. 1.7, donde se puede observar una típica curva de saturación. En la parte inicial la luz es limitante y esa pendiente inicial está definida como el rendimiento cuántico de la fotosíntesis ( $\Phi$ ). Después se llega a una parte limitada por la velocidad de la reacción de la carboxilación, donde el incremento en luz fotosintéticamente activa (PPFD) no produce un incremento significativo de FN (Palmqvist, 2000). El valor de RO se obtiene a PPFD= 0. El punto de compensación de luz (Pc) es el nivel de PPFD al que la FN es igual a 0, es decir, la RO es igual a la fotosíntesis bruta (FB). El punto de saturación de luz normalmente se define como la PPFD a la que se alcanza el 90% de la tasa máxima de FN (Green *et al.*, 1997).

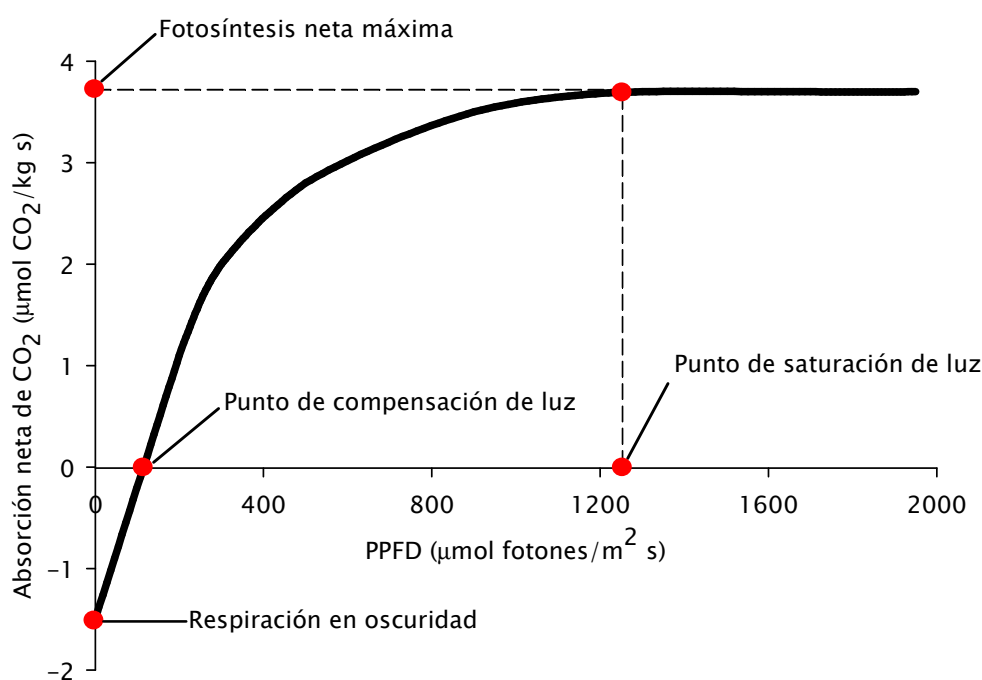


Fig. 1.7: Respuesta de la fotosíntesis a la luz.

Como ocurría con el agua, la tolerancia a la luz, la preferencia por unos niveles lumínicos u otros, y el comportamiento al cambiar los regímenes lumínicos son altamente dependientes del hábitat de los líquenes. Desde hace tiempo se han diferenciado las llamadas “plantas de sol” y “plantas de sombra” (v.gr., Björkman, 1981). Las plantas de sol viven de manera obligada en localidades soleadas y suelen ser capaces de obtener tasas de FN más altas a PPFD más altas que las plantas de

sombra, que viven en lugares no expuestos a luz directa. Las plantas de sol también suelen mostrar valores más altos de Pc y Ps, y tasas más altas de RO. Dentro de una misma planta algunas hojas se pueden adaptar a irradiaciones más bajas, mostrando propiedades tendentes a las de las hojas de plantas de sombra. Por el contrario, las plantas de sombra resultan dañadas con facilidad por el exceso de luz. En principio, esperaríamos que los líquenes tuvieran un comportamiento similar en cuando a su ambiente lumínico, pero su naturaleza poiquilohidra representa un posible escudo frente a la alta irradiación, porque tienden a desecarse y por tanto a inactivarse en esas condiciones. Se ha visto que cuando están activos están sometidos a menudo a niveles lumínicos mucho más bajos que los que sugiere el ambiente lumínico general (Schroeter *et al.*, 2011). Se ha demostrado que cuando los líquenes están activos las altas irradiaciones pueden inhibir los procesos fotoquímicos del FS II, debido a un exceso de energía provocado por el exceso de irradiación absorbida por los complejos antena (Gauslaa & Solhaug, 1996; Barták *et al.*, 2008). Este proceso se había observado previamente en plantas vasculares (Powels, 1984). El contenido hídrico tiene por tanto una gran influencia en el modo en que los líquenes interactúan con la radiación incidente. Los fotobiontes de los líquenes están mucho más protegidos de la luz que las células foliares, al tener un córtex fúngico que suele contener sustancias o estructuras que dispersan una gran proporción de la luz incidente. Algunas especies son verdes cuando están hidratadas, indicando que el córtex es casi transparente entonces. Se han planteado algunos estudios con el fin de evaluar el nivel real de luz que llega a las células fotosintéticas (Büdel & Lange, 1994, Dietz *et al.*, 2000), que han demostrado que el aparato fotosintético del líquen experimenta probablemente condiciones de sombra profunda, incluso cuando está expuesto a la luz más intensa (Green & Lange, 1994). Sin embargo, está fuera de duda que los líquenes son capaces de adaptarse a distintos ambientes lumínicos. Se ha establecido un rango de puntos de saturación lumínica desde el 1% a más del 50% de la luz incidente a pleno sol (Green & Lange, 1991; Lange *et al.*, 1991) y Green *et al.* (1991) encontraron un valor de compensación lumínica de sólo 1  $\mu\text{mol}$  de fotones  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  para *Pseudocyphellaria dissimilis*, mientras que puede alcanzar los 200  $\mu\text{moles}$  de fotones  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  para líquenes que viven en bosques caducifolios abiertos (Kershaw, 1985). Muchas especies muestran también una gran capacidad de aclimatarse a los cambios de PPFD debido a la estacionalidad del dosel arbóreo. Se han encontrado valores más altos de Pc y Ps para las irradiaciones más altas invernales en estos ambientes (Kershaw, 1985).

Algunos estudios han sugerido que probablemente los líquenes fotosintetizan habitualmente en condiciones ambientales fuera de las que se supone que son óptimas según las curvas de respuesta a PPF (Schroeter *et al.*, 1995; Green *et al.*, 1995). Asimismo, en una revisión reciente Green y colaboradores (2011a) muestran que los líquenes, a diferencia de los briófitos, suelen estar activos a contenidos hídricos subóptimos para la FN, tanto por exceso como por defecto.

## Temperatura

La FN muestra una típica respuesta a la temperatura (Fig. 1.8). La tasa de FN aumenta con la temperatura hasta que se alcanza un máximo a partir del cual vuelve a descender debido a la respuesta diferente de la RO, que aumenta casi exponencialmente con la temperatura hasta la desnaturalización de las membranas y las enzimas por efecto del calor. La FB se eleva hasta una tasa máxima y permanece constante hasta que se llega al daño térmico. Como en el caso de la luz y del contenido hídrico, el comportamiento del líquen frente a la temperatura se muestra altamente dependiente del hábitat en el que vive cada especie.

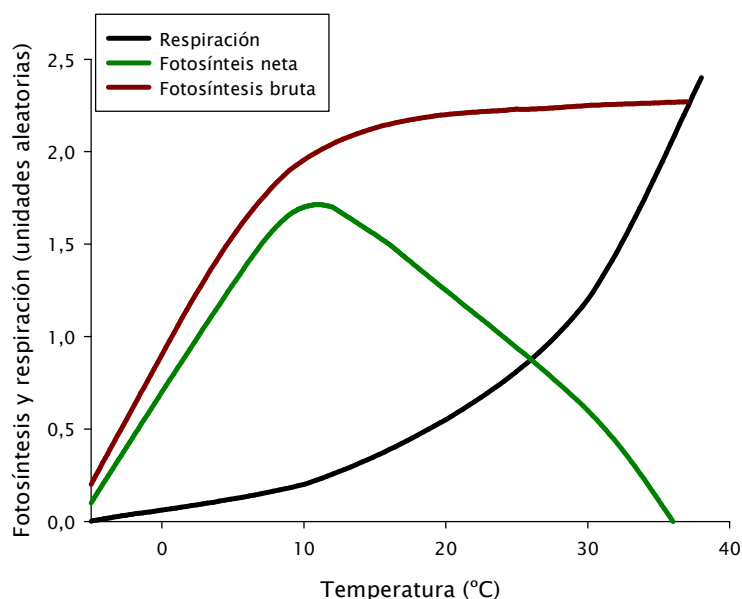


Fig. 1.8: Respuesta de la RO, FN y FB a la temperatura.

Se han medido temperaturas óptimas desde valores tan bajos como 5°C en muestras árticas y antárticas (v.gr., Green *et al.*, 2011b) hasta valores tan altos como 28°C (*Diploschistes diacapsis*, desierto de Utah, Lange *et al.*, 1997). Como ocurría con el contenido hídrico y la disponibilidad lumínica, los líquenes parecen estar raramente activos, si es que lo están alguna vez, a los óptimos de temperatura medidos en laboratorio (Schroeter *et al.*, 2010), pero normalmente son capaces de obtener buenas tasas de FN dentro de un amplio rango de temperaturas. Esto es especialmente ventajoso para bajas temperaturas, porque la RO es mucho menor con respecto a la FN. Ésta aún tiene lugar cuando la temperatura es demasiado baja para que se detecte RO. Se han medido tasas de FN en muestras antárticas de *Umbilicaria decussata* a -11 °C, mientras que la RO cesó entre -5 y -8 °C (Lange, 1965). Otro estudio mostró una casi completa aclimatación de la RO a la temperatura a lo largo del año en varias especies de líquenes (Lange & Green, 2005).

### Respiración

Como se ha dicho ya previamente, las tasas de respiración tienen gran influencia en las tasas de FN. La respiración es un proceso metabólico necesario para proveer de energía para los procesos de crecimiento, transporte y asimilación y para transformar el carbono fijado en sustancias que pueden utilizarse para el crecimiento y el

mantenimiento de los organismos (Palmqvist, 2000). El ergosterol (Erg), al ser el principal esteroide de la membrana plasmática fúngica (Ekblad *et al.*, 1998), ha sido utilizado como un marcador indirecto de la biomasa fúngica viva en varios estudios con líquenes (Palmqvist *et al.*, 2002; Dahlman & Palmqvist, 2003; Sundberg *et al.*, 1999; Gaio-Oliveira *et al.*, 2004) y con asociaciones de micorrizas con plantas (Ekblad & Näsholm, 1996). Sundberg *et al.* (1999) encontraron una relación muy estrecha entre esta molécula y la RO, apoyando de esta manera la hipótesis de que la mayor parte de la RO está provocada por la parte fúngica de la simbiosis. Sin embargo, en una investigación posterior donde se estudiaban 75 especies de líquenes de distintos hábitats, Palmqvist *et al.* (2002) no incluyeron el Erg en el modelo predictivo de la RO en ninguno de esos hábitats, pues no encontraron que su influencia fuera estadísticamente significativa.

### **Nutrientes inorgánicos**

Los elementos esenciales que las plantas requieren para su desarrollo son hidrógeno, carbono, oxígeno, nitrógeno, potasio, calcio, magnesio, fósforo, azufre, cloro, boro, hierro, manganeso, cinc, cobre y molibdeno (Epstein, 1972). Se piensa que los líquenes consiguen estos elementos por deposición directa, en húmedo o en seco, en el talo (Nash, 1996). Pero algunos estudios sugieren que podría haber una translocación de P y N desde partes viejas y moribundas del talo hacia partes en crecimiento (Crittenden, 1991; Hyvärinen & Crittenden, 1998, 2000). Se cree que estos dos nutrientes son los más limitantes para el crecimiento y desarrollo de las plantas en general y los líquenes en particular (Crittenden *et al.*, 1994; Johansson *et al.*, 2010). Los cianolíquenes y los líquenes tripartitos (es decir, líquenes cuyo fotobionte primario es un alga verde, pero que alojan cianobacterias en estructuras especiales llamadas cefalodios) son capaces de fijar nitrógeno atmosférico gracias a la actividad nitrogenasa de su cianobionte. Esto les proporciona una gran ventaja adaptativa a la hora de colonizar ecosistemas pobres en N. Como se ha dicho, este elemento es limitante para los líquenes (Crittenden *et al.*, 1994), pero cuando se encuentra en exceso puede ser un factor perjudicial para las especies sensibles a él. Así, muchos estudios han mostrado la sucesión de especies sensibles a N por especies tolerantes en zonas donde ha aumentado la deposición de N atmosférico (Søchting, 1995; Van Herk, 1999; Larsen Vilsholm *et al.*, 2009). Actualmente, la deposición de este nutriente, tanto en forma oxidada como reducida, está incrementando de manera global como resultado de las actividades humanas (Galloway *et al.*, 2008). La acumulación de arginina no sólo se ha interpretado como un mecanismo para la acumulación y reserva celular de N (Legaz *et al.*, 1986), sino también como un mecanismo para evitar los efectos tóxicos de exceso de  $\text{NH}_4^+$  mediante la inmovilización de esta molécula. De este modo, Dahlman *et al.* (2002) y Dahlman & Palmqvist (2003) encontraron una cantidad de arginina 60 veces superior en respuesta a la fertilización con N. También encontraron un incremento general en la inversión de N en el fotobionte con respecto a tejidos fúngicos como resultado de esa fertilización, lo cual es necesario para producir suficientes compuestos carbonados para respaldar el proceso de inmovilización de  $\text{NH}_4^+$  y el aumento de la respiración basal de un tejido con un mayor nivel de N (Chapin *et al.*, 1987; Dahlman & Palmqvist, 2003). Muchos

líquenes han evolucionado en ecosistemas pobres en N, y tienen, por tanto mecanismos eficientes de captación de este elemento, pero pueden no ser capaces de regularlos cuando hay un exceso de N, mostrando una tendencia a ser conservativos y a absorber grandes cantidades de recursos cuando están disponibles (Johansson *et al.*, 2010).

### Clorofila

Las plantas de sombra suelen tener contenidos de clorofila más altos en función de peso seco que las plantas de sol (Boardman, 1977; Björkman, 1981; Björkman & Demmig-Adams, 1994). Ambos tipos tienen una cantidad similar de Chl por centro de reacción, pero hay más centros de reacción del FS II por cadena de transporte electrónico en plantas de sombra, con el fin de optimizar la captación de luz (Björkman, 1981). En consecuencia se observa una menor proporción Chl $a$ /Chl $b$ . Esta situación no es tan clara en líquenes. En muchos estudios se ha observado que las poblaciones de lugares sombreados tienen un contenido en Chl más alto que aquéllos de lugares más iluminados (v.gr., Kappen, 1983; Legaz *et al.*, 1986; Strobl & Türk, 1990; Tretiach & Brown, 1995). Pintado *et al.* (2005) encontraban un contenido de Chl por peso seco similar entre poblaciones de sol y de sombra de *Diploschistes diacapsis*, pero cuando el cálculo se hacía en función de superficie, la cantidad de Chl era superior en la población de sombra.

Valladares *et al.* (1996) describieron una correlación entre el contenido en Chl y el ambiente lumínico para diferentes especies de Umbilicariáceas. Por ejemplo, *Lasallia hispanica*, que vive en bloques de granito expuestos, tenía un contenido de Chl más bajo, tanto por peso seco como por superficie, que *Lasallia pustulata*, que suele vivir en lugares más sombreados. De esta forma, se ha observado a menudo una similitud en tasas de FN cuando los cálculos se refieren a unidad de Chl entre líquenes de sol y de sombra (v.gr. Valladares *et al.*, 1996) o entre ecotipos de la misma especie (Kershaw *et al.*, 1983, MacFarlane *et al.*, 1983), indicando que los líquenes de sombra tienen normalmente tasas más altas de FN por peso seco, pero también mayor cantidad de Chl (ver más abajo). Se esperaría una correlación entre el contenido en Chl y la tasa fotosintética suponiendo un número relativamente constante de moléculas de Chl por centro de reacción. Sin embargo, Pintado *et al.* (2005) describieron distintas estrategias en formas de sol y de sombra de *Diploschistes diacapsis*: periodos de actividad cortos, pero con grandes tasas de FN en talos en exposición sur, y periodos de humedad más largos, pero con tasas de FN más bajas en los talos sombreados por la exposición al norte, que tenían mayor contenido en Chl por unidad de superficie. Éste parece ser el comportamiento habitual de líquenes que viven en hábitats donde la disponibilidad de agua es limitante, como los ambientes ártico-alpinos o las zonas mediterráneas (Pintado *et al.*, 1997), donde la brevedad de los periodos con disponibilidad hídrica condiciona profundamente la supervivencia de los organismos fotosintéticos, siendo más determinante que el régimen lumínico. Del mismo modo, Schipperges *et al.* (1995) observaron un mayor contenido en Chl en líquenes de zonas más meridionales y secas que en otros procedentes de áreas más húmedas.

En plantas superiores se ha comprobado que la absorción de la radiación depende en gran medida de la concentración de los pigmentos fotosintéticamente activos, que suponen el factor limitante para los procesos fotoquímicos bajo luz intensa (Agustí, 1994). A cualquier nivel lumínico por debajo de la saturación el factor limitante es la intensidad de luz. Como la mayoría de los líquenes están activos a PPFD subóptimas en condiciones naturales, la Chl no será nunca el factor limitante. Además, el contenido de Chl por unidad de área parece ser suficiente para absorber entre el 80 y el 99% de la luz incidente en doce especies de *Umbilicaria* y *Lasallia* (Valladares *et al.*, 1996). Sin embargo, varios estudios han mostrado una importante correlación positiva entre el contenido en Chl y las tasas de FN o el crecimiento (v.gr., Nash, 1980; Tretiach & Carpanelli, 1992; Palmqvist *et al.*, 2002; Dahlman & Palmqvist, 2003; pero véase Pintado *et al.* 1997). Como señalaron Valladares *et al.* (1996), esto puede explicarse por el hecho de que incluso cuando el contenido de Chl no parece ser un factor limitante para la fotosíntesis máxima, la presencia de un córtex grueso puede desempeñar un papel muy importante en la limitación de la penetración de la luz (aunque es posible que también exista una dispersión de la luz dentro del talo debido a la presencia de cristales en la médula), dificultando la evaluación de la cantidad de luz realmente absorbida por los complejos antena. También encontraron una relación inversa entre la cantidad de algas y la concentración intracelular de Chl, que explicaron como un mecanismo para evitar el auto-sombreado al distribuir más eficazmente los pigmentos fotosintéticos sobre una superficie determinada. Efectivamente, un contenido demasiado alto de Chl podría implicar auto-sombreado entre las células del alga, incluso en líquenes foliáceos, donde, al contrario que en los fruticulosos, las células del fotobionte están casi siempre expuestas directamente a la máxima radiación incidente (Pintado *et al.*, 1997). Un talo con una alta relación superficie-volumen (bajo peso específico del talo) probablemente tendrá una absorción de luz más eficiente. Con el mismo contenido en Chl, alcanzará mayores tasas de FN por unidad de Chl. Pero su capacidad de retención de agua sería quizá más baja (Sancho, resultados inéditos).

La Chl<sub>a</sub> se ha utilizado con mucha frecuencia como marcador de la biomasa del fotobionte en la simbiosis líquénica (v.gr., Tretiach & Carpanelli, 1992; Raven, 1992; Enríquez *et al.*, 1996; Palmqvist *et al.*, 2002; Dahlman & Palmqvist, 2003; pero ver también Strobl & Türk, 1990; Valladares *et al.*, 1996). La Chl<sub>a</sub> se correlaciona no sólo con la FN, sino también con la RO entre diferentes especies (Tretiach & Carpanelli, 1992; Green *et al.*, 1997; Palmqvist *et al.*, 1998; Palmqvist & Sundberg, 1999, Palmqvist *et al.* 2002). Este hecho llevó a Palmqvist (2000) a sugerir que la demanda de hidratos de carbono por parte del micobionte puede regular la población y/o actividad del fotobionte para un conjunto de especies de líquenes. Palmqvist *et al.* (2002) mostraron en un amplio estudio con 75 especies de líquenes que la capacidad fotosintética parece incrementar más que la respiración con el aumento de Chl<sub>a</sub>, en lo que sería una respuesta adecuada para aumentar la ganancia de carbono en situaciones de mayor respiración basal correspondiente a talos que probablemente tienen un mayor contenido en N, teniendo en cuenta la relación positiva existente entre N y Chl<sub>a</sub>.



No obstante, la relación entre crecimiento y contenido en Chl y entre Chl y FN o RO podría ser también un resultado de la covariación de estos factores, es decir, el crecimiento o la tasa de FN no son una consecuencia de la cantidad de Chl, sino que simplemente responden del mismo modo a un factor determinado, probablemente el régimen lumínico en el ambiente. Una radiación más intensa o más duradera potenciaría el metabolismo, promoviendo de este modo la síntesis tanto de Chl como de todas las proteínas pertenecientes al aparato fotosintético.

### **Estructura del talo**

Varios estudios han señalado la importancia de la anatomía y morfología del talo en sus relaciones hídricas, y en consecuencia en su capacidad fotosintética (Valladares *et al.*, 1993, 1997; Pintado *et al.*, 2005, Dahlman & Palmqvist, 2003). Sojo *et al.* (1997) encontraron morfotipos diferentes del líquen endémico antártico *Catillaria corymbosa*, que, cuando crecen en zonas protegidas muestran una morfología mucho más compacta, lo que conlleva una menor relación superficie-volumen y, por tanto, una reducción de la pérdida de agua por evaporación. Esto permite a los talos ampliar su periodo de actividad metabólica, lo cual puede ser muy conveniente para colonizar y prosperar en cavidades donde el agua líquida es escasa. Se ha relacionado un mayor IPE (índice de peso específico, calculado como peso seco por unidad de superficie) con una capacidad de retención de agua más alta (Snelgar & Green, 1981; Pintado *et al.*, 2005; Dahlman & Palmqvist, 2003) y se ha sugerido que es la consecuencia de la alta irradiación (Hilmo, 2002) o una respuesta adaptativa a la erosión del viento (Kappen, 1973).

### **Metabolismo del carbono**

Los hidratos de carbono producidos por la fotosíntesis en los ficobiontes verdes son polioles. En *Trebouxia* se produce principalmente ribitol, que es exportado al micobionte, quien, vía pentosas-fosfato lo transforma rápida e irreversiblemente en arabitol y a partir de ahí, en arabinosa, ribosa, fructosa y finalmente en manitol, la molécula de almacén y reserva, haciéndolo inaccesible para el fotobionte (Gorin *et al.*, 1988; Fahselt, 1994; Palmqvist *et al.*, 2008). El arabitol se utiliza más rápidamente que el manitol en condiciones adversas. De este modo, puede funcionar como una reserva de hidratos de carbono a corto plazo y de alta disponibilidad (Palmqvist *et al.*, 2008). La alternancia entre desecación y rehidratación de los talos era necesaria para el metabolismo y translocación de los polioles en *Hypogymnia physodes*, según Farrar (1976). Y a su vez, como se ha dicho antes, los polioles parecen ejercer un importante papel en la protección celular a bajos niveles hídricos, promoviendo la absorción pasiva de agua y el mantenimiento del potencial osmótico y la turgencia celular, disminuyendo de este modo el daño celular (Smith *et al.*, 1969; Farrar, 1988; Ahmadjian, 1993). A bajas actividades de agua protegen la estructura de otras moléculas, como proteínas y ácidos nucleicos al reemplazar realmente las moléculas de agua en ellas, impidiendo así su ruptura (Green *et al.*, 2011a). Farrar también sugirió el uso de las reservas de polioles como tampón frente al excesivo consumo de proteínas y otros componentes básicos de la célula; de este modo, los polioles se



quemar antes en la llamada respiración de resaturación, que sucede cuando los líquenes se rehidratan, tras un periodo seco (Farrar, 1976, 1978). Así, las cantidades de proteínas y polisacáridos tienden a permanecer constantes, mientras que el nivel de polioles aumenta y disminuye, según las condiciones a las que está sometido el líquen. Sin embargo, no está claro si este proceso es ecológicamente relevante o no (Lange, 2003a). Los polioles son también excelentes antioxidantes y los únicos que funcionan en líquenes a bajos contenidos hídricos (Green *et al.*, 2011a).

### **¿Por qué estudiar líquenes?**

Como se ha mencionado al principio, los líquenes constituyen la principal cobertura vegetal en regiones polares y alpinas, donde las plantas superiores son muy escasas o incluso ausentes (Kappen, 1988; Ahmadian, 1993), siendo por tanto, parte fundamental de esos ecosistemas. A pesar de su importancia, aún estamos lejos de comprender enteramente el funcionamiento fisiológico y ecofisiológico de los líquenes y su potencial adaptativo, conocimientos fundamentales para poder predecir su comportamiento en hipotéticos escenarios forzados por el cambio global, y, por tanto, para poder pronosticar el futuro de los ecosistemas dominados por ellos. Los gradientes naturales son una herramienta muy útil para el estudio de las respuestas a largo plazo de organismos y ecosistemas a los cambios en factores abióticos (Diamond, 1986), ya que algunos de estos factores varían, mientras que otros permanecen más o menos constantes (Fukami & Wardle, 2005). Son especialmente interesantes en el caso de los líquenes, como organismos sésiles, de crecimiento lento y difícilmente cultivables fuera de su ambiente. En el presente trabajo se ha estudiado la respuesta de tres especies de líquenes a tres gradientes ambientales diferentes:

1. Gradiente latitudinal (*Umbilicaria decussata*, capítulo 2). El estudio del comportamiento de las mismas especies y de ecosistemas similares en distintos puntos del globo es muy útil para la evaluación de la posible universalidad de los procesos y respuestas ante las alteraciones del medio natural de origen antropogénico o no (v.gr., Bird *et al.*, 1996; Gholz *et al.*, 2000; Wardle *et al.*, 2004). Ha sido una aproximación muy utilizada en líquenes, ya que muchas especies presentan amplias distribuciones que facilitan y hacen muy interesantes estos estudios (v.gr., Schipperges *et al.*, 1995; Sancho *et al.*, 2000; Pintado *et al.*, 2005; Green *et al.*, 2011b).
2. Gradiente altitudinal (*Lasallia hispanica* y *Lasallia pustulata*, capítulo 3). Los gradientes altitudinales permiten la investigación del impacto a largo plazo de los cambios de temperatura en espacios geográficos reducidos y tiempos cortos (Körner, 2007; Fukami & Wardle, 2005). Se han llevado a cabo muchos estudios aprovechando gradientes altitudinales, tanto en especies de plantas vasculares y comunidades (v.gr. Whittaker, 1975; Körner, 1999; Cordell *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2004), como en líquenes (v.gr., Larcher & Vareschi, 1988; Pirintsos *et al.*, 1993, 1995; Loppi *et al.*, 1997; Pintado *et al.*, 2001).

3. Gradiente estacional (*Lasallia hispanica* y *Lasallia pustulata*, capítulos 4 y 5). Los cambios en los factores abióticos inducidos por el paso de las estaciones son importantes, pues suceden de manera repetitiva y regular en un espacio de tiempo corto y deben ser especialmente tenidos en cuenta en regiones templadas, donde son más acusados. En la región mediterránea en concreto son más bruscos (Joffre *et al.*, 2007), por lo que proporcionan una buena oportunidad para el estudio de cambios fisiológicos en poco tiempo. También hay diversos estudios centrados en los cambios estacionales en el metabolismo de líquenes (v.gr., Stålfelt, 1939; Lechowicz & Adams, 1974; Larson, 1980; MacKenzie *et al.*, 2001; Pirintsos *et al.*, 2011).



## 1. INTRODUCTION



Lichens are the intriguing result of a symbiotic process between a fungus (the mycobiont) and a photosynthetic partner (the photobiont) that can be a green alga and/or a cyanobacterium. The heterotrophic fungal partner provides the photobiont with an structure for photosynthesis in an aerial rather than an aquatic environment, and the autotrophic algal partner gets energy for both symbionts through photosynthesis. Therefore, lichens may be more competitive than their isolated partners and able to colonise new habitats, being the predominant vegetative cover in the 8% of the terrestrial habitats (Larson, 1987), in particular extreme habitats such as polar and alpine regions (Kappen, 1988; Ahmadijan, 1993). Their success with respect to vascular plants in these barren environments is a function of the poikilohydric lifestyle of lichens, which allows them to endure adverse conditions while they are inactive due to desiccation and thus allows them to exploit environments with minimal water storage such as rock surfaces. The disadvantage is that their growth is slower compared to most vascular plants, for they have a shorter activity period. When active, lichens convert incident light energy into new biomass as efficiently as vascular plants (Palmqvist & Sundberg, 2000). The process by which both lichens and vascular plants obtain energy for their vital functions is the photosynthesis.

### **Photosynthesis**

Photosynthesis is the process by which autotrophic organisms fix atmospheric CO<sub>2</sub> into carbohydrates using light energy for this reduction, thus obtaining chemical energy for their survival, growth and reproduction. As in lichens, several heterotrophs have taken advantage of this ability by forming symbioses with plants, algae or autotrophic bacteria. Fungi have lichenised independently several times through evolution with photosynthetic green algae and/or cyanobacteria, forming structured, homogeneous looking thalli, which are often regarded as single autotrophic organisms (Gargas *et al.*, 1995). Lichens, therefore, have an energy raising process, photosynthesis, which relies exclusively on the photobiont, and an energy consuming process, respiration, which takes place in both bionts, although it is suggested that total thallus respiration mainly reflects the metabolic activity of the mycobiont, much more abundant in heteromerous lichens than the photobiont, which may constitute as little as the 10% of the total thallus biomass (Sundberg *et al.*, 1999).

### **The photosynthetic process**

Photosynthesis takes place inside the chloroplast of plant cells and eukaryotic algae (Fig. 1.1) and in the thylakoids of cyanobacteria, the latter being the most probable origin of chloroplasts through an endosymbiotic process (Margulis, 1970; Cavalier-Smith, 1987).

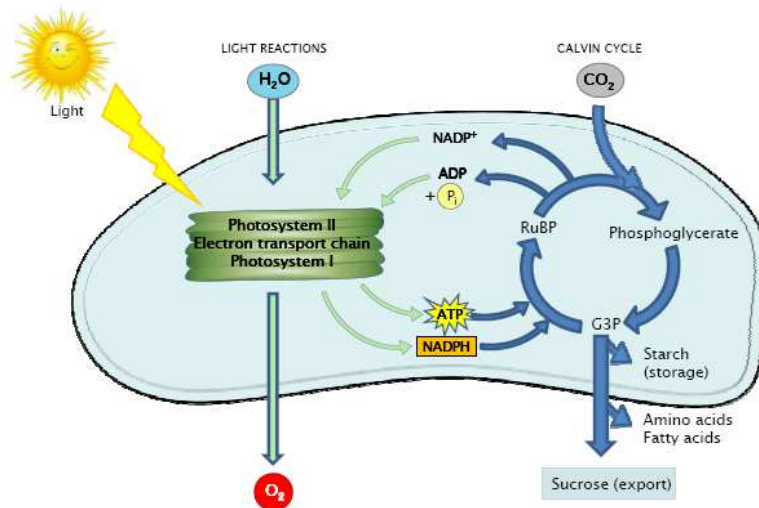


Fig. 1.1: Photosynthetic process within a chloroplast (J.M. Vivas).

Photosynthesis can be broadly divided into two processes, the first being the so-called ‘light reactions’, by which the light energy of photons is captured and delivered in a form that is metabolically useful (usually reduced molecules or energy carriers, ATP). Second are the so-called ‘dark reactions’. These utilise the energy carriers from the light reactions to fix carbon dioxide to produce carbohydrates. Dark reactions are so called because they do not require light, however, they typically only run in the light and CO<sub>2</sub> fixation stops when there is no light. Limitations to the photosynthetic process can occur at almost all stages of the light and dark reactions. Such limitations, however, are interesting as they may be related to the ecology of the lichens. There is also the possibility that the lichens themselves can also apply limitations such as control of overall growth and carbon balance which, therefore, may not be tightly linked to the environment.

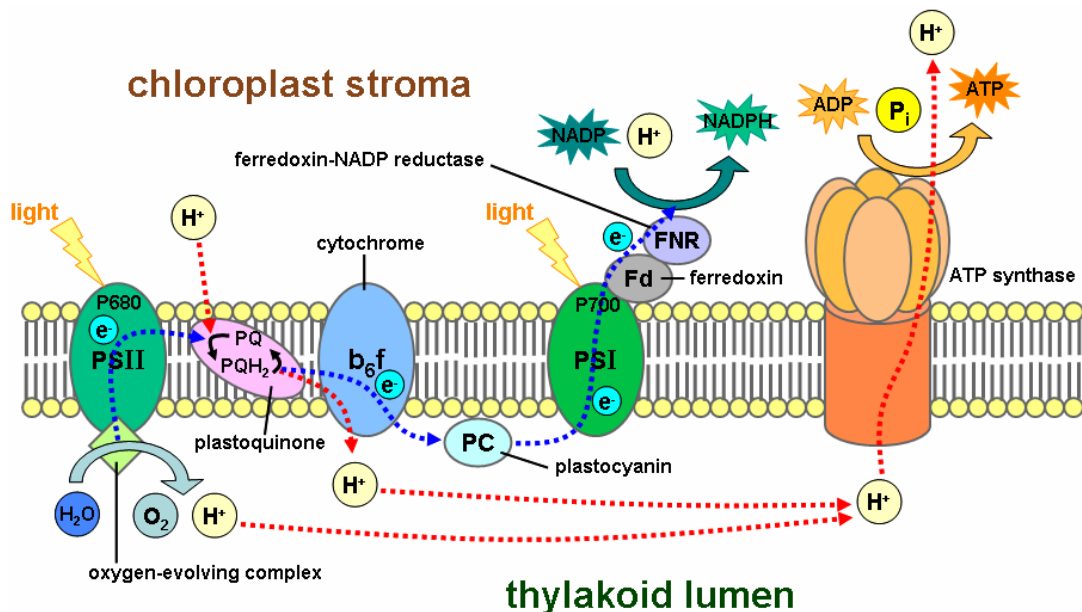


Fig. 1.2: Chloroplast light reactions (Source: Wikimedia Commons.)

A summary of the light reactions is given in Fig. 1.2. The receptors for light radiation are the chlorophyll molecules (Chl) *a* and *b*. Both have major absorption

peaks in the red and blue, but differing slightly in their maximal absorption wavelengths. Other accessory pigments, such as carotenes and xanthophylls can be present. These absorb mainly in the blue and UV. Cyanobacteria lack Chl*b*, but contain additionally phycocyanin and phycoerythrin inside structures called phycobilisomes. These pigments are all associated with light harvesting protein complexes, constituting the so-called photosystems. Within them, the chlorophylls form antennae, that absorb light, and which are attached to reaction centres, formed by Chl *a* molecules with absorption maxima further towards the red than the chlorophylls in the antennae, thus ensuring that all absorbed photons eventually end up in the reaction centres. Two different photosystems are present. Photosystem I (PS I) was the first to appear in evolution and its predominant antenna pigment is Chl*a*. The reaction centre (P700) is a Chl*a*-protein complex with an absorption peak at 700 nm. Photosystem II (PS II) contains a Chl*a*-protein complex with maximal absorption at 680 nm (P680), and has a higher proportion of Chl*b* and xanthophylls in its antenna. These latter pigments have an important role in removing excess energy.

PS II has high oxidising potential and can split water, so that it is an electron donor to the reaction centre. PS I is a weak oxidiser and receives electrons from PS II, but a strong reducer so that it can reduce the acceptor molecule NADP. Reduced NADPH, together with ATP from the electron transport pathway linking both photosystems, can then be used to fix CO<sub>2</sub>.

The process begins when a photon of light is absorbed by the pigments producing excited electrons within the chlorophyll molecules of the antenna of PS II which are then gathered at the reaction centre and passed to the primary electron acceptor, phaeophytin, and subsequently, to the electron transport chain. The electrons required for the reduction of Chl are in most organisms provided by photolysis of water. In the course of photolysis protons and oxygen are also released. These protons accumulate inside the thylakoid of chloroplasts, generating a proton gradient which provides the energy for the formation of ATP by ATP synthase in the thylakoid membranes. The excited electrons are transferred to PS I, which utilises photons absorbed in its own antenna to further excite the electron. The excited electrons are finally transferred to the enzyme ferredoxin-NADP<sup>+</sup> reductase, which uses them to convert the final acceptor NADP<sup>+</sup> to NADPH<sub>2</sub>. A steady flow of electrons from water passing through both photosystems to the acceptor is crucial to reach the optimal rate of photosynthesis. This process is also called non-cyclic photophosphorylation. Cyclic photophosphorylation can occur in PS I, which produces excited electrons that are recycled back to PS I, but which generate a proton gradient within the thylakoids that is used to produce more ATP. Cyclic photophosphorylation occurs without photolysis of water and with no production of O<sub>2</sub> or NADPH<sub>2</sub> and compensates for the ATP deficit produced in the non-cyclic process.

These ATP and NADPH<sub>2</sub> molecules are used for the reduction of CO<sub>2</sub> to carbohydrates, of higher energy value, via the reductive Pentose-Phosphate pathway or Calvin-Benson cycle, which begins with the carboxylation of ribulose 1,5-bisphosphate



(RuBP) by the enzyme RuBP-carboxylase-oxygenase (Rubisco). This protein may represent as much as the 50% of the total chloroplast soluble protein content, being therefore the major nitrogen sink of the biosphere (Chapin *et al.*, 1987). The efficiency of carboxylation is limited by the quantity and activity of Rubisco as well as by the availability of CO<sub>2</sub>, the higher its concentration in the surrounding environment, the more efficient is the carboxylative activity of Rubisco. For this reason, many photobionts have developed a CO<sub>2</sub> concentrating mechanism (CCM).

### Chlorophyll *a* fluorescence

Only a small part of the absorbed radiation goes to the photochemical process, the rest is dissipated as heat and as fluorescence. Chlorophyll *a* fluorescence, photochemistry pathway (photochemical quenching) and heat dissipation (non-photochemical quenching, NPQ) are competitive processes (Fig. 1.3).

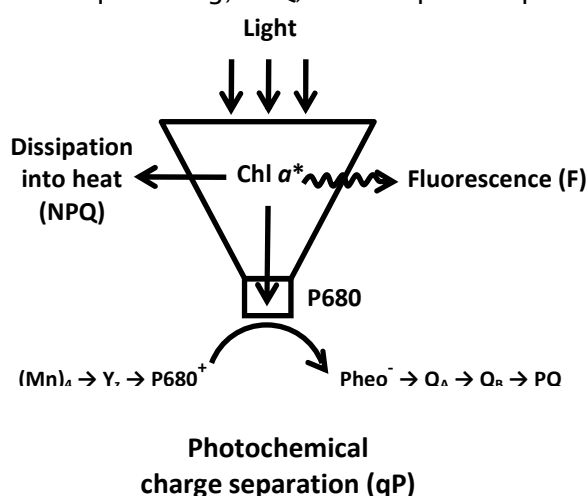


Fig. 1.3: Competition between the yields of fluorescence, heat dissipation and photosynthesis (J.M. Vivas).

NPQ (non-photochemical quenching) is a photoprotective mechanism to dissipate excessive energy by means of heat loss. The xanthophyll cycle has an important role in this process. Under stressing conditions this cycle is activated and violaxanthin is epoxidated to antheraxanthin and further to zeaxanthin. This molecule is responsible for the dissipation as heat (Demmig-Adams & Adams, 1996). Protective actions of xanthophylls also include scavenging of reactive oxygen species (Havaux & Niyogi, 1999; Gasulla, 2009). It has been shown an increase of the total xanthophyll cycle pool content (VAZ: violaxanthin, antheraxanthin and zeaxanthin) under stressing conditions of high light, low temperatures and/or nutrient stress (Demmig-Adams & Adams, 1996; Calatayud *et al.*, 1997; Vráblíková *et al.*, 2006).

The co-occurrence of these three processes in the molecules of Chl has allowed the development of non-intrusive methods to measure rapidly *in vivo* PS II activity as a proxy for photosynthesis. Being competitive processes, any increase in the efficiency of one of them will result in a decrease of the other two. Nowadays, Chl*a* fluorescence is widely used as an indicator for photosynthetic electron transport in higher plants. Although the total amount of Chl fluorescence is only 1 or 2% of the total light absorbed, by measuring the changes in the Chl fluorescence it is possible to obtain information about photochemical and non-photochemical quenching. It is necessary to

distinguish between these latter two processes in order to get complete information about the state of PS II and this can be achieved by using the saturation pulse methodology (Fig. 1.4).

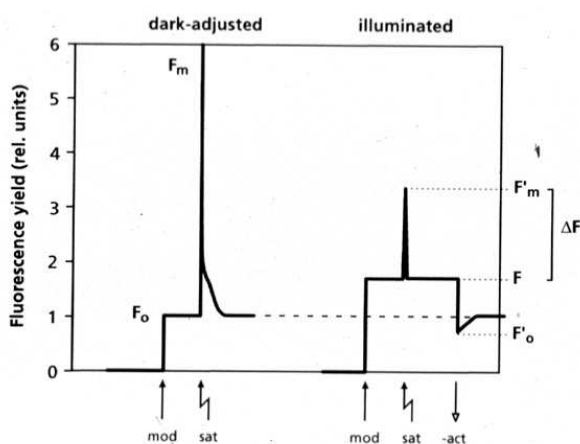


Fig.1.4: Measurement of Chl fluorescence by the saturation pulse method.

When a photosynthetic sample is held in darkness, all the reaction centres for the photosystems are opened, i.e., maximally oxidised. Exposure to a weak non actinic light ( $0.1 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , too low for photosynthesis) produces a minimal, basal value of fluorescence ( $F_0$ ). A high intensity, short duration flash of light is then given (several thousands of  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , for 1 s or less), which closes immediately all PS II reaction centres and fully reduces plastoquinone  $Q_A$  the first acceptor (after phaeophytin). The photosynthetic pathway, which is a slower process, is unable to dissipate energy, and moreover, thermal dissipation is not active in dark adapted samples. Hence, maximal fluorescence level,  $F_m$ , is observed. The difference between  $F_m$  and  $F_0$  is defined as the variable fluorescence,  $F_v$  ( $F_v = F_m - F_0$ ). The ratio  $F_v/F_m$  is an estimate of the maximum quantum yield of PS II photochemistry, i.e., the maximal potential  $Q_A$  reduction. The fluorescence measured by the fluorometers comes only from PS II.

In healthy leaves  $F_v/F_m$  normally lies close to a theoretical maximum of 0.83. A lower value is taken as an indicator of damage to PS II, leading to less efficient energy transfer. As this damage is usually due to high light, it is called photoinhibition and is usually reversible, for instance, over night. For mosses and lichens, much lower values are observed, which probably do not indicate photoinhibition, but are a result of their enhanced photoprotection, and a value of 0.63–0.76 is considered good (Jensen, 2002)

If an actinic light, at a level able to drive both photosynthesis and heat dissipation, is then applied, a basal fluorescence in the light,  $F_t$ , is obtained, which is higher than  $F_0$ . Application of a saturation pulse will cause a transient rise in fluorescence to a maximum value  $F_m'$ . The difference between  $F_t$  and  $F_m'$  is the variable fluorescence in the light,  $\Delta F$  ( $\Delta F = F_m' - F_t$ ) and is the photochemical quenching.  $F_m'$  in the light is lower than  $F_m$  in the darkened measurement and the difference is electrons taken by protection systems which remove them eventually to heat, this is the non-photochemical quenching (Fig. 1.5). A new yield can be calculated

with light-obtained values:  $(F_m' - F_t)/F_m'$ , which is called effective quantum yield of PS II ( $\Phi_{PSII}$ ). The effective quantum yield of PS II is a measure of the proportion of absorbed electrons that are transported through PS II and finally are trapped into NADPH which is used for CO<sub>2</sub> fixation. It is possible to obtain a measure of the number of electrons passing through PS II, the relative electron transport rate (ETR) by multiplying incident light by the yield:

$$ETR = [(F_m' - F_t)/F_m'] * PPFD (\mu\text{mol e}^- \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}),$$

where PPFD is the photosynthetically active photon flux density, in  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . The obtained value is called the *relative* electron transport rate, as the actual rate can only be calculated if the PPFD at the chloroplast antenna is known.

Theoretically, there should be a strong relationship between ETR and CO<sub>2</sub> fixation rate as the electrons measured by the fluorometer are those that will be used to fix CO<sub>2</sub>. In reality, the relationship can often be complex especially if there are processes after PS II that consume electrons so that they do not contribute to photosynthesis. In higher plants photorespiration is such a process and this means that photosynthesis of C3 plants is not well predicted by ETR. In mosses and lichens there are indications that alternative electron sinks, possibly oxygen, can oxidise NADPH, and this leads to a lack of relationship between ETR and photosynthesis (Green *et al.*, 1997; Proctor & Smirnoff, 2011).

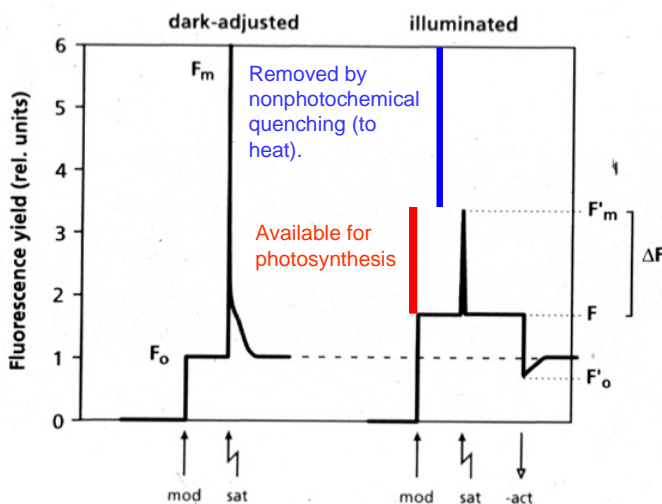


Fig. 1.5: Deduction of photochemical and non photochemical quenching values from fluorescence.

Nowadays, most measuring devices are based in the 'pulse amplitude modulated' (PAM) system. In these fluorometers, the light source used to measure fluorescence is modulated, i.e., switched on and off at a high frequency, and the fluorescence detector is tuned to detect only fluorescence provoked by the measuring light. This system has the great advantage that it allows measurements under ambient light, and not only on darkened samples.

#### Factors influencing carbon gain in lichens

Because they are poikilohydric organisms, the water status of lichens is completely dependent on their environment, in contrast with homoiohydric vascular

plants, which maintain their water status within fairly tight limits. Terrestrial poikilohydric organisms must often be able to tolerate desiccation, as most of them will dry out on at least some occasions. Therefore, the poikilohydric lifestyle affects the ecophysiology of photosynthetic performance. The environmental constraints for lichen photosynthesis are the same than for other plants: CO<sub>2</sub> concentration, light and temperature, but with the addition of a photosynthetic response to thallus water content. There are also additional constraints that can limit photosynthetic rate and these include chlorophyll content, mineral contents, especially nitrogen and phosphate, and also thallus structure because of interactions between water and diffusion of CO<sub>2</sub>.

Maximal net photosynthetic rates of lichens and of the also poikilohydric bryophytes have been found lower than those of other terrestrial plants whether calculated on a dry weight or surface area basis. The relatively lower chlorophyll content of lichens has been considered responsible for these lower photosynthetic rates (Green & Lange, 1994). Therefore, the choice of reference units for expressing photosynthetic yield can influence comparisons among different organisms as well as affect interpretation of results within lichen genera or species. Indeed, large differences in net photosynthesis (NP) on a dry weight basis for different sizes of *Umbilicaria* thalli disappeared when calculations were made on a surface area basis (Larson, 1979, 1984). Also, when comparing rates on a chlorophyll content basis, lichens and bryophytes perform even better than higher plants if gross photosynthesis (GP = NP + dark respiration, DR) is taken into account, as they have a lower or even similar NP, but a higher DR rate.

#### **Environmental CO<sub>2</sub> concentration**

Normal ambient levels (currently, ca. 380 ppm) have been demonstrated to be limiting for photosynthesis in higher plants (Stitt, 1991) as well as in bryophytes (Coxson & Mackey, 1990) and lichens (Cowan *et al.*, 1992). The underlying cause is the high K<sub>M</sub> to CO<sub>2</sub> of Rubisco which is not saturated by CO<sub>2</sub> until about 5 times preent ambient concentrations, and also because it has an oxygenase function that lowers the overall efficiency of the fixation process. In all photosynthetic organisms with a C3 metabolism, an increase of CO<sub>2</sub> in the environment would cause the more efficient working of Rubisco, enhancing its carboxylase activity over the oxygenase one. In lichens some green algal photobionts (e.g. *Trebouxia*) and all cyanobacterial photobionts have CO<sub>2</sub> pumps, the CCM (carbon concentrating mechanism), which can increase the CO<sub>2</sub> concentration around the Rubisco. The CCM can also lower the internal CO<sub>2</sub> concentration to levels close to zero and this helps to overcome the high diffusion resistances that can occur in lichens, especially at high thallus water contents (Cowan *et al.*, 1992).

#### **Water**

Because lichens are not able to regulate their water status, this is one of the most important determinants for their photosynthesis. Thallus water content can vary from equilibrium with air (about 10% of the DW) to fully saturated (which can be as much as

400% in chlorolichens and 1000% of the DW in cyanolichens) and this is highly influenced by thallus morphology and structure. Many studies have stressed its importance and have described the behaviour of photosynthesis at different thallus water contents (e.g.: Coxson *et al.*, 1983; Lange *et al.*, 1995, 1996, 2001).

Lichens are normally subjected to drying–wetting cycles. The frequency of these events can be limiting for many species in particular habitats, as it severely affects their carbon budget. Too short and infrequent periods of metabolic activity might lead to high rates of respiration, especially if they occur in darkness, making impossible to get a positive carbon balance (Lange, 2003a, 2003b; Reiter *et al.*, 2008). Dynamics of water uptake and loss are very variable and depend on the surrounding environment, the individual thallus maximum water holding capacity (MWC) and water status. These two latter rely strongly on the thallus morphology, anatomy and colour (Rundel, 1982; Lange *et al.*, 1993, 1999).

One reason why lichens are so effective at low water contents (50 – 100% of their DW) is the ability of green algal lichens to regain photosynthetic activity in the presence of water vapour (e.g., Lange & Kilian, 1985; Scheidegger *et al.*, 1995; Pintado & Sancho, 2002). This can be of major importance for establishment and survival of several species in ecological situations where metabolic activity is water limited. There are some habitats where lichens grow where liquid water is scarce or even absent, but humidity is periodically or frequently high, such as some arid deserts (Lange *et al.*, 1970; Lange & Tenhunen, 1982; Lange & Redón, 1983). Lichens with cyanobacterial photobionts are much less efficient or completely unable to reactivate photosynthesis through hydration by water vapour, they need to be hydrated with liquid water (Lange *et al.*, 1986; Schlenzog *et al.*, 2000).

At high thallus water contents, above the water content where the optimal NP is reached, the net photosynthetic rate can remain at its maximum level or show various degrees of depression (Fig. 1.6). Studies with helox (helium/oxygen) mixtures showed that the depression was caused by increased CO<sub>2</sub> diffusion resistances (Cowan *et al.*, 1992). The degree of depression is species specific, but can be very different even within the same species in samples from different localities (Lange *et al.*, 1993, 1997). The depression means that the photosynthetic gain can be substantially lowered at high water availability (Lange, 2003a). This problem is not shared with bryophytes, which are able to separate water storage from CO<sub>2</sub> diffusion pathways (Green *et al.*, 2011a).

Pintado *et al.* (1997) described two different strategies regarding water dynamics in north and south–facing populations of *Ramalina capitata*. South–facing populations had a higher water holding capacity and longer retention time, as well as a higher Chl content, which they explained as a consequence of the higher evaporation rate and, hence, shorter periods of activity on the south face of the rocks, compared to the north face, indicating that in that case, the main factor inducing ecophysiological differences between the two populations was light utilization efficiency during the periods of

suitable moist conditions, south-facing populations had to take advantage of their shorter periods of activity by having more chlorophyll molecules and by enhancing their ability to retain water under higher irradiances that cause a faster evaporation. In a later study, Pintado *et al.* (2005) showed a similar water holding capacity for sun and shade ecotypes of *Diploschistes diacapsis* when calculated per dry weight, but sun exposed thalli displayed a lower value on a surface area basis, thus having shorter moist periods combined with higher NP rates. Valladares *et al.* (1993, 1997) demonstrated that water retention capacity increased with increasing thallus density in species of *Umbilicariaceae*.

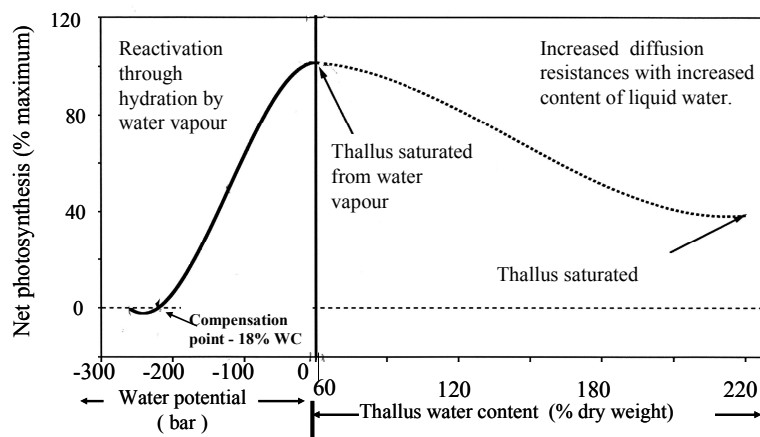


Fig. 1.6: Response of Net Photosynthesis to thallus water content idealised curve from *Ramalina maciformis* (from Schulze *et al.*, 2002).

## Light

The photosynthetic response of lichens to increasing light is depicted in Fig. 1.7, where a typical saturation curve can be observed. There is an initial light-limited part, whose slope is defined as the quantum yield of photosynthesis ( $\Phi$ ). Then, a carboxylation-limited part is reached, when the increase of PPFD does not produce a significant increase in NP (Palmqvist, 2000). DR is obtained at zero PPFD. Light compensation point ( $P_c$ ) is defined as the PPFD level where NP is 0, i.e.: DR equals GP. Light saturation point ( $P_s$ ) is usually defined as the PPFD at which 90% of maximal NP rate is reached (Green *et al.*, 1997).

As it was the case for water, tolerance to light, preferred light levels, and behaviour with changing light regimes are highly dependent on the habitat of lichens. So called 'sun plants' and 'shade plants' have long been distinguished in higher plants (e.g.: Björkman, 1981). Sun plants live obligately in sunny locations and are usually capable of higher rates of NP at higher PPFD than shade plants, which live in shaded places. Sun plants also show higher values of  $P_c$  and  $P_s$ , and higher DR rates. Within a single plant, some leaves can adapt to lower irradiances, displaying properties tending to those of shade plant leaves. In contrast, shade plants become easily photodamaged from the excess light. Lichens might be expected to have similar behaviour regarding their light environment, but the situation is complicated by their poikilohydry, which can act as a possible shield against high irradiation, as they tend to become desiccated and thus inactive under those conditions. It has been shown that when they are active they are often at much lower light levels than suggested by the overall light

environment (Schroeter *et al.*, 2011). High irradiances when lichens are active have been proved to inhibit photochemical processes of PSII, due to an excess of energy provoked by an excess of irradiation absorbed by antenna complexes (Gauslaa & Solhaug, 1996; Barták *et al.*, 2008). This process was previously observed in vascular plants as well (Powles, 1984). Water content is then highly influential in the way lichens deal with PPFD. Lichen photobionts are usually far more protected from light than leaf cells, having a fungal cortex which usually contains substances or structures that scatter a large portion of incident radiation. Some of them are green when wet, indicating the cortex is then almost transparent. Some studies have assessed the actual light level reaching the photosynthetic cells (Büdel & Lange, 1994, Dietz *et al.*, 2000). In some species the lichen photosynthetic apparatus probably experiences deep shade conditions, even when exposed to the brightest sunlight (Green & Lange, 1994). However, it is clear that lichens are able to adapt to different light environments. Light saturation points have been found to range between 1% to more than 50% of full sunlight (Green & Lange, 1991; Lange *et al.*, 1991) and Green *et al.* (1991) found a light compensation value of only  $1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  for *Pseudocyphellaria dissimilis*, while it can be as high as 200 for lichens living in open deciduous forests (Kershaw, 1985). Many species also show a high ability to acclimate to changing PPFD due to seasonality of tree canopy cover. Higher  $P_c$  and  $P_s$  were found for the higher winter irradiances (Kershaw, 1985).

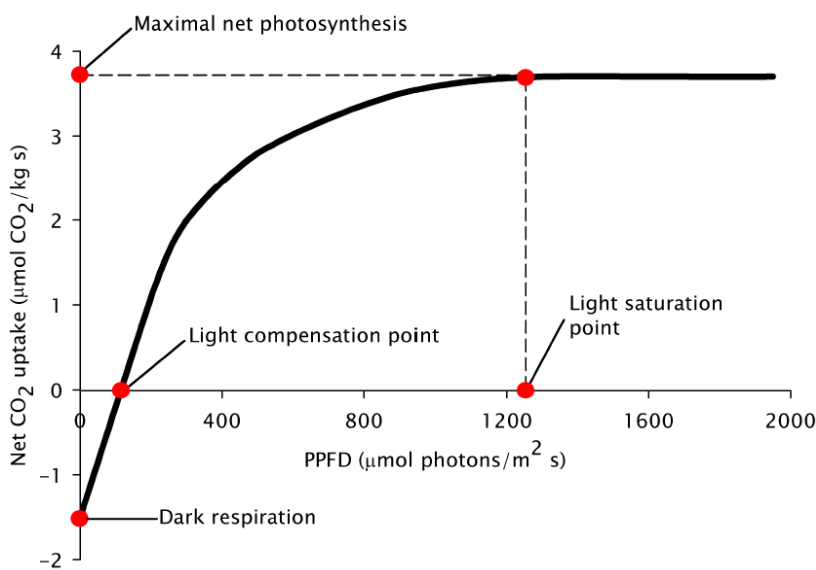


Fig. 1.7: Response of lichen photosynthetic performance to light.

Some studies have suggested that lichens may predominantly photosynthesise under environmental conditions outside those supposed to be optimal by NP response curves to PPFD (Schroeter *et al.*, 1995; Green *et al.*, 1995). In a recent review, Green *et al.* (2011a) show that lichens, in contrast to bryophytes, typically operate also at suboptimal water contents for net photosynthesis, either too low or too high (diffusion limitations).



## Temperature

NP shows a typical response to temperature (Fig. 1.8). NP rate increases with temperature until a maximum is reached and then decreases again due to DR, which increases almost exponentially with temperature until denaturation of membranes and enzymes by heat. GP rises to a maximal rate and then remains constant until thermal damage occurs. Like light and water content, lichen response to temperature appears to be highly dependent on the habitat where the species live. Optimal temperatures have been measured from very low values, around 5°C, in arctic and antarctic samples (e.g., Green *et al.*, 2011b) to values as high as 28°C (*Diploschistes diacapsis*, Utah desert, Lange *et al.*, 1997). Similarly to the situation for water content and light availability, lichens rarely, if ever, seem to be photosynthetically active at their measured optimal temperature (Schroeter *et al.*, 2010). However, they are usually able to perform at good rates in a wide temperature range and this is especially advantageous at low temperatures, because DR is much lower with respect to NP. NP still takes place when, at low temperatures, DR value is already undetectable. NP rates have been measured in Antarctic samples of *Umbilicaria decussata* at -11°C, while DR became 0 at -5 to -8°C (Lange, 1965). Lichens have also been shown to have almost complete acclimation of DR to temperature through the year (Lange & Green, 2005).

## Respiration

Respiration is a metabolic process necessary to provide energy for growth, transport and assimilation processes and to transform fixed carbon into substances that can be used for growth and maintenance (Palmqvist, 2000). Ergosterol (Erg), being the principal sterol of fungal plasma membranes (Ekblad *et al.*, 1998) has been used as an indirect marker of fungal living biomass in several studies with lichens (Palmqvist *et al.*, 2002; Dahlman & Palmqvist, 2003; Sundberg *et al.*, 1999; Gaio-Oliveira *et al.*, 2004) and mycorrhizal associations with plants (Ekblad & Näsholm, 1996). Indeed, Sundberg *et al.* (1999) found a tight relationship between it and DR, thus supporting the view that most of the DR might be caused by the fungal partner. However, in a later study on 75 lichen species from different habitats, Palmqvist *et al.* (2002) did not include Erg in the model for DR prediction for any habitat, for they did not find it to be a significant influence.

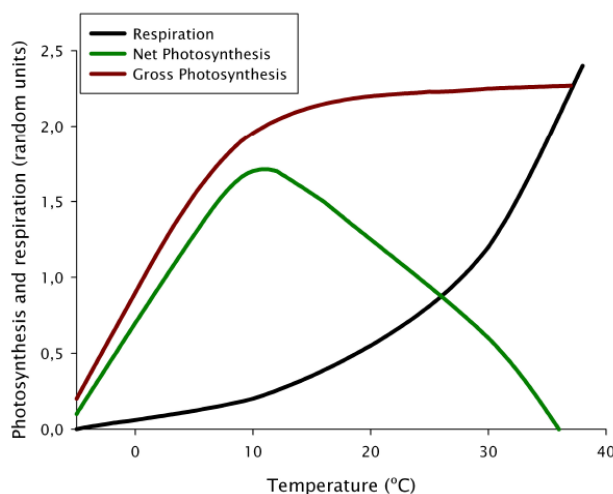


Fig. 1.8: Response of NP, GP and DR to temperature.



### **Inorganic nutrients**

The essential elements required by plants are hydrogen, carbon, oxygen, nitrogen, potassium, calcium, magnesium, phosphorus, sulphur, chlorine, boron, iron, manganese, zinc, copper and molybdenum (Epstein, 1972). Acquisition of these elements in lichens is thought to be by a direct wet or dry deposition on the thallus (Nash, 1996). But there are some studies which suggest that there could be a translocation of P and N from older dying parts of the thallus towards growing parts (Crittenden, 1991; Hyvärinen & Crittenden, 1998; 2000). These two nutrients are believed to be the most limiting to growth and development (Crittenden *et al.*, 1994; Johansson *et al.*, 2010). Cyanolichens and tripartite lichens (i.e., chlorolichens with cyanobacteria in special structures called cephalodia) are able to fix atmospheric nitrogen thanks to the nitrogenase activity of their cyanobiont. This provides them with a great advantage to colonise N-poor ecosystems. Although N is a limiting nutrient for lichens (Crittenden *et al.*, 1994), when supplied in excess, it can be a stressor for N-sensitive lichen species. Indeed, many studies have shown a replacement of N-sensitive by N-tolerant species in areas with increased atmospheric N deposition (Søchting, 1995; Van Herk, 1999; Larsen Vilsholm *et al.*, 2009). Nowadays, N deposition, both in oxidised and reduced forms is increasing globally as a result of human activities (Galloway *et al.*, 2008). Arginine accumulation has not only been regarded as a nitrogen reserve (Legaz *et al.*, 1986a), but also as a mechanism to avoid  $\text{NH}_4^+$ -excess toxic effects, by the immobilisation of this molecule. Indeed, Dahlman *et al.* (2002) and Dahlman & Palmqvist, (2003) described a 60-fold increase of arginine in response to N fertilization. They also found a general increase in N investment in photobiont in relation to mycobiont tissues as a result of the fertilization, which is necessary to produce enough carbon compounds to support the  $\text{NH}_4^+$  immobilisation process and the increase in maintenance respiration of a tissue with a higher N status (Chapin *et al.*, 1987; Dahlman & Palmqvist, 2003). Many lichens have evolved in N-poor ecosystems, and thus have highly efficient N-uptake mechanisms, but they may not be able to down-regulate them, hence, they tend to be nutrient-conservative, taking high amounts of resources when they are available (Johansson *et al.*, 2010).

### **Chlorophyll**

Shade plants have usually higher Chl content on a dry weight basis than sun plants (Boardman, 1977; Björkman, 1981; Björkman & Demmig-Adams, 1994). Both have a similar quantity of Chl per reaction centre, but there are more PS II reaction centres per electron transport pathway in shade plants, in order to broaden the capture of light (Björkman, 1981). Consequently, a lower Chl *a* to *b* ratio is observed. The situation is not so clear for lichens. In many studies performed with lichens, it was also observed that populations from shaded sites had a higher Chl content than those from sunnier places (e.g., Kappen, 1983; Legaz *et al.*, 1986b; Strobl & Türk, 1990; Tretiach & Brown, 1995). Pintado *et al.* (2005) observed a similar Chl content between sun and shade populations of *Diploschistes diacapsis* when calculated per dry weight, but it was higher for the shade population on a surface area basis.

Valladares *et al.* (1996) described a correlation between Chl content and light environment for different species of *Umbilicariaceae*. *Lasallia hispanica*, which lives in exposed granite boulders, had a lower Chl content, both by dry weight and surface area, than *Lasallia pustulata*, that usually lives in more shaded habitats. As a result, NP rates can be very similar when calculations are related to Chl content, as it has been frequently observed for sun and shade lichen species (e.g.: Valladares *et al.*, 1996) or ecotypes of the same species (Kershaw *et al.*, 1983, MacFarlane *et al.*, 1983). A correlation between chlorophyll content and maximal photosynthetic rate would be expected if there is a relatively constant number of chlorophyll molecules per reaction centre. In contrast, Pintado *et al.* (2005) reported different strategies of sun and shade-living forms of *Diploschistes diacapsis*, namely, short active periods, but high NP for thalli in south facing slopes, and more extended wet periods, but lower photosynthetic rates for the shade north-facing form, which had a higher Chl content on a surface area basis. This appears to be a normal behaviour for lichens living in water limited habitats, such as arctic-alpine environments or mediterranean areas (Pintado *et al.*, 1997), where the brevity of periods of water availability severely affects survival of photosynthetic organisms. Similarly, Schipperges *et al.* (1995) observed a larger Chl content in lichens from southern, more xeric zones than in others coming from higher-latitude, more mesic areas.

In higher plants, absorption of radiation has been found to depend to a large extent on the concentration of photosynthetically active pigments, these being the limiting factor for the photochemical process under intense light (Agustí, 1994). At any light level below saturation the limiting factor is light intensity. Because most lichens operate at suboptimal PPFD in natural conditions, Chl is never going to be the limiting factor. Also, Chl content in relation to surface area was found to be enough to absorb between 80 to 99% of the incident light in 12 *Umbilicaria* and *Lasallia* species (Valladares *et al.*, 1996). However, several studies have shown an important positive correlation between Chl content and NP rates or growth (e.g., Nash *et al.*, 1980; Tretiach & Carpanelli, 1992; Palmqvist *et al.*, 2002; Dahlman & Palmqvist, 2003, but see Pintado *et al.* 1997). As Valladares *et al.* (1996) pointed out, this might be explained by the fact that even when Chl content seems not to be a limiting factor for Amax, the amount of light really harvested by antenna complexes is unknown due to the presence of a thick cortex layer which may limit light penetration (although it could exist light scattering as well, due to the presence of crystals in the medulla), and, under these conditions, it might be useful to have a larger amount of Chl. Valladares *et al.* (1996) also found an inverse relationship between the amount of algae and the intracellular Chl concentration, which they explain as a mechanism to avoid self-shading by distributing more efficiently the photosynthetic pigments over a given surface area. Indeed, a too high Chl content could cause self-shading between algal cells, even in foliose thalli, where, in contrast to fruticose lichens, algal cells are almost always directly exposed to the maximum incident radiation (Pintado *et al.*, 1997). A thallus with a high surface to volume ratio (low TSW) is likely to have a more efficient light harvest. With the same Chl content, it would reach higher NP rates by Chl content. But its water retention ability would perhaps be smaller (Sancho, unpublished results).

Chl $a$  has been extensively used as a marker of the biomass of the algal partner in the lichen symbiosis (e.g., Tretiach & Carpanelli, 1992; Raven, 1992; Enríquez *et al.*, 1996; Palmqvist *et al.*, 2002; Dahlman & Palmqvist, 2003; but see Strobl & Türk, 1990; Valladares *et al.*, 1996). Chl $a$  has been found to correlate not only with NP, but also with DR between species (Tretiach & Carpanelli, 1992; Green *et al.*, 1997; Palmqvist *et al.*, 1998; Palmqvist & Sundberg, 2000, Palmqvist *et al.* 2002). This fact led Palmqvist (2000) to suggest that mycobiont carbohydrate demand might regulate the amount and/or activity of the photobiont, for a range of lichen species. Palmqvist *et al.* (2002) showed, in a broad range study with 75 lichen species, that photosynthetic capacity appears to increase more than respiration with increasing Chl $a$ , in a response implying a higher carbon gain to support the increased maintenance respiration of a thallus which probably has a higher N content, taking into account the positive relationship between N and Chl $a$ .

Nevertheless, the link between growth and Chl content and between Chl and NP or DR could also be a matter of covariation of these factors, i.e., growth or NP are not a consequence of Chl amount, but they respond in the same way to a different factor, most likely light regime in the environment. A more intense or longer-lasting radiation would enhance the metabolism, thus promoting the synthesis of both Chl and all the proteins belonging to the photosynthetic apparatus.

### **Thallus structure**

Several studies have pointed out the importance of anatomy and morphology in thallus water relations, and consequently, in photosynthetic performance (Valladares *et al.*, 1993, 1997; Pintado *et al.*, 2005, Dahlman & Palmqvist, 2003). Sojo *et al.* (1997) observed different morphotypes of the antarctic endemic lichen *Catillaria corymbosa*, which, when growing in sheltered zones, shows a much more compact morphology, thus decreasing surface to volume ratio and consequently, reducing water loss by evaporation. This would extend the periods of metabolic activity, which could be advantageous in order to colonise and prosper in cavities where little liquid water is available. A higher TSW (thallus specific weight, calculated as dry weight per surface area unit) has been related to a higher water retention capacity (Snelgar & Green, 1981; Pintado *et al.*, 2005; Dahlman & Palmqvist, 2003), and it has been suggested that it is a consequence of high irradiation (Hilmo, 2002) or an adaptive response to wind erosion (Kappen, 1973).

### **Carbon metabolism**

In green phycobionts the carbohydrates produced by photosynthesis are polyols, while glucose is the molecule released by cyanobionts. In *Trebouxia* ribitol is mainly produced and exported to the mycobiont, which, via pentose-phosphate pathway, rapidly and irreversibly metabolises it to arabitol and then to arabinose, ribose, fructose and finally to the storage pool mannitol, making it unavailable for the photobiont (Gorin *et al.*, 1988; Fahselt, 1994; Dahlman & Palmqvist, 2003; Palmqvist *et al.*, 2008). Arabitol is depleted more rapidly than mannitol under stress; therefore, it

may function as a short-term carbohydrate reserve (Palmqvist *et al.*, 2008). Alternating drying and wetting of thalli was required for polyol metabolism and translocation in *Hypogymnia physodes*, according to Farrar (1976). Also, polyols have been suggested to have a very important role on cell protection at low water levels, promoting passive water uptake and maintenance of osmotic potential and turgor during desiccation, thus minimising cell damage (Smith *et al.*, 1969; Farrar, 1988; Ahmadjian, 1993). At low water activities they protect the structure of other molecules, such as proteins and nucleic acids by actually replacing the water molecules in them, preventing breakdown (Green *et al.*, 2011a). Farrar also suggested the use of the polyol pool as a buffer against excessive depletion of proteins and other basic compounds of the cell; this way, polyols would be respired first through the so-called resaturation respiration, which occurs when lichens are rewetted, after a dry period (Farrar, 1976, 1978). Therefore, the amounts of protein and polysaccharides would tend to remain constant, while the level of polyols rises and falls, according to the recent conditions to which the lichen is exposed. However, it is still unclear whether this process is ecologically relevant (Lange, 2003a). Also, polyols are excellent antioxidant compounds and are the only ones that can work in lichens at low water contents (Green *et al.*, 2011a).

### **Why study lichens?**

As stated at the beginning of this section, lichens constitute the main vegetal cover in polar and alpine regions, where vascular plants are scarce or even absent (Kappen, 1988; Ahmadjian, 1993), thus being a fundamental part of these ecosystems. Despite their importance, we are far from fully understanding the physiological and ecophysiological functioning of lichens and their adaptive potential, which are fundamental knowledge to predict their behavior in hypothetical scenarios forced by global change, and therefore to predict the future of ecosystems dominated by them. Natural gradients are a useful tool for the study of long-term responses of organisms and ecosystems to changes in abiotic factors (Diamond, 1986), since some of these factors vary, while others remain more or less constant (Fukami & Wardle, 2005). These gradients are especially interesting in the case of lichens, as sessile organisms, slow growing and very difficult to grow out of their environment. In this work we have studied the response of three lichen species to three different environmental gradients:

1. Latitudinal gradient (*Umbilicaria decussata*, Chapter 2). The study of the behaviour of the same species and similar ecosystems in different parts of the globe can be very useful for the evaluation of the possible universality of the processes and responses to environmental disturbances from anthropogenic or non anthropogenic origin (e.g., Bird *et al.*, 1996; Gholz *et al.*, 2000; Wardle *et al.*, 2004). It has been a widely used approach in lichens, as many species have broad distributions that make these studies easy to perform and interesting (e.g., Schipperges *et al.*, 1995; Sancho *et al.*, 2000; Pintado *et al.*, 2005, Green *et al.*, 2011b).

2. Altitudinal gradient (*Lasallia hispanica* and *Lasallia pustulata*, Chapter 3). Altitudinal gradients allow the study of the long-term impact of temperature

changes in small geographical areas and short periods of time (Körner, 2007; Fukami & Wardle, 2005). Many studies have taken advantage of altitudinal gradients in both vascular plant species and communities (e.g., Whittaker, 1975; Körner, 1999; Cordell *et al.*, 1998, Li *et al.*, 2004), and in lichens (eg, Vareschi & Larcher, 1988; Pirintsos *et al.*, 1993, 1995; Loppi *et al.*, 1997; Pintado *et al.*, 2001).

3. Seasonal gradient (*Lasallia hispanica* and *Lasallia pustulata*, Chapters 4 and 5). Changes in abiotic factors induced by the changing seasons are important because they occur repeatedly and regularly in a short space of time and must be taken into account especially in temperate regions, where they are more pronounced. In the Mediterranean region they are particularly steep (Joffre *et al.*, 2007), thus providing a good opportunity for the study of physiological changes in a short time. There are also several studies focusing on seasonal changes in lichen metabolism (e.g., Stålfelt, 1939; Lechowicz & Adams, 1974; Larson, 1980; MacKenzie *et al.*, 2001; Pirintsos *et al.*, 2011).

**2. ESTUDIO DE LA PLASTICIDAD FENOTÍPICA DE LA ESPECIE  
POLAR Y ALPINA *UMBILICARIA DECUSSATA* BASADO EN MEDIDAS  
ECOFISIOLÓGICAS DE SIETE POBLACIONES DE TODO EL MUNDO**



## INTRODUCCIÓN

Los seres vivos hacen frente a los cambios de las condiciones ambientales de distintas maneras. En algunos casos, aparecen diferentes ecotipos, es decir, existe una diferencia genética entre las poblaciones de una especie, provocada por la adaptación a condiciones ambientales específicas. Estas diferencias genéticas implican cambios fenotípicos, que también pueden aparecer, sin embargo, como resultado de la plasticidad fenotípica, donde no hay diferencias genotípicas. La plasticidad fenotípica como respuesta a un ambiente concreto es una cualidad valiosa que permite la colonización de diferentes hábitats (Pigliucci, 2001). Es de suponer que especies que muestran amplias distribuciones ecológicas, y por tanto probablemente también geográficas, tendrán mayor plasticidad fenotípica que especies con distribuciones más restringidas (Sultan, 2000; Valladares *et al.*, 2007).

Las diferentes presiones selectivas pueden contribuir a la evolución de la adaptación de una misma especie a nivel local (Nicotra *et al.*, 2007), por lo que frecuentemente, poblaciones diferentes de la misma especie de plantas vasculares, que crecen en hábitats con condiciones distintas, muestran diferentes fenotipos, con diferencias morfológicas, anatómicas y/o fisiológicas, que responden a la variación de factores abióticos como las condiciones climáticas, la limitación de nutrientes o la disponibilidad de agua (v.gr., Bradshaw, 1965; Cordell *et al.*, 1998; Mäkinen *et al.*, 2002; Nicotra *et al.*, 2007), o a interacciones diferentes con otras especies en otro tipo de comunidades (Davis *et al.*, 1998).

Esto puede ser más complicado en el caso de los líquenes. La actividad metabólica de ambos simbioses, el fotobionte autótrofo y el micobionte heterótrofo, deben ajustarse mutuamente de forma muy compleja para conseguir y mantener la estructura, función y crecimiento del talo (Honegger, 1993; Lange & Green, 2006). Como organismos duales que son, ambos simbioses deben aclimatarse a las condiciones cambiantes, mostrando una versatilidad complementaria para adaptarse a diferentes hábitats. Y sin embargo, esto no es siempre imprescindible. Fernández-Mendoza *et al.* (2011) mostraron que los propágulos fúngicos pueden liquenizar con células algales del acervo local, por tanto ya adaptadas, y también se ha descrito un cambio de fotobionte en casos de dispersión conjunta (Nelsen & Gargas, 2009; Wornik & Grube, 2010).

La plasticidad fenotípica dentro de una especie liquénica concreta se ha estudiado en algunos casos (Schipperges *et al.*, 1995; Pintado *et al.*, 1997; Rikkinen, 1997; Sojo *et al.*, 1997; Sancho *et al.*, 2003; Pintado *et al.*, 2005; Green *et al.*, 2011b), pero normalmente dentro de un espacio geográfico reducido (con la excepción de Sancho *et al.*, 2000), a pesar del hecho de que muchas de las especies de líquenes muestran distribuciones amplias, que a menudo incluyen varios continentes. El éxito en la colonización de hábitats aparentemente tan distintos puede explicarse por su gran potencial adaptativo, y por la relativa similitud en las condiciones microclimáticas, especialmente cuando los líquenes están activos, aunque el macroclima puede ser muy



distinto (Sancho *et al.*, 2000, Green *et al.*, 2008). Por tanto, aunque esté viviendo en lugares tan distintos y remotos, la presencia de una misma especie indica una cierta similitud en al menos algunos parámetros, siendo de esta manera una especie especialista y no generalista como podría parecer. Una especie requiere para su establecimiento, crecimiento y desarrollo unas características ecológicas concretas, tanto en lo tocante a los factores bióticos como a los abióticos, que conforman su nicho ecológico (Larcher, 1995). Cuando estas características se reúnen la especie puede establecerse y medrar. Según la amplitud del rango que puede tolerar para cada factor, una especie concreta estará más o menos extendida, aparte de la influencia, por supuesto, de factores estocásticos.

Las especies bipolares muestran una distribución muy interesante, pues viven en regiones polares, así como en la alta montaña de las regiones tropicales y templadas (Galloway & Aptroot, 1995). El modo en que han llegado a ocupar lugares tan remotos y desconectados entre ellos es una incógnita biogeográfica, que puede explicarse en parte por sucesos de glaciación que conectaron lugares que ahora están aislados, así como por la dispersión de propágulos a larga distancia (Kappen & Straka, 1988; Muñoz *et al.*, 2004). Los líquenes dominan a menudo estos ambientes marginales, que en teoría son susceptibles de mostrarse más afectados por el cambio climático (Nash & Olafssen, 1995; Lange & Green, 2005; IPCC, 2007). Por consiguiente, los líquenes de estas regiones pueden ser muy sensibles al cambio de las condiciones climáticas, lo que dificultaría la supervivencia de muchas especies, tanto de manera directa como indirecta, pues la llegada y desarrollo de especies más competitivas se vería facilitada.

Los líquenes y los ecosistemas dominados por ellos estarían particularmente en riesgo si el predicho aumento de temperaturas ocurre efectivamente (Lange & Green, 2005). Las pérdidas de carbono debidas a la respiración en oscuridad (RO) pueden casi igualar la tasa fotosintética neta (FN), y, como la respiración tiene una respuesta mayor a la temperatura que la fotosíntesis, el balance neto de carbono puede hacerse negativo a temperaturas moderadamente elevadas bajo condiciones de luz normales (Green & Lange, 1994). Se ha sugerido que la distribución de los líquenes en zonas bajas tropicales se ve limitada por el balance de carbono excepcionalmente pobre debido al incremento de las pérdidas de carbono cuando los líquenes están hidratados durante las cálidas noches tropicales (Zotz & Winter, 1994; Zotz, 1999; Lange *et al.*, 2000).

El estudio y la descripción del comportamiento fisiológico de una especie concreta procedente de lugares geográficamente aislados pueden ser muy útiles a la hora de aumentar nuestro conocimiento en la identificación de las condiciones climáticas que son más favorables para el éxito de esa especie. Schipperges *et al.* (1995) encontraron distintos ecotipos del líquen fruticuloso terrícola ártico-alpino *Cetraria nivalis* a lo largo de un gradiente latitudinal desde zonas templadas hasta árticas. Estos autores evaluaron el intercambio de CO<sub>2</sub>, las relaciones hídricas y el contenido en clorofila, así como las diferencias anatómicas y la proporción fotobionte-micobionte, y observaron que el contenido de clorofila y las tasas de fotosíntesis neta

disminuyeron al aumentar la latitud. Sin embargo, cuando las poblaciones templadas se transplantaron a zonas árticas, mostraron tasas más bajas de FN que las poblaciones autóctonas, revelando que estas últimas estaban mejor adaptadas a las condiciones climáticas de la zona donde se realizó el transplante. Sancho *et al.* (2000) compararon dos poblaciones de *Umbilicaria nylanderiana* de la Antártida y de la alta montaña española en cuanto a su comportamiento ecofisiológico, y también observaron tasas de FN más altas en la población templada. De la misma manera, ésta tenía un óptimo de temperatura para la fotosíntesis más alto que la población polar. Por el contrario, la respiración en oscuridad no muestra variaciones entre ambas poblaciones, lo que llevó a los autores a concluir que el micobionte no se veía sustancialmente afectado por las condiciones ambientales y que la adaptación a la temperatura dependía más del fotobionte.

*Umbilicaria decussata* es una especie de distribución bipolar ártico alpina (Fig. 2.1). Se ha demostrado que esta especie tolera muy bien el frío. Lange (1965) estudió la actividad fotosintética de muestras antárticas de *Umbilicaria decussata*, y encontró que es posible detectar FN a temperaturas muy bajas, a las que el valor de RO es ya 0. Este autor detectó actividad fotosintética a  $-11\text{ }^{\circ}\text{C}$ , mientras que la RO cesaba a entre  $-5$  y  $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ . De este modo, esta especie era capaz de alcanzar una ganancia neta de carbono a temperaturas muy bajas. Otra representante de este género, *U. aprina*, era capaz de fotosintetizar a bajas temperaturas bajo la nieve, extendiendo de esta manera su periodo de actividad, algo muy ventajoso si tenemos en cuenta la brevedad de éste en las zonas polares (Schroeter *et al.*, 1994). Suponiendo que *U. decussata* también fuera capaz de algo así, la cantidad de carbono fijado en esas condiciones no sería importante, porque es una especie que vive en bloques verticales expuestos al viento, donde la nieve no se acumula durante periodos largos. De hecho, esta especie parece ser muy quionófoba y no tolera la acumulación de nieve (Creveld, 1981; Reiter *et al.*, 2007). Sancho & Kappen (1989) la definieron como una especie aerohigrófila, por tanto, caracterizada por su rápida pérdida y absorción de agua. En condiciones naturales absorbe agua del ambiente (lluvia, niebla, rocío) y es capaz de equilibrarse rápidamente con la humedad ambiental.

Nos hemos centrado en esta especie para estudiar su variabilidad a lo largo de un gradiente latitudinal en gran parte de su rango de distribución. Teniendo en cuenta las condiciones climáticas de cada localidad, hemos intentado explicar qué variables tienen mayor influencia en su productividad, para poder predecir de qué modo se vería afectada esta última por modificaciones en el ambiente, como un acercamiento para explicar si el cambio climático puede afectar a su supervivencia de manera distinta en estos ecosistemas diferentes. Con este objetivo, hemos evaluado la respuesta fotosintética de las poblaciones muestreadas a diferentes regímenes de luz y temperatura y hemos intentado relacionarla con otros factores fisiológicos, así como con variables abióticas. Caracterizar el estado fisiológico de un organismo es muy importante para entender e intentar predecir su respuesta. Hemos medido el contenido en clorofila como marcador del fotobionte, de quitina y ergosterol como marcadores del micobionte, de C, N y azúcares y aminoácidos para intentar evaluar posibles

diferencias en la distribución de los recursos disponibles en el talo, de ácido girofórico como una posible molécula de efecto fotoprotector, y, finalmente, la fluorescencia de la Chla para evaluar la vitalidad del fotosistema II.

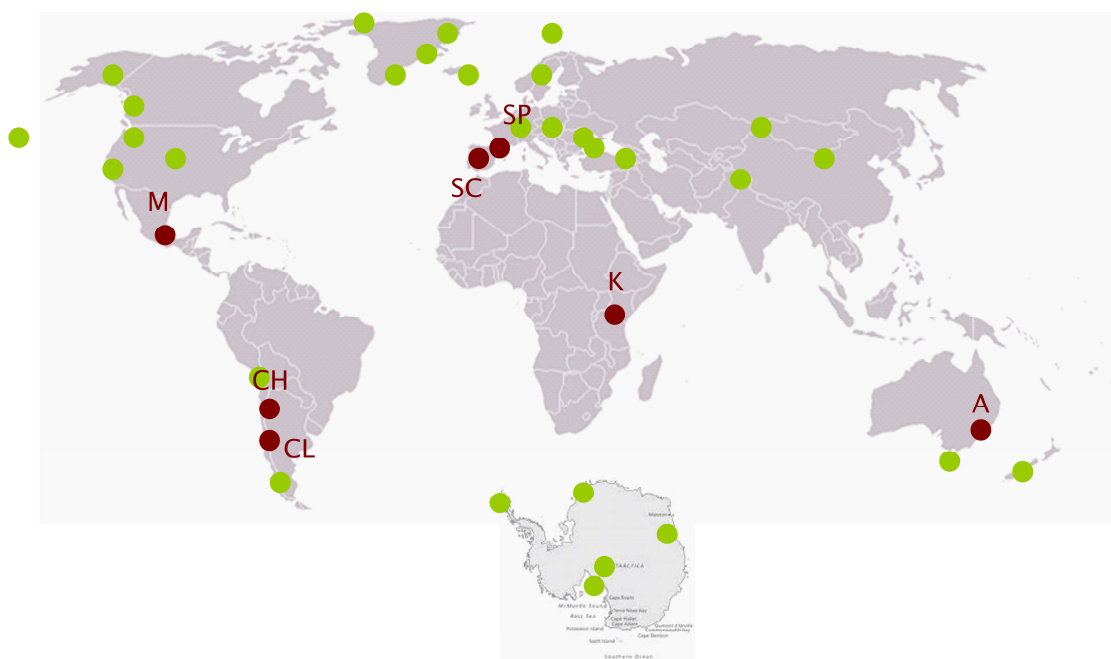


Fig. 2.1: Mapa de distribución de *Umbilicaria decussata*. Puntos verdes: localidades citadas en la bibliografía o pertenecientes a colecciones de herbario. Puntos rojos: localidades muestreadas en este estudio.

Dentro de esta especie, planteamos la hipótesis de que las poblaciones procedentes de la alta montaña de regiones templadas (30–45 ° de latitud) pueden mostrar mayor plasticidad, pues están expuestas a un ambiente más inestable, debido a las diferencias estacionales en fotoperiodo y temperatura. Por esta razón estas poblaciones podrían mostrarse más capaces de adaptarse y sobrevivir en condiciones cambiantes, suponiendo que pudieran también hacer frente a la competencia con otros organismos.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Material líquénico

*Umbilicaria decussata* (Vill.) Zahlbr. pertenece a la familia de las Umbilicariáceas, en el orden Umbilicariales. Como todas las especies de esta familia está unida al sustrato por un ombligo central en la cara inferior formado por tejido fúngico. Se encuentra raramente con apotecios, pero posee taloconidios, propágulos asexuales que cubren casi completamente su cara inferior dándole su aspecto carbonáceo característico. Vive sobre rocas silíceas, por encima del límite de bosque, normalmente expuesta a fuertes vientos y se encuentra generalmente en pendientes muy inclinadas y paredes rocosas verticales. Se distribuye por todo el mundo, como se puede ver en la Fig. 2.1, y su patrón de distribución es circumboreal–tropical montano–circumantártico (Galloway & Aptroot, 1995).

Nombre	Localidad	Coordenadas	Precipitación (mm)	TM (°C)	Tm (°C)	Recolectores y fecha
K	Monte Kilimanjaro, Camino de Shira Hut a Barranco Hut. Rocas volcánicas. Tanzania	S 3° 4' 17" S, E 37° 18' 58"; 4400–4500 m.	400	3.7	0.1	L. Muggia. 9–1–2009
M	Volcán Iztaccihuatl. Bloques de andesitas en praderas de <i>Festuca</i> . Méjico.	N 19° 2' 36", O 98° 38' 1"; 4284 m.	800	6.4*	3.4*	L. G. Sancho & M. Arróniz. 5–11–2009
CH	VII Región del Maule. Paso Vergara. Bloques expuestos. Chile (High).	S 35° 10' 36", O, 70° 30' 38"; 2736 m.	787	10.4*	–1.8*	S. Pérez–Ortega & F. Fernández–Mendoza. 4–4–2009
A	Thredbo ski resort. Bloques graníticas cerca del Monte Kosciuszko. Australia	S 36° 28' 57", E 148° 16' 48"; 2047 m.	1682	10.7	–3.2	F. Fernández–Mendoza. 7–5–2009
CL	VII Región del Maule. Paso de Pino Hachado. Bloques expuestos. Chile (Low).	S 38° 39' 27", O 70° 53' 47"; 1987 m.	749	11.4	–0.4	S. Pérez–Ortega & F. Fernández–Mendoza. 1–4–2009
SC	Los Claveles, Peñalara, Madrid. España (Sistema Central).	N 40° 51', O 3° 57' 22"; 2412 m.	1500	13.1*	–3.5*	M. Vivas, J. Raggio & L. G. Sancho. 26–6–2009
SP	Agulles de Travessany. Aigüestortes. Lérida. ESpaña (Pirineos).	N 42°36' 29", E 0° 53' 15"; 2620 m.	1399	10.1	–4.7	M. Vivas, S. Pérez–Ortega & L. G. Sancho. 14–7–2009

Tabla 2.1: Localidades de muestreo con los datos climáticos (precipitación anual, TM: temperatura media del mes más cálido, Tm: temperatura media del mes más frío). Los datos se obtuvieron de: **K**, Røhr & Killingtveit (2003), Duane *et al.* (2008), Sarmiento (1986); **CL & CH**, Kalin Arroyo *et al.* (1981), Amigo (1998), Lara *et al.* (2001); **SC**, Comunidad de Madrid (2002); **SP**, Servei Meteorològic de Catalunya (2011); **A**, <http://www.weatherzone.com.au/climate/station.jsp?lt=site&lc=71032>; **M**, Sarmiento (1986), Beaman (1962). Los valores con asterisco son valores deducidos para nuestras localidades a partir de la diferencia de altitud entre el lugar de recolección y la estación meteorológica más próxima o las teselas de WorldClim.

## Muestreo

Las localidades de estudio están marcadas por puntos rojos en la Fig. 2.1 con más detalles en la Tabla 2.1. Todas las muestras se recogieron en estaciones similares en cada zona geográfica. Las épocas de recolección fueron las siguientes: la población de Australia (**A**) y las dos poblaciones de los andes chilenos (**CL** y **CH**) se recogieron al principio del otoño austral (Abril–Mayo). Lo mismo ocurrió con las muestras de Méjico (**M**), recogidas en Noviembre, al final del periodo lluvioso. Las muestras del Kilimanjaro (**K**), Sistema Central (**SC**) y Pirineos (**SP**) se recolectaron al final de la primavera–principio del verano, que es para los líquenes mediterráneos el último periodo de alta actividad, antes de la inactividad estival debida a la sequía (Joffre *et al.*, 2007). Tras la recolección, los talos se secaron al aire a 20 °C y se almacenaron en oscuridad a –21 °C hasta su posterior análisis. Se procuró cubrir toda la variabilidad de las poblaciones de cada localidad cogiendo talos de rocas distintas y de diferentes tamaños. A menos que se especifique lo contrario, se utilizaron 4 conjuntos de 2 a 6 talos cada uno de cada población para las medidas de intercambio gaseoso y los análisis subcelulares.

### Datos climáticos

Se obtuvieron datos de precipitación anual, temperatura media del mes más frío (Tm) y temperatura media del mes más cálido (TM) de la bibliografía existente. Cuando ésta era escasa e insuficiente, se recurrió a datos procedentes de los valores medios para el periodo 1950–2000, por interpolación en una malla geográfica de 30 segundos de resolución (latitud y longitud) hecha a partir de estaciones meteorológicas distribuidas por todo el mundo (datos de WorldClim, Hijmans *et al.*, 2005) y extraídos por medio del programa DIVA-GIS v.7.5 (Tabla 2.1). Estos datos se obtuvieron gracias a la amable ayuda del Dr. Antonio Torralba. Los valores entre paréntesis son los deducidos a partir de la diferencia en altitud entre el lugar de recolección y la localización de la estación meteorológica o las teselas de WorldClim.

### Medidas de intercambio gaseoso

Los talos se reactivaron durante tres días en una cámara a 10 °C con un fotoperiodo de 12h en oscuridad/12 h a 100  $\mu\text{mol fotonos}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  de luz fotosintéticamente activa (PPFD), y pulverizando con agua mineral una vez al día. Las medidas de intercambio gaseoso se llevaron a cabo con un sistema compacto de minicubeta CMS 400 (Walz, Effeltrich, Alemania) y un analizador de gases infrarrojo IRGA (Binos 100, Leybold-Heraeus, Alemania) bajo condiciones controladas de temperatura, humedad e irradiación, y a concentración de CO<sub>2</sub> ambiental (350 ppm, aprox.). Se puede encontrar una descripción completa de este método en Schroeter *et al.* (1994). Antes de las medidas, los líquenes se hidrataron completamente pulverizándolos con agua mineral hasta la saturación y se retiró el exceso de agua suavemente con un papel absorbente. Se hicieron curvas de respuesta a la luz a 0, 5, 10, 15, 20 y 25 °C con cada población recolectada. Primero se obtuvo el valor de respiración en oscuridad (RO), manteniendo la muestra sin luz hasta que se alcanzaba un valor estable y en ese momento, se iba incrementando la PPFD consecutivamente desde 25 hasta 1200  $\mu\text{moles de fotonos}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (25, 50, 100, 200, 400, 800 y 1200). Antes y después de cada serie de medidas, los talos se pesaron para determinar el contenido de agua del talo en función del peso seco. A veces fue necesario rehidratar los talos durante las medidas para asegurar el nivel de hidratación óptima de los mismos, que se había determinado previamente por medio de curvas de respuesta al contenido hídrico (véase más abajo). Las tasas se calcularon por unidad de peso seco, de superficie y de clorofila, mediante las ecuaciones de von Caemmerer & Farquhar (1981). Las curvas de respuesta a la luz se analizaron mediante un ajuste estadístico a una función de Smith, según se detalla en Green *et al.* (1997). Este ajuste nos proporciona los siguientes parámetros: **Pc** (punto de compensación de luz, PPFS a la que la fotosíntesis neta, **FN**, es 0, es decir, la fotosíntesis bruta compensa la respiración en oscuridad), **Ps** (punto de saturación de luz, calculado como la PPFD a la que se alcanza el 90% de la máxima fotosíntesis neta medida, **Amáx**) y  $\Phi$  (rendimiento cuántico aparente para la luz incidente, que es la pendiente primaria de la curva de respuesta a la luz). También calculamos el coeficiente de eficiencia fotosintética, **KF**, como  $\text{KF} = (\text{Amáx} + \text{RO}) / \text{RO}$  (Larcher, 1995). La temperatura óptima y los puntos de compensación superior e inferior (**Tcs** y **Tci** respectivamente, es decir, los valores de

temperatura a los que la FN es igual a 0, de manera que no se alcanza compensación a temperaturas más bajas que el Tci ni más altas que el Tcs) se calcularon mediante el ajuste de las curvas de respuesta a la temperatura a funciones polinómicas de segundo grado. Las curvas de respuesta al contenido hídrico o curvas de desecación se realizaron como sigue: las muestras se hidrataron completamente con agua mineral y se pesaron para obtener el peso fresco máximo (**PFM**), y se introdujeron en la cubeta, donde el intercambio de CO<sub>2</sub> se sometió a un seguimiento continuo según el talo se iba secando lentamente, bajo condiciones controladas de temperatura (15 °C), humedad relativa (70%), flujo del aire (0'6 l min<sup>-1</sup>) e iluminación (200 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), hasta que no se detectaba señal fotosintética alguna. Las muestras se pesaban cada 30 minutos. Se calculó el contenido hídrico máximo en función del peso seco (**CHM** = PFM-PS)/PS, es decir, g H<sub>2</sub>O g<sup>-1</sup> PS) y en función de la superficie (**CHMA** = (PFM-PS)/área, por tanto, g H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup>), y el contenido hídrico óptimo (**CHO** y **CHOA** en función de peso seco y de superficie respectivamente). También se calculó el tiempo medio necesario para alcanzar el 50 y el 20% del contenido hídrico máximo (**T50** y **T20** respectivamente), así como el **T50Act** (el porcentaje de la actividad máxima que se conserva cuando el contenido hídrico del talo es del 50% del máximo).

Tras las medidas de intercambio gaseoso se determinó la superficie de las muestras cuando los talos estaban húmedos y completamente expandidos, haciendo una fotografía y analizándola con el software libre ImageJ 1.42q (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA). Todas las muestras se secaron entonces en gel de sílice durante 72 horas y se determinó su peso seco con una precisión de décima de miligramo. A partir de ello, se calculó el índice de peso específico (**IPE**, en g m<sup>-2</sup>) de cada muestra.

### **Análisis subcelulares**

Los talos utilizados para las medidas de intercambio gaseoso se usaron también para el análisis de pigmentos según el método de Barnes *et al.* (1992) (los detalles completos se pueden encontrar en el capítulo 3). Otro conjunto de muestras se utilizó para llevar a cabo el análisis de quitina, ergosterol, aminoácidos, azúcares, ácido girofórico y C/N. Para ello, los talos se molieron hasta convertirlos en un polvo homogéneo poco antes de analizarlos. La Chl<sub>a</sub> se utilizó como marcador de la cantidad de células del fotobionte (Raven 1992; Enríquez *et al.* 1996). Para evaluar la masa fúngica total se midió la quitina, y el ergosterol (Erg) se valoró como indicador de la biomasa fúngica, pues es el esteroide más abundante en la membrana plasmática de los hongos (Weete, 1973; Palmqvist *et al.*, 2002). Esta molécula se ha utilizado como marcador de la actividad metabólica fúngica en asociaciones micorrizógenas con plantas (Ekblad & Näsholm, 1996; Ekblad *et al.*, 1998) así como en líquenes (Palmqvist *et al.*, 1998, 2002; Gaio-Oliveira *et al.*, 2004). Tanto la quitina como el ergosterol se cuantificaron mediante HPLC, según Dahlman *et al.* (2001). Brevemente, se mezclaron 20 mg de líquen pulverizado con 1 ml de etanol, se agitó la mezcla vigorosamente en un vórtex y se incubó en agitación durante 30 min a 5 °C. Tras centrifugar (14.000 rpm, 15 min) se determinó el Erg en el sobrenadante mediante un cromatógrafo Waters (Milford, EEUU) con una columna ODS-ultra sphere (250 mm de longitud x 4'6

mm de diámetro interno, tamaño de partícula 5  $\mu\text{m}$ ) para la separación de las moléculas y en una elución isocrática con 100% de metanol como fase móvil. Todo el proceso tuvo lugar en oscuridad para evitar la degradación del compuesto. Se midió la absorción del Erg a 280 nm mediante un detector UV. Los datos se corrigieron para un rendimiento de extracción del 80% (Dahlman *et al.*, 2001). La quitina se midió en el precipitado que quedó tras la extracción de Erg. Se comprobó que no hubiera pérdida de quitina durante ese proceso comparando el contenido con el de algunas muestras en las que no se extrajo previamente el Erg (datos no mostrados). Las muestras se lavaron con NaOH 0.2 M para eliminar los aminoácidos y proteínas que pueden interferir con la medida. Se realizó una hidrólisis ácida en HCl 6M para liberar los residuos de glucosamina, que se convirtieron en derivados fluorescentes al tratarlos con cloroformato de 9-fluorenilmetilo (FMOC), y fueron entonces analizados por HPLC de fase reversa mediante elución en gradiente. Los datos se corrigieron para un rendimiento de extracción del 83% (Dahlman *et al.*, 2001; Ekblad & Näsholm, 1996).

### **Análisis de Carbono y Nitrógeno**

Se tomaron entre 3 y 4 mg de cada muestra para analizarlos con un Analizador elemental Flash EA 1112 NC (Thermo Fisher Scientific). Se determinó la cantidad total de C y N en cada muestra.

### **Análisis de aminoácidos**

Se mezclaron 30 mg de líquen pulverizado con 1 ml de HCl 10 mM. Esta mezcla se agitó y los aminoácidos que contenía se transformaron en derivados fluorescentes por adición de carbamato de 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidilo con el equipo de ensayo comercial Waters AccQ-Tag Ultra Derivatization kit, según las instrucciones del fabricante. Las muestras se analizaron por cromatografía líquida de fase reversa utilizando un equipo Waters Ultra High Performance (UPLC), provisto de un detector UV Waters Tunable (Acquity, Waters, Milford, EEUU). A cada alícuota (10ml) de muestras o de patrones se añadieron 70  $\mu\text{l}$  de tampón borato (1 M) y 10  $\mu\text{l}$  de norvalina 100  $\mu\text{mol N}^{-1}$ , como patrón interno. Tras ello, se añadieron 20  $\mu\text{l}$  del reactivo derivatizante AccQ-Tag y todo ello se mezcló a conciencia inmediatamente y se mantuvo a 55 °C durante 10 min. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se utilizó una alícuota de la mezcla de reacción para la inyección en el UPLC. La separación se hizo gracias a una columna AccQ-Tag Ultra, mediante elución en una mezcla de dos disolventes: A) ácido fórmico al 99.9% y B) acetonitrilo al 10% (ambos v/v en agua MilliQ) según el siguiente gradiente: de 0 a 5.74 min, elución isocrática con 100% de A, de 5.74 a 7.74 min, reducción de A desde el 100% hasta 90.9%, llegando al 78.8% a los 8.24 min, y al 40.4% a los 8.74 min. De los 8.74 a los 9.54 min tiene lugar el reequilibrio del sistema hasta el 100% de A. El flujo era constante a 0.6 ml min<sup>-1</sup> y la columna estaba a una temperatura de 55 °C. Los patrones de aminoácidos y de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> se prepararon diariamente en el rango de 100-0.1  $\mu\text{mol N}^{-1}$  por diluciones seriadas 1:2 en agua MilliQ (Inselsbacher *et al.*, 2011).



### **Análisis de azúcares**

Para la determinación de los azúcares en las muestras se utilizó el sobrenadante del análisis de aminoácidos. Las muestras se sometieron a cromatografía de intercambio iónico (Metrohm, Herisau, Suiza). Los compuestos de carbono solubles se separaron gracias a una columna Metrosep Carb-250 (250 mm x 4 mm) utilizando NaOH 0'1 M como disolvente isocrático y a una velocidad de flujo de 1 ml · min<sup>-1</sup> (cada muestra eluía en 20 min). Las muestras se cuantificaron a partir de muestras patrón hechas con la mezcla de concentraciones conocidas de los siguientes azúcares: D-(+)-arabitol (Fluka, Buchs, SG, Suiza), D-(+)-glucosa (Sigma, Buchs, SG, Suiza), D-manitol (Sigma), D-(+)-galactosa (Sigma), D-(+)-fructosa (Sigma), sacarosa (Sigma) y adonitol (es decir, ribitol) (Fluka). Cada veinte muestras se eluía una disolución patrón para asegurar la precisión de los ensayos (Palmqvist & Dahlman, 2006).

### **Ácido girofórico**

El ácido girofórico se cuantificó con el objeto de detectar su posible papel fotoprotector. Para ello, se tomaron 10 mg de liquen pulverizado, que se mezclaron con 1 ml de acetona para extraer los ácidos liquénicos. El ácido girofórico se midió por medio del mismo equipo de HPLC utilizado para la cuantificación de Erg y Quit, pero en esta ocasión, con una columna ODS-ultra sphere (250 mm x 4'6mm) con 2'5 µm de diámetro de partícula, según el protocolo de Serriñá *et al.* (1991). La fase móvil era metanol:acetona:ácido acético (75:25:1) y la longitud de onda de detección 270 nm. Lamentablemente, no fue posible emplear ácido girofórico purificado para hacer una recta patrón y obtener así la cantidad en g por peso seco de nuestras muestras, pero sí es posible realizar una comparación relativa según el área bajo la curva de los picos de los cromatogramas, con respecto a g de peso seco.

### **Medidas de fluorescencia de la Chl<sub>a</sub> *in vivo***

La fluorescencia de la Chl<sub>a</sub> se determinó por medio de un fluorímetro MINI-PAM (Walz, Effeltrich, Alemania). Se recogieron los datos del proceso de inducción oscuridad-luz, seguido del proceso de recuperación luz-oscuridad, mediante una función programada por el fabricante (curva de inducción + recuperación). Esta curva supone la medida de 20 valores consecutivos del rendimiento cuántico efectivo del fotosistema II ( $\Phi_{FSII}$ ), que se calcula como el cociente  $(F_m' - F) / F_m'$  (Genty *et al.*, 1989), donde F es el valor de la fluorescencia bajo luz ambiental y F<sub>m</sub>' es la fluorescencia máxima en muestras preiluminadas tras la aplicación de un pulso de luz saturante (0'8 s y 8000 µmoles de fotones m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>). Antes de las medidas, las muestras se hidrataron completamente y se adaptaron a oscuridad, tapándolas con un paño negro durante 20 minutos. Antes de empezar la curva de inducción, se aplicó un primer pulso de saturación para cuantificar F<sub>0</sub> (la fluorescencia basal en una muestra adaptada a oscuridad), F<sub>m</sub> (máxima fluorescencia en muestra adaptada a oscuridad) y F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub> ((F<sub>m</sub> - F<sub>0</sub>)/F<sub>m</sub>), es decir, el máximo rendimiento cuántico. Entonces, tras 40 segundos en oscuridad, se aplicó una luz actínica (de 55 µmoles de fotones m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> aproximadamente), permitiendo el inicio de los procesos de apagamiento fotoquímico y no fotoquímico, y el rendimiento cuántico se evaluó a intervalos fijos de 20 s en 13 pulsos de saturación adicionales. En la segunda parte de la curva, la parte de



recuperación, la luz actínica se apagó y se aplicaron otros 6 pulsos de saturación, tras 10 s, 30 s, 60 s, 2 min, 5 min y 10 min, según la muestra vuelve a adaptarse a la oscuridad. En ese momento, se evalúa la recuperación de los valores de rendimiento cuántico, debido a la inactivación de los apagamientos. Los parámetros que se compararon entre las distintas poblaciones fueron: **Y1** (rendimiento cuántico cuando se aplica el segundo pulso de saturación), **Yi** (rendimiento cuántico en el último punto de la curva de inducción), **Yr** (rendimiento cuántico en el primer punto de la curva de recuperación) e **Yf** (rendimiento cuántico en el último punto de la curva de recuperación). También se calcularon valores relativos al rendimiento cuántico inicial  $F_v/F_m$ : **PY1** (porcentaje de la caída de rendimiento inicial, cuando se aplicó el primer pulso de saturación), **PYi** (porcentaje de la caída en el último punto de la curva de inducción), **PYr** (porcentaje de recuperación en el primer punto de la curva de recuperación) y **PYf** (porcentaje de recuperación al final de la curva) (ver diagrama explicativo en la Fig. 2.16a).

### **Modelado de nicho**

El modelo de máxima entropía ejecutado por el programa MaxEnt v.3.3.3 (Phillips *et al.*, 2004, 2006) se utilizó para componer el nicho ambiental de *Umbilicaria decussata*, estimado a partir de datos de sólo presencia. El nicho de la especie se modelizó utilizando su distribución conocida y las variables ambientales. Edith *et al.* (2006) mostraron que MaxEnt es un programa más fiable que otros basados en datos de sólo presencia. Estos datos de presencia de la especie se descargaron de la base GBIF (<http://www.data.gbif.org>), donde había 984 registros georreferenciados. Las siete localidades utilizadas en este estudio se añadieron también. Las citas de la Antártida tuvieron que eliminarse del análisis porque no hay datos climáticos para esta zona en WorldClim. En total, se utilizaron 433 registros. Para la estimación del nicho actual se obtuvieron 19 variables climáticas de WorldClim, con una resolución de 2'5 minutos de arco (Hijmans *et al.*, 2005). Estas variables se derivan de las temperaturas mensuales y las capas de precipitación y representan información de la variación del clima con significado biológico (Hijmans *et al.*, 2005). Las 19 variables se redujeron por medio de un análisis de componentes principales y de correlación llevado a cabo en PAST v.2.16 (Hammer *et al.*, 2001). El conjunto de datos reducido comprendía las siguientes variables: temperatura media anual, estacionalidad en la temperatura (desviación típica\*100), temperatura media del trimestre más húmedo, estacionalidad en la precipitación (coeficiente de variación) y precipitación en el trimestre más cálido. También se hicieron modelos de nicho para el último máximo glacial (LGM, hace 21500 años) y para las predicciones del clima futuro según el IPCC para 2050 (IPCC, 2007). Los datos para el LGM se obtuvieron del Paleoclimate Modelling Intercomparison Project Phase II (PMIP<sub>2</sub>, <http://pmip2.lsce.ipsl.fr/>). Las variables bioclimáticas para el estudio del futuro se obtuvieron de <http://www.ccafs-climate.org/data/> utilizando el método Delta, el escenario SRES A2A y el modelo CGCM3. Todas las capas están disponibles en WorldClim. Los modelos se corrieron con el umbral de convergencia por defecto, el máximo número de iteraciones y utilizando el 20% de los puntos para validar el modelo. Se hicieron 10 modelos para evitar los efectos de quitar el 20% de las muestras y los resultados se consensuaron utilizando la

opción de validación cruzada. Las capas de datos producidas por MaxEnt se visualizaron en Diva-Gis 7.5. Estos análisis se hicieron con la amable ayuda del Dr. Borja Jiménez-Alfaro.

### **Análisis estadístico**

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa informático libre R 2.10.0 (R Development Core Team, 2009), con la ayuda adicional de las librerías multcomp (Hothorn *et al.*, 2008), Hmisc (Harrell, 2012) y FactoMineR (Lê *et al.*, 2008). Se realizaron ANOVAs seguidos por el análisis *a posteriori* Tukey HSD para indicar diferencias estadísticamente significativas entre poblaciones, para valores de  $p < 0.05$ . Se realizaron análisis de regresión lineal para encontrar las relaciones entre Amáx y un conjunto de variables explicativas. Se comprobó la homocedasticidad y normalidad de los residuos de los modelos estadísticos. Todas las variables resultaron normales o cuasi-normales, y por tanto la representación gráfica de los residuos no mostraba patrones definidos. Los resultados relativos a la temperatura deben considerarse con cautela, pues se estimaron los valores de temperatura a partir de los datos disponibles de estaciones climáticas situadas a menor altitud que el lugar de recolección de las muestras para las siguientes localidades: **SP**, **CL**, **CH**, **SC** y **M**. El efecto de la latitud se analizó mediante correlaciones parciales entre esta variable y el resto. Los gráficos de intercambio gaseoso, los ajustes a la función de Smith y los gráficos de los componentes subcelulares se hicieron con SigmaPlot 10.0 (Chicago, Illinois, EEUU).

## **RESULTADOS**

*Umbilicaria decussata* es una especie ampliamente distribuida, presente en todas las regiones alpinas, que muestra una gran capacidad de adaptación. Las diferencias en las condiciones macroclimáticas son notables en su área de distribución. En la región mediterránea, zona de procedencia de dos de nuestras poblaciones (**SP** y **SC**), las diferencias estacionales climáticas se ven potenciadas por la altitud, con inviernos muy fríos y nevados y veranos extremadamente secos y calurosos, en los que, además, el rango de temperatura diario puede ser amplio. Por el contrario, a bajas latitudes el fotoperiodo es constante a lo largo del año, y los rangos de temperatura, incluso en la alta montaña, son más pequeños también a lo largo del año (la diferencia entre las temperaturas medias del mes más frío y del mes más cálido es de 3 °C en **M** y **K**, mientras que es de 16.6 °C en **SC**), aunque el rango diario sí es bastante amplio. El régimen de lluvias mostraba grandes diferencias entre nuestras localidades, siendo **SC** y **A** las que mayores precipitaciones registran (1500 y 1682 mm anuales respectivamente), y disminuyendo la cantidad de lluvia en general hacia el Ecuador, más o menos paralelamente al ascenso altitudinal. Aunque en los últimos años ha habido un incremento del interés en los estudios climatológicos del área del Kilimanjaro, aún carecemos de buenos registros y los datos de la bibliografía se basan en general en estudios a corto plazo. Sarmiento (1986) subraya la existencia de una importante variabilidad interanual en la precipitación en esta zona. Salt (1954) y Duane *et al.* (2008) afirman que la lluvia disminuye rápidamente con la altitud en el Kilimanjaro, dando lugar a un paisaje tan árido que el cinturón más alto se ha

considerado un desierto alpino. También se estableció que esta disminución es más pronunciada en la vertiente occidental de la montaña (Beaman, 1976; Sarmiento, 1986). Los hábitats tanto de **K** como de **M** se describen como muy brumosos y nublados (Beaman, 1962; Sarmiento, 1986; ver también las figuras 2.18 y 2.19), situación que probablemente les proporciona a los líquenes una fuente de hidratación importante.

### Intercambio de CO<sub>2</sub>

Como se detallaba en Material y Métodos, la actividad fotosintética se midió en todas las poblaciones a temperaturas y regímenes lumínicos diferentes. Los resultados de estas medidas se muestran en las Figs. 2.2 a 2.6 y las Tablas 2.2 a 2.5.

En la Fig. 2.2 puede verse la respuesta de estas poblaciones al incremento de temperatura. Todas ellas muestran patrones similares, con óptimos de FN entre 10 y 15 °C. Aunque los valores son bastante parecidos, **SP** y **CH** tienen los óptimos más bajos y la menor Tci (junto con **SC** esta última), mientras que **SC** y **M** muestran los óptimos más altos y también las mayores Tcs, notablemente más altos que las otras poblaciones (no olvidar que son valores extrapolados). El rango más estrecho se puede encontrar en **K**, con la Tci más alta y la Tcs más baja. Amáx es siempre máxima en las muestras de **M** a todas las temperaturas de medida (Figs. 2.2 y 2.6), pero, de acuerdo con las curvas ajustadas (Fig. 2.2), la FN sería más alta para **SP**, **CH** y **SC** a temperaturas más bajas de las medidas, y, para esta última población, también a temperaturas más altas. Todas las poblaciones mostraron valores parecidos de RO a bajas temperaturas (Fig. 2.2), las tasas que empiezan a diferenciarse a partir de 15 °C, pues la RO aumenta de manera exponencial. A 25 °C **A** tiene la mayor tasa de respiración y **SC** la más baja.

Cuando se representa la curva de luz completa a la temperatura óptima empírica de cada población (10 °C para **SP**, **CH**, **SC** y **M**, y a 15 °C para **A**, **CL** y **K**, Fig. 2.3a) es posible observar que **M** tiene de nuevo la mayor tasa cuando los datos se expresan en función de peso seco, a todas las intensidades lumínicas desde 100  $\mu\text{moles de fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Ninguna población, a excepción de **K**, muestra saturación a 1200  $\mu\text{moles de fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , la mayor PPFD utilizada para estas curvas. Este comportamiento puede considerarse característico de líquenes polares y alpinos (Green *et al.*, 2008). Las curvas de luz con valores calculados en función de superficie o de cantidad de Chl muestran distintos patrones (Fig. 2.3 b y c). **K** sigue teniendo el menor rendimiento, pero **M** ya no es el que muestra los valores más altos, especialmente en los calculados en función de Chl. Todas las poblaciones muestran un aumento del Pc según aumenta la temperatura, un cambio impulsado por la respuesta sensible de la RO a la temperatura (Tablas 2.4 y 2.5). **K** tiende a tener valores más altos, y **SC** más bajos. El Ps muestra una fuerte tendencia a ser menor a bajas temperaturas y existe un máximo real en **A** (a 20 °C) y **CH** (a 15 °C). Algunas diferencias de las existentes entre las poblaciones son estadísticamente significativas: **SC** tiene un Pc y un Ps más bajos que **CH** a 10 y 15 °C y que **SP** a 10 °C, y también un Pc menor que el de **CH** a 20 °C y el de **SP** a 25 °C, mientras que el Pc de **CH** a 15 °C es significativamente más alto que en **K** y **M**, y su Ps es mayor que cualquiera de los demás a 15 °C.

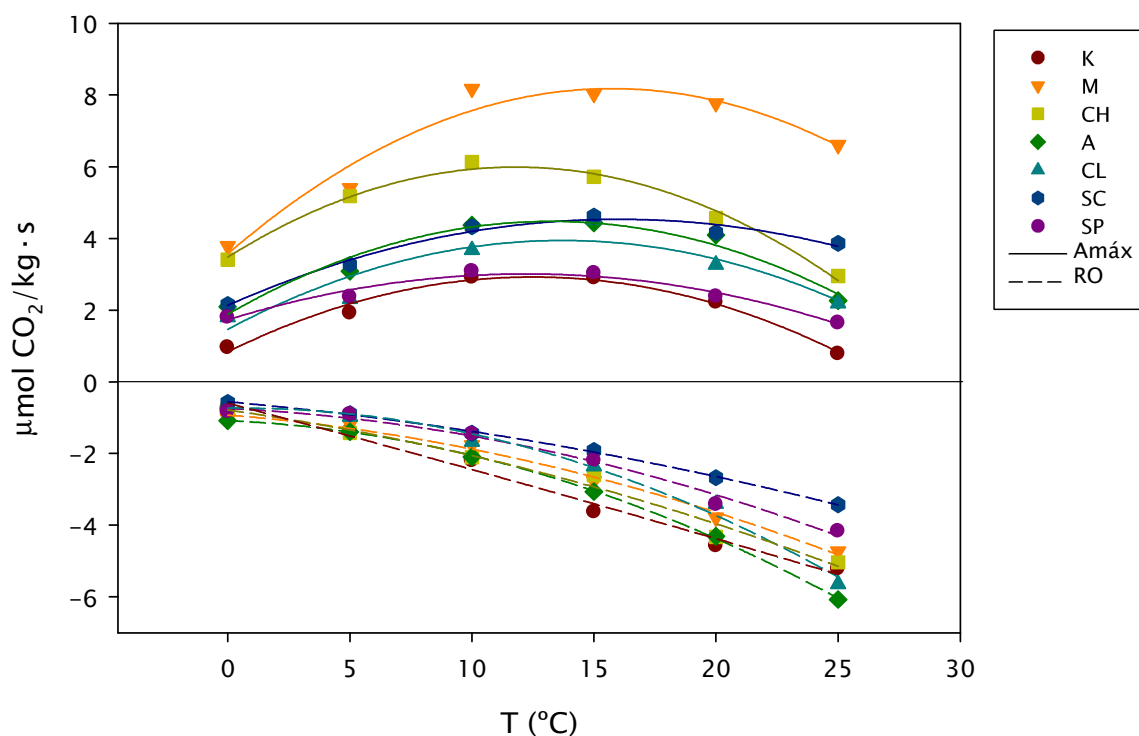


Fig. 2.2: Amáx (línea continua, fotosíntesis neta a 1200  $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y RO (línea discontinua, 0  $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) en el rango de temperaturas medidas. Los datos están ajustados a una ecuación de segundo grado ( $r^2$  siempre  $>0.95$ ).

Localidad	Amáx 0°C	Amáx 5°C	Amáx 10°C	Amáx 15°C	Amáx 20°C	Amáx 25°C
K	0.96±0.06 a	1.92±0.04 a	2.92±0.1 a	2.9±0.14 cd	2.22±0.24 a	0.78±0.15 a
M	3.78±0.17 c	5.4±0.07 bc	8.17±0.43 b	6.49±0.1 b	7.77±0.3 b	6.61±0.27 c
CH	3.41±0.17 bc	5.18±0.31 b	6.13±0.72 ab	5.16±0.26 bc	4.57±0.43 ab	2.95±0.21 ab
A	2.1±0.1 a	3.09±0.14 a	4.38±0.17 ab	4.44±0.13 bc	4.09±0.14 a	2.26±0.18 ab
CL	1.81±0.12 a	2.31±0.22 a	3.68±0.3 ab	4.53±0.2 bc	3.27±0.28 a	2.18±0.28 ab
SC	2.16±0.05 ab	3.28±0.09 ac	4.33±0.19 ab	3.73±0.3 cd	4.17±0.17 a	3.87±0.23 b
SP	1.8±0.11 a	2.37±0.15 a	3.08±0.12 a	2.13±0.07 ad	2.38±0.24 a	1.64±0.2 ab

Tabla 2.2: Amáx (tasa de asimilación máxima), en  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ s}^{-1}$  a cada temperatura de medida. De aquí en adelante, a menos que se especifique lo contrario, los valores son la media  $\pm$  SE para  $n=4$  en cada localidad, las localidades que comparten letra no son significativamente distintas para  $p<0.05$ , según un ANOVA seguido por un test post-hoc Tukey's HSD.

Localidad	Topt (°C)	Tci (°C)	Tcs (°C)	Área
K	12.47	-2.29	27.23	55.57
M	15.74	-5.23	36.71	175.42
CH	11.79	-6.41	29.98	126
A	13.3	-4.17	30.76	92.73
CL	13.7	-3.58	30.97	80.84
SC	16.29	-6.54	39.12	96.63
SP	12.15	-6.53	30.83	63.81

Tabla 2.3: El óptimo de temperatura de la fotosíntesis (Topt) se ha calculado como el punto en el que la derivada de la función se hace cero. Los puntos de compensación de temperatura superior e inferior (Tcs y Tci respectivamente) son los puntos de corte de la parábola con el eje de abscisas. El área se calcula mediante integración de la función entre 0 y 25 °C.

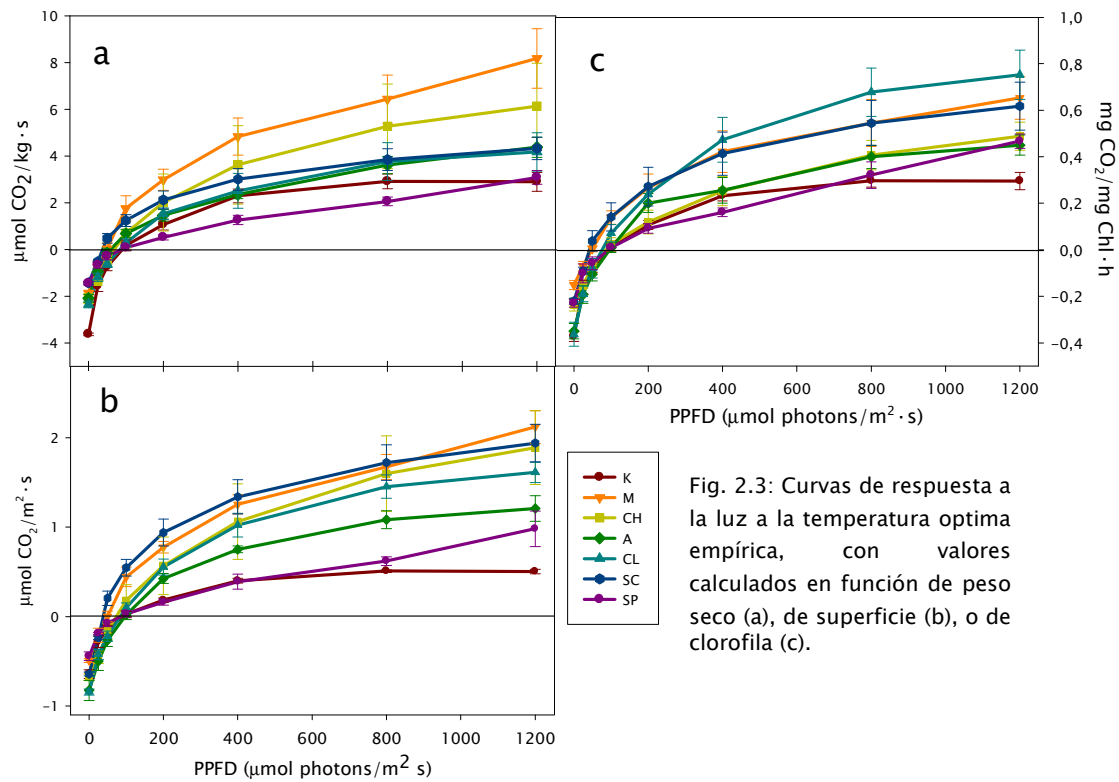


Fig. 2.3: Curvas de respuesta a la luz a la temperatura óptima empírica, con valores calculados en función de peso seco (a), de superficie (b), o de clorofila (c).

Loc.	Pc 0°C	Pc 5°C	Pc 10°C	Pc 15°C	Pc 20°C	Pc 25°C
K	60±3*	86±0.4*	105±2*	83±3 a	180±3*	584±54*
M	29±2	44±1	64±2	77±2 a	144±11	188±6
CH	39±3	60±3	121±11 a	178±16 b	187±8 a	196±16
A	44±2	60±2	84±5	101±4	161±9	183±5
CL	64±6*	84±5*	114±8*	97±5	186±9*	297±21*
SC	25±1	39±4	54±3 b	62±5 a	90±6 b	132±9 a
SP	39±3	67±5	130±4a	97±3	180±5	261±10 b

Tabla 2.4: Puntos de compensación de luz (Pc, en  $\mu\text{mol fotonos m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) a todas las temperaturas de medida. Las letras indican las diferencias significativas entre las localidades a cada temperatura. \* indica los valores excluidos del análisis estadístico por las razones detalladas en la sección de Material y métodos.

La Fig. 2.4 muestra las curvas de luz de todas las poblaciones a todas las temperaturas de medida: 0, 5, 10, 15, 20 y 25 °C. El aumento de los puntos de compensación de luz según aumenta la temperatura es claro. La falta de saturación también es obvia en la mayoría de las curvas de temperaturas superiores a 5 °C, excepto en el caso de K.

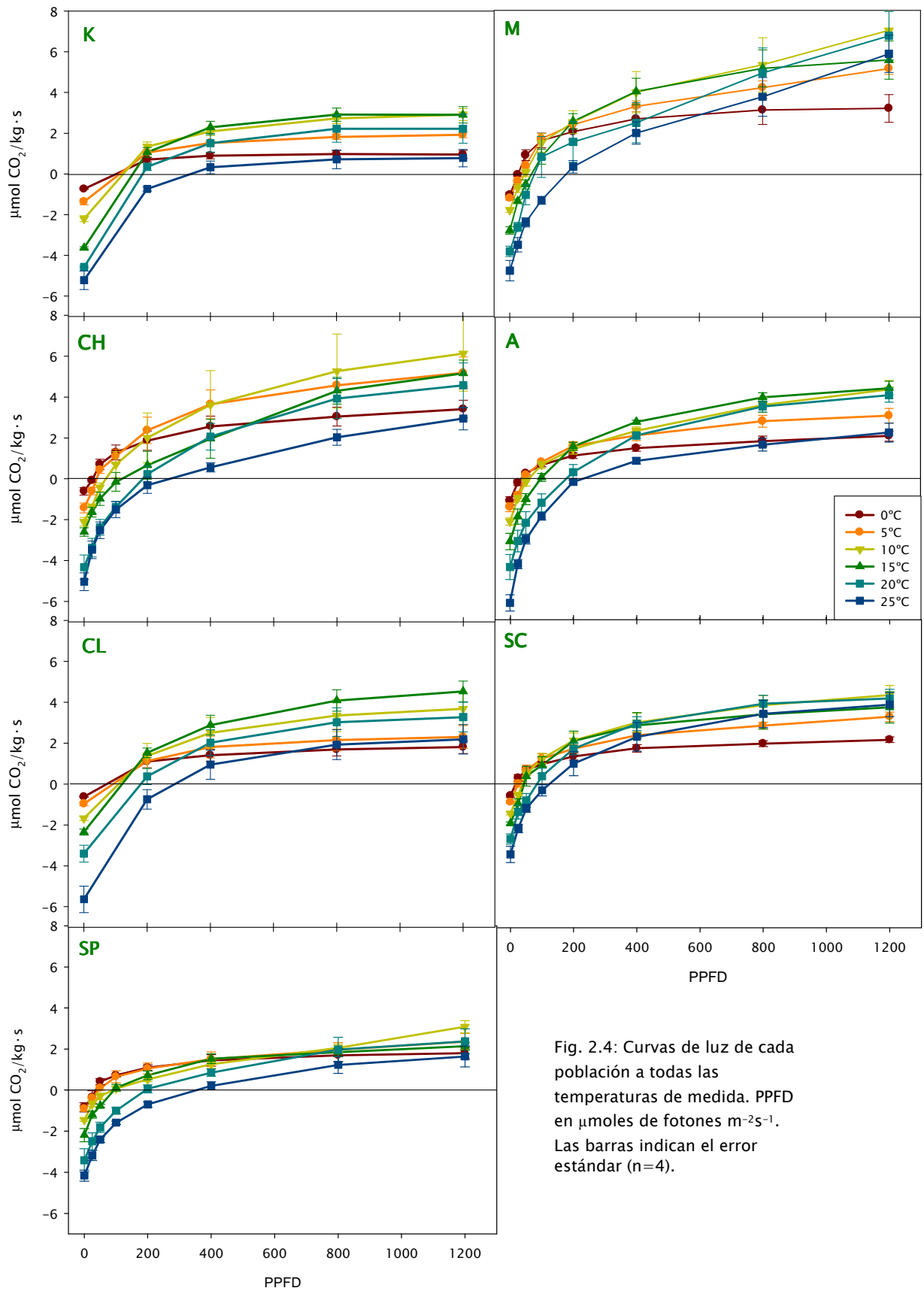


Fig. 2.4: Curvas de luz de cada población a todas las temperaturas de medida. PPFD en  $\mu\text{moles de fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Las barras indican el error estándar ( $n=4$ ).

Como el IPE (índice de peso específico, en g de peso seco por m<sup>2</sup> de superficie) difiere significativamente entre poblaciones (Tabla 2.6), esto provoca que los valores de Amáx tengan distinto patrón según si se calculan por peso o por área (Fig. 2.5) Ocorre lo mismo con el contenido de Chl (Fig. 2.10). Es notable que la población **K** siempre tiene la menor actividad fotosintética, independientemente de en función de qué se calcule Amáx. Hay, sin embargo, diferencias interesantes en otras poblaciones. La más destacable es la inversión que tiene lugar entre **M** y **CL**: cuando Amáx se calcula en función de peso seco, **M** tiene siempre la mayor productividad, y es significativamente más alta que **SP** y **K**, y claramente (aunque no significativamente) más alta que **CL**. Las tasas en función de superficie son muy parecidas entre **CL** y **M**, sin embargo. Pero, cuando se hace el cálculo en función de cantidad de Chl, **CL** tiene una tasa más alta (no significativamente) que **M**, mientras que el resto mantienen valores similares. El IPE es significativamente mayor en **SC** comparado con el resto de poblaciones excepto **CL** y **CH**, mientras que el valor de **K** es significativamente menor que **CL**, **CH** y **SC**. Cuando todos los valores de peso seco y superficie se analizan juntos, la relación entre ellos no es significativa ( $p=0'44$ ), pero se convierte en significativa ( $p= 0'04$ ,  $r^2= 0'42$ ) cuando los valores de **SC** se excluyen de la regresión lineal (Fig. 2.7).

Loc.	Ps 0°C	Ps 5°C	Ps 10°C	Ps 15°C	Ps 20°C	Ps 25°C
K	340±19	481±6	549±7	367±9 <sup>a</sup>	641±4	756±50
M	260±10	450±11	561±24	489±11 <sup>a</sup>	687±41	765±15
CH	407±19	537±20	725±28 <sup>a</sup>	820±40 <sup>b</sup>	752±9	647±32
A	307±24	423±14	518±24	541±15 <sup>a</sup>	663±24	604±21
CL	477±29	565±17	673±20	578±19 <sup>a</sup>	741±15	827±24
SC	259±17	364±31	436±17 <sup>b</sup>	378±9 <sup>a</sup>	503±21	593±147
SP	283±17	473±23	715±11 <sup>a</sup>	454±11 <sup>a</sup>	661±17	766±28

Tabla 2.5: Puntos de saturación de luz (Ps, en  $\mu\text{mol fotonos m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) a todas las temperaturas de medida.

Las poblaciones mantienen sus posiciones relativas a todas las temperaturas (sólo se muestra la Amáx por peso seco, Fig. 2.6) e independientemente de la base utilizada para el cálculo de Amáx.

Loc.	TSW (g/m <sup>2</sup> )
K	177.8±5.34 <sup>a</sup>
M	265.03±7.76 <sup>ac</sup>
CH	336.94±19.86 <sup>bc</sup>
A	270.68±6.3 <sup>ac</sup>
CL	361.92±5.57 <sup>bc</sup>
SC	450.06±6.71 <sup>b</sup>
SP	311.74±18.28 <sup>ac</sup>

Tabla 2.6: Índice de peso específico del talo (IPE, en g m<sup>-2</sup>) de todas las poblaciones.

La RO y FB calculadas en función de peso seco, área y Chl se muestran en la Fig. 2.5. El valor más alto de RO lo muestra **K** en función de peso seco y Chl, mientras que los valores tendían a ser más parecidos en función de superficie. En las gráficas de barras las poblaciones están organizadas por orden creciente de latitud absoluta (sin tener en cuenta a qué hemisferio pertenecen) y es interesante ver la tendencia aparente a mostrar valores más bajos de Amáx (por peso seco) a latitudes mayores. Esta tendencia es aún más visible en FB.

El coeficiente de eficiencia fotosintética (KF) se muestra en la Fig. 2.8 y la Tabla 2.7. Ninguna población mostraba su máximo valor de KF a la temperatura óptima. Por el contrario, **CL**, **CH**, **SC** y **M** tenían su máximo KF a 0 °C, mientras que **K**, **A** y **SP** lo tenían a 5 °C. Sin embargo, todas mostraban el valor más bajo de KF a 25 °C, como era de esperar, debido a la alta tasa de respiración a esa temperatura. **K** tenía el valor de KF más bajo a todas las temperaturas y **M** normalmente el más alto.

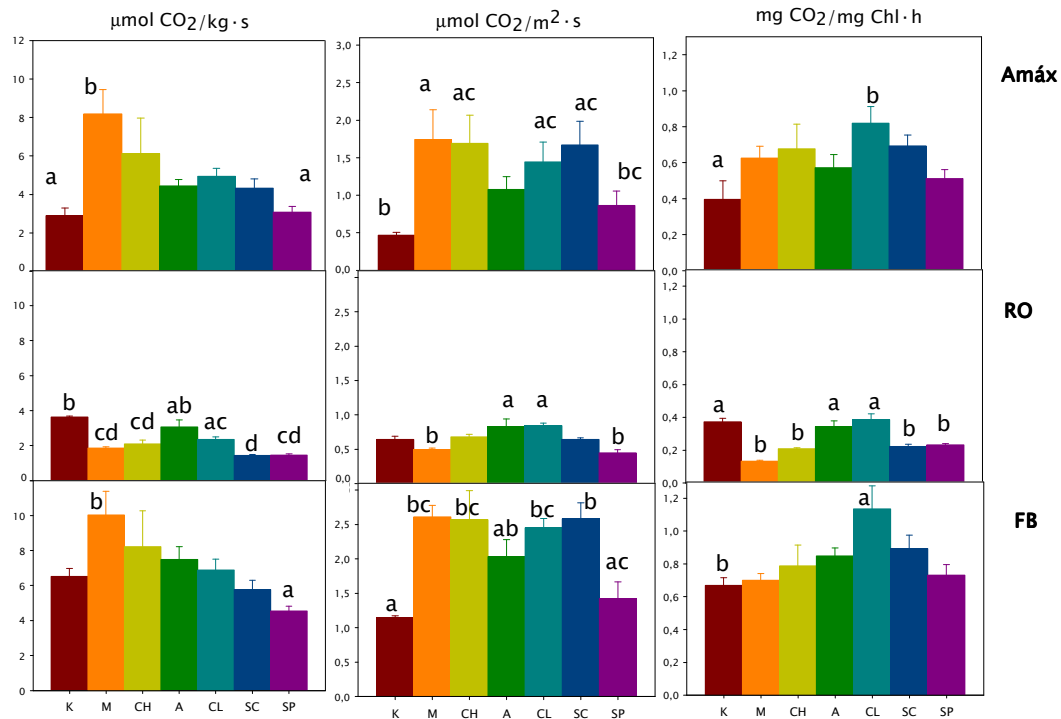


Fig. 2.5: Amáx, RO y FB calculados por peso seco (izquierda), superficie (centro) y Chl (derecha). De aquí en adelante, y a menos que se indique lo contrario, las barras marcan el error estándar (n=4), las letras diferentes indican diferencias significativas para  $p < 0.05$  por ANOVA seguido del test post-hoc Tukey's HSD.

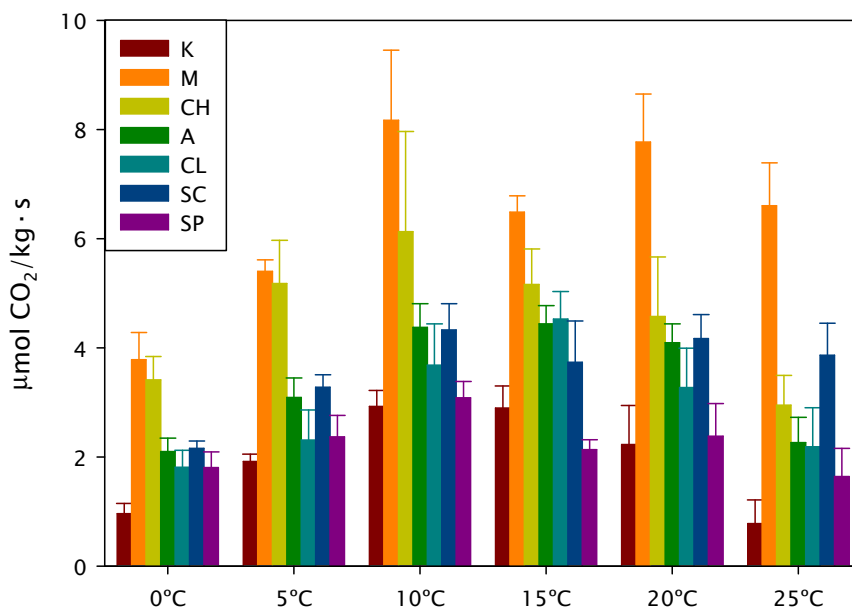


Fig. 2.6: Amáx en función de peso seco (no se muestran las diferencias significativas).



Loc.	KF0	KF5	KF10	KF15	KF20	KF25	KFmáx
K	2.3±0.1 <sup>bb</sup>	2.4±0.1 <sup>bb</sup>	2.3±0.03 <sup>bb</sup>	1.8±0.03 <sup>b</sup>	1.5±0.1 <sup>ba</sup>	1.1±0.03 <sup>ba</sup>	1.8±0.03 <sup>b</sup>
M	5.1±0.1 <sup>acB</sup>	5.9±0.2 <sup>aB</sup>	5.3±0.2 <sup>aB</sup>	3.3±0.1 <sup>aA</sup>	3±0.1 <sup>aA</sup>	2.3±0.1 <sup>aA</sup>	5.3±0.2 <sup>a</sup>
CH	5.5±0.2 <sup>aB</sup>	4.7±0.2 <sup>acBD</sup>	3.8±0.2 <sup>CD</sup>	3±0.1 <sup>acAC</sup>	2.1±0.1 <sup>bcA</sup>	1.6±0.04 <sup>A</sup>	3.8±0.2 <sup>cd</sup>
A	3.2±0.2 <sup>bcB</sup>	3.3±0.1 <sup>bcB</sup>	3.1±0.1 <sup>bbc</sup>	2.5±0.2	2±0.02 <sup>bcAC</sup>	1.4±0.04 <sup>ba</sup>	2.5±0.04 <sup>bd</sup>
CL	3.9±0.2 <sup>B</sup>	3.4±0.2 <sup>bcB</sup>	3.2±0.1 <sup>bbc</sup>	2.9±0.1 <sup>BC</sup>	2±0.1 <sup>bcAC</sup>	1.4±0.1 <sup>ba</sup>	2.9±0.1 <sup>bc</sup>
SC	4.9±0.1 <sup>acB</sup>	4.7±0.2 <sup>acB</sup>	4±0.1 <sup>BC</sup>	3±0.2 <sup>acAC</sup>	2.6±0.1 <sup>acAC</sup>	2.2±0.1 <sup>aA</sup>	4±0.1 <sup>ac</sup>
SP	3.3±0.1 <sup>bcB</sup>	3.6±0.1 <sup>bcB</sup>	3.1±0.1 <sup>bb</sup>	2±0.1 <sup>bcA</sup>	1.7±0.04 <sup>ba</sup>	1.4±0.04 <sup>ba</sup>	3.1±0.1 <sup>bc</sup>

Tabla 2.7: Coeficiente de eficiencia fotosintética (KF= (FN+RO)/RO) a todas las temperaturas. KFmáx indica KF a la temperatura óptima empírica para Amáx. Las minúsculas indican diferencias entre poblaciones y las mayúsculas indican diferencias dentro de cada población.

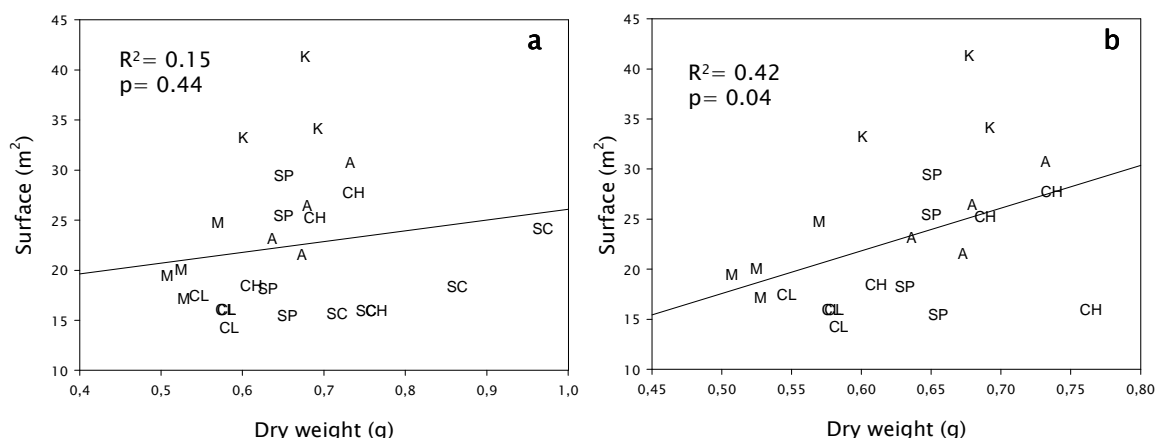


Fig. 2.7: Regresión lineal simple entre superficie y peso seco, con todos los valores juntos (izqda.) y excluyendo la población SC (dcha.).

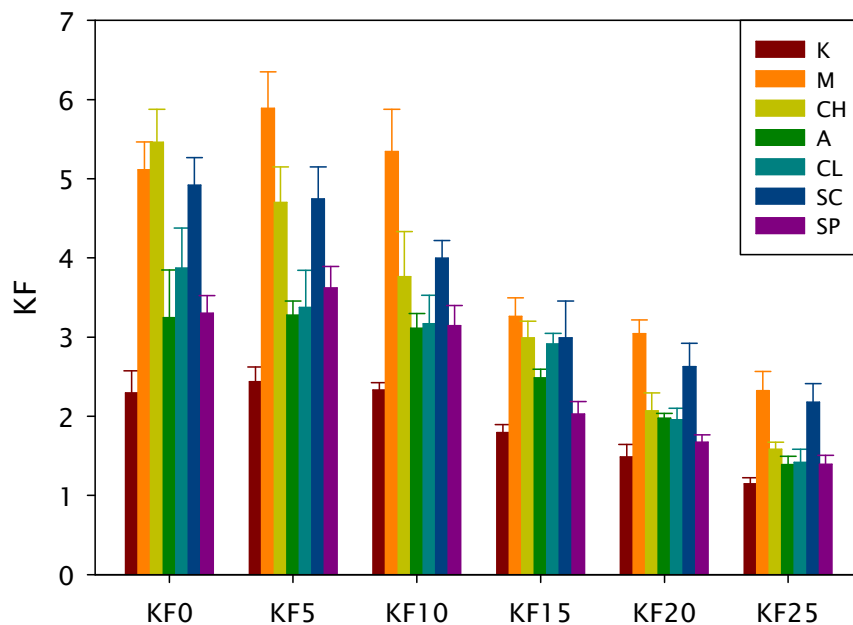


Fig. 2.8: Representación gráfica de la Tabla 2.7. Las diferencias estadísticamente significativas se muestran allí.

### Relaciones hídricas

Los datos de T50, T20, contenido hídrico máximo por peso seco (CHM) y por superficie (CHMA) se muestran en la tabla 2.8. La población K tenía un valor de T20 significativamente menor que CL y SC. El CHMA de SC era significativamente más alto que el de SP, A y K. Se encuentra un patrón parecido para el contenido hídrico óptimo

(CHO). **M** tiene un valor más alto que **SP** y **A**, y, de nuevo, cuando se calcula en función de área (CHOA), el valor de **SC** es el más alto y significativamente mayor que **K** y **A**.

Loc.	T50	T20	CHM	CHMA	CHO	CHOA
K	38±1	85±3 <sup>b</sup>	256±5	456±18 <sup>a</sup>	81±4	146±12 <sup>a</sup>
M	52±1	139±3	254±5	678±23	114±4 <sup>b</sup>	306±16
CH	68±2	180±7	207±3	627±26	75±1	227±10
A	50±2	143±7	185±7	500±18 <sup>a</sup>	58±3 <sup>a</sup>	155±5 <sup>a</sup>
CL	79±4	205±10 <sup>a</sup>	177±4	644±24	76±3	276±12
SC	73±5	203±9 <sup>a</sup>	181±4	816±21 <sup>b</sup>	83±3	377±17 <sup>b</sup>
SP	60±5	152±9	164±3	502±23 <sup>a</sup>	73±3 <sup>a</sup>	231±19

Tabla 2.8: Tiempo medio en minutos necesario para alcanzar el 50 (T50) y el 20% (T20) del contenido hídrico máximo (CHM, en % relativo al peso seco), contenido hídrico máximo por unidad de área, en g H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> (CHMA), contenido hídrico óptimo por peso seco (CHO) o por área (CHOA).

Cuando se enfrentaron todos los datos de CHMA frente a IPE se encontró una correlación positiva ( $r^2 = 0.62$ ,  $p < 0.0001$ , Fig. 2.9) que indica que cuanto mayor es el peso seco por superficie, mayor es la cantidad de agua que puede retener. Lo mismo sucede cuando se representaron los valores de CHOA frente a IPE, con una correlación igualmente positiva y significativa ( $r^2 = 0.63$ ,  $p < 0.0001$ ).

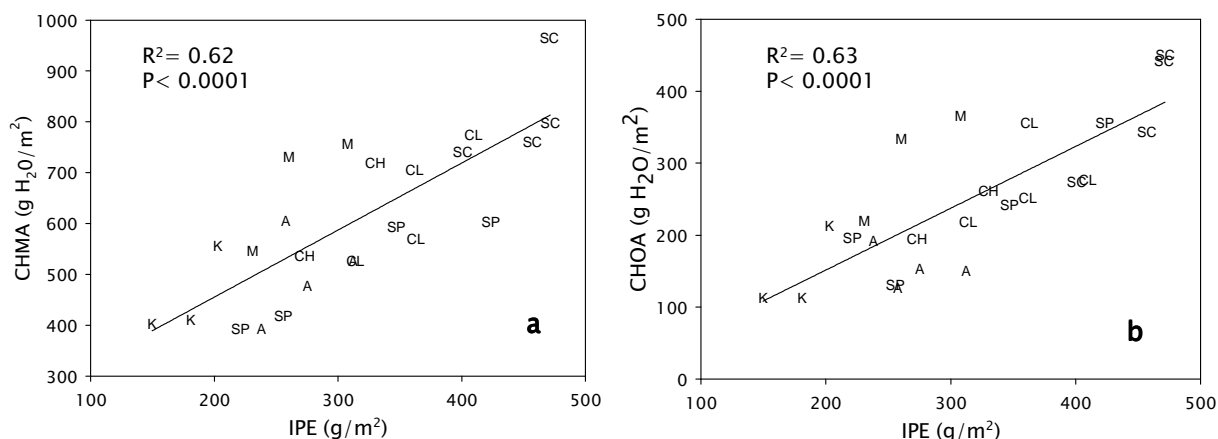


Fig. 2.9: Índice de peso específico (IPE, en g m<sup>-2</sup>) vs. contenido hídrico máximo por área (CHMA, en g H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup>, a) y vs. contenido hídrico óptimo por área (CHOA, en g H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup>, b) de todos los datos juntos.

### Componentes subcelulares

El contenido en Chl difiere entre localidades (Fig. 2.10), pero en general no existen diferencias notables, ni por peso seco ni por área. Sin embargo, cabe destacar el valor sorprendentemente alto de Chl<sub>b</sub> en **K**, que tiene el valor más bajo del cociente Chl<sub>a</sub>/Chl<sub>b</sub> (Tabla 2.9), mientras que **CH** tiene el mayor. El alto contenido en Chl<sub>b</sub> de las muestras **K** le hace tener uno de los valores más altos de Chl por peso seco, aunque es el más bajo cuando ésta se calcula en función de superficie. **M** tiene el mayor contenido en Chl total, principalmente a causa de su alto contenido en Chl<sub>a</sub>, aunque el valor de Chl<sub>b</sub> también es mayor que en otras poblaciones.

En lo que respecta a los marcadores fúngicos, el Erg muestra poca variabilidad entre poblaciones (Fig. 2.11), con la excepción de **M**, cuyo contenido en Erg por peso seco es el más alto. Lo mismo sucede en el caso de la quitina, donde **SC** muestra el valor más alto, tanto por peso seco como por superficie, y le proporciona a esta población el cociente más alto Quit/Erg, significativamente mayor que **K**, **CL**, **A** y **M**.

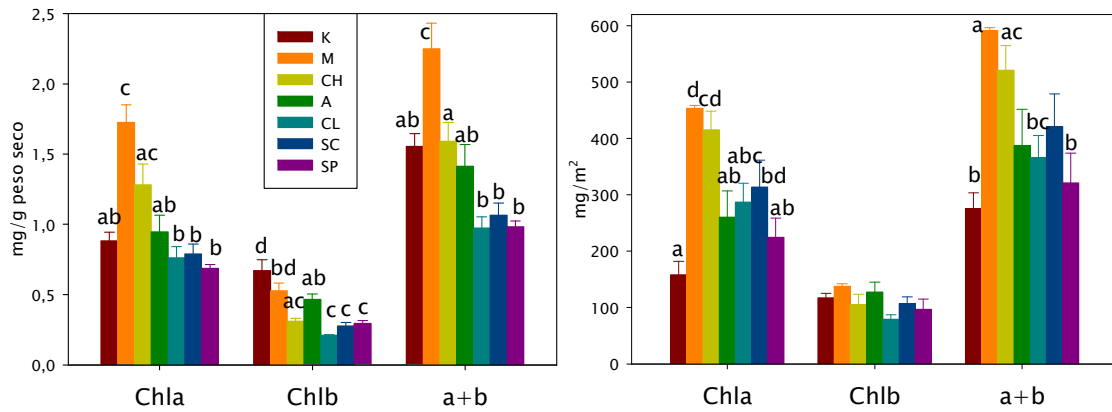


Fig. 2.10: Chl *a*, *b*, y Chl total calculadas en función de peso seco (izqda.) y de superficie (dcha.).

Loc.	Chl <i>a</i> / <i>b</i>
K	1.35±0.06 <sup>a</sup>
M	3.3±0.04 <sup>bd</sup>
CH	4.25±0.27 <sup>d</sup>
A	2.01±0.04 <sup>ab</sup>
CL	3.77±0.15 <sup>cd</sup>
SC	3.12±0.07 <sup>bd</sup>
SP	2.32±0.03 <sup>abc</sup>

Tabla 2.9: Cociente Chl*a*/Chl*b*.

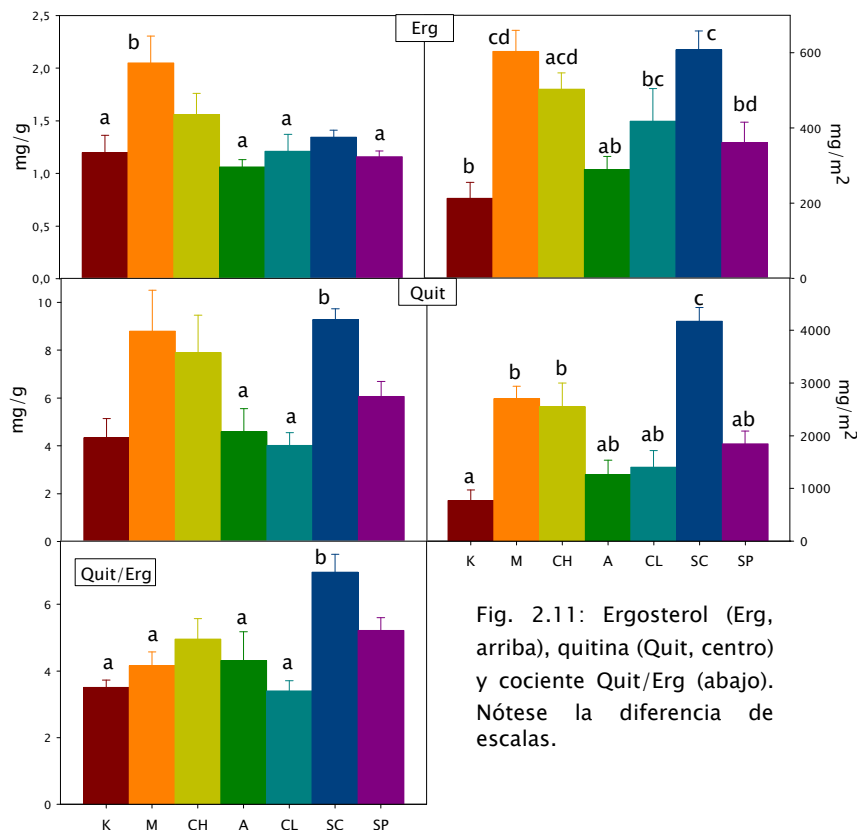


Fig. 2.11: Ergosterol (Erg, arriba), quitina (Quit, centro) y cociente Quit/Erg (abajo). Nótese la diferencia de escalas.

El análisis de aminoácidos se muestra en la Fig. 2.12, donde se puede ver un contenido total de aa bastante parecido en todas las localidades. Sin embargo, la composición no es tan parecida, pues la proporción de arginina es significativamente mayor en **SP** que en el resto, excepto **CL**.

Los resultados del análisis elemental y  $\text{NH}_4^+$  se pueden ver en a Fig. 2.13. El nitrógeno total en función de peso seco es máximo en **M** y mínimo en **SP**. EL patrón es parecido para el  $\text{NH}_4^+$ , aunque las diferencias son más marcadas en este caso. El cociente C/N es máximo en **SP** y mínimo en **M**, porque los valores de C son muy similares entre las poblaciones (Tabla 2.10). **SC** muestra los valores más altos cuando el cálculo se realiza en función de superficie.

La Tabla 2.11 y Fig. 2.14 muestran los resultados del análisis de azúcares. El contenido total en azúcares (en función de peso seco) fue máximo en **M** y mínimo en **K**. Curiosamente, este patrón se invertía cuando se consideraba el cociente ribitol/manitol, lo cual quiere decir que en **M** la cantidad de este azúcar fúngico es mayor en proporción al ribitol algal que en **K**. Sin embargo, esto no se observa en el cociente ribitol/(manitol+arabitol), incluso aunque el arabitol no muestra diferencias significativas entre las poblaciones (Tabla 2.11). El contenido en azúcares calculado en función de superficie es máximo en **SC**.

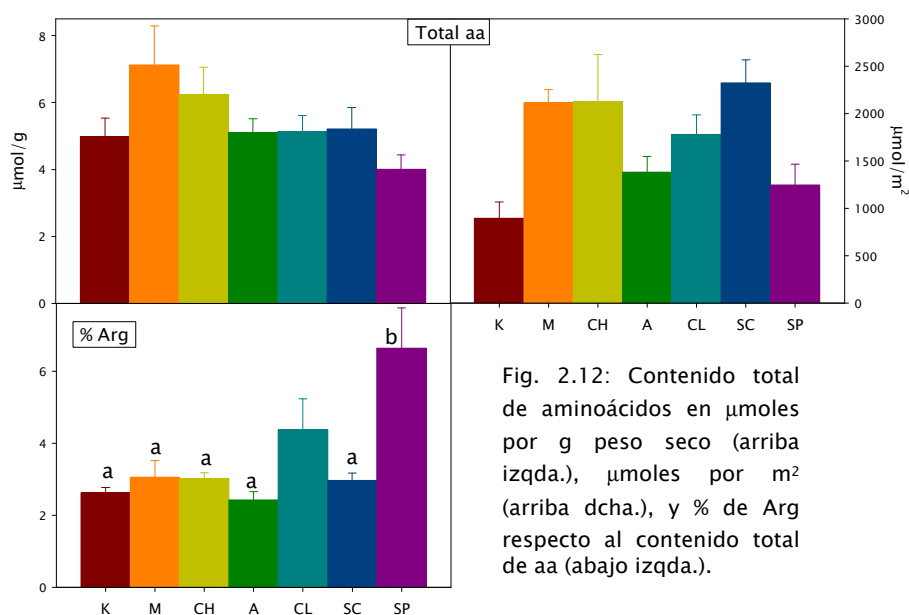


Fig. 2.12: Contenido total de aminoácidos en  $\mu\text{moles}$  por g peso seco (arriba izqda.),  $\mu\text{moles}$  por  $\text{m}^2$  (arriba dcha.), y % de Arg respecto al contenido total de aa (abajo izqda.).

Loc.	C	N	C/N	$\text{NH}_4^+$
K	$413 \pm 0.6$ a	$11.07 \pm 0.23$ ac	$37.58 \pm 0.79$	$0.22 \pm 0.001$ b
M	$401 \pm 0.5$ bc	$14.67 \pm 0.21$ b	$27.43 \pm 0.35$ a	$0.6 \pm 0.02$ a
CH	$401 \pm 1.3$ b	$12.46 \pm 0.57$ bc	$33.54 \pm 1.63$ ac	$0.26 \pm 0.01$ b
A	$410 \pm 0.2$ ac	$10 \pm 0.07$ ac	$40.96 \pm 0.31$ bc	$0.39 \pm 0.02$
CL	$411 \pm 0.7$ ad	$9.68 \pm 0.67$ ac	$43.55 \pm 1.75$ bc	$0.3 \pm 0.02$ bc
SC	$400 \pm 0.5$ b	$11.13 \pm 0.06$ ac	$35.9 \pm 0.19$	$0.53 \pm 0.03$ ac
SP	$403 \pm 0.6$ bcd	$8.85 \pm 0.19$ a	$45.88 \pm 0.99$ b	$0.2 \pm 0.01$ b

Tabla 2.10: Contenido de C y N en  $\text{mg/g}$ , cociente C/N y contenido de  $\text{NH}_4^+$ , en  $\mu\text{moles}$  por g de peso seco.

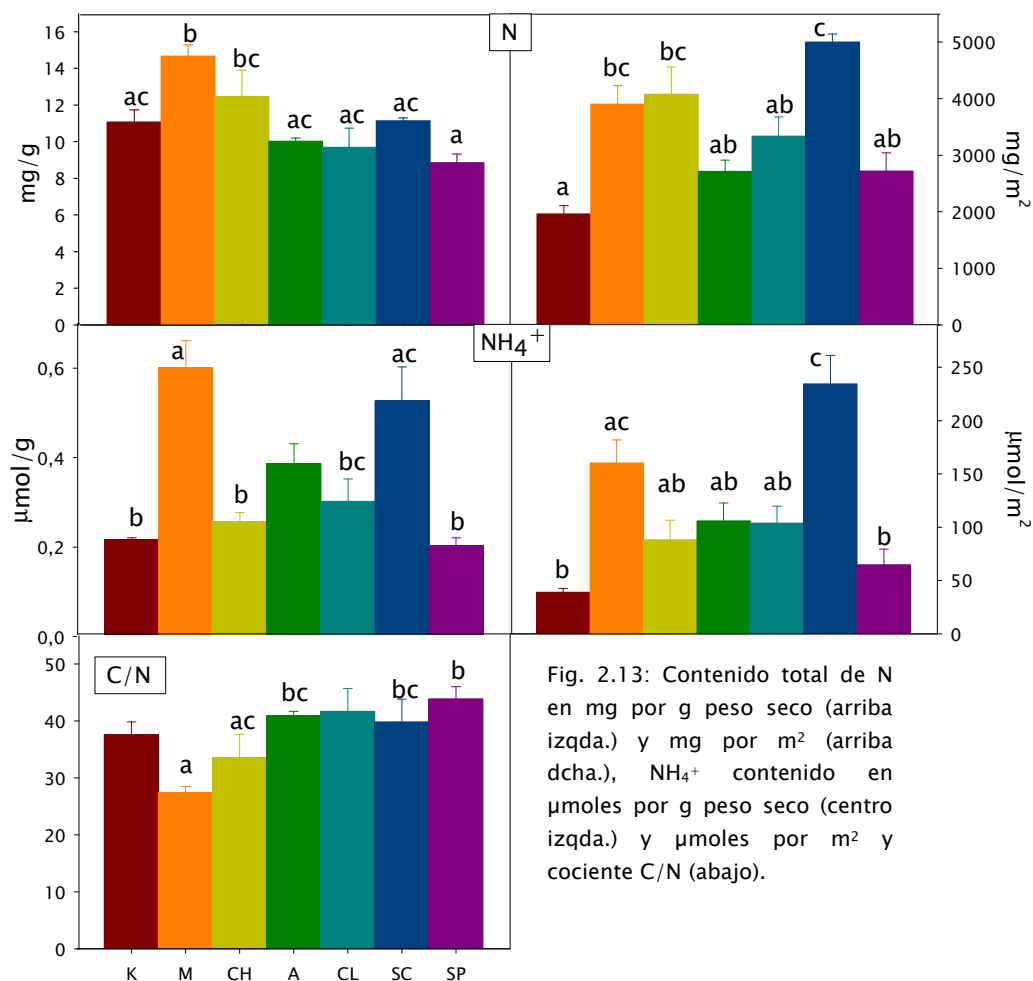


Fig. 2.13: Contenido total de N en mg por g peso seco (arriba izqda.) y mg por m<sup>2</sup> (arriba dcha.), NH<sub>4</sub><sup>+</sup> contenido en µmoles por g peso seco (centro izqda.) y µmoles por m<sup>2</sup> y cociente C/N (abajo).

Loc.	Tot. azúcares	Ribitol	Manitol	Arabitol	rib/man	rib/man+arab
K	7.88±0.59 <sup>a</sup>	1.12±0.07	1.73±0.12 <sup>b</sup>	2.98±0.26	0.65±0.002 <sup>d</sup>	0.24±0.004 <sup>a</sup>
M	28.48±0.42 <sup>b</sup>	2.7±0.05	10.42±0.28 <sup>a</sup>	3.34±0.08	0.26±0.01 <sup>ac</sup>	0.19±0.004
CH	21.44±0.58	1.77±0.15	10.04±0.28 <sup>z</sup>	1.33±0.08	0.17±0.01 <sup>bc</sup>	0.15±0.009
A	15.62±0.16	1.93±0.02	6.01±0.16	2.84±0.13	0.33±0.01 <sup>a</sup>	0.22±0.003 <sup>a</sup>
CL	23.11±1.65	2.22±0.08	8.36±0.53	4.4±0.31	0.28±0.01 <sup>ab</sup>	0.18±0.01
SC	22.39±0.33	1.46±0.09	9.13±0.09 <sup>a</sup>	1.58±0.06	0.16±0.01 <sup>c</sup>	0.14±0.008 <sup>b</sup>
SP	22.8±2.22	1.94±0.23	9.37±0.98 <sup>a</sup>	5.64±0.89	0.2±0.01 <sup>bc</sup>	0.13±0.001 <sup>b</sup>

Tabla 2.11: Contenido total de azúcares, ribitol, manitol y arabitol, en mg/g. Cociente ribitol/manitol y cociente ribitol/manitol+arabitol.

El ácido girofórico es el compuesto secundario más abundante sintetizado por esta especie, pero, de acuerdo con la bibliografía, no está siempre presente (Løfall & Timdall, 2005). No se encontró en ninguna muestra de **K**, **SC** y **M** y estaba presente sólo en la mitad de los ejemplares de **CL** y **SP**. Sin embargo, todas las muestras de **CH** y **A** lo tenían en grandes cantidades (Fig. 2.15).

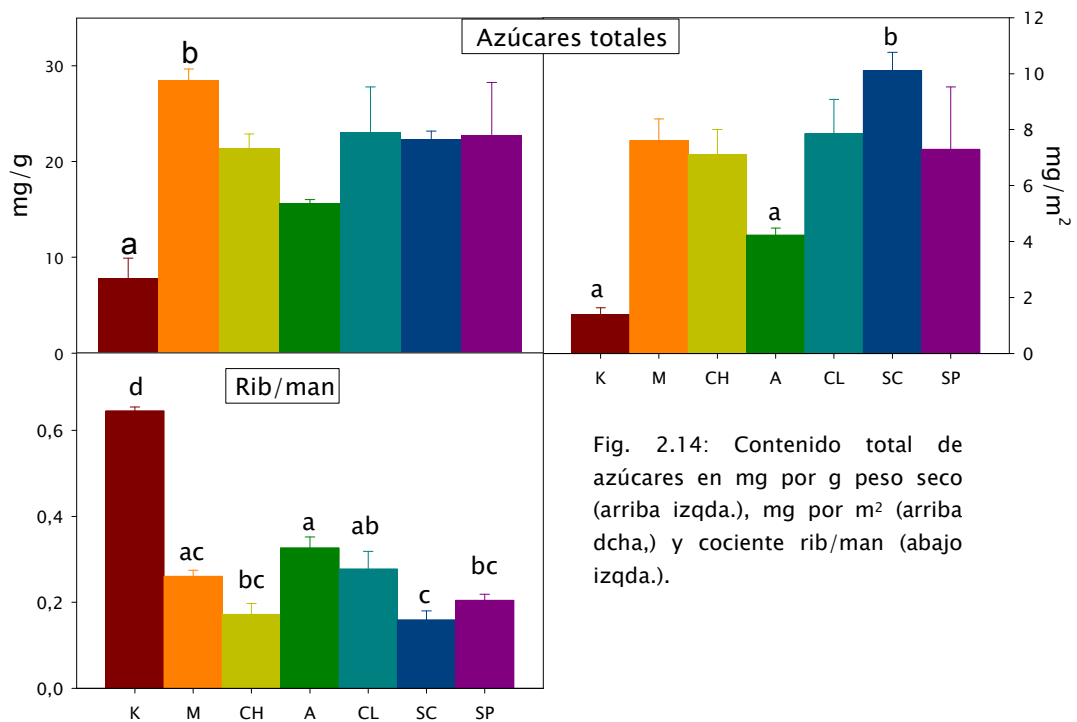


Fig. 2.14: Contenido total de azúcares en mg por g peso seco (arriba izqda.), mg por m<sup>2</sup> (arriba dcha,) y cociente rib/man (abajo izqda.).

### Medidas de fluorescencia

Los resultados de las curvas de inducción y recuperación se muestran en las Figs. 2.16 y 2.17 y en la Tabla 2.12. Las poblaciones se distribuyen en dos grupos: el primero está formado por **K**, **CL** y **SP**, con valores más bajos de rendimiento, mientras que en el segundo, formado por **CH**, **A**, **SC** y **M**, los valores eran prácticamente idénticos y mostraban una excelente recuperación (Fig. 2.16). La parte de inducción mostraba más diferencias entre ellas, como puede verse en la Tabla 2.12, aunque en general existen diferencias significativas entre los dos grupos, pero no dentro de ellos. Sin embargo, este patrón es bastante diferente si nos centramos en los valores relativos de estos parámetros (Fig. 2.17). Los dos grupos ya no son distinguibles, porque la mayor diferencia entre ellos procedía del valor inicial de  $F_v/F_m$ , pero la recuperación de este valor es excelente en casi todos los casos. Cuando los valores se refieren a ese primer valor de  $F_v/F_m$  la diferencia desaparece. La única población con distinta respuesta es **SP**, con valores significativamente más bajos que el resto. **SC** y **CL** también mostraron diferencias significativas comparadas con **M** en el último punto de la sección de inducción (PYi), con los valores más bajos, al igual que en el primer punto de la recuperación (PYr). El valor de PYi de **K** es significativamente más bajo también que **M**, pero luego no hay diferencias ni en PYr ni en el valor final PYf, como ocurre también con **SC** y **CL**.

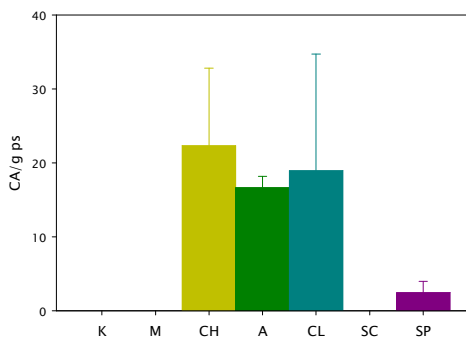


Fig. 2.15: Ácido giranfórico en unidades de área arbitrarias por peso seco. No se aplicó ningún test estadístico, al no haber suficientes réplicas.

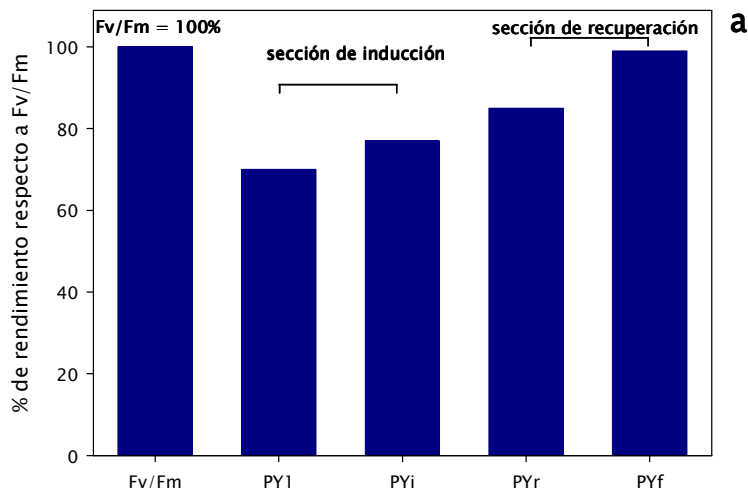
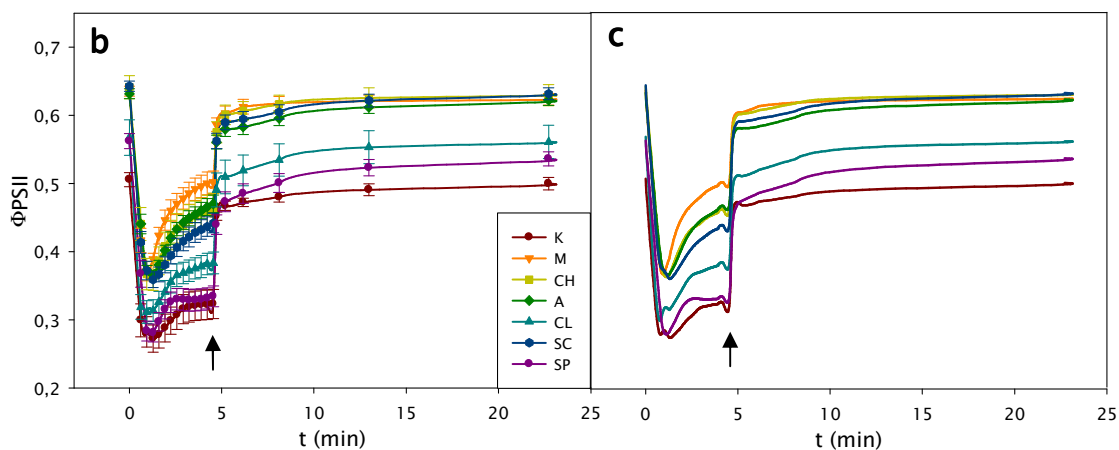


Fig. 2.16: (a) Diagrama explicativo de los parámetros obtenidos en las curvas de inducción y recuperación del rendimiento cuántico del FS II ( $\Phi_{FSII}$ ). Dichas curvas vs. tiempo en minutos: (b) con barras de error (n= 8 a 12), (c) sólo las líneas para facilitar la comparación. Las flechas indican el comienzo de la curva de recuperación. Ver detalles en la sección de Material y Métodos.



Loc.	Fv/Fm	Y1	Yi	Yr	Yf
K	0.51±0.03 <sup>b</sup>	0.3±0.06 <sup>b</sup>	0.32±0.06 <sup>b</sup>	0.45±0.02 <sup>b</sup>	0.5±0.02 <sup>b</sup>
M	0.64±0.03 <sup>a</sup>	0.42±0.06 <sup>a</sup>	0.5±0.06 <sup>a</sup>	0.59±0.03 <sup>a</sup>	0.62±0.03 <sup>a</sup>
CH	0.64±0.06 <sup>a</sup>	0.44±0.08 <sup>a</sup>	0.46±0.07 <sup>a</sup>	0.58±0.05 <sup>a</sup>	0.63±0.05 <sup>a</sup>
A	0.63±0.03 <sup>a</sup>	0.44±0.05 <sup>a</sup>	0.47±0.04 <sup>a</sup>	0.56±0.04 <sup>a</sup>	0.62±0.03 <sup>a</sup>
CL	0.57±0.08 <sup>b</sup>	0.32±0.06 <sup>b</sup>	0.38±0.05 <sup>bc</sup>	0.49±0.08 <sup>b</sup>	0.56±0.08 <sup>b</sup>
SC	0.64±0.03 <sup>a</sup>	0.41±0.06 <sup>a</sup>	0.44±0.05 <sup>ac</sup>	0.56±0.04 <sup>a</sup>	0.63±0.03 <sup>a</sup>
SP	0.56±0.04 <sup>b</sup>	0.37±0.07	0.33±0.05 <sup>b</sup>	0.44±0.05 <sup>b</sup>	0.54±0.03 <sup>b</sup>

Tabla 2.12: Valor inicial del rendimiento cuántico del FS II (Fv/Fm). Y1 es el  $\Phi_{FSII}$  cuando se aplica el primer pulso de saturación tras el inicio de la luz actínica, Yi es el  $\Phi_{FSII}$  al final de la curva de inducción (pulso 14, ver M&M), Yr es el primer  $\Phi_{FSII}$  tras el inicio de la fase de recuperación (pulso 15) e Yf el rendimiento al final de la recuperación (pulso 20) (n=12).

## Análisis estadísticos

Hicimos regresión múltiple para encontrar una ecuación que explicara la varianza de Amáx por peso seco, medida para cada población a la temperatura y contenido hídrico óptimos y máxima irradiación ( $1200 \mu\text{mol de fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ). Los resultados se muestran en las Tablas 2.13 y 2.14. La diferencia entre ellas es que en el análisis representado en la Tabla 2.14 se excluye **K**.

	F	p	Varianza explicada	Coefficientes
Modelo	10.66	<0.0001	78.04	
Efectos				
Térm. indep.	0.0202	0.888		0.609
C/N	1.6012	0.222	5.19	-0.074
Chla	9.7364	0.006**	31.56	4.0164
Precipitación	0.0889	0.769	0.29	0.0003
Tm	0.886	0.359	2.87	0.225
TM	0.1406	0.712	0.46	0.142
Latitud	0.3759	0.547	1.22	0.05

Tabla 2.13: Resultado de la regresión múltiple donde Amáx es la variable de respuesta a los efectos de C/N, Chla, rib/man, Precipitación, Tm, TM, y Latitud. Se muestran los valores de F, la significación estadística (p) y el porcentaje de varianza explicada por el modelo y por cada variable, así como los coeficientes de regresión. Grados de libertad: 8,18 para el modelo y 1,18 para cada efecto. \*\* indica  $0.01 > p > 0.001$ .

	F	p	Varianza explicada	Coefficientes
Modelo	11.84	<0.0001	81.72	
Efectos				
Térm. indep.	2.595	0.128		-11.078
C/N	3.489	0.081 ·	7.63	-0.111
Chla	15.225	0.001**	33.30	5.613
Precipitación	2.064	0.171	4.51	0.002
Tm	5.146	0.038*	11.26	0.853
TM	0.112	0.743	0.24	0.117
Latitud	4.683	0.047*	10.24	0.365

Table 2.14: Resultado de la regresión lineal múltiple con Amáx como variable de respuesta a las mismas covariables que en la tabla 2.13, pero con la exclusión de la población **K**. Se muestran los valores de F, la significación estadística (p) y el porcentaje de varianza explicada por el modelo y por cada variable, así como los coeficientes de regresión. Grados de libertad: 8,18 para el modelo y 1,18 para cada efecto. · Indica  $0.1 > p > 0.05$ ; \* indica  $0.05 > p > 0.01$ ; \*\* indica  $0.01 > p > 0.001$ .

La covariable más importante, que explica mejor la varianza de Amáx para todas las poblaciones es Chla. En cuanto a las variables ambientales, la mayor influencia parece ser la temperatura media del mes más frío (Tc). El coeficiente de determinación  $R^2$  es alto, 0'78 en el modelo con todos los datos, y 0'82 en el modelo donde **K** se excluyó. En este último, la latitud tenía una influencia significativa y el cociente C/N resultó casi significativo. Para las variables metabólicas los valores nulos no tienen sentido, pues no es posible obtener fotosíntesis alguna si no hay Chl o C. Sin embargo, ya que las variables ambientales sí pueden tomar un valor nulo, se permitió el cálculo de términos independientes en la ecuación, que no resultaron significativos en ninguno de los análisis. Se hicieron también modelos de regresión lineal múltiple para Amáx en función de área y de cantidad de Chl. En el primer caso, todas las variables se recalcularon también en función de área (no se muestran estos datos). En este caso, las variables más influyentes fueron igualmente Chla y el cociente C/N, éste último casi significativo.  $R^2$  era algo mayor, 0'79, en el modelo completo, mientras que era menor, 0'72, en el modelo sin **K**. En el último caso, la latitud no tenía influencia en la Amáx por superficie. Cuando la variable respuesta analizada era la Amáx por Chl (la Chla se excluyó del análisis en este caso) ninguna variable resultó ser significativa en el



modelo completo. Al excluir **K**, el cociente C/N, Tm y la latitud resultaron significativos, aunque el coeficiente de determinación era mucho más bajo (0'55).

### Efecto de la latitud

El efecto de la latitud se muestra en la Tabla 2.15. Se encontró un aumento de los coeficientes de correlación de Pearson, así como de la significación, cuando la población **K** se excluyó del análisis de correlaciones.

Parámetros	Todas las localidades		Excluyendo <b>K</b>	
	r	p	r	p
Amáx	-0.06	0.77	-0.65	0.001***
FB	-0.26	0.22	-0.61	0.003**
Chl	-0.58	0.003**	-0.87	0***
Erg	-0.26	0.2	-0.77	0***
Total azúcares	0.28	0.18	-0.31	0.16
Total aminoácidos	-0.35	0.096	-0.71	0.0002***
C/N	0.36	0.078	0.64	0.001**
N	-0.38	0.06	-0.71	0.0002***

Tabla 2.15: Coeficientes de correlación de Pearson (r) y significación de la correlación entre latitud y los parámetros indicados, con todas las muestras (izqda.) y tras la exclusión de la población **K** (dcha.). · Indica 0.1>p>0.05; \*\* indica 0.05>p>0.001; \*\*\* indica p<0.001.

### Modelado de nicho

Tras los análisis de MaxEnt (Fig. 2.18) llevados a cabo con las condiciones pasadas, presentes y previstas para el año 2050, se puede ver que *U. decussata* tiene un área potencial restringida a las zonas alpinas y polares (Körner *et al.*, 2011). Esta área potencial era mucho más amplia en el último máximo glacial, y parece que las condiciones futuras causarán su desaparición de la alta montaña de regiones templadas y subtropicales, pero su área de distribución se verá ligeramente incrementada en zonas polares.

## DISCUSIÓN

La plasticidad fenotípica permite a los seres vivos sobrevivir bajo condiciones ambientales cambiantes y colonizar diferentes hábitats. Una respuesta plástica frente al ambiente parece ser especialmente importante para organismos sésiles, que crecen despacio y en los que no existen procesos homeostáticos complejos (Pintado *et al.*, 1997; Sultan, 2000).

A pesar de las grandes diferencias en las condiciones ambientales de los lugares en los que *Umbilicaria decussata* crece (Fig. 2.1) y que son en sí mismas una indicación de su habilidad de adaptación, la presencia de esta especie siempre indica condiciones alpinas. No se encuentra en los ambientes más bajos y más suaves, probablemente porque su balance de carbono no sería favorable en esas condiciones. Al estar presente en casi todos los lugares considerados alpinos (*sensu* Körner *et al.*, 2011) de todo el mundo, es una especie muy representativa de estos hábitats, y, de esta manera, el retroceso de esta especie indicaría de manera fiable el retroceso del hábitat alpino, siendo un marcador muy útil de la pérdida de hábitats alpinos. De ahí la importancia de entender su comportamiento ecofisiológico y su respuesta a los cambios.

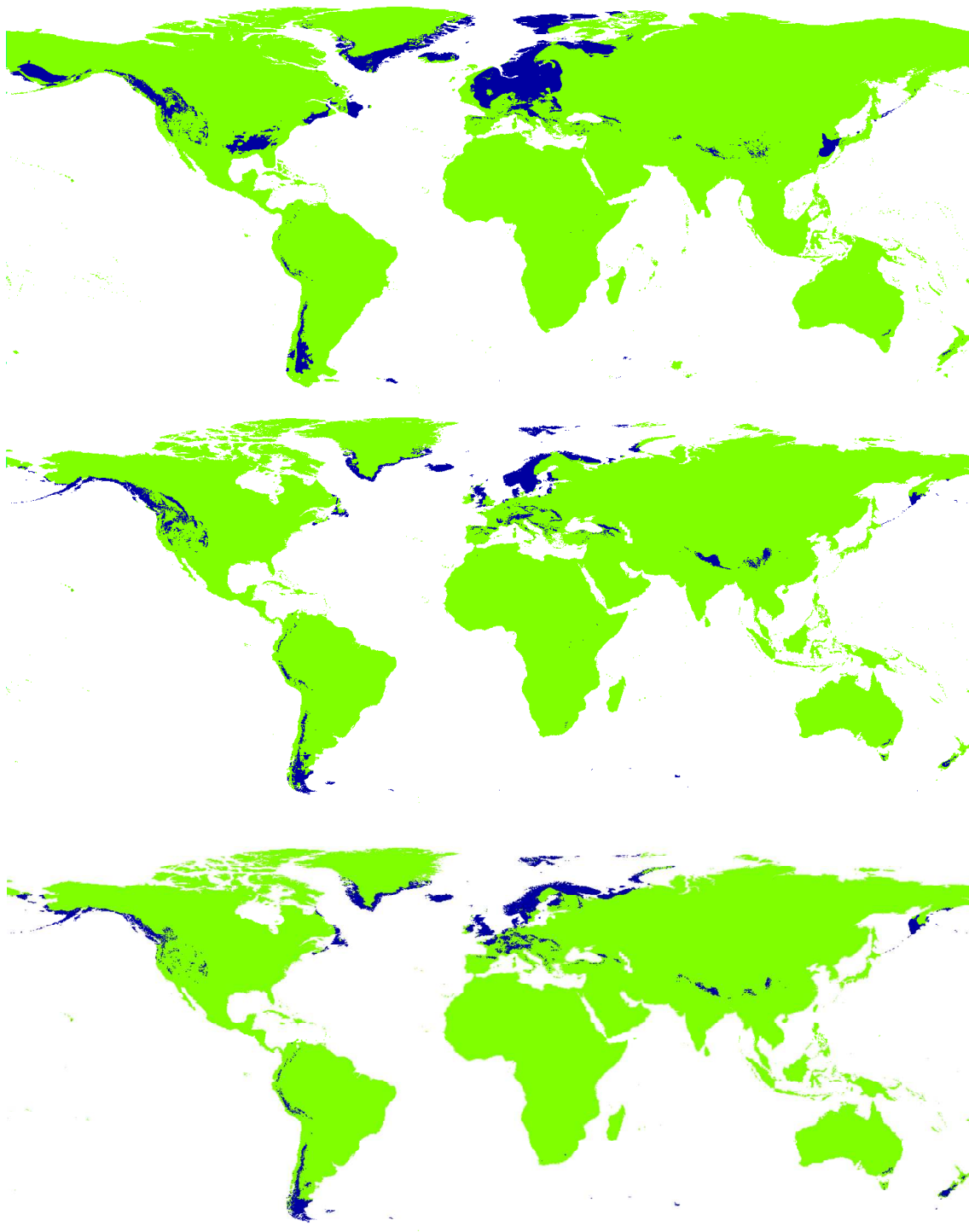


Fig. 2.18: Nicho potencial de *Umbilicaria decussata*, tras los análisis con MaxEnt con valores de variables ambientales correspondientes a la última glaciación (arriba), presentes (centro) y futuros (abajo).

En este estudio pretendíamos comprobar si *Umbilicaria decussata* tenía un comportamiento diferente en las siete localidades muestreadas, de diferentes puntos de su distribución templada y tropical, y, si no era así, evaluar la amplitud de los rangos fisiológicos de esta especie.

El resultado más sorprendente de este estudio es la correlación más o menos marcada entre la latitud y algunos de los parámetros medidos. Éstos son: aumento de Am<sub>ax</sub> y FB, Erg, Chl, aa, N y azúcares en latitudes bajas; e incremento del cociente C/N en latitudes altas. Los patrones eran siempre más claros cuando se excluía **K** (Tabla 2.15), situación en la que las correlaciones con todos los parámetros anteriores resultaban más significativas, con la única excepción del contenido en azúcares. La inclusión de **K** en los datos utilizados para la regresión es con seguridad la causa de que la latitud no resulte significativa en el modelo de regresión (Tabla 2.13), pues al eliminar esta población la latitud sí tiene una influencia significativa. Este resultado contrasta marcadamente con la ausencia de patrones latitudinales en distintas especies de *Cladonia* (Lechowicz & Adams, 1979), pero está de acuerdo con otros estudios donde se encontraron tendencias latitudinales (Schipperges *et al.*, 1995; Sancho *et al.*, 2000). Estos últimos estudios se hicieron dentro de un gradiente latitudinal restringido, con menos poblaciones y siempre incluyendo muestras polares. En el presente estudio hemos podido ampliar el rango a los trópicos. Si hubiéramos incluido datos polares es más que probable que la tendencia se hubiera mantenido, según se puede deducir de nuestros datos y de las medidas hechas con *U. decussata* de la Antártida (Lange, 1965; Green *et al.*, 2011b). Curiosamente, Green *et al.* (2011b) no encontraron ninguna diferencia en la tasa de FN entre dos poblaciones antárticas de esta especie separadas por 22° de latitud, lo que explicaron como resultado de la mayor importancia del microclima que del macroclima.

La gran pregunta que surge de este estudio es qué está realmente detrás de la respuesta a la latitud. Como se ve en la Tabla 2.15, a menor latitud, mayor Am<sub>ax</sub>, FB, Chl, Erg, Taa y N. Hemos visto la influencia que tienen la Chl<sub>a</sub> y la temperatura en la productividad. Una temperatura más alta cuando los líquenes están activos les proporcionaría un rendimiento fotosintético más eficiente (mayor KF) siempre y cuando la temperatura permaneciera dentro del rango subóptimo que experimentan habitualmente en el campo (Schroeter *et al.*, 1995; Green *et al.*, 1995). Esto posibilita un metabolismo más activo, que, combinado con un nivel de N más elevado, lleva a las altas cantidades de azúcares, aminoácidos, pigmentos y otros que hemos observado en este gradiente. Se ha demostrado que el límite de bosque, y por tanto el comienzo de la zona alpina, siguen aproximadamente una isoterma de temperatura media a todas las latitudes (Körner & Paulsen, 2004). En nuestro análisis, la temperatura más influyente resultó ser la media del mes más frío (Tabla 2.14) y no la del mes más cálido. Esto puede sugerir que el invierno es el momento clave para estos organismos, ya que es una época fuera de la estación de crecimiento en sí y la posibilidad de activarse en esa temporada puede suponer una diferencia importante. La longitud del periodo de actividad tendría una gran influencia en la efectividad de todos los factores que a su vez influyen en la productividad. Un periodo activo más largo explicaría fácilmente la mayor productividad y cantidad de metabolitos, pero el momento en que los líquenes están activos puede ser también importante, v.gr., estar activos durante noches cálidas puede provocar importantes pérdidas respiratorias (Lange, 2003a; Reiter *et al.*, 2008). Al ser organismos poiquilohidros su tiempo de actividad está limitado por la disponibilidad de agua. Las condiciones climáticas más constantes que

existen hacia el Ecuador proporcionan a las plantas una estación de crecimiento más larga (Körner & Paulsen, 2004). La presencia frecuente de la niebla puede proporcionar también periodos de actividad más largos, gracias a la humedad que suministra, y también a la protección frente al sol, que de otro modo, provocaría la rápida deshidratación de los talos. En las regiones templadas con un fuerte contraste estacional la niebla aparece sólo en determinadas épocas del año, mientras que en zonas tropicales puede formarse todos los días. El contraste de temperaturas entre invierno y verano es muy importante también. En zonas tropicales de alta montaña el régimen de temperaturas puede ser muy adecuado para el crecimiento de los líquenes, pues las temperaturas durante el día tienden a ser más altas, permitiendo una buena productividad fotosintética, mientras que por la noche suelen ser bajas, lo cual minimiza la pérdida respiratoria de carbono. En regiones templadas las temperaturas pueden ser muy altas en verano, también durante la noche, provocando una importante pérdida de carbono por respiración. En invierno la mayor parte de la precipitación es en forma de nieve, lo cual impide que el agua sea disponible para la fotosíntesis. En zonas mediterráneas no hay fotosíntesis en verano debido a la característica sequía estival. Esto limita mucho el periodo de actividad. De hecho, Körner & Paulsen (2004) midieron una estación de crecimiento más corta en zonas mediterráneas que en zonas boreales.

¿Cuáles son las razones de la exclusión de K de este gradiente? Es posible que las muestras estuvieran dañadas antes de su estudio en el laboratorio. El daño podría haber ocurrido durante el transporte del campo al laboratorio. O las muestras podían haber estado ya dañadas cuando se recogieron. O ambas cosas. Al ser un líquen alpino, se esperaría que *U. decussata* fuera muy tolerante a la desecación, pero no todos los líquenes pueden hacerle frente de manera eficaz. Green *et al.* (1991) mostraron una alta mortalidad de *Pseudocyphellaria dissimilis* cuando se exponía a periodos cortos al 5–16% HR. Esta especie, procedente de bosques de lluvia resultó ser menos tolerante a la desecación que los propios líquenes acuáticos. Coxson (1987) también observó la extremada sensibilidad a la deshidratación de *Cora glabrata* (bajo *Cora pavonia*), un basidioliquen de la zona de nieblas de un volcán tropical. Sin embargo, muestras de la misma especie (bajo *Dictyonema glabratum*) recuperaron actividad fotosintética tras una desecación completa (Larcher & Vareschi, 1988), demostrando diferentes tolerancias a la deshidratación dentro de una misma especie. A pesar de las diferencias obvias entre un cloroliquen alpino y un basidioliquen o un cianoliquen de un bosque de lluvia, al venir de un ambiente neblinoso, nuestra población K puede haber sufrido más que otras los efectos de la desecación previa a la congelación y las medidas. Esto se ve apoyado por los bajos valores de IPE de estas muestras, que sugieren que el líquen vive en un ambiente húmedo (ver más abajo), y no requiere por tanto la inversión de recursos en el reforzamiento de la estructura talina. No podemos descartar la posibilidad del daño previo a la recolección de estos talos. Los bosques del Kilimanjaro se encuentran en regresión debido al cambio de los usos tradicionales del suelo, la tala y el fuego, especialmente desde el comienzo de la década de los 60 del siglo pasado (Soini, 2005). Se ha establecido que el uso del suelo en las proximidades de la región montana altera los parámetros de circulación de las

masas de aire generados por la topografía, así como la temperatura y humedad de las masas de aire bajas que desembocan en la formación de nubes (Lawton *et al.*, 2001; Nair *et al.*, 2003). Este hecho se ha relacionado con los diferentes cambios experimentados por la precipitación y el régimen de lluvias en el límite de bosque y en la cumbre (Hemp, 2009; Fairman *et al.*, 2011). De esta manera, la vegetación de esta región sufre los rápidos cambios en el régimen hídrico (Hemp, 2009). Por tanto, esta población de *U. decussata* podría encontrarse en regresión. Esto se ve apoyado por los bajos valores de fluorescencia en comparación con el resto de poblaciones de este estudio. La buena respuesta en la curva de recuperación puede indicar que el daño no se debía a una manipulación incorrecta antes de las medidas, sino que estaba ya presente cuando las muestras se recogieron.

Ahora se discutirán en detalle los cambios en los parámetros medidos que muestran las poblaciones de estudio.

### **Intercambio gaseoso y relaciones hídricas**

Hemos encontrado diferencias interesantes en la ecofisiología de las siete poblaciones de esta especie, que pueden atribuirse a las diferentes condiciones climáticas en las que vive.

**M** muestra las mayores tasas de FN, independientemente de la intensidad lumínica o la temperatura, cuando el cálculo se hace en función de peso seco (Figs. 2.2, 2.3 y 2.5). Esta tendencia no se mantiene con tasas basadas en Chl o área (Figs. 2.3 y 2.5), donde los valores se hacen mucho más parecidos entre poblaciones, con la excepción de **K**, que siempre tiene el valor más bajo.

Un talo con mayor cociente superficie/peso (bajo IPE) puede tener una captura de luz más eficiente, pues es menos probable que se dé auto-sombreado de las moléculas de Chl. Con el mismo contenido de Chl en función de peso seco, alcanzaría mayores tasas de FN por unidad de Chl, pues las moléculas de este pigmento estarían completamente expuestas a la luz. Pero su capacidad de retención de agua sería menor, como se ha visto en este estudio (Fig. 2.9). **K** posee el talo más delgado, teniendo en cuenta que su IPE es el menor (Tabla 2.6), lo que explica parcialmente su menor rendimiento fotosintético cuando se calcula en función de superficie (Fig. 2.5). Del mismo modo, aunque su contenido en Chl por peso seco es uno de los mayores, es el menor en función de superficie, y una parte importante de esta Chl (el 40%) es Chl**b**, lo que resulta en una gran eficiencia en la captación de luz, pero un menor transporte de energía (Dale & Causton, 1992). Cuando la FN se calcula en función del contenido de Chl, **K** muestra el menor valor también, significativamente más bajo que el de **CL**, que tiene un contenido de Chl similar por área, pero mucho menor por peso. Esto podría indicar que, a pesar del contenido en Chl y su capacidad de captura de luz, y teniendo en cuenta su talo más delgado, que descartaría el efecto del auto-sombreado, su Chl podría ser menos eficiente como consecuencia de la degradación. Esto se ve apoyado por el cociente de feofitización (PQa, datos no mostrados), que era el menor en las muestras de **K** (0'96, cuando el valor óptimo está entre 1'3 y 1'4,

según Garty *et al.*, 1985). Como los procesos de extracción y de medida fueron idénticos para todas las muestras, esto sugiere una degradación previa.

Por otro lado, la alta tasa de FN de M tanto por peso seco como por superficie se explica en su mayoría por el mayor contenido de Chl de esta población, que indica una mayor inversión en el aparato fotosintético (Figs. 2.5 y 2.10). En efecto, su tasa de FN por peso seco es la más alta comparada con las otras seis poblaciones, pero no es así cuando las tasas se refieren a contenido de Chl. En este caso, los valores son parecidos para las siete poblaciones. Esto puede deberse a una cantidad de Chl relativamente constante por centro de reacción. Pero en la población **M** podría estar ocurriendo también un efecto de auto sombreado, que provocaría el descenso de la eficiencia potencial de la Chl (en este caso los valores de PQa son normales). Así lo sugiere la comparación con la población **CL**, que muestra valores discretos, con un contenido en Chl bajo y una tasa de FN no muy alta. Su FN por unidad de Chl es más alta que la de M, lo que explica las bajas tasas por peso seco como efecto de la diferencia en la cantidad de Chl, y también por los valores más altos de IPE de **CL**, considerando que un incremento en IPE se debe en su mayoría al micobionte. Las tasas de FN son muy parecidas en función de área, aunque **M** tiene más Chl por m<sup>2</sup>. De esta manera, parece que **CL** utiliza su Chl disponible de manera más eficiente, apoyando la hipótesis de un posible auto sombreado en la población algal de **M**.

En este estudio Tci y Tcs (Tabla 2.3) se calcularon a partir de la ecuación ajustada, no son valores empíricos. Ya Lange (1965) demostró la capacidad de esta especie para obtener importantes tasas de fotosíntesis a bajas temperaturas, y las poblaciones que parecen ser más tolerantes al frío son **M** y **CH**, que tienen la mayor FN a 0 °C, con una RO parecida. Sin embargo, al menos M parece estar raramente sometida a temperaturas tan bajas en condiciones naturales (Tabla 2.1). Diversos estudios indican que los datos de laboratorio son buenos indicadores del comportamiento de los líquenes en el campo (Lange *et al.*, 2001; Reiter *et al.*, 2008), pero no pueden proporcionar ninguna indicación de la asimilación real en condiciones naturales. Por esta razón, estas poblaciones merecerían estudios de campo que hicieran posible la estimación precisa de su ganancia de carbono real. Es notable que **SC** y **SP**, las poblaciones con los valores más bajos de Tci, proceden de los lugares más fríos, con 160 días al año de heladas y 168 con cobertura nival en la estación meteorológica, situada 500 m por debajo del lugar de recolección (datos para **SC**). Teniendo en cuenta que en estas dos localidades la precipitación es en su mayoría en forma de nieve (100 días al año para **SC**), es probable que no estén activos durante mucho tiempo en invierno, no limitados por la temperatura, sino por la disponibilidad de agua. Sin embargo, parecen estar preparados para la fijación de carbono en invierno, aprovechando la fusión de la nieve durante los días fríos, pero soleados, que no son raros en las montañas mediterráneas y en los Pirineos. **SC** es también la población con el valor más alto de Tcs, y tiene por tanto el rango más amplio de temperatura de actividad (45'7 °C frente a los 29'5 °C de **K**), seguida por **M** y **SP** (41'9 y 37'4 °C, respectivamente). Esto es otra indicación de la versatilidad de esta especie, que se debe ver potenciada en esta población mediterránea, pues los cambios en

temperatura diurna y HR hacen que los ambientes alpinos sean más extremos que los polares (Kappen, 1988). Podemos también hacernos una idea de la productividad potencial que cada población tendría en el rango estudiado de temperaturas por comparación del área bajo la curva de temperaturas (Fig. 2.2 y Tabla 2.3). **SC** y **SP**, aunque tienen rangos amplios, no son las más eficientes, porque su productividad no es tan grande como en otras poblaciones con un rango de temperaturas más estrecho (v.gr. **CH**). Sin embargo **M** tiene tanto un rango amplio como una alta productividad, siendo de lejos la población más efectiva en el rango de temperaturas medido.

**SC** muestra el mayor valor de IPE, que explica en parte su baja eficiencia fotosintética por peso seco, pero mucho mayor por unidad de área y de Chl. El grosor del talo (observación personal) caracteriza a esta población, y la distingue del resto en muchos aspectos influenciando su respuesta fisiológica de manera marcada.

**CL** y **CH** son dos poblaciones geográficamente próximas, en las que la diferencia en altitud se compensa con la diferencia en latitud (Fig. 2.1). Sus tasas de FN son bastante parecidas, independientemente de la base de cálculo, pero se pueden observar algunas diferencias. **CH** siempre muestra valores más altos de Am<sub>ax</sub> a todas las temperaturas (Fig. 2.6). Esto se debe en parte al mayor contenido en Chl de las muestras de **CH**, pero este patrón se puede observar también en el coeficiente de eficiencia fotosintética (KF) (Fig. 2.8, Tabla 2.7). Las diferencias, aunque no significativas, son claramente más altas a bajas temperaturas, lo que sugiere una mejor aclimatación a estas temperaturas en **CH**, tal como se esperaba. Los efectos de vivir en un lugar más alto, y por tanto con un nivel lumínico mayor (Körner, 2007) se pueden observar también en los valores de compensación y saturación de luz (Green *et al.*, 2008). Aunque los valores de **CL** para temperaturas distintas de 15 °C deben considerarse con reservas por las razones detalladas en Material y Métodos, es notable el cambio que se observa en el patrón de P<sub>c</sub>. A bajas temperaturas **CH** parece alcanzar compensación a menores PPF<sub>D</sub>, siendo por tanto más eficaz entre 0 y 10 °C; pero a 15 °C es **CL** la que compensa antes, indicando que vive en un ambiente menos iluminado. Esto se ve confirmado también por los valores de P<sub>s</sub>, significativamente distintos entre estas poblaciones a 15 °C. Esta respuesta al ambiente lumínico se ha descrito en otros estudios (Kershaw, 1985; Green & Lange, 1991; Green *et al.*, 1997). El valor de P<sub>s</sub> de **CH** es de hecho significativamente distinto del de las otras seis poblaciones (Tabla 2.5). Aunque hay poblaciones de altitudes similares (**SP** y **SC**) o incluso mayores (**K** y **M**), este resultado no es sorprendente; **SP** y **SC** proceden de lugares donde las altas irradiaciones no coinciden apenas con la disponibilidad de agua, por lo que los líquenes no suelen estar activos a altas PPF<sub>D</sub> (aunque, como se ha dicho más arriba, **SC** parece estar preparada para aprovechar los días fríos, pero soleados, aunque la irradiación no es tan intensa en invierno). **M** y **K** crecen en ambientes donde las nubes y la niebla son frecuentes (Beaman *et al.*, 1962; Duane *et al.*, 2008). **A** y **CL** proceden de localidades a altitud y latitud similares, por lo que no es sorprendente que muestren un comportamiento fotosintético parecido, con valores similares de P<sub>c</sub>, P<sub>s</sub> y rendimiento cuántico aparente (Φ) (Tablas 2.4 y 2.5).



Las dos poblaciones españolas, **SP** y **SC**, tienen un régimen lumínico y fotoperiodo similares, pero el clima es muy distinto, a pesar de su proximidad. La principal diferencia radica en el régimen de lluvias, que para **SP** es mucho más regular a lo largo del año, pues el clima de su zona es realmente eurosiberiano, mientras que para **SC** la lluvia es muy rara, si no completamente ausente en verano, al vivir en una región con un clima típicamente mediterráneo. Ambas poblaciones tienen un contenido de Chl similar por peso seco; pero por unidad de superficie, aunque la diferencia no es significativa, el valor de **SC** es claramente más alto. Esta diferencia se explica por el IPE significativamente mayor de **SC** (450 frente a 311 g m<sup>-2</sup>), que permite un mayor almacenamiento de agua y por tanto, un incremento de la longitud de los periodos de actividad. Lo mismo sucede con la respuesta fotosintética. **SC** siempre muestra valores más altos (Fig. 2.5), pero la mayor diferencia se encuentra cuando las tasas se calculan en función de área. Como se puede ver en la Fig. 2.4, el comportamiento fotosintético frente a la temperatura es similar en ambas poblaciones, pero **SP** siempre tiene valores más bajos de Amáx (Tabla 2.2, Fig. 2.6), así como menor valor de KF (Tabla 2.7) y mayores Pc y Ps a todas las temperaturas (Tablas 2.4 y 2.5), algunos de ellos significativamente distintos. Es por tanto probable que en su ambiente natural los talos de **SC** estén activos bajo menores irradiaciones que los de **SP**. Todos estos datos, junto con la mayor capacidad de retención de agua de **SC**, llevan a pensar que esta última está mejor adaptada a su ambiente, donde una alta capacidad de retención de agua es muy deseable, teniendo en cuenta la irregularidad de los episodios de lluvia. Esto se ve apoyado por el aspecto más blanquecino de los talos de esta población, que no absorben tanta radiación como los talos más oscuros, permitiendo un mayor tiempo de retención de agua (Sancho & Kappen, 1989; Valladares, 1993). Pintado y sus colaboradores describieron un comportamiento diferente entre formas de sol y sombra de *Ramalina capitata* (Pintado, 1996; Pintado *et al.*, 1997) así como de *Diploschistes diacapsis* (2005), que bien podía aplicarse en este caso. Ella observó que las poblaciones de exposición sur de *R. capitata* mostraban una mayor capacidad de almacenamiento de agua y un tiempo de retención más largo, lo que explicó como una consecuencia de la menor duración de los periodos de actividad en la cara sur de las rocas, en comparación con la cara norte, donde las fuerzas evaporativas son menores. En el caso de *D. diacapsis*, los autores midieron una tasa de FN mayor en las poblaciones de sol. Ambas estrategias tienen como objetivo maximizar la fotosíntesis en los periodos de actividad metabólica más breves de los nichos expuestos al sol. También los resultados de fluorescencia indican una menor eficiencia de **SP** (Tabla 2.12, Figs. 2.15 y 2.16). Se encontraron valores de rendimiento cuántico del FS II significativamente mayores en **SC**.

La mayor eficiencia (KF, Tabla 2.7, Fig. 2.8) no coincide para ninguna población ni con la temperatura óptima para la FN ni con la óptima para la FB (temperatura que no se alcanzó en el rango medido en este estudio, siendo superior a 25 °C). Lejos de ello, la mayor eficiencia se alcanza, dependiendo de las poblaciones, a 0 o 5 °C. Esto se debe claramente a la mayor sensibilidad del metabolismo respiratorio a las bajas temperaturas, comparado con la FN, que aunque también se reduce a temperaturas



frías, no se ve tan afectada como la RO (Lange, 1965; Schroeter *et al.*, 1994; Lange & Green, 2005, 2006).

En nuestros datos **M** y **K**, que viven como se ha dicho anteriormente, en un ambiente a menudo neblinoso y nublado (Figs. 2.19 y 2.20), muestran una baja capacidad de almacenamiento de agua y tiempos de retención cortos, relacionados ambos parámetros con su bajo IPE, pues no necesitan retener agua al estar ésta frecuentemente disponible. Puede ser también una estrategia para evitar la irradiación excesiva al secarse rápidamente cuando las nubes y la niebla se despejan. Por otro lado, **SC** muestra el valor más alto de retención de agua por unidad de área, como se muestra en la Fig. 2.9, y también tiene uno de los tiempos de retención más largos (Tabla 2.8). Esto está de acuerdo con su IPE y la anterior discusión acerca de las condiciones ambientales. Podemos inferir que es probable que los eventos de hidratación sean más infrecuentes para **SC** que para **M** y **K**. Esto explicaría las menores tasas de FN que muestra **K** en comparación con **SC** (y casi con cualquier otra población, de hecho). Además, **K** muestra el valor más bajo de cociente  $Chl a/b$ , por lo que puede decirse que se comporta de manera consistente como un líquen adaptado a sombra (ver más abajo). Pero la población **M** es notable por sus extraordinarios valores en todos los parámetros medidos (ver también más abajo). Se puede argüir, de manera similar a la discusión previa sobre **SC**, que **M** tendría estas tasas tan altas de FN como estrategia para maximizar su productividad durante breves periodos de actividad, pero esto no es probable en este caso, debido a la baja capacidad de retención de agua y al IPE de esta población. La lluvia en esta localidad es estacional, extendiéndose el periodo húmedo de Mayo a Octubre. Durante este periodo las tormentas son diarias y se alternan con periodos soleados. Esta población se activaría por tanto todos los días durante seis meses. De esta manera, no sólo su periodo de actividad en el campo sería más largo que el de la mayoría de las poblaciones, sino que también su FN es más alta, debido a su mayor contenido en Chl y a su mayor eficiencia. Esta población parece hallarse por encima de las demás, debido a la combinación de unas condiciones ambientales muy adecuadas, con temperaturas relativamente suaves, poca variación a lo largo del año y un régimen de lluvia muy conveniente. Todas estas circunstancias aseguran un periodo de actividad largo durante todo el año en condiciones más que adecuadas para el crecimiento y desarrollo.

Como se ha dicho antes, un estudio de seguimiento del microclima y la actividad de estas poblaciones en sus condiciones naturales proporcionaría información muy valiosa para interpretar estas situaciones.

### **Componentes subcelulares**

#### **Clorofila**

La  $Chl a$  se ha utilizado a menudo como medida de la cantidad de algas en la simbiosis líquénica (v.gr., Raven, 1992; Tretiach & Carpanelli, 1992; Enríquez *et al.*, 1996; Palmqvist *et al.*, 2002; Dahlman & Palmqvist, 2003; pero véase Strobl & Türk, 1990; Valladares *et al.*, 1996). Los valores aquí obtenidos se encuentran dentro del rango medido en clorolíquenes boreal-templados (Palmqvist *et al.*, 2002), así como en

especies de Umbilicariáceas (Valladares *et al.*, 1996) (Fig. 2.10). Se ha visto que la Chla se correlaciona con FN y con RO entre especies (Tretiach & Carpanelli, 1992; Green *et al.*, 1997; Palmqvist *et al.*, 1998; Palmqvist & Sundberg, 2000; Palmqvist *et al.* 2002). Este hecho llevó a Palmqvist (2000) a sugerir que la demanda de carbono del micobionte es lo que regula realmente la cantidad y/o actividad del fotobionte, para un amplio número de especies. Palmqvist *et al.* (2002) mostraron en un amplio estudio con 75 especies de líquenes, que la capacidad fotosintética parece aumentar más que la respiración con el incremento en Chla, en una respuesta adecuada que implica una mayor ganancia de carbono para sostener el incremento en respiración de mantenimiento de un talo que probablemente tiene mayor contenido en N, teniendo en cuenta la relación positiva entre N y Chla. Hemos podido comprobar por primera vez el mantenimiento de este patrón dentro de una misma especie de líquen. En efecto, el coeficiente de correlación de Pearson entre Chla y RO a 10 °C es  $r = 0.5$  ( $p = 0.01$ ), mientras que es  $r = 0.82$  ( $p = 0$ ) para la regresión entre Chla y Amáx (datos no mostrados). La Chla también se relaciona con KF ( $r = 0.60$ ,  $p = 0.001$ , a 5 °C), como sugirieron Palmqvist & Dahlman (2006) para la especie foliácea de cloroliquen *Platismatia glauca*, pero que no pudieron confirmar, pues carecían de datos de intercambio gaseoso.



Fig. 2.19: Lugar de recolección de las muestras K. Foto: Dr. Lucia Muggia.

Existen diferencias significativas entre las poblaciones respecto al cociente Chla/b, con el mayor valor perteneciente a **CH** (4'3) y el menor a **K** (1'4). Las altas cantidades de Chlb se han relacionado con el daño producido por la contaminación, ya que la Chla es más sensible a los contaminantes del aire, y se degrada a feofitinaa con mayor facilidad que la Chlb a feofitinaab (Garty *et al.*, 1985, 1993; Weissman *et al.*, 2006). Pero en nuestro caso, no es probable que esto esté sucediendo, pues el Monte Kilimanjaro está a 200 km de Nairobi, mientras que el volcán Iztaccihuatl está a sólo 60 km de Ciudad de Méjico, de modo que es más probable que el incremento relativo de Chlb se deba a las condiciones de luz. Esto se ve apoyado por los resultados ya comentados de Pc, Ps y rendimiento cuántico aparente ( $\Phi$ , datos no mostrados). Este

último parámetro es máximo en **K** ( $0'055 \pm 0'002$  a  $15\text{ }^\circ\text{C}$ ), y mínimo en **CH** ( $0'02 \pm 0'002$ ), y se relaciona inversamente con **Pc** y **Ps**, como mostraron Green *et al.* (1997). El alto valor encontrado en **K** está provocado por la combinación de su mayor tasa de **RO** con el hecho de que el **PC** es bastante bajo. Pero, como mostraron Kershaw (1985) y Palmqvist (2000), los valores altos de  $\Phi$  y bajos de **PS** son indicadores de una **Amáx** baja. De esta manera, aunque sus tasas de **FN** son las más bajas, esto se ve compensado por su eficiencia aparentemente mayor, que permite a esta población alcanzar sus tasas máximas a menores intensidades lumínicas. Todos estos hechos indicarían un hábitat más iluminado para las poblaciones con valores más altos de cociente  $\text{Chla}/b$ , **Pc**, **Ps** y valores más bajos de  $\Phi$ . De hecho, el hábitat de **K** tiene un 40% de días nublados a mediodía (Duane *et al.*, 2009), reduciéndose considerablemente de esta manera la irradiación en el momento más luminoso del día. Por tanto, como se ha dicho arriba, podemos considerar a **K** una población aclimatada a sombra. **M** tiene también valores de  $\Phi$  bastante altos ( $0'04 \pm 0'001$  a  $15\text{ }^\circ\text{C}$ ), y un **Pc** menor que el de **K** (Tabla 2.4), lo que, añadido a su menor **RO**, hace de ésta una población más productiva, conduciendo a un incremento de **Ps**, como explican Kershaw (1985) y Palmqvist (2000). Esto significa que, incluso aunque su hábitat se describe como neblinoso, parece estar adaptada para aprovechar los momentos en que la niebla se aclara y hay mayor luz disponible.



Fig. 2.20: Volcán Iztaccihuatl, donde se recogieron las muestras **M**. Foto: Sarah Leen. © 2005 National Geographic Society.

### **Ergosterol y quitina**

Los valores de ergosterol (**Erg**) eran similares en nuestras poblaciones y estaban dentro del rango para líquenes foliáceos boreales–templados (Palmqvist *et al.*, 2002), con la excepción de **M**, que mostraba el valor más alto y significativamente distinto de otras 4 poblaciones. La cantidad de quitina también entraba en los valores normales (Palmqvist *et al.*, 2002), pero en este caso era la población **SC** la que destacaba, mostrando los valores más altos también de cociente  $\text{Quit}/\text{Erg}$ . Esto puede ser un reflejo de la estrategia de la población **SC** para enfrentarse a los fuertes vientos y las nevadas intensas (Kappen, 1988). Su inversión en estructura y tejidos de resistencia es

la mayor. Existe de hecho una correlación positiva y significativa entre IPE y la cantidad de quitina por área ( $r = 0.72$ ,  $p < 0.001$ ).

Se ha visto que el ergosterol está estrechamente relacionado con las tasas de RO (Sundberg *et al.*, 1999). Al juntar los datos de todas las poblaciones y considerando la RO y el contenido de Erg por peso seco, no encontramos ninguna relación entre ellos, pero con los valores calculados en función de superficie sí que existe una tendencia significativa a todas las temperaturas con coeficientes de correlación desde 0.31 (a 0 °C) hasta 0.59 (a 10 °C), mostrando una clara tendencia al aumento de la RO a mayor contenido en Erg. Es probable que los coeficientes hubieran sido mayores, como en el estudio de Sundberg *et al.* (1999) de haber tenido más réplicas. Es interesante ver que el patrón encontrado por esos autores en 8 especies diferentes se mantiene en muchos aspectos dentro de una misma especie. De acuerdo con ese estudio, encontramos en el nuestro que las muestras con altos valores de cociente C/N tenían menores contenidos en Erg y menores tasas de RO ( $r = -0.75$ ,  $p < 0.001$ , para el caso de Erg frente a C/N). A diferencia de otros estudios centrados en una única especie de líquen (Sundberg *et al.*, 2001; Dahlman *et al.*, 2002, Dahlman & Palmqvist, 2003; Gaio-Oliveira *et al.*, 2005; Palmqvist & Dahlman, 2006), hemos encontrado una estrecha relación entre Erg y N total ( $r = 0.82$ ,  $p < 0.001$ ), por lo que al menos *Umbilicaria decussata* no satisface la teoría propuesta acerca de una posible concentración constante de hifas fúngicas activas en relación con la masa del talo e independiente del contenido en N. El contenido en N del talo fue también un buen indicador de RO a todas las temperaturas, especialmente cuando los cálculos se referían a área ( $r$  de 0.36 a 0 °C a 0.76 a 10 °C,  $p$  siempre  $< 0.01$ ). Esto quiere decir que las muestras con respiración baja parecen ser relativamente ricas en compuestos carbonados que contribuyen a la biomasa, pero tienen menor demanda de regeneración metabólica y energía, mientras que un alto contenido en N llevaría a una mayor necesidad de energía relacionada con la regeneración de proteínas (Palmqvist, 2000; Lambers, 1985). De hecho encontramos mayor cantidad de aminoácidos totales (Taa) en las muestras con mayor contenido de N, y, por tanto, Taa se relaciona también con RO a todas las temperaturas entre 5 y 25 °C, con  $r$  entre 0.61 y 0.71, y  $p < 0.01$ , así como con Amáx ( $r = 0.67$ ,  $p < 0.001$ ), apoyando de nuevo la relación entre demanda de energía y Amáx. El contenido de Chl *a* estaba también ligera, pero significativamente relacionado con RO de 5 a 25 °C, de acuerdo con Palmqvist *et al.* (1998), Palmqvist & Sundberg (2000), y Palmqvist *et al.* (2002) ( $r$  de 0.47 a 0.67, y  $p$  siempre  $< 0.02$ ).

### **Nitrógeno y aminoácidos**

SP era la población con el menor valor de N, y lógicamente, con el menor contenido en aa. Sin embargo es la población con la mayor inversión relativa en Arg (Fig. 2.12), un 7% del total de aa (datos no mostrados), mientras que las otras poblaciones tenían entre un 3 y un 4%. El porcentaje de Arg se relaciona de manera inversa con el contenido en  $\text{NH}_4^+$ , tal como se esperaba ( $r = -0.39$ ,  $p = 0.05$ ). De este modo, SP podría ser más sensible al N (Dahlman *et al.*, 2002, Dahlman & Palmqvist, 2003), aunque, de acuerdo a su contenido en N, su hábitat no está en absoluto enriquecido en N. Hovenden (2000) observó un contenido de N máximo en muestras

antárticas de *U. decussata* de 7'72 mg g<sup>-1</sup>, un valor ligeramente más bajo que el de nuestras muestras de **SP**, pero la mitad del contenido de N encontrado en **M**.

### **Poliolos**

Hemos encontrado una cantidad relativamente constante de ribitol. **M** mostraba el valor más alto (2'7 mg g<sup>-1</sup>) y **K** el más bajo (1'12 mg g<sup>-1</sup>). La cantidad de arabitol difería poco entre las poblaciones. Por el contrario, la cantidad de manitol era mínima en **K**, que era también la única población que tenía más arabitol que manitol. Este hecho le hace tener el mayor cociente ribitol/manitol. Si se calcula el cociente ribitol/(manitol+arabitol), es decir, azúcares algales frente a fúngicos, **K** tiene aún el valor más alto, aunque en este caso es más cercano al resto. El arabitol se metaboliza más rápidamente que el manitol bajo condiciones adversas y por tanto funciona como una reserva de hidratos de carbono a corto plazo (Palmqvist *et al.*, 2008). Todas las poblaciones parecían necesitar una cantidad absoluta parecida de hidratos de carbono disponibles para su metabolismo, independientemente de los niveles diferentes del resto de azúcares. Esta demanda parece ser demasiado grande para permitir a la población **K** acumular manitol. El arabitol no muestra relación alguna con Amáx, mientras que el ribitol y el manitol sí la muestran, de manera más marcada para el anterior ( $r = 0'62$ ,  $p = 0'001$  y pendiente = 2 para el ribitol;  $r = 0'46$ ,  $p = 0'02$  y pendiente = 0'3 para el manitol). Palmqvist & Dahlman (2006) mostraron en un estudio con *Platismatia glauca* una cantidad mucho mayor de arabitol, tanto en contenido absoluto como relativo. Sin embargo, a excepción de la población **K**, los valores para el ribitol son muy parecidos y la cantidad de manitol es mayor en nuestros datos. Esto sugiere que podría tratarse de una característica específica, pero no tenemos datos suficientes para asegurarlo. También es cierto que *U. decussata* y *P. glauca* viven en ambientes muy distintos, lo que puede explicar en parte esta diferencia. Al vivir en ambientes tan duros, *U. decussata* podría necesitar más polioles para proteger sus células frente a la desecación, gracias a la función de estas moléculas como reguladoras de la presión osmótica y la turgencia celular (Farrar, 1988; Ahmadjian, 1993; Green *et al.*, 2011a). Al vivir en bosques, *P. glauca* sufre probablemente ciclos de hidratación y desecación menos frecuentes. Además, de acuerdo con Farrar (1976), estos ciclos favorecen el metabolismo de los polioles y la translocación de éstos del fotobionte al micobionte en *Hypogymnia physodes*. Finalmente, también es cierto que nuestras muestras tenían valores ligeramente más altos de N, Chl y Erg que *Platismatia glauca*, lo que les proporcionaría una mayor productividad fotosintética, conduciendo al mayor nivel de carbohidratos encontrado, pero ésta es una hipótesis que no se pudo comprobar, pues ese estudio no incluía datos de intercambio gaseoso (Palmqvist & Dahlman, 2006).

### **Fluorescencia**

Los resultados de las medidas de fluorescencia de la Chl<sub>a</sub> mostraron valores absolutos de ΦFSII más bajos para **K**, **SP** y **CL** (Fig. 2.16, Tabla 2.12). Este hecho respalda las tasas observadas de intercambio gaseoso, especialmente las bajas tasas de **K** y **SP**. La fotoinhibición es probablemente la causa que explica los valores de **SP**, lo que se vería apoyado por su baja capacidad de recuperar el nivel inicial durante la



curva de recuperación (Fig. 2.16) (Barták *et al.*, 2008). Pero en el caso de **K**, la razón puede ser otra, pues, aunque tienen valores más bajos, su recuperación es tan buena como en todas las demás poblaciones. Esto indicaría un eficiente sistema de disipación para protegerse frente a las altas irradiaciones.

### Regresión estadística

La mejor regresión que encontramos (Tablas 2.13 y 2.14) muestra la importancia crítica de la Chl $a$  en la capacidad fotosintética de *Umbilicaria decussata*. Como se ha explicado arriba, este resultado está de acuerdo con muchos estudios, tanto entre distintas especies como dentro de la misma (Tretiach & Carpanelli, 1992; Green *et al.*, 1997; Palmqvist *et al.*, 2002). La Chl $a$  explica el 32% de la variación de FN (Tabla 2.13; 33% para el modelo sin **K**, Tabla 2.14). Como mostraron Palmqvist *et al.* (2002, 2008), esto podría parecer sorprendente, pues sólo un 0'37–0'85% del N se invierte en Chl $a$  (datos no mostrados). Pero este hecho realmente está indicando que la inversión en Chl $a$  covaría con la inversión total en el aparato fotosintético, sugiriendo que la relación entre Chl $a$  y otras proteínas fotosintéticas puede ser constante en los fotobiontes liquénicos (Palmqvist *et al.*, 1998). Así, la Chl $a$  aparece como una molécula fácil de medir y adecuada como marcador de las unidades fotosintéticas, que puede no estar relacionada con el número de células del fotobionte, al menos en las Umbilicariáceas, según Valladares *et al.* (1996).

Cuando la población **K** fue excluida de los datos (Tabla 2.14) la Chl $a$  era aún la variable más explicativa, pero otros parámetros resultaron tener también una influencia significativa. El más interesante de ellos es la latitud, cuya influencia creció desde un 1'22% de varianza explicada hasta un 10'24%.

Todos los factores climáticos incluidos en el modelo explicaban juntos el 16% de la variación de FN, pero sólo T $m$  fue significativa. El coeficiente C/N estuvo en el borde de la significación estadística, con un coeficiente negativo, que indica que cuanto más N hay por C, mayor es la Amáx, lo que se entiende fácilmente teniendo en cuenta que los líquenes obtienen su N por medio de la deposición pasiva húmeda o seca y este elemento es normalmente limitante para ellos (Crittenden *et al.* 1994; Johansson *et al.*, 2010).

Se ha sugerido que las áreas alpinas y polares son especialmente sensibles al cambio climático y al calentamiento global (IPCC, 2007; Beniston, 2003). Las predicciones del informe del IPCC para estos hábitats incluyen aumentos de temperatura y niveles atmosféricos de CO $_2$ , retroceso glaciar y cambios en el régimen de nieves/llovias. Teniendo en cuenta nuestros resultados, por un lado los incrementos en temperatura y en concentración de CO $_2$  pueden ser positivos para *U. decussata*, pues pudimos ver que los valores de Amáx eran más altos a temperaturas superiores a la media que experimentan en sus condiciones naturales. Sin embargo, la temperatura no tiene una influencia tan crítica en las tasas de FN bajo las condiciones lumínicas habituales a las que el líquen está expuesto en condiciones naturales como la que tiene a 1200  $\mu$ moles de fotones m $^{-2}$ s $^{-1}$ , la irradiación experimental más alta, que

ocurre muy raramente en el campo. Además, los hongos son capaces de aclimatar sus tasas de respiración a los cambios en temperatura (Lange & Green, 2005). También se beneficiarían del incremento de la deposición de N previsto, al vivir en hábitats donde este elemento es limitante. Pero por otro lado, a pesar de estos tres argumentos, parece más probable que su distribución se viera negativamente afectada. El análisis de modelado de nicho para las condiciones del futuro (Fig. 2.18) muestra un incremento de la distribución de esta especie en las regiones polares debido al retroceso glacial, pero un descenso e incluso desaparición en regiones templadas y subtropicales. El retroceso que ha experimentado el área potencial de esta especie desde la última glaciación hasta ahora se ve claramente. Un escenario más cálido no sería favorable para ninguna de las poblaciones estudiadas. De hecho, un incremento de 5 °C provocaría un descenso de KF del 8% en **CL** al 34% en **M** (calculado a partir del descenso de KF entre 10 y 15 °C). De esta manera, la población que parecía mejor adaptada a su ambiente por su mayor productividad y su metabolismo más activo es la que muestra menor plasticidad fenotípica, de acuerdo con Valladares *et al.* (2007), y puede ser más vulnerable a los cambios ambientales. Además, está previsto que las precipitaciones en América Central se reduzcan entre el 10 y el 20% en el periodo 2090–2099 respecto al periodo 1980–1999 (IPCC, 2007). Lo mismo ocurriría en los Andes y especialmente en el Mediterráneo, que se encuentra en riesgo severo de desertificación. Por el contrario, se espera que las precipitaciones en el área del Kilimanjaro aumenten un 10% entre Diciembre y Febrero para el mismo periodo, pero es muy probable que la desaparición del bosque tenga en la práctica una influencia mucho mayor, invirtiendo esta predicción. En la parte oriental de Australia se espera un ligero descenso de las precipitaciones. Por tanto, sólo nuestra población **K** se vería teóricamente favorecida por un incremento de precipitación, pero de ocurrir, es probable que al final causara su retroceso, pues, combinado con el aumento de temperatura, permitiría la colonización de especies más competitivas. Según Davis *et al.* (1998), las interacciones bióticas, que no se tienen en cuenta a la hora de elaborar modelos de nicho ecológicos, pueden tener un papel importantísimo en la distribución de las especies bajo condiciones ambientales cambiantes. Generalmente se asume que el calentamiento global lleva a cambios en la distribución de las especies hacia latitudes y altitudes mayores. Algunos estudios recientes, sin embargo, apuntan a una tendencia inversa, que se explica como el resultado de las interacciones competitivas (Lenoir *et al.*, 2010), de la modificación antrópica de los usos del suelo (Archaux, 2004), de las respuestas específicas (Millar *et al.*, 2004) y, curiosamente, de la interacción entre cambios de temperatura y equilibrio hídrico (Crimmins *et al.*, 2010). De cualquier modo, en el caso de los líquenes y específicamente de *Umbilicaria decussata* podría ser que la influencia del cambio de temperatura tuviera un efecto más marcado en su posible cambio de distribución que el equilibrio hídrico, en comparación con otros organismos, gracias a su naturaleza poiquilohidra y su tolerancia a la desecación. Pero las interacciones entre todos los factores citados sería determinante para la respuesta de esta especie. Habíamos planteado la hipótesis de una posible mayor plasticidad fenotípica en las poblaciones templadas, que les proporcionaría más posibilidades de supervivencia bajo los nuevos escenarios forzados por el cambio climático, independientemente de la naturaleza de estos

escenarios. A partir de nuestros resultados no es posible alcanzar una conclusión general. La población **SC** parece estar mejor preparada que **SP** para los cambios esperados en la región mediterránea al mostrar una pérdida de KF ligeramente menor con el incremento de temperatura (del 20 frente al 31%) y, especialmente, debido a su mayor capacidad de retención de agua (Green & Lange, 1991). Pero, independientemente de su plasticidad, pueden no ser capaces de hacer frente a la presión competitiva de otras especies, pues no pueden escapar de ella yendo a altitudes mayores, porque ya se encuentran en las cimas de las montañas de su área de distribución. En esta línea, **A** tendría el mismo problema, pero **CL**, **CH**, **K** y **M** aún podrían encontrar un nicho a mayor altitud. Teniendo esto en cuenta **CL** y **CH** parecen tener más posibilidades de sobrevivir, pues también muestran la menor pérdida de KF con el aumento de temperatura.

Se están realizando análisis genéticos de la estructura de las poblaciones, tanto del micobionte como del fotobionte, que nos ayudarán a comprender las diferencias en la capacidad de adaptación de estas poblaciones.





**2. ASSESSMENT OF THE PHENOTYPIC PLASTICITY OF THE  
POLAR–ALPINE LICHEN SPECIES *UMBILICARIA DECUSSATA* BASED  
ON ECOPHYSIOLOGICAL STUDIES OF SEVEN POPULATIONS  
WORLDWIDE**



## INTRODUCTION

Living beings cope with changing environmental conditions in different ways. In some cases, different ecotypes appear, i.e., there exists a genetic difference between the populations of one species, caused by the adaptation to specific environmental conditions. These genetic differences show themselves as changes in the phenotype. Phenotypes, however, can also change as a result of phenotypic plasticity, where no genotypic difference is present. Phenotypic plasticity in response to distinct environmental conditions is a valuable ability that allows the colonisation of different habitats (Pigliucci, 2001). Species occupying wide ecological and hence probably also geographical ranges are supposed to have greater phenotypic plasticity than species with more restricted distributions (Sultan, 2000; Valladares *et al.*, 2007).

Within a species, differing selective pressures may contribute to the evolution of local adaptation (Nicotra, 2007), so that different populations of the same species of vascular plants growing in habitats with contrasting conditions often have different phenotypes. They usually show morphological, anatomical and/or physiological differences, which are a response to varying abiotic factors such as climatic conditions, nutrient limitation or water availability (e.g., Bradshaw, 1965; Cordell *et al.*, 1998; Mäkinen *et al.*, 2002; Nicotra, 2007), or to interactions with other species (Davis *et al.*, 1998).

Things become more complicated for lichens. Metabolic activity of both partners, the autotrophic photobiont and the heterotrophic mycobiont, must be mutually tuned in a very complicated manner in order to achieve and maintain structure, function and growth of the thallus (Honegger, 1993; Lange & Green, 2006). As dual organisms, both symbionts must acclimate to contrasting conditions, showing matching versatility to adapt to different habitats. However, this is not always necessary. Fernández-Mendoza *et al.* (2011) showed that fungal propagules may lichenise with algal cells from the local pool, which are presumably already well adapted. A shift of the photobiont in cases of joint-dispersal has also been described (Nelsen & Gargas, 2009; Wornik & Grube, 2010).

Phenotypic plasticity within a single lichen species has been usually studied within a very narrow geographical area ((Schipperges *et al.*, 1995; Pintado *et al.*, 1997; Rikkinen, 1997; Sojo *et al.*, 1997; Sancho *et al.*, 2003; Pintado *et al.*, 2005; Green *et al.*, 2011b; but see Sancho *et al.*, 2000), in spite of the fact that most of the lichen species show widespread distributions, usually including several continents. The success in colonising such seemingly different habitats can be explained by their large adaptation potential, and by a relative similarity in microclimatic conditions, although macroclimates can be very different (Sancho *et al.*, 2000). Thus, although living in quite different and remote places, the presence of the same species indicates similarities in at least some parameters, so that the lichen could be a specialist species, and not generalist as first expected. A species requires for its establishment, growth and development precise ecologic characteristics regarding both biotic and

abiotic factors, which form its niche (Larcher, 1995). When these characteristics are found together, the species can establish and thrive. Depending on the width of the range for each factor that it can tolerate, a given species will be more or less widespread, although this can be modified by stochastic factors as well.

Bipolar species present a very interesting distribution, living in polar regions, as well as in high mountains of temperate and tropical regions (Galloway & Aptroot, 1995). The way that they have arrived at such remote and disconnected places is a biogeographical challenge, which can be partially explained by glaciation events that once connected places that are now isolated, as well as long distance propagules dispersal (Kappen & Straka, 1988; Muñoz *et al.*, 2004). Lichens usually dominate these marginal environments, which are predicted to show more rapid climate changes (Nash & Olafssen, 1995; Lange & Green, 2005; IPCC, 2007). Consequently, lichens from these regions might be very sensitive to changing climate conditions, which could make survival difficult for many species, both in a direct and an indirect way, as the arrival and development of more competitive species could be facilitated.

Lichens and lichen-dominated ecosystems would appear to be particularly at risk if global temperature rises do occur (Lange & Green, 2005). Carbon loss rates through dark respiration can almost equal the net photosynthetic rate and, as respiration has a higher temperature response than photosynthesis, net carbon exchange can become negative at moderately elevated temperatures under normal light conditions (Green & Lange, 1994). It has been suggested that the distribution of lichens in lowland tropical areas is limited by exceptionally poor carbon balance due to increased carbon losses whilst hydrated over warm nights (Zotz & Winter, 1994; Zotz, 1999; Lange *et al.*, 2000).

The study and description of the physiological behaviour of one single species from geographically isolated places may be very useful as a means to increase our understanding of the climatic conditions which are more favourable for the success of this species. Schipperges *et al.* (1995) found different ecotypes of the arctic-alpine fruticose terricolous lichen *Cetraria nivalis* across a latitudinal gradient from the temperate to the Arctic climatic zone. They assessed CO<sub>2</sub> exchange, water relations and chlorophyll content, as well as anatomical differences and the ratio photobiont to mycobiont, finding that chlorophyll content and net photosynthetic rates decreased with increase in latitude. However, when temperate populations were transplanted to arctic areas, they had lower NP than arctic populations, showing that the latter are better adapted to climatic conditions of the transplantation area. Sancho *et al.* (2000) compared two populations of *Umbilicaria nylanderiana* from Antarctica and from Spanish high mountains in terms of ecophysiological behaviour, and also found higher NP rates in the temperate population, which also had a higher temperature optima for photosynthesis. In contrast, dark respiration showed no differences between both populations, which led the authors to conclude that the fungal partner was not substantially affected by the environmental conditions and the adaptation to temperature relied more on the algal partner.

*Umbilicaria decussata* is a bipolar arctic–alpine species (Fig. 2.1). This species has been proved to tolerate the cold very well. Lange (1965) studied the photosynthetic performance of antarctic samples of *U. decussata*, and found that NP still takes place at low temperatures when DR value is already 0. He found detectable NP rates at  $-11$  °C, while DR was 0 at  $-5$  to  $-8$  °C. Therefore, a positive NP could be reached at very low temperatures. Another representative of this genus, *U. aprina*, was found able to photosynthesise at low temperatures under snow, thus extending its period of activity (Schroeter *et al.*, 1994). If *U. decussata* could also do this, the amount of carbon fixed would not be very important, as this species lives in wind exposed vertical boulders, where snow does not accumulate for long periods of time. Indeed, this species seems to be very achionophytic and does not tolerate late–lying snow (Creveld, 1981; Reiter *et al.*, 2007). Sancho & Kappen (1989) defined it as an aerohygrophytic species. Thus, it is characterised by rapid water loss and uptake. Under natural conditions, it gains water from the ambient air (rain, fog, dew) and must be able to quickly equilibrate with the air humidity.

We have focused on this species to determine its ecophysiological variability along a latitudinal gradient over most of its distribution range. Taking into account the climatic conditions at each location, we have also tried to explain which variables have most influence on its productivity, to predict in which way productivity would be affected by environmental modifications and in a tentative approach to understand whether climate change could affect its survival in these ecosystems. To achieve this, we assessed the photosynthetic response of the sampled populations to different light and temperature regimes and tried to relate it to other physiological parameters, as well as to abiotic variables. It is very important to characterise the physiological status of an organism to understand or to predict its response. We measured chlorophyll content as an algal marker; chitin and ergosterol as fungal markers; C, N, sugars and amino acids to try to assess possible differences in resource allocation; gyrophoric acid as a possible photoprotective molecule; and finally, Chl $a$  fluorescence was used to test vitality of photosystem II.

Within this single species, we hypothesised that those populations from temperate areas ( $30$ – $45$  ° of latitude) might have greater plasticity, as they have to cope with a more changing environment, due to the differences in photoperiod and temperature throughout the seasons. For this reason, these populations would be more capable to adapt and survive in changing conditions, provided they could withstand competition from other organisms as well.

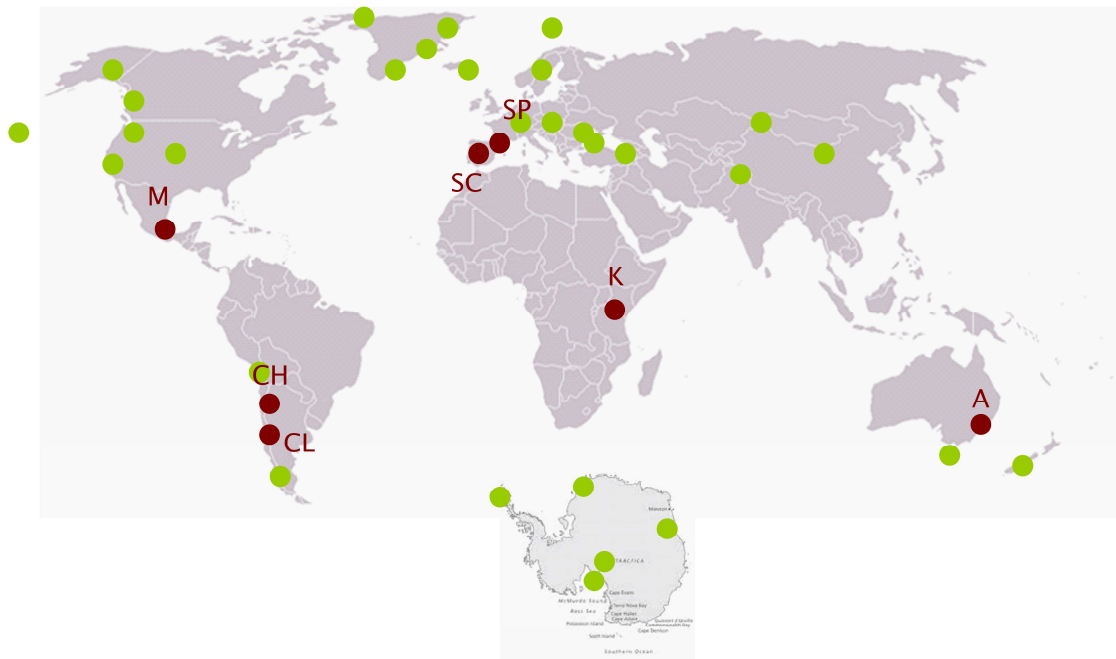


Fig. 2.1: Distribution map of *Umbilicaria decussata*. Green points represent localities cited in the literature or from herbarium collections. Red points depict localities sampled for this study.

## MATERIAL AND METHODS

### Lichen material

*Umbilicaria decussata* (Vill.) Zahlbr. belongs to the family *Umbilicariaceae*, in the order *Umbilicariales*. As for all the species within this family, it is attached to the substrata by a strong central holdfast in the lower side, formed by fungal tissue. It is seldom found with apothecia, relying for dispersal on thalloconidia, asexual propagules that almost completely cover its lower surface, providing it with a characteristic, black carbonaceous appearance. It lives on siliceous rocks, above the treeline, usually exposed to strong winds and is mostly found on very steep slopes to slightly overhanging rock faces. It has a worldwide distribution, as shown in Fig. 2.1, described as a circumboreal–tropical mountains–circumantarctic pattern by Galloway & Aptroot (1995).

### Field sampling

Our studied localities are marked by red dots on Fig. 2.1, further details are given in Table 2.1. All samples were collected in similar seasons in each geographical area: the Australian (A) and the two populations from Chilean Andes (Chile low, CL and Chile high, CH) were taken at the beginning of southern hemisphere autumn (April–May). The same is true for Mexican (M), collected in November, after the rainy period. Kilimanjaro (K), Spanish Sistema Central (SC) and Spanish Pyrenees (SP) samples were collected at the end of spring–beginning of summer, which is for the mediterranean lichens the last period of high activity before summer inactivity due to extreme drought (Joffre *et al.*, 2007). After harvest, the thalli were air dried at *c.* 20 °C and subsequently stored in darkness at –21 °C until further analysis. An attempt was made to try to cover all the variability at each locality by taking thalli from different rocks and

with different sizes. Unless otherwise stated, 4 sets of 2 to 6 thalli were made for each population for gas exchange and subcellular analyses.

Name	Locality	Coordinates	Precipitation (mm)	TM (°C)	Tm (°C)	Collectors and date
K	Mt. Kilimanjaro, Machame Route, from Shira Hut to Barranco Hut. On volcanic rocks. Tanzania	3° 4' 17" S, 37° 18' 58" E; 4400–4500 m.	400	3.7	0.1	L. Muggia. 9–1–2009
M	Iztaccihuatl Volcano. Andesite boulders on <i>Festuca</i> grasslands. Mexico.	19° 2' 36" N, 98° 38' 1" W; 4284 m.	800	6.4*	3.4*	L. G. Sancho & M. Arróniz. 5–11–2009
CH	VII Región del Maule. Paso Vergara. Exposed boulders. Chile (High).	35° 10' 36" S, 70° 30' 38" W; 2736 m.	787	10.4*	-1.8*	S. Pérez–Ortega & F. Fernández–Mendoza. 4–4–2009
A	Thredbo ski resort. On granitic boulders near Mount Kosciuszko walk. Australia	36° 28' 57" S, 148° 16' 48" E; 2047 m.	1682	10.7	-3.2	F. Fernández–Mendoza. 7–5–2009
CL	VII Región del Maule. Paso de Pino Hachado. Exposed boulders. Chile (Low).	38° 39' 27" S, 70° 53' 47" W; 1987 m.	749	11.4	-0.4	S. Pérez–Ortega & F. Fernández–Mendoza. 1–4–2009
SC	Los Claveles, Peñalara, Madrid. Spain (Sistema Central).	40° 51' N, 3° 57' 22" W; 2412 m.	1500	13.1*	-3.5*	M. Vivas, J. Raggio & L. G. Sancho. 26–6–2009
SP	Agulles de Travessany. Aigüestortes. Lérida. Spain (Pyrenees).	42°36' 29" N, 0° 53' 15" E; 2620 m.	1399	10.1	-4.7	M. Vivas, S. Pérez–Ortega & L. G. Sancho. 14–7–2009

Table 2.1: Localities of sample collection, with climatic data (annual rainfall in mm, average temperature of the warmest month (TM, in °C), average temperature of the coldest month (Tm, in °C) and collectors with date of collection. Climatic data were obtained from: **K**, Røhr & Killingtveit (2003), Duane *et al.* (2008), Sarmiento (1986); **CL** & **CH**, Kalin Arroyo *et al.* (1981), Amigo (1998), Lara *et al.* (2001); **A**, <http://www.weatherzone.com.au/climate/station.jsp?lt=site&lc=71032>; **SC**, Comunidad de Madrid (2002); **SP**, Servei Meteorològic de Catalunya (2011); **M**, Sarmiento (1986), Beaman (1962). Values with asterisk are values deduced for our localities from the difference of altitude between the collecting site and the location of the closest meteorological station or the tiles of WorldClim.

### Climatic data

Annual precipitation, mean temperature of the coldest month (Tm) and mean temperature of the warmest month (TM) were obtained from the available literature (see Table 2.1). When the literature was scarce and insufficient, data were obtained as mean values from the period 1950–2000, by interpolation in a geographic grid of 30 seconds (latitude and longitude) resolution from meteorological stations distributed worldwide (dataset from WorldClim, Hijmans *et al.*, 2005) and extracted by means of DIVA–GIS v.7.5 (Table 2.1). This data was obtained thanks to the kind help of Dr. Antonio Torralba (Universidad de Oviedo, Spain). Values with an asterisk are calculated



from the difference in altitude between the collecting site and the location of the meteorological station or the tiles of WorldClim.

### Gas-exchange measurements

Thalli were reactivated for three days in a chamber at 10 °C, and photoperiod of 12h at a photosynthetically active photon flux density (PPFD) of 100  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , followed by 12h in darkness. Samples were sprayed once a day with mineral water. CO<sub>2</sub> exchange measurements were performed using a Compact Minicuvette System (CMS 400, Walz, Effeltrich, Germany) and a differential IRGA (Binos 100, Leybold-Heraeus, Germany) under fully controlled conditions of temperature, humidity and irradiation and at ambient CO<sub>2</sub> (aprox. 350 ppm). A full description of the method is given elsewhere (Schroeter *et al.* 1994). Prior to measurements, lichens were fully hydrated by spraying with mineral water until saturation and then gently blotted with tissue paper to remove excess water. Light response curves were performed at 0, 5, 10, 15, 20 and 25 °C, by first obtaining a dark respiration (DR) value in darkness until steady-state was reached (aprox. 20 min.), and then increasing PPFD stepwise from 25 to 1200  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (25, 50, 100, 200, 400, 800 and 1200). Before and after each series of measurements, thalli were weighed so that thallus water content (as %DW) could be determined. It was necessary in some cases to re-hydrate the thalli during the measurements to retain optimal hydration, which had been determined by means of water content response curves (see below). Gas exchange rates were then calculated on a dry weight, surface area and chlorophyll content basis, according to von Caemmerer and Farquhar (1981). The PPFD response curves were analysed by statistical fit to a Smith function, as detailed in Green *et al.* (1997). This fit provided us with the following parameters: **Pc** (light compensation point, PPFD where net photosynthesis, **NP**, is 0, i.e., gross photosynthesis compensates dark respiration), **Ps** (light saturation point, calculated as PPFD where 90% of maximal measured NP, **Amax**, is reached) and  $\Phi$  (apparent quantum yield for incident light, which is the initial slope of the light response curves). Photosynthetic efficiency quotient was also calculated as **KF**=(**Amax**+**DR**)/**DR** (Larcher, 1995). Temperature optima and temperature upper and lower compensation points (**Tcu** and **Tcl** respectively, i.e. low and high temperature where NP equals 0) were calculated by fitting temperature response curves (2<sup>nd</sup> degree polynomial functions). Response curves of NP to thallus water content were also performed as follows: samples were soaked in mineral water and weighed to obtain the maximum fresh weight (**MFW**), and then placed in the cuvette, and CO<sub>2</sub> exchange monitored continuously as the thallus slowly dried, at 15 °C, 70% RH, 0.6 l min<sup>-1</sup> air flow and 200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  of PPFD, until no photosynthetic signal could be obtained due to complete drying. Samples were weighed every 30 minutes. We calculated maximum water content on a dry weight basis (**MWC** = (MFW-DW)/DW, i.e., g H<sub>2</sub>O g<sup>-1</sup>DW) and on a surface area basis (**MWCA** = (MFW-DW)/area, i.e., g H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup>), and optimum water content (**OWC** and **OWCA** on a dry weight and a surface area basis, respectively). Mean time required to reach 50 and 20% of thallus maximum water content (**T50** and **T20**, respectively) was also calculated, as well as **T50Act** (the % of remaining activity relative to maximal activity when thallus water content was 50% of maximal) was determined.

After the gas-exchange measurements, thalli surface area was measured when the thallus was wet and fully expanded by taking a picture and analysing it with ImageJ 1.42q software (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA). All samples were then dried in Silica Gel and their dry weight determined to the nearest 0.1 mg. Thallus specific weight (**TSW**, in  $\text{g m}^{-2}$ ) was calculated. Samples were then frozen and stored until further subcellular analysis.

### **Subcellular analyses**

Samples were split into two sets, one to quantify chlorophyll *a* and *b* (**Chl*a*** and **Chl*b***) spectrophotometrically according to Barnes *et al.* (1992) (further details can be found in chapter 3); and the other to perform chitin, ergosterol, amino acid, sugars, glyphoric acid and C/N analysis. For all analyses, they were first milled to a homogeneous powder. Chl*a* was used as a proxy for the amount of photobiont cells (Raven, 1992; Enríquez *et al.*, 1996). The fungal cell wall component chitin was measured, together with ergosterol, as proxies for total fungal and fungal living biomass, respectively, the latter is the dominant sterol in fungal plasma membrane (Weete, 1973; Palmqvist *et al.*, 2002) and has been used as a marker for the metabolic activity of fungi in mycorrhizal associations with plants (Ekblad and Näsholm, 1996; Ekblad *et al.*, 1998) as well as in lichens (Palmqvist *et al.*, 1998, 2002; Gaio-Oliveira *et al.*, 2004). Both chitin and ergosterol were quantified by HPLC techniques, according to Dahlman *et al.* (2001). Briefly, 20 mg of lichen powder were mixed with 1 ml ethanol, intensively shaken on a Vortex and incubated on a shaker at 5 °C for 30 min. After centrifugation (14000 rpm, 15 min) ergosterol was determined in the supernatant by HPLC (Waters, Milford, USA), using an ODS-ultra sphere column (250 mm x 4.6 mm; particle size 5 $\mu\text{m}$ ) as separator and isocratic elution with 100% methanol as mobile phase. The entire process took place in darkness to avoid degradation of the compound. Ergosterol absorption at 280 nm was measured with a UV detector. Data was corrected for an extraction yield of 80% (Dahlman *et al.*, 2001). Chitin was measured in the pellet remaining after ergosterol extraction. We checked that there was no loss of chitin during the ergosterol extraction by comparing the content with some samples without previous ergosterol extraction (data not shown). Samples were washed with 0.2 M NaOH to remove amino acids and proteins that could interfere with the results. Acid hydrolysis in 6M HCl was used to release the glucosamine residues, which were converted to fluorescent derivatives by treatment with 9-fluorenylmethylchloroformate (FMOC), and then analysed by RP-HPLC using gradient elution. Data was corrected for an extraction yield of 83% (Ekblad & Näsholm, 1996; Dahlman *et al.*, 2001).

### **Carbon and Nitrogen content**

Between 3 and 4 mg of each sample were analysed with a Flash EA 1112 NC Elemental Analyzer (Thermo Fisher Scientific). The content (%) of C and N in the samples was determined.

### **Amino acid analysis**

30 mg of lichen powder were mixed with 1 ml HCl 10mM, then shaken and finally derivatised with a Waters AccQ–Tag Ultra Derivatization kit following the instructions of manufacturer. Samples were analysed by reversed phase liquid chromatography using a Waters Ultra High Performance (UPLC) system with a Waters Tunable UV detector (Acquity, Waters, Milford, USA). Briefly, 70 µl borate buffer (1 M) and 10 µl of internal standard (norvalin, 100 µM) were added to aliquots (10 µl) of samples or standards. Thereafter 20 µl of AccQ–Tag derivatisation reagent were added and thoroughly mixed immediately and subsequently heated to 55 °C for 10 min. After cooling down to room temperature, an aliquot of the reaction mixture was used for UPLC injection. The individual amino acids and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> were determined after separation on an AccQ–Tag Ultra column by elution with a mixture of 99.9% formic acid and 10% acetonitrile (in MilliQ water) at the following gradient: 0–5.74 min isocratic 99.9% formic acid, declining to 90.9% formic acid from 5.74 to 7.74 min, to 78.8% formic acid at 8.24 min and then to 40.4% formic acid at 8.74 min, before re–equilibration with 99.9% formic acid from 8.74 to 9.54 min. The flow rate was 0.6 ml min<sup>-1</sup> and column temperature was 55 °C. Amino acid and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> standards were prepared fresh daily in the range of 100–0.1 µmol N l<sup>-1</sup> by serial 1:2 dilution in MilliQ water (Inselsbacher *et al.*, 2011).

### **Sugar analysis**

Supernatant of aa analysis was also used for determination of sugars and sugar alcohols in the samples, by means of ion exchange chromatography (Metrohm, Herisau, Switzerland). The soluble carbon compounds were separated on a Metrosep Carb–250 column (250 cm × 4 mm) using 0.1 M NaOH as isocratic eluent and a flow rate of 1 ml min<sup>-1</sup> (20 min per sample), and quantified using D–(+)-arabitol (Fluka, Buchs, SG, Switzerland), D–(+)-glucose (Sigma, Buchs, SG, Switzerland), D–mannitol (Sigma), and adonitol (i.e. ribitol) (Fluka). Quantifications were obtained using standard curves. A mixture of known concentrations of the standards was run every 20th sample to check for accuracy of the assays (Palmqvist & Dahlman, 2006).

### **Gyrophoric acid**

Gyrophoric acid was assessed in order to detect its possible photoprotective role. 10 mg of lichen powder were mixed with 1 ml acetone with the purpose of extracting lichen acids. Gyrophoric acid was assessed by means of the same HPLC equipment, using an ODS–ultra sphere column (250 mm × 4.6 mm; particle size 2.5µm), following Seriñá *et al.* (1991). Mobile phase was methanol:acetone:acetic acid (75:25:1), and detection wavelength was λ=270 nm. Unfortunately, we could not find a control substance to quantify the amount of acid in g per g dry weight, so comparisons between samples are made by area under the curve in the chromatogram on a g dry weight basis.

### ***In vivo* Chla fluorescence measurements**

Chla fluorescence was assessed using a fluorometer MINI–PAM (Walz, Effeltrich, Germany). We recorded the dark/light induction process followed by the light/dark

recovery taking advantage of a function already programmed by the manufacturer (induction curve + recovery). This curve involves 20 consecutive measurements of effective quantum yield of photosystem II ( $\Phi_{PSII}$ ), which is calculated as  $(F_m' - F) / F_m'$  (Genty *et al.*, 1989), where  $F$  is the fluorescence under ambient light and  $F_m'$  is maximal fluorescence following a saturation light pulse. Samples were fully hydrated by spraying with mineral water and dark adapted for 20 min. Before recording the induction curve, a single saturation pulse, of 0.8 s and 8000  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  is applied on the samples for assessment of  $F_0$  (basal fluorescence in a dark adapted sample),  $F_m$  (maximal fluorescence in a dark adapted sample) and  $F_v/F_m$  ( $(F_m - F_0) / F_m$ ), i.e., the maximal photochemical quantum yield. Then, after 40 seconds in darkness, an actinic light (approximately, 55  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) is applied to initiate photochemical and non-photochemical quenching processes, and yield is assessed at fixed intervals of 20 seconds by 13 additional saturation pulses. In the second part of the curve, the recovery part, the actinic light is turned off and 6 saturation pulses are applied, after 10 s, 30 s, 60 s, 2 min, 5 min and 10 min, as dark recovery of fluorescence parameters occurs. Yield recovery, due to inactivation of quenchings, is then assessed. The parameters compared among samples (Fig. 2.16a) are the following: **Y1** (yield when the second saturation pulse is applied), **Yi** (yield at the last point of the induction curve), **Yr** (yield at the first point of the recovery curve) and **Yf** (yield at the last point of the recovery curve). And we calculated also these values relative to  $F_v/F_m$ : **PY1** (percentage of initial yield decay, when the first saturation pulse was applied), **PYi** (percentage of decay at the last point of the induction curve), **PYr** (percentage of recovery at the first point of recovery curve) and **PYf** (percentage of recovery at the end of the curve).

### Niche modeling

The maximum entropy model implemented in the program MaxEnt v.3.3.3 (Phillips *et al.*, 2004, 2006) was used to recover the environmental niche of *Umbilicaria decussata* estimated from presence-only data. The niche of the species was modeled using its known distribution and environmental variables. Elith *et al.* (2006) showed that MaxEnt performs better than other programs based in presence-only data. Presence data was retrieved from GBIF (<http://www.data.gbif.org>) from which 984 georeferenced records were obtained. The seven localities studied in this chapter were also added. Occurrences from Antarctica were removed from the dataset as no information is available in WorldClim for this area. In total, 433 records were used. For the estimation of the current niche, 19 bioclimatic variables were obtained from the WorldClim data set with a resolution of 2.5 min (Hijmans *et al.*, 2005). These bioclimatic variables are derived from monthly temperature and precipitation layer and represent biologically meaningful information of climate variation (Hijmans *et al.*, 2005). The 19 bioclimatic variables were reduced by means of principal component analysis and correlation analysis carried out in PAST v. 2.16 (Hammer *et al.*, 2001). The reduced dataset comprised the following variables: annual mean temperature, temperature seasonality (standard deviation\*100), mean temperature of the wettest quarter, precipitation seasonality (coefficient of variation) and precipitation of the warmest quarter. Further, niche models for the last glacial maximum (LGM, 21,500

years before present) and for the predictions of future climate according to the IPCC for 2050 were estimated (IPCC, 2007). For the LGM the data from the Paleoclimate Modelling Intercomparison Project Phase II (PMIP<sub>2</sub>, <http://pmip2.lsce.ipsl.fr/>) were used. For the future conditions, bioclimatic variables were obtained from the <http://www.ccafs-climate.org/data/> website using the Delta method, the SRES A2A scenario and the CGCM3 model. All layers are available at WorldClim (<http://www.worldclim.org>). The models were run with the default convergence threshold, maximum number of iterations, using 20% of points for testing the model. We used 10 replicates of the model in order to avoid the effects of removing 20% of samples before model training, and averaged the results using the cross-validation option. Data layers (ascii's) produced by MaxEnt were visualised in Diva-Gis 7.5 (<http://www.diva-gis.org>). These analyses were made with the kind help of Dr. Borja Jiménez-Alfaro.

### Statistical analysis

Statistical analyses were conducted in R 2.10.0 (R Development Core Team, 2009). ANOVA tests were performed to assess differences among populations, followed by Tukey HSD post-hoc tests, and indicating significant differences for  $p < 0.05$ . Multiple linear regression was used to find the relationship between Amax and a set of explanatory variables. Homocedasticity and normality of residuals of statistical models were checked. All variables were normal or quasi-normal, and subsequent plotting of residuals showed no patterns. Results regarding temperatures should be taken carefully, as we estimated temperature values from available data of climatic stations situated at less altitude than the place of collection for these localities: **SP**, **CL**, **CH**, **SC** and **M**. The effect of latitude was analysed by partial correlations. Graphs were made using SigmaPlot 10.0 (Chicago, Illinois, USA).

## RESULTS

*Umbilicaria decussata* is a widely distributed species, present in every alpine zone, showing a high adaptability. Differences in macroclimatic conditions are remarkable in its distribution area. In Mediterranean area, the source of two of our populations (**SP** and **SC**), seasonal climatic differences are enhanced by the altitude, with very cold and snowy winters and extremely dry and hot summers, when, moreover, daily temperature range can be large. In contrast, at low latitudes photoperiod is constant over the year, and temperature ranges, even in high mountains, are much smaller along the year as well (a difference between mean temperature of warmest and coldest month of 3 °C in **M** and **K** vs. 16.6 °C in **SC**), although the daily range is very large. Rainfall regime showed large differences across our localities, being highest in **SC** and **A** (1500 and 1682 mm per year respectively), and decreasing in general towards the Equator, more or less related with increasing altitude. For **K**, although there has been in recent years an increase of the interest and studies of the climatology of this area, good climatic records are still lacking, and data from the literature are, in general, based on short term measurements. Sarmiento (1986) states that there is a large interannual variability in precipitation in this area.

Salt (1954) and Duane *et al.* (2008) report that rainfall decreases rapidly with altitude in Kilimanjaro, resulting in such a barren landscape that its uppermost belt has been considered an alpine desert. It is also established that this decrease is more pronounced on the west slope of this mountain (Beaman, 1976; Sarmiento, 1986). Both **K** and **M** habitats are described as very foggy and cloudy (Beaman, 1962; Sarmiento, 1986; also see Figs. 2.19 and 2.20), a situation that likely provides lichens with an important hydration source.

### CO<sub>2</sub> exchange

As detailed in Material and Methods, photosynthetic activity was measured on all the populations at different temperatures and light regimes. Results of these measurements are shown in Figs. 2.2 to 2.6 and Tables 2.2 to 2.5.

In Fig. 2.2 we can see the response of these populations to increase in temperature. All of them show similar patterns, with NP (net photosynthesis) optima between 10 and 15 °C. Although values are quite similar, **SP** and **CH** have the lowest optima and the lowest T<sub>cl</sub> as well (with **SC**), while **SC** and **M** have the highest optima, and also the highest T<sub>cu</sub>, remarkably higher than the other populations (extrapolated values). The narrowest range is found in **K** samples, with the highest T<sub>cl</sub> and the lowest T<sub>cu</sub>. A<sub>max</sub> (maximal assimilation rate, i.e., maximal net photosynthesis reached) is always highest for **M** samples at every measured temperature (Figs. 2.2 and 2.6), but, according to the fitted curves (Fig. 2.2), NP would be higher for **SP**, **CH** and **SC** populations at lower temperatures than measured, and for the latter, also at higher temperatures than measured. All populations reach similar DR at low temperatures (Fig. 2.2), differences begin to be seen from 15 °C, as DR increased in an exponential pattern. At 25 °C **A** has the highest respiration rate, and **SC** the lowest.

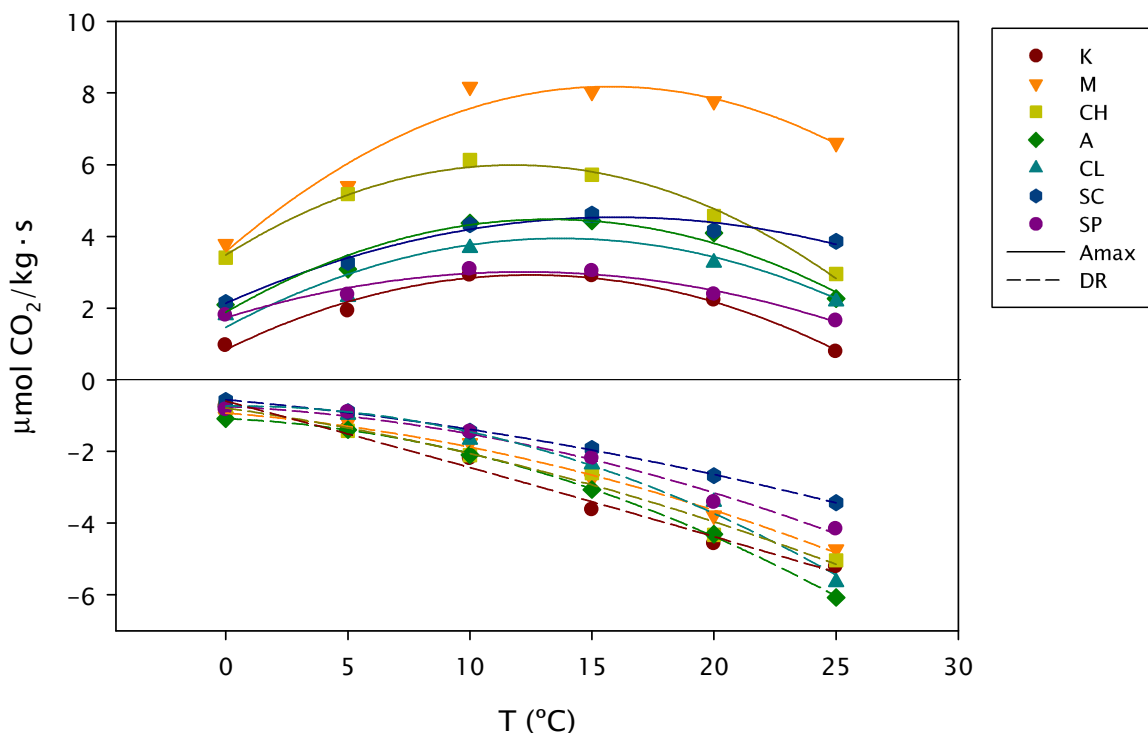


Fig. 2.2: Amax (solid line, net photosynthesis at 1200  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) and DR (dashed line, dark respiration, at 0  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) at every measuring temperature. Data are fitted using polynomial regressions (2<sup>nd</sup> degree,  $R^2$  always >0.95).

Locality	Amax 0°C	Amax 5°C	Amax 10°C	Amax 15°C	Amax 20°C	Amax 25°C
K	0.96±0.06 <sup>a</sup>	1.92±0.04 <sup>a</sup>	2.92±0.1 <sup>a</sup>	2.9±0.14 <sup>cd</sup>	2.22±0.24 <sup>a</sup>	0.78±0.15 <sup>a</sup>
M	3.78±0.17 <sup>c</sup>	5.4±0.07 <sup>bc</sup>	8.17±0.43 <sup>b</sup>	6.49±0.1 <sup>b</sup>	7.77±0.3 <sup>b</sup>	6.61±0.27 <sup>c</sup>
CH	3.41±0.17 <sup>bc</sup>	5.18±0.31 <sup>b</sup>	6.13±0.72 <sup>ab</sup>	5.16±0.26 <sup>bc</sup>	4.57±0.43 <sup>ab</sup>	2.95±0.21 <sup>ab</sup>
A	2.1±0.1 <sup>a</sup>	3.09±0.14 <sup>a</sup>	4.38±0.17 <sup>ab</sup>	4.44±0.13 <sup>bc</sup>	4.09±0.14 <sup>a</sup>	2.26±0.18 <sup>ab</sup>
CL	1.81±0.12 <sup>a</sup>	2.31±0.22 <sup>a</sup>	3.68±0.3 <sup>ab</sup>	4.53±0.2 <sup>bc</sup>	3.27±0.28 <sup>a</sup>	2.18±0.28 <sup>ab</sup>
SC	2.16±0.05 <sup>ab</sup>	3.28±0.09 <sup>ac</sup>	4.33±0.19 <sup>ab</sup>	3.73±0.3 <sup>cd</sup>	4.17±0.17 <sup>a</sup>	3.87±0.23 <sup>b</sup>
SP	1.8±0.11 <sup>a</sup>	2.37±0.15 <sup>a</sup>	3.08±0.12 <sup>a</sup>	2.13±0.07 <sup>ad</sup>	2.38±0.24 <sup>a</sup>	1.64±0.2 <sup>ab</sup>

Table 2.2: Amax (maximal assimilation rate), in  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ kg dw}^{-1} \text{ s}^{-1}$  at every measured temperature. From now on, and unless otherwise stated, values are the mean  $\pm$  SE for  $n=4$  in each locality, different letters indicate significant differences among populations for  $p<0.05$  by ANOVA followed by Tukey's HSD post-hoc test.

When plotting the whole light curve at empirical optimum temperature for each population (10 °C for **SP**, **CH**, **SC** and **M**, and 15 °C for **A**, **CL** and **K**) (Fig. 2.3a) it is possible to observe that, **M** population shows again the highest performance, when data is given on a dry weight basis, at every irradiance from 100  $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . No population, except **K**, shows light saturation at 1200  $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , the highest experimental PPF used. This behaviour can be considered characteristic of alpine and polar lichens (Green *et al.*, 2008). Light curves with values calculated on a surface area, as well as on a Chl content bases, are also given and show different patterns (Fig. 2.3 b and c). **K** continues to show the lowest performance, but **M** is no longer the one with the highest values, especially on a Chl content basis. Every population shows an increase in  $P_c$  as temperature increases, a change driven by the high temperature response of respiration (Tables 2.4, 2.5). **K** tends to have higher values and **SC** lower. PPF to produce saturation ( $P_s$ ) shows a strong tendency to be lower at low temperatures and actually shows a maximum in **A** (at 20 °C) and **CH** (at 15 °C) populations. Some differences between the populations are significant, namely, **SC** has a significantly lower  $P_c$  and  $P_s$  than **CH** at 10 and 15 °C, and than **SP** at 10 °C, and also a  $P_c$  lower than **CH** at 20 °C and than **SP** at 25 °C as well, while **CH** at 15 °C is significantly higher than **K** and **M** for  $P_c$ , and than any other population for  $P_s$  at 15 °C.

Locality	Topt (°C)	Tcl (°C)	Tcu (°C)	Area
K	12.47	-2.29	27.23	55.57
M	15.74	-5.23	36.71	175.42
CH	11.79	-6.41	29.98	126
A	13.3	-4.17	30.76	92.73
CL	13.7	-3.58	30.97	80.84
SC	16.29	-6.54	39.12	96.63
SP	12.15	-6.53	30.83	63.81

Table 2.3: The temperature optimum of photosynthesis (Topt) has been calculated as the point at which the derivate of the function becomes zero. Lower and upper temperature compensation points (Tcl and Tcu respectively) are the points where  $y$  equals 0 in the quadratic equation. Area is calculated by integration of the function between 0 and 25°C.



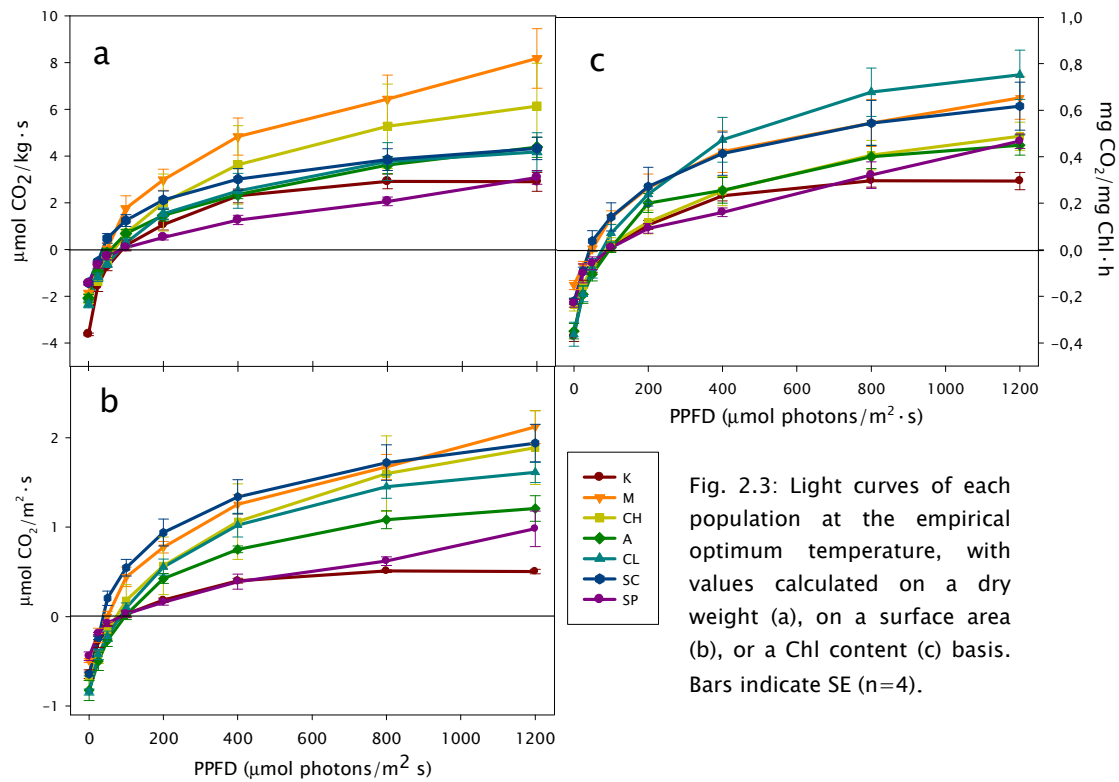


Fig. 2.4 shows all the light curves for each population at the measuring temperatures: 0, 5, 10, 15, 20 and 25 °C. The increase of light compensation point as temperature increases is clear. The lack of light saturation is also obvious in most of the curves for temperatures over 5 °C except for K population.

Loc.	Pc 0°C	Pc 5°C	Pc 10°C	Pc 15°C	Pc 20°C	Pc 25°C
K	60±3*	86±0.4*	105±2*	83±3 <sup>a</sup>	180±3*	584±54*
M	29±2	44±1	64±2	77±2 <sup>a</sup>	144±11	188±6
CH	39±3	60±3	121±11 <sup>a</sup>	178±16 <sup>b</sup>	187±8 <sup>a</sup>	196±16
A	44±2	60±2	84±5	101±4	161±9	183±5
CL	64±6*	84±5*	114±8*	97±5	186±9*	297±21*
SC	25±1	39±4	54±3 <sup>b</sup>	62±5 <sup>a</sup>	90±6 <sup>b</sup>	132±9 <sup>a</sup>
SP	39±3	67±5	130±4 <sup>a</sup>	97±3	180±5	261±10 <sup>b</sup>

Table 2.4: PPFD compensation points (Pc, in  $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) at every temperature measured. Letters indicate statistical significance between localities at each temperature. \* indicates values excluded from statistical analysis for the reasons detailed in Material and Methods section.



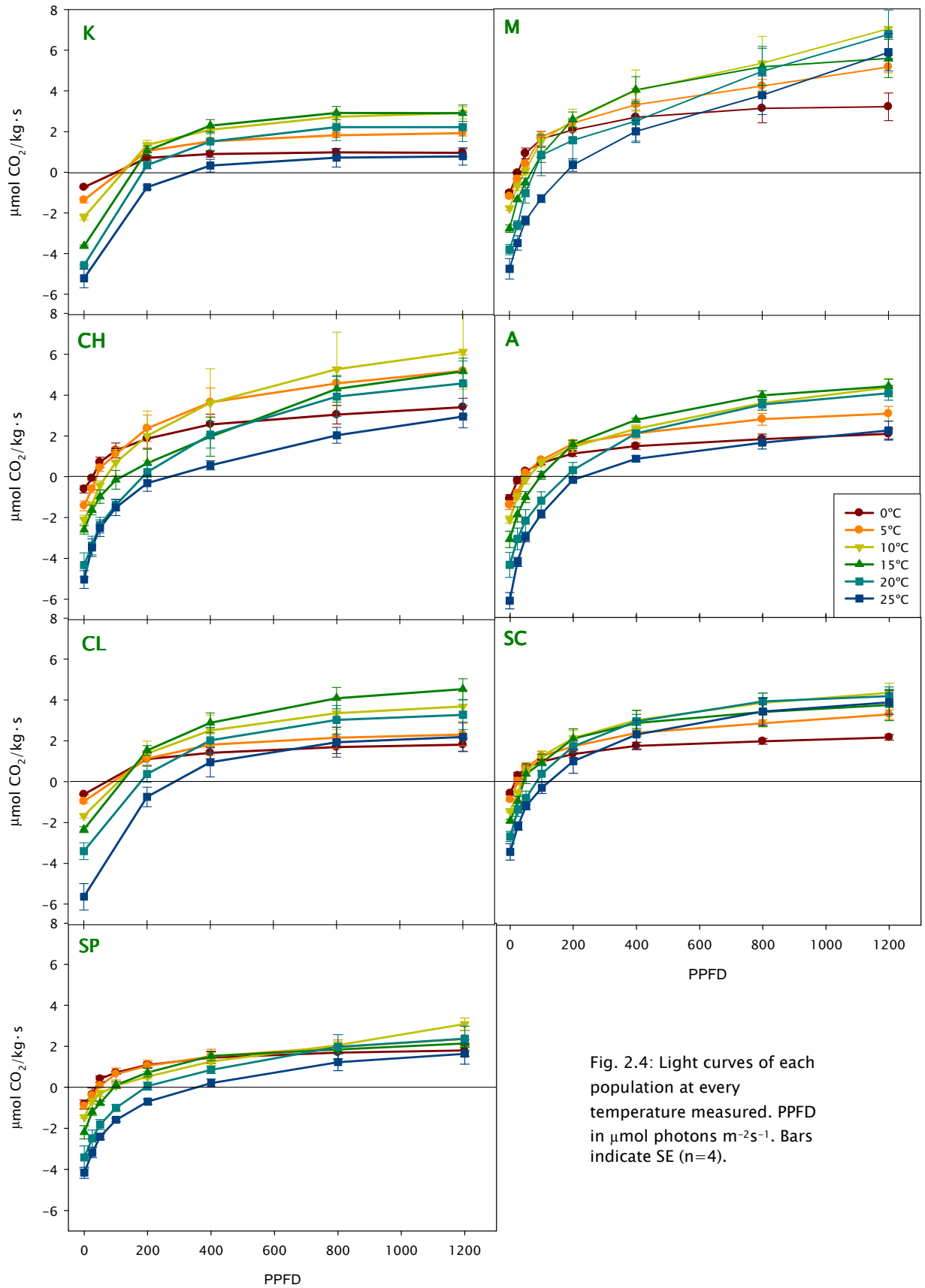


Fig. 2.4: Light curves of each population at every temperature measured. PPFD in  $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Bars indicate SE (n=4).

Because TSW (thallus specific weight, in g dry weight per m<sup>2</sup> surface area) differs significantly among populations (Table 2.6), this affects the Amax values calculated on a dry weight or on a surface area basis (Fig. 2.5). The same is true for Chl content (Fig. 2.10). It is remarkable that **K** population always has the lowest photosynthetic activity, independent of the basis on which Amax is calculated. There are, however, interesting differences in other populations. The most striking is the shift that takes place between **M** and **CL** population: when Amax is calculated on a dry weight basis, **M** has the highest productivity, being significantly higher than **SP** and **K**, and clearly (although not statistically significant) higher than **CL**. Rates are quite similar between **CL** and **M** on a surface area basis, but when calculated by Chl content, **CL** has a non-significant higher rate than **M**, while the others keep similar values. TSW is significantly higher in **SC** compared to all populations except **CL** and **CH**, while **K** value is lower than **CL**, **CH** and **SC**. When all values of dry weight and surface area were used, we see a non-significant relationship ( $p=0.44$ ) that becomes significant ( $p=0.04$ ,  $R^2= 0.42$ ) when **SC** values are removed from linear regression (Fig. 2.7).

Loc.	Ps 0°C	Ps 5°C	Ps 10°C	Ps 15°C	Ps 20°C	Ps 25°C
K	340±19	481±6	549±7	367±9 <sup>a</sup>	641±4	756±50
M	260±10	450±11	561±24	489±11 <sup>a</sup>	687±41	765±15
CH	407±19	537±20	725±28 <sup>a</sup>	820±40 <sup>b</sup>	752±9	647±32
A	307±24	423±14	518±24	541±15 <sup>a</sup>	663±24	604±21
CL	477±29	565±17	673±20	578±19 <sup>a</sup>	741±15	827±24
SC	259±17	364±31	436±17 <sup>b</sup>	378±9 <sup>a</sup>	503±21	593±147
SP	283±17	473±23	715±11 <sup>a</sup>	454±11 <sup>a</sup>	661±17	766±28

Table 2.5: PPFD saturation points (Ps, in  $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) at every temperature measured.

Populations retain their relative values at every temperature, (only Amax per dry weight is represented, Fig. 2.6), and independent of the basis used for the calculation of Amax.

Loc.	TSW (g/m <sup>2</sup> )
K	177.8±5.34 <sup>a</sup>
M	265.03±7.76 <sup>ac</sup>
CH	336.94±19.86 <sup>bc</sup>
A	270.68±6.3 <sup>ac</sup>
CL	361.92±5.57 <sup>bc</sup>
SC	450.06±6.71 <sup>b</sup>
SP	311.74±18.28 <sup>ac</sup>

Table 2.6: Thallus specific weight (TSW, in g m<sup>-2</sup>) of all the populations.

DR and GP calculated on DW, area and Chl are given in Fig. 2.5. The highest DR was for **K** on DW and Chl bases, while values tended to be more similar on an area basis. Bar plots are arranged in order of increasing latitude (ignoring the hemisphere) and it is interesting to see the apparent trend for lower Amax values (DW basis) at higher latitudes. This trend is even more obvious for GP.

The photosynthetic efficiency quotient (KF) is shown on Fig. 2.8 and Table 2.7. None of the populations have their highest KF at their optimal temperature. In contrast, **CL**, **CH**, **SC** and **M** samples had maximal KF at 0 °C and **K**, **A** and **SP** at 5 °C. However, all have their lowest KF value at 25 °C, as expected, due to the high

respiration rate at this temperature. **K** had the lowest KF at every temperature and **M** usually the highest value.

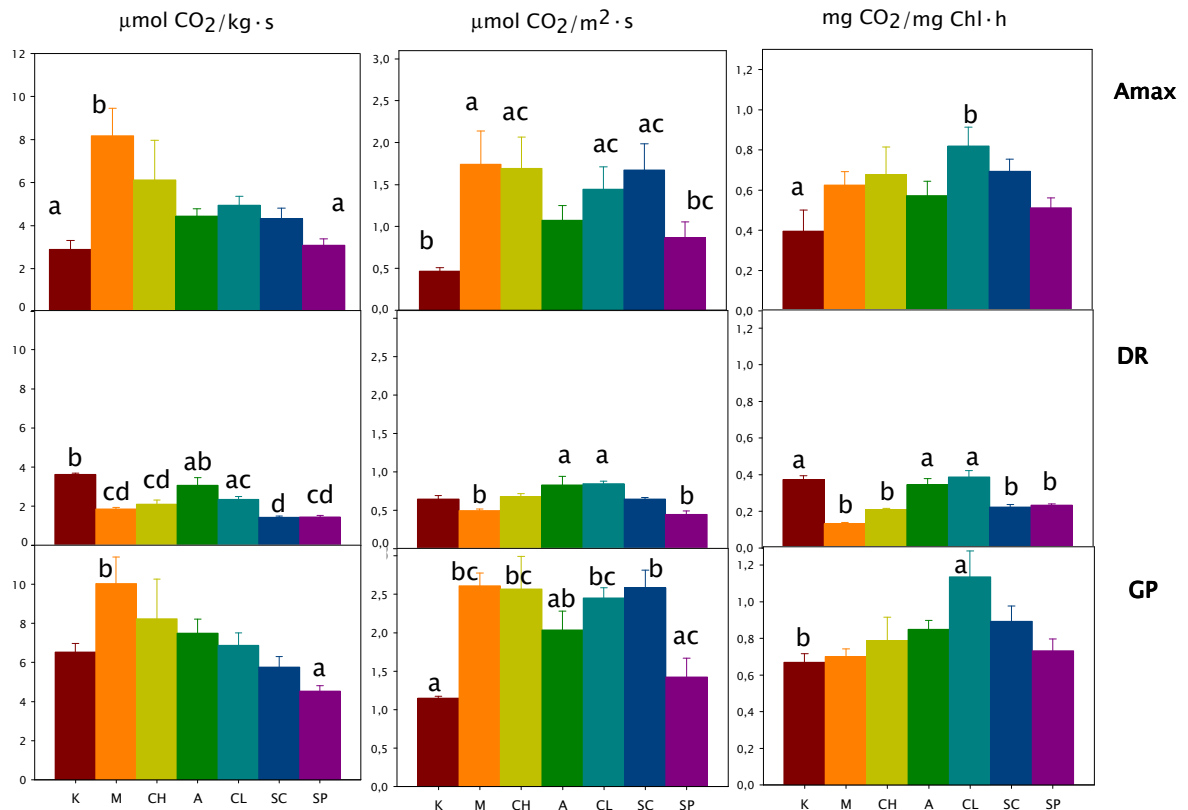


Fig. 2.5: Amax, DR and GP calculated on a dry weight basis (left), surface area basis (middle) and Chl content basis (right). From now on and unless otherwise stated, bars mark SE (n=4), different letters indicate significant differences for  $p < 0.05$  by ANOVA followed by Tukey's HSD post-hoc test.

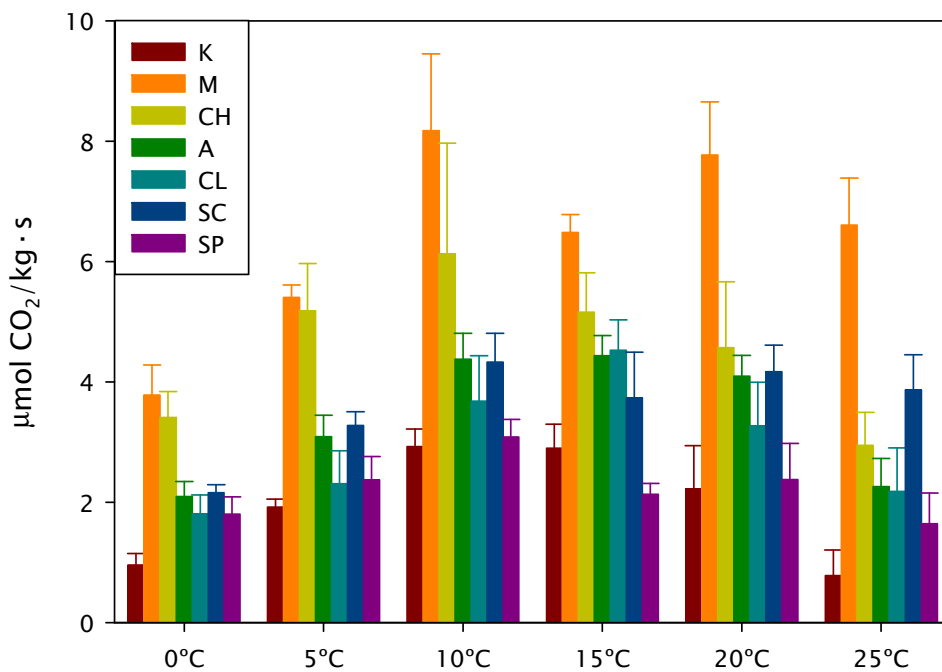


Fig. 2.6: Amax on a dry weight basis at every measuring temperature (statistically significant differences not shown).

Loc.	KF0	KF5	KF10	KF15	KF20	KF25	KFmax
K	2.3±0.1 <sup>bb</sup>	2.4±0.1 <sup>bb</sup>	2.3±0.03 <sup>bb</sup>	1.8±0.03 <sup>b</sup>	1.5±0.1 <sup>ba</sup>	1.1±0.03 <sup>ba</sup>	1.8±0.03 <sup>b</sup>
M	5.1±0.1 <sup>acB</sup>	5.9±0.2 <sup>aB</sup>	5.3±0.2 <sup>aB</sup>	3.3±0.1 <sup>aA</sup>	3±0.1 <sup>aA</sup>	2.3±0.1 <sup>aA</sup>	5.3±0.2 <sup>a</sup>
CH	5.5±0.2 <sup>aB</sup>	4.7±0.2 <sup>acBD</sup>	3.8±0.2 <sup>CD</sup>	3±0.1 <sup>acAC</sup>	2.1±0.1 <sup>bcA</sup>	1.6±0.04 <sup>A</sup>	3.8±0.2 <sup>cd</sup>
A	3.2±0.2 <sup>bcB</sup>	3.3±0.1 <sup>bcB</sup>	3.1±0.1 <sup>bbC</sup>	2.5±0.2	2±0.02 <sup>bcAC</sup>	1.4±0.04 <sup>ba</sup>	2.5±0.04 <sup>bd</sup>
CL	3.9±0.2 <sup>B</sup>	3.4±0.2 <sup>bcB</sup>	3.2±0.1 <sup>bbC</sup>	2.9±0.1 <sup>BC</sup>	2±0.1 <sup>bcAC</sup>	1.4±0.1 <sup>ba</sup>	2.9±0.1 <sup>bc</sup>
SC	4.9±0.1 <sup>acB</sup>	4.7±0.2 <sup>acB</sup>	4±0.1 <sup>BC</sup>	3±0.2 <sup>acAC</sup>	2.6±0.1 <sup>acAC</sup>	2.2±0.1 <sup>aA</sup>	4±0.1 <sup>ac</sup>
SP	3.3±0.1 <sup>bcB</sup>	3.6±0.1 <sup>bcB</sup>	3.1±0.1 <sup>bb</sup>	2±0.1 <sup>bcA</sup>	1.7±0.04 <sup>ba</sup>	1.4±0.04 <sup>ba</sup>	3.1±0.1 <sup>bc</sup>

Table 2.7: Photosynthetic efficiency quotient (KF=(NP+DR)/DR) at every temperature measured. KFmax indicates KF at the temperature where empirically Amax was reached for each population. Little letters indicate differences among populations and capital letters indicate differences within each population.

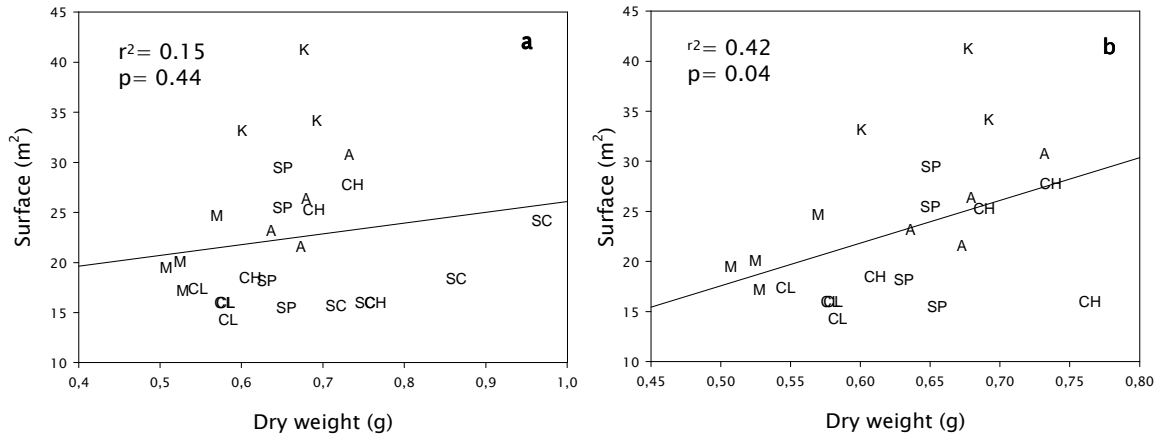


Fig. 2.7: Simple linear regression between surface and dry weight, pooling all values (a), and excluding SC population (b).

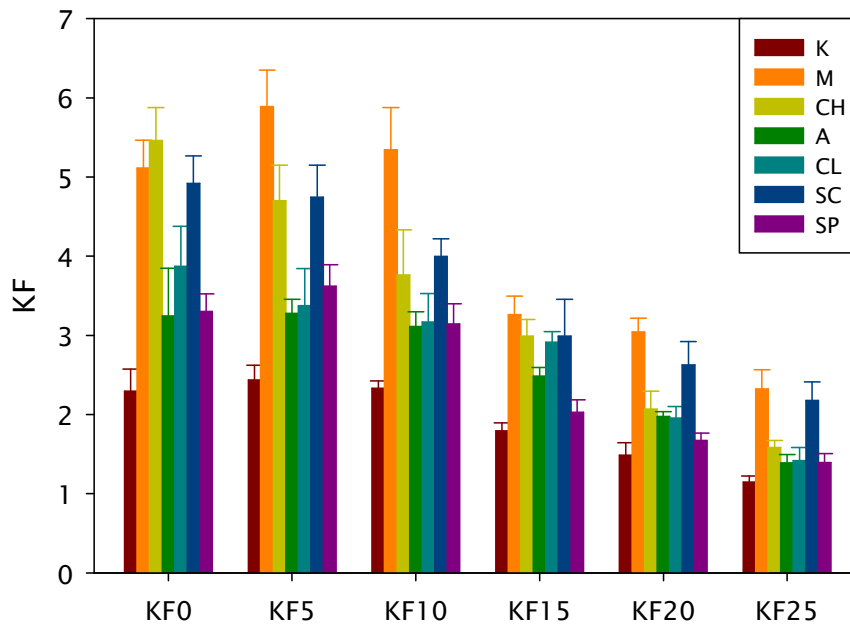


Fig. 2.8: Graphical interpretation of data on Table 2.7. Statistically significant differences are shown there.

### Water relations

Data for T50 and T20 as well as maximum water content on a dry weight (MWC) and a surface area basis (MWCA) are given in table 2.8. K population has a significantly lower T20 value compared to CL and SC. The SC population has a significantly higher MWCA value than SP, A and K. A similar pattern is found for optimum water content

(OWC). **M** has higher values than **SP** and **A** and, again, when calculated on a surface area basis (OWCA) **SC** value is highest and significantly greater than **K** and **A**.

Loc.	T50	T20	MWC	MWCA	OWC	OWCA
K	38±1	85±3 <sup>b</sup>	256±5	456±18 <sup>a</sup>	81±4	146±12 <sup>a</sup>
M	52±1	139±3	254±5	678±23	114±4 <sup>b</sup>	306±16
CH	68±2	180±7	207±3	627±26	75±1	227±10
A	50±2	143±7	185±7	500±18 <sup>a</sup>	58±3 <sup>a</sup>	155±5 <sup>a</sup>
CL	79±4	205±10 <sup>a</sup>	177±4	644±24	76±3	276±12
SC	73±5	203±9 <sup>a</sup>	181±4	816±21 <sup>b</sup>	83±3	377±17 <sup>b</sup>
SP	60±5	152±9	164±3	502±23 <sup>a</sup>	73±3 <sup>a</sup>	231±19

Table 2.8: Mean time in minutes required to reach 50 (T50) and 20% (T20) of thallus maximum water content (MWC, in % relative to dry weight), thallus maximum water content in a surface area basis, in g H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> (MWCA), thallus optimal water content in a dry weight basis (OWC) or in a surface area basis (OWCA).

When all data were plotted as MWCA vs. TSW, a positive correlation ( $R^2=0.62$ ,  $p<0.0001$ , Fig. 2.9) was found indicating that the higher the dry weight per surface area, the higher the water holding capacity. The same is true when OWCA is plotted against TSW, with an equally significant positive correlation ( $R^2=0.63$ ,  $p<0.0001$ ).

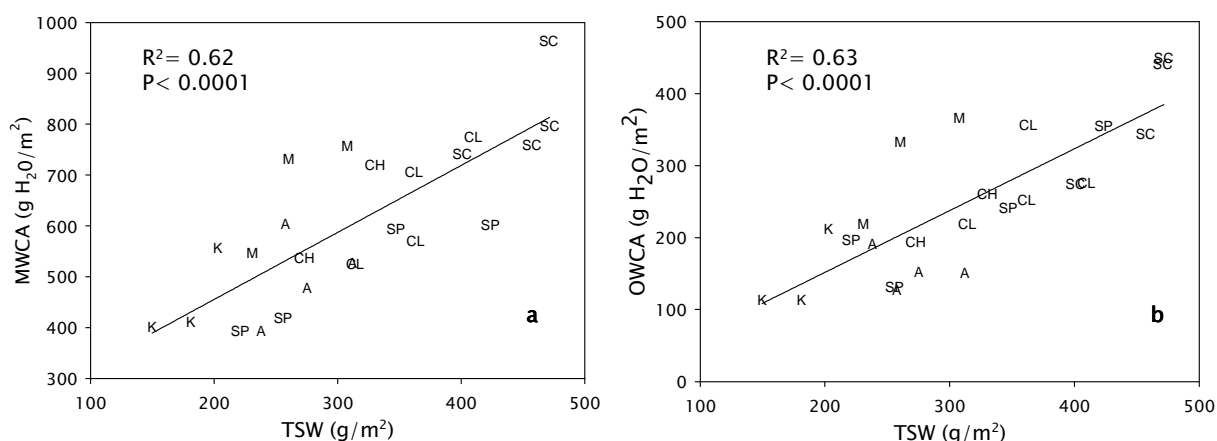


Fig. 2.9: Thallus specific weight (TSW, in g m<sup>-2</sup>) vs. maximum water content (MWCA, in g H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup>, a) and vs. optimum water content (OWCA, in g H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup>, b) in an area basis of all data pooled.

### Subcellular components

Chlorophyll content differs among localities (Fig. 2.10) but, in general, there are not remarkable differences when calculated on a dry weight or surface area basis. Nevertheless, it is worth noting the surprisingly high Chl $b$  content of the **K** population, which has the lowest Chl $a$  to  $b$  ratio (Table 2.9), while **CH** has the highest. The high Chl $b$  content of **K** samples gives them one of the highest total Chl contents on a dry weight basis, although it was the lowest when calculated per surface area. **M** population has the highest total Chl, mainly due to its high Chl $a$  content, although its Chl $b$  content is also higher than several other populations.

For fungal markers, Erg shows little variability among populations (Fig. 2.11), with the exception of **M**, whose Erg content per g dry weight is the highest. The same is true for chitin, where **SC** has the highest value on both dry weight and surface area bases and gives this population the highest Chit to Erg ratio, significantly higher than **K**, **CL**, **A** and **M** samples.

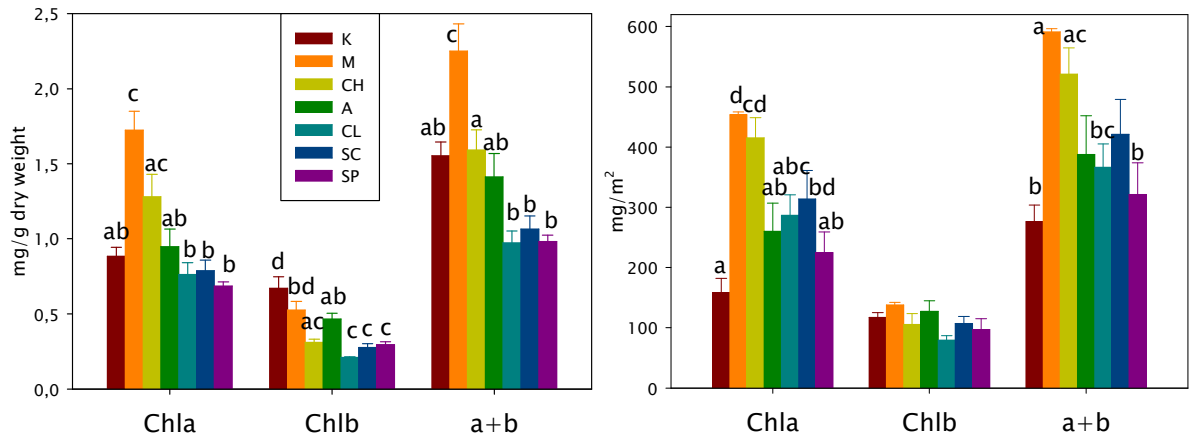


Fig. 2.10: Chl *a*, *b*, and total Chl content calculated on a dry weight basis (left) and on a surface area basis (right).

Loc.	Chl <i>a</i> /b
K	1.35±0.06 <sup>a</sup>
M	3.3±0.04 <sup>bd</sup>
CH	4.25±0.27 <sup>d</sup>
A	2.01±0.04 <sup>ab</sup>
CL	3.77±0.15 <sup>cd</sup>
SC	3.12±0.07 <sup>bd</sup>
SP	2.32±0.03 <sup>abc</sup>

Table 2.9: Ratio Chl*a*:Chl*b*

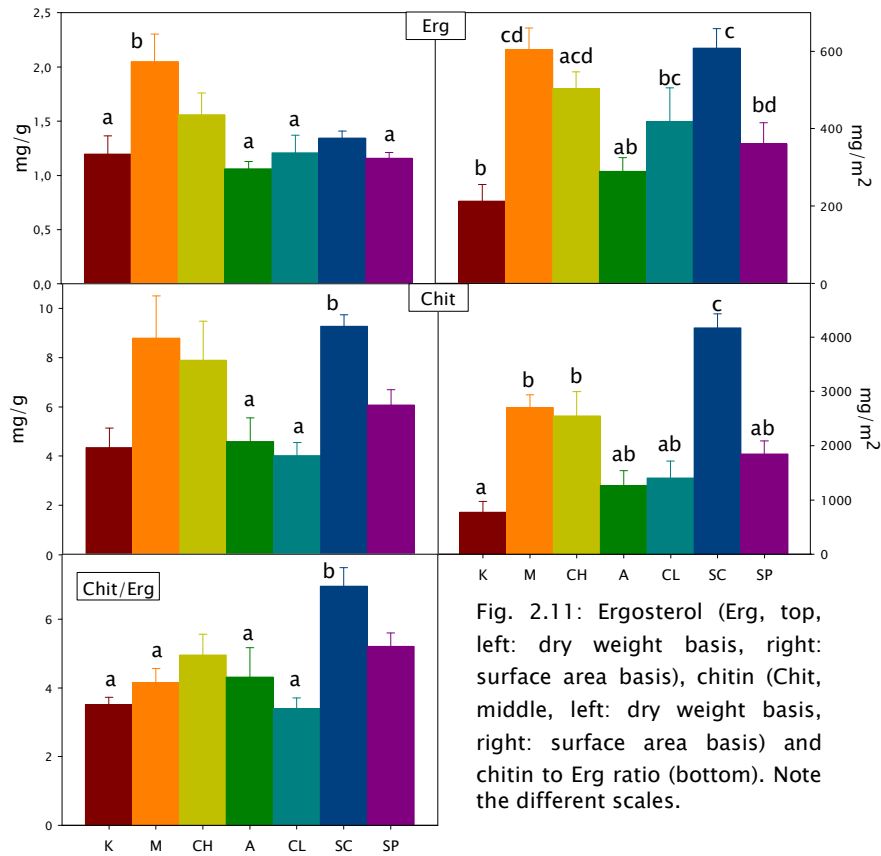


Fig. 2.11: Ergosterol (Erg, top, left: dry weight basis, right: surface area basis), chitin (Chit, middle, left: dry weight basis, right: surface area basis) and chitin to Erg ratio (bottom). Note the different scales.

The analysis of amino acid content is shown in Fig. 2.12, where we can see a fairly constant total amino acid content across all the localities. However, the

composition is not that constant as arginine proportion is significantly higher in **SP** population than in all others except **CL**.

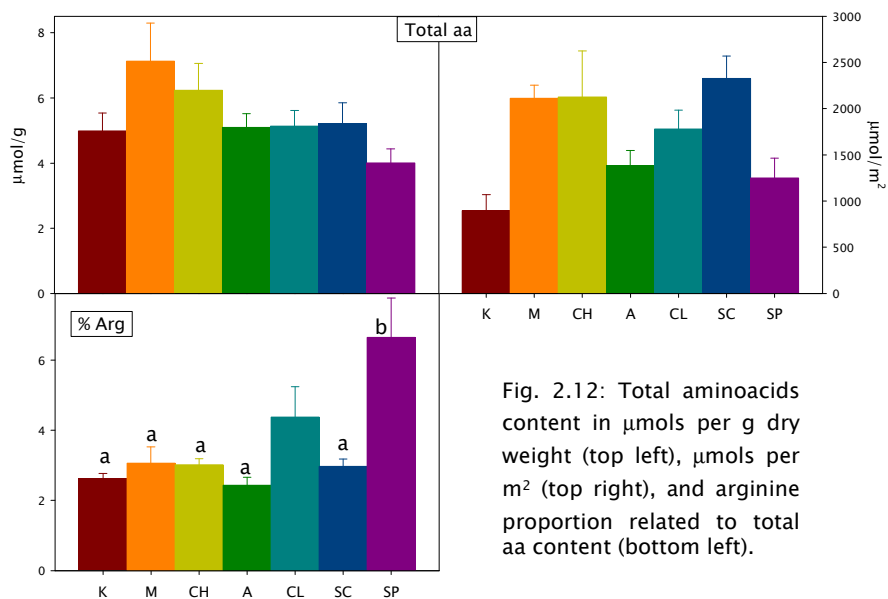


Fig. 2.12: Total aminoacids content in  $\mu\text{mol}$  per g dry weight (top left),  $\mu\text{mol}$  per  $\text{m}^2$  (top right), and arginine proportion related to total aa content (bottom left).

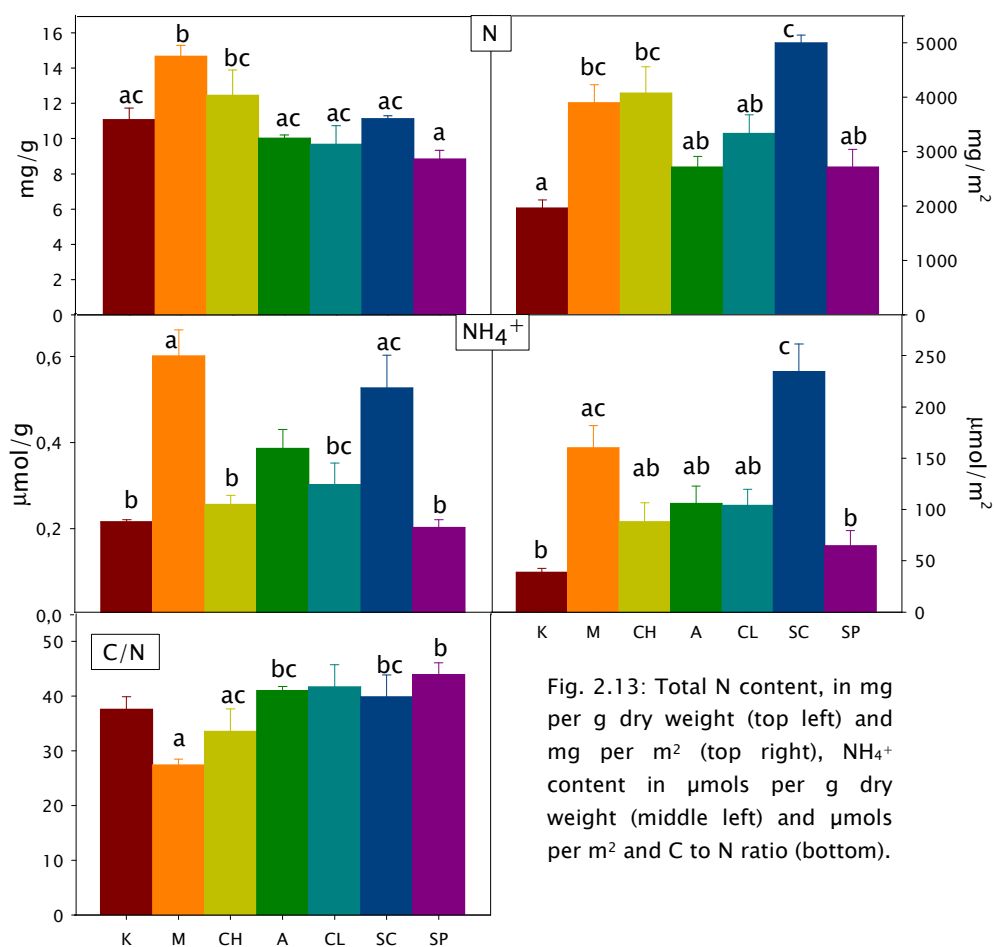


Fig. 2.13: Total N content, in  $\text{mg}$  per g dry weight (top left) and  $\text{mg}$  per  $\text{m}^2$  (top right),  $\text{NH}_4^+$  content in  $\mu\text{mol}$  per g dry weight (middle left) and  $\mu\text{mol}$  per  $\text{m}^2$  and C to N ratio (bottom).

Results of elemental analysis and  $\text{NH}_4^+$  are given in Fig. 2.13. Total nitrogen on a dry weight basis is highest in **M** and lowest in **SP**. The pattern is similar for  $\text{NH}_4^+$ , although differences are more marked. C to N ratio is, however, maximal in **SP** and

minimal in **M**, because C values are similar between populations (Table 2.10). When calculated on a surface area basis, **SC** population has the highest values.

Table 2.11 and figure 2.14 show the results of the analysis of sugars. Total sugar content (on a dry weight basis) was maximal in **M** samples, and minimal in **K**. Interestingly, this pattern reverses when ribitol to mannitol ratio is considered, indicating that in **M** population this fungal sugar is higher in its proportion to the algal ribitol than in **K** samples. However, this is not observed when we look at ribitol to mannitol+arabitol ratio, even when arabitol shows no significant differences among populations (Table 2.11). When calculated on an area basis **SC** had the highest value.

Loc.	C	N	C/N	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>
K	413±0.6 <sup>a</sup>	11.07±0.23 <sup>ac</sup>	37.58±0.79	0.22±0.001 <sup>b</sup>
M	401±0.5 <sup>bc</sup>	14.67±0.21 <sup>b</sup>	27.43±0.35 <sup>a</sup>	0.6±0.02 <sup>a</sup>
CH	401±1.3 <sup>b</sup>	12.46±0.57 <sup>bc</sup>	33.54±1.63 <sup>ac</sup>	0.26±0.01 <sup>b</sup>
A	410±0.2 <sup>ac</sup>	10±0.07 <sup>ac</sup>	40.96±0.31 <sup>bc</sup>	0.39±0.02
CL	411±0.7 <sup>ad</sup>	9.68±0.67 <sup>ac</sup>	43.55±1.75 <sup>bc</sup>	0.3±0.02 <sup>bc</sup>
SC	400±0.5 <sup>b</sup>	11.13±0.06 <sup>ac</sup>	35.9±0.19	0.53±0.03 <sup>ac</sup>
SP	403±0.6 <sup>bcd</sup>	8.85±0.19 <sup>a</sup>	45.88±0.99 <sup>b</sup>	0.2±0.01 <sup>b</sup>

Table 2.10: C and N content, in mg/g, C to N ratio, and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> content, in μmols per g dry weight.

Loc.	Tot. sugars	Ribitol	Mannitol	Arabitol	rib/man	rib/man+arab
K	7.88±0.59 <sup>a</sup>	1.12±0.07	1.73±0.12 <sup>b</sup>	2.98±0.26	0.65±0.002 <sup>d</sup>	0.24±0.004 <sup>a</sup>
M	28.48±0.42 <sup>b</sup>	2.7±0.05	10.42±0.28 <sup>a</sup>	3.34±0.08	0.26±0.01 <sup>ac</sup>	0.19±0.004
CH	21.44±0.58	1.77±0.15	10.04±0.28 <sup>z</sup>	1.33±0.08	0.17±0.01 <sup>bc</sup>	0.15±0.009
A	15.62±0.16	1.93±0.02	6.01±0.16	2.84±0.13	0.33±0.01 <sup>a</sup>	0.22±0.003 <sup>a</sup>
CL	23.11±1.65	2.22±0.08	8.36±0.53	4.4±0.31	0.28±0.01 <sup>ab</sup>	0.18±0.01
SC	22.39±0.33	1.46±0.09	9.13±0.09 <sup>a</sup>	1.58±0.06	0.16±0.01 <sup>c</sup>	0.14±0.008 <sup>b</sup>
SP	22.8±2.22	1.94±0.23	9.37±0.98 <sup>a</sup>	5.64±0.89	0.2±0.01 <sup>bc</sup>	0.13±0.001 <sup>b</sup>

Table 2.11: Total sugars content, ribitol, mannitol and arabitol, in mg/g. Ribitol to mannitol ratio, and ribitol to mannitol plus arabitol ratio.

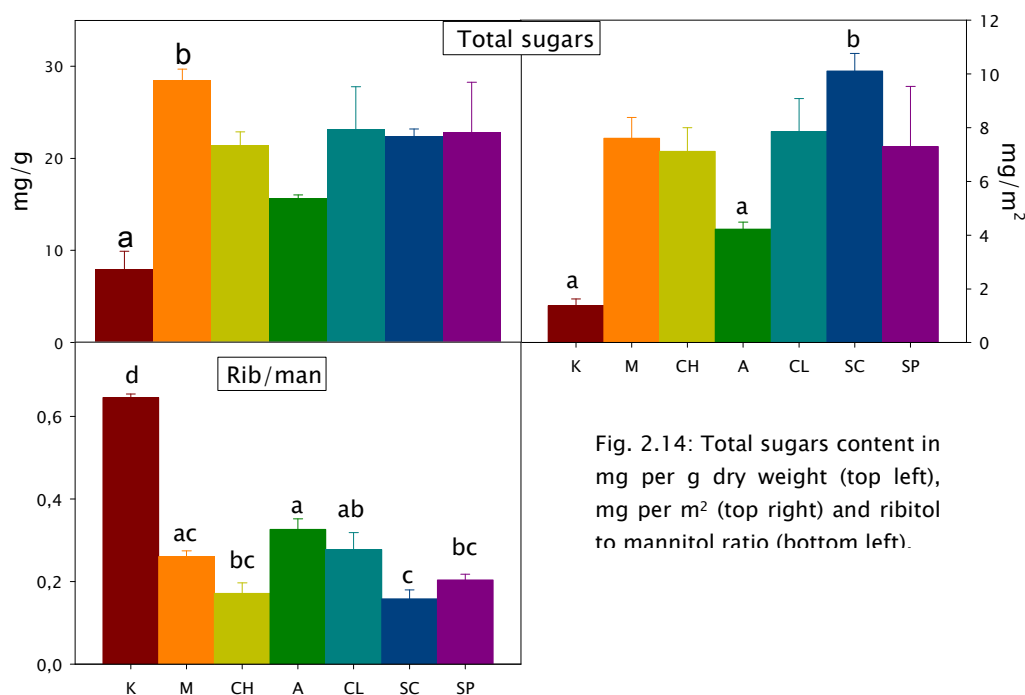


Fig. 2.14: Total sugars content in mg per g dry weight (top left), mg per m<sup>2</sup> (top right) and ribitol to mannitol ratio (bottom left).



Gyrophoric acid is the major secondary compound synthesised by this species, but according to the literature, it is not always present (Løfall & Timdall, 2005). No gyrophoric acid was found in any sample from **K**, **SC** and **M**, and it was present only in half of the specimens from **CL** and **SP**. In contrast, all the samples from **CH** and **A** showed high amounts of this acid (Fig. 2.15).

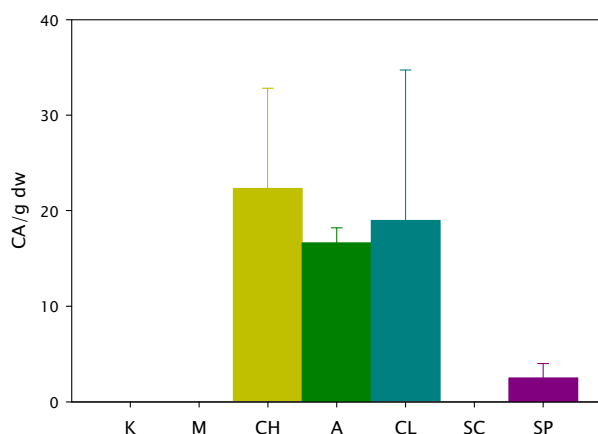


Fig. 2.15: Gyrophoric acid in arbitrary units of area respective to dry weight. No statistical test was applied, as there were not enough replicates.

### Fluorescence measurements

Results of the induction and recovery curves are given in Figs. 2.16 and 2.17 and Table 2.12. The populations fall into two groups: the first containing **K**, **CL** and **SP**, had lower yields whilst the populations of the second group, **CH**, **A**, **SC** and **M**, were almost identical and showed excellent recovery (Fig.2.16). The induction section yields more differences among them, as it can be seen on Table 2.12, although in general, significant differences are found among groups and not within them. However, this pattern is fairly different if we look at the relative values of these parameters (Fig. 2.17). The two groups are no longer distinguishable, because the main difference came from the initial Fv/Fm value, but the recovery is excellent in almost all of them. When values are related to that first Fv/Fm value, the differences disappear. We can just differentiate **SP** population from the rest due to its lowest values. **SC** and **CL** populations also show significant differences with **M** for the minimal yield value, just before recovery (PYi) and the first point after the beginning of the recovery section (PYr). The minimal yield for **K** is significantly lower than **M** as well, but then, it shows no difference at PYr, nor at its final value relative to initial maximal yield (PYf), as it happens with PYf of **SC** and **CL**.

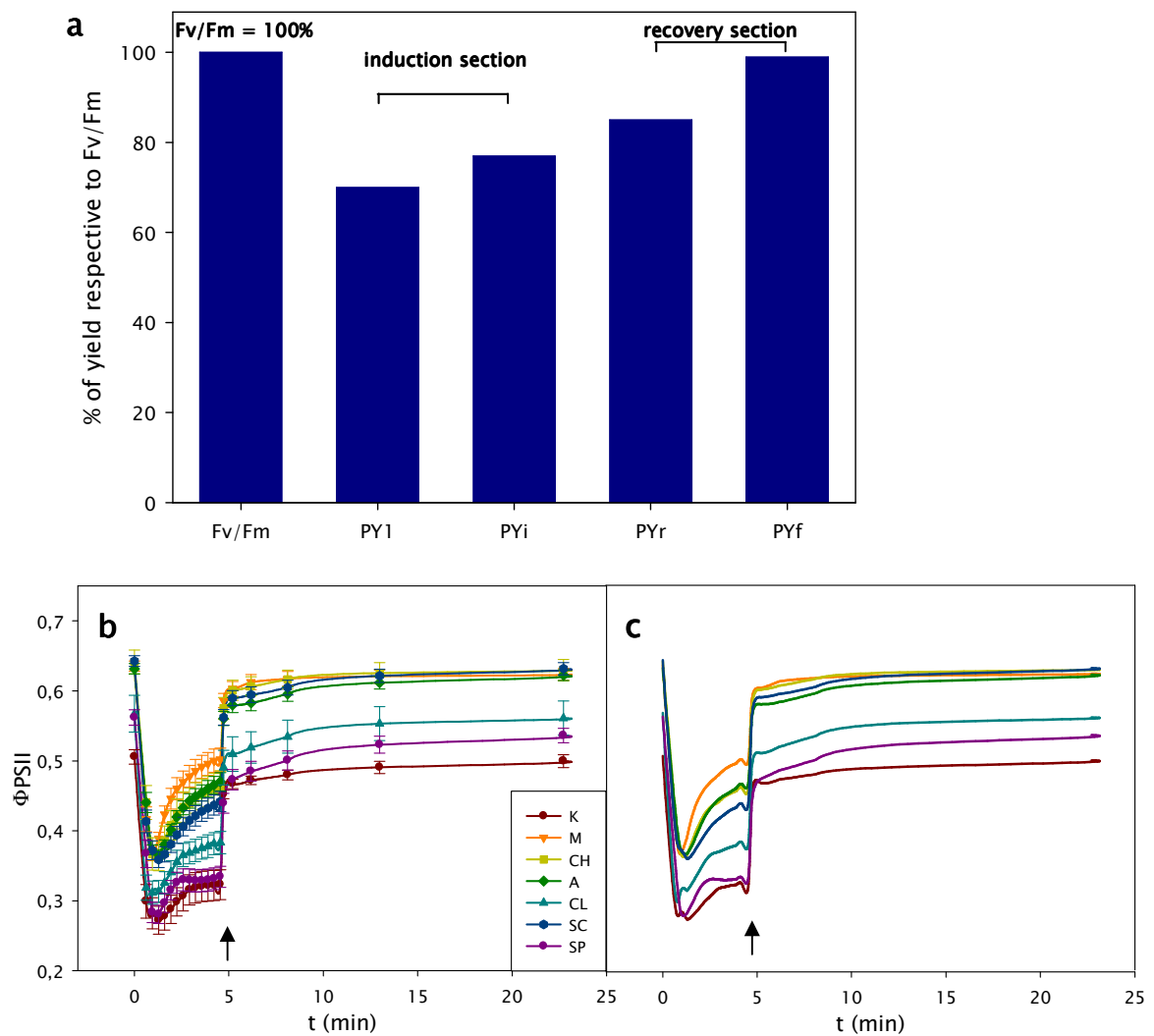


Fig. 2.16: (a) Diagram explaining the parameters calculated from the induction and recovery curves. Induction and recovery curves plotting PSII quantum yield ( $\Phi_{PSII}$ ) vs. time in minutes: (b) with SE bars (n= 8 to 12), (c) only the lines to ease comparisons. Arrows indicate the beginning of the recovery curve. For details, see Material and Methods section.

Loc.	Fv/Fm	Y1	Yi	Yr	Yf
K	$0.51 \pm 0.03^b$	$0.3 \pm 0.06^b$	$0.32 \pm 0.06^b$	$0.45 \pm 0.02^b$	$0.5 \pm 0.02^b$
M	$0.64 \pm 0.03^a$	$0.42 \pm 0.06^a$	$0.5 \pm 0.06^a$	$0.59 \pm 0.03^a$	$0.62 \pm 0.03^a$
CH	$0.64 \pm 0.06^a$	$0.44 \pm 0.08^a$	$0.46 \pm 0.07^a$	$0.58 \pm 0.05^a$	$0.63 \pm 0.05^a$
A	$0.63 \pm 0.03^a$	$0.44 \pm 0.05^a$	$0.47 \pm 0.04^a$	$0.56 \pm 0.04^a$	$0.62 \pm 0.03^a$
CL	$0.57 \pm 0.08^b$	$0.32 \pm 0.06^b$	$0.38 \pm 0.05^{bc}$	$0.49 \pm 0.08^b$	$0.56 \pm 0.08^b$
SC	$0.64 \pm 0.03^a$	$0.41 \pm 0.06^a$	$0.44 \pm 0.05^{ac}$	$0.56 \pm 0.04^a$	$0.63 \pm 0.03^a$
SP	$0.56 \pm 0.04^b$	$0.37 \pm 0.07$	$0.33 \pm 0.05^b$	$0.44 \pm 0.05^b$	$0.54 \pm 0.03^b$

Table 2.12: PSII quantum yield initial value (Fv/Fm). Y1 stands for PSII quantum yield when first saturation pulse is applied, Yi is the yield at the last point of the induction curve (pulse 14, see Material and Methods), Yr the yield at the first point of the recovery curve (pulse 15) and Yf the yield at the last point of the recovery curve (pulse 20) (n=12).

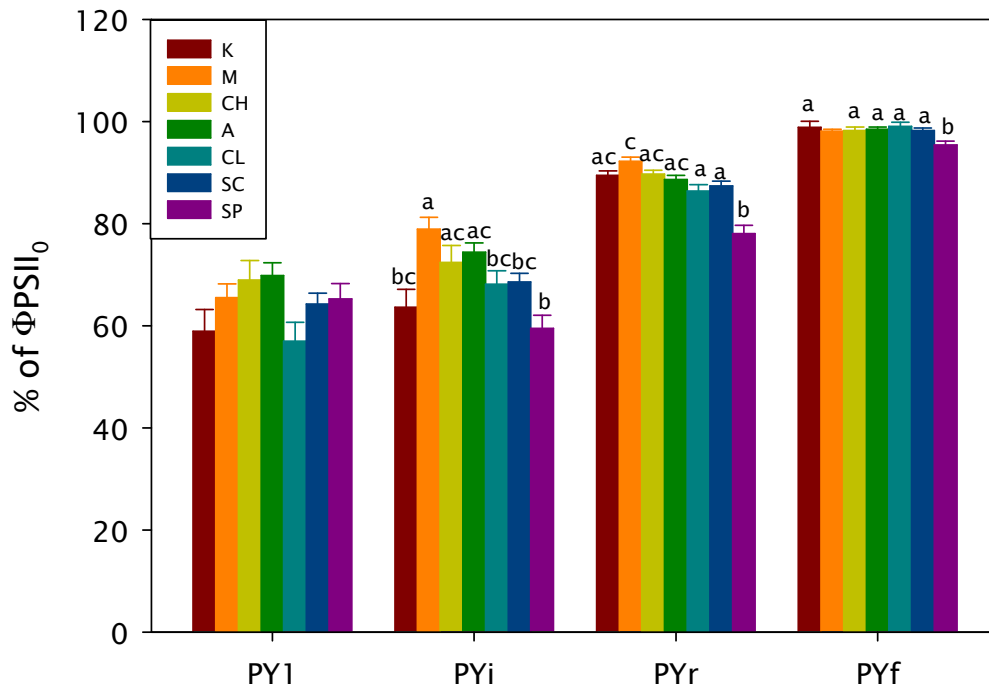


Fig. 2.17: Comparison among localities of percentage of initial yield decay, when the first saturation pulse was applied (PY1), percentage of decay at the last point of the induction curve (PYi), percentage of recovery at the first point of recovery curve (PYr) and at the end of the curve (PYf). All percentages are calculated respective to initial value of PSII quantum yield ( $F_v/F_m$ ).

### Statistical analyses

We have performed multiple linear regression analyses to find an equation to explain the variance in  $A_{max}$ , measured for each population at the optimal temperature, water content and highest irradiation ( $1200 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) and calculated on a dry weight basis. Results are shown on tables 2.13 and 2.14. The difference between them is that the analysis represented by table 2.14 does not include K population.

The most important covariable, which best explains  $A_{max}$  for all the populations is Chl $a$ . For the environmental variables, the greatest influence seems to be the average temperature of the coldest month ( $T_m$ ).  $R^2$  is high, 0.78 for the model with all data, and 0.82 for the model where K was excluded. In this latter model, latitude was significantly influent and C to N ratio was also nearly significant. For metabolic variables, zero values have no validity as it is not possible to have any photosynthesis with no Chl or C. However, environmental variables may have a value of 0 and intercept values were calculated, but were not significant for our models. Multiple linear regression models using  $A_{max}$  calculated on a surface area and a Chl content basis were also performed. For the former, all variables were recalculated on a surface area basis as well (data not shown). In this case, the most influential variables were also Chl $a$  content, and C to N ratio was again close to being significant.  $R^2$  was slightly higher, 0.79, for the full model, and lower, 0.72, for the model without K. For the latter, latitude was not found to influence  $A_{max}$  calculated on surface area basis. When  $A_{max}$  on a Chl basis was used as response variable (Chl $a$  content was then excluded

from the analysis) no significant variable was found for the full model. When **K** population was excluded, C to N ratio and Tm were again significant, although R<sup>2</sup> was much lower (0.55). In this case, latitude was also significant.

	F	p	Variance explained	Coefficients
Model	10.66	<0.0001	78.04	
Main effects				
Intercept	0.0202	0.888		0.609
C/N	1.6012	0.222	5.19	-0.074
Chla	9.7364	0.006**	31.56	4.0164
Precipitation	0.0889	0.769	0.29	0.0003
Tm	0.886	0.359	2.87	0.225
TM	0.1406	0.712	0.46	0.142
Latitude	0.3759	0.547	1.22	0.05

Table 2.13: Result of a multiple linear regression model for Amax testing for the effects of C to N ratio, Chla content, ribitol to mannitol ratio, Precipitation, Tm, TM, and Latitude. F value, statistical significance (p) and the percentage of explained variance by each effect and by the model, as well as the regression coefficients are shown. Degrees of freedom are 8,18 for the model and 1,18 for each effect. \*\* indicates 0.01 > p > 0.001.

	F	p	Variance explained	Coefficients
Model	11.84	<0.0001	81.72	
Main effects				
Intercept	2.595	0.128		-11.078
C/N	3.489	0.081 ·	7.63	-0.111
Chla	15.225	0.001**	33.30	5.613
Precipitation	2.064	0.171	4.51	0.002
Tm	5.146	0.038*	11.26	0.853
TM	0.112	0.743	0.24	0.117
Latitude	4.683	0.047*	10.24	0.365

Table 2.14: Result of a multiple linear regression model for Amax testing for the effects of the same parameters than in table 2.13, but excluding **K** population. F value, statistical significance (p) and the percentage of explained variance by each effect and by the model, as well as the regression coefficients are shown. Degrees of freedom are 6,15 for the model and 1,15 for each effect. · Indicates 0.1 > p > 0.05; \* indicates 0.05 > p > 0.01; \*\* indicates 0.01 > p > 0.001.

### Latitude effect

The effect of latitude is shown in Table 2.15. It was found an increase on Pearson's product-moment correlation coefficients, as well as of significance, when **K** population was excluded from the analysis.

Parameters	All localities		Excluding <b>K</b>	
	r	p	r	p
Amax	-0.06	0.77	-0.65	0.001***
GP	-0.26	0.22	-0.61	0.003**
Chl	-0.58	0.003**	-0.87	0***
Erg	-0.26	0.2	-0.77	0***
Total sugars	0.28	0.18	-0.31	0.16
Total aminoacids	-0.35	0.096 ·	-0.71	0.0002***
C/N	0.36	0.078 ·	0.64	0.001**
N	-0.38	0.06 ·	-0.71	0.0002***

Table 2.15: Pearson's correlation coefficients (r) and significance for the correlation between latitude and the indicated parameters, with all the samples (left) and excluding **K** population (right). · Indicates 0.1 > p > 0.05; \*\* indicates 0.05 > p > 0.01; \*\*\* indicates p < 0.001.

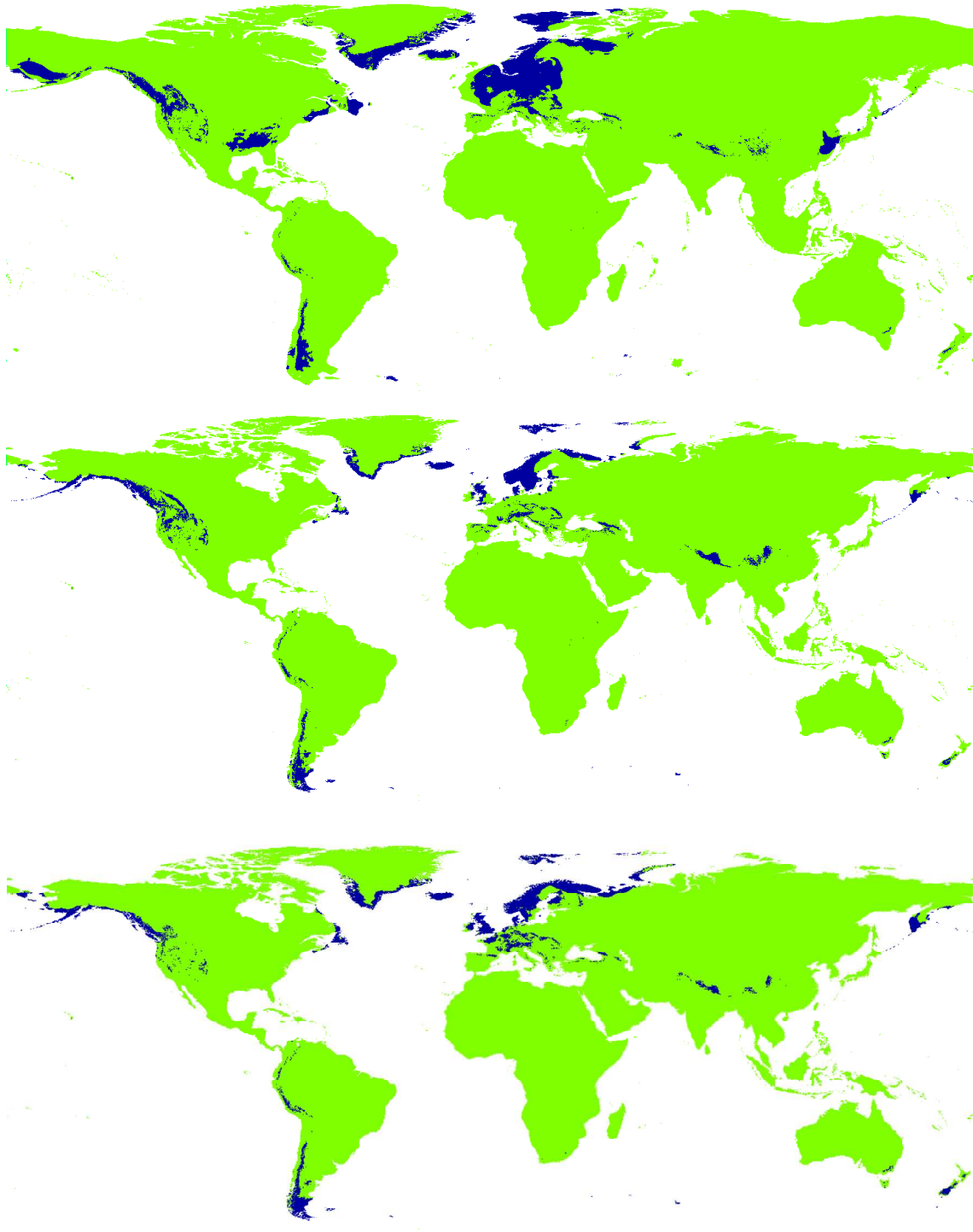


Fig. 2.18: Potential niche of *Umbilicaria decussata*, after a MaxEnt analysis with the environmental conditions of the last glacial period (top), the current environmental conditions (middle) and the predicted conditions for the year 2050 (bottom), according to the IPCC (2007) (bottom).

### Niche modeling

After the MaxEnt analyses (Fig. 2.18) with past, present and forecasted (for the year 2050) environmental conditions, we can see that *U. decussata* has a potential area restricted to the polar and alpine zones (Körner *et al.*, 2011). Its area was much wider at the LGP, and it seems that the future conditions would cause its disappearance from

the high mountains of temperate and subtropical areas, but its area would be slightly larger in polar regions.

## DISCUSSION

Phenotypic plasticity allows organisms to survive under varying environmental conditions and to colonise different habitats. Plastic response to the environment seems especially valuable for organisms that are sessile, grow slowly and where complex buffering processes are not present (Pintado *et al.*, 1997; Sultan, 2000).

Despite the large differences in environmental conditions of the locations where *Umbilicaria decussata* grows (Fig. 2.1) and which are in themselves an indication of its ability to adapt, the presence of this species always indicates alpine climatic conditions. It is not found in the milder, lower environments, possibly because its carbon balance would not be favourable under those conditions. Being present in almost all the places considered alpine (*sensu* Körner *et al.*, 2011) worldwide, it is a very representative species of those habitats, and therefore, a decrease of the populations of this species would reliably indicate the retreat of alpine habitat, being a useful marker of alpine habitat loss. Hence the importance of understanding its ecophysiological behaviour and its response to changing conditions.

This study tried to ascertain whether *Umbilicaria decussata* showed a different behaviour in the seven localities sampled, from different points of its temperate and tropical distribution, and, if not, how wide its physiological ranges were.

The most striking result that we have found in this study was the more or less marked correlation between latitude and some measured parameters. These are: increase in Amax and GP, Erg, Chl, aa, N and sugar content in lower latitudes; and increase in C to N ratio at higher latitudes. The trends were always more clear when K population was excluded (Table 2.15), when all the former parameters were found to be more significant, with the only exception of total sugar content. The inclusion of K in the data used to model the response of Amax is probably the cause of latitude not then being a significant factor (Table 2.13), as the exclusion of this population makes latitude having a significant influence. This result is in marked contrast with the absence of any latitudinal pattern in different *Cladonia* species (Lechowicz & Adams, 1979), but in agreement with other studies that found latitudinal trends (Schipperges *et al.*, 1995; Sancho *et al.*, 2000). These other studies were made within a restricted latitudinal gradient, with less populations and always comparing temperate and polar samples. In this study, we could broaden the range to the tropics. Had we had also included polar data, it is most likely that we would have found the same pattern, as it can be inferred from our data and measurements made with *U. decussata* from Antarctica (Lange 1965; Green *et al.*, 2011b). Interestingly, Green *et al.* (2011b) did not find any difference in NP rate between two Antarctic populations of *U. decussata* separated by 22° of latitude, which they explained as microclimate being more important than macroclimate.

The big question that arises from our results is what is really driving this response to latitude. We have seen the influence of Chl $a$  and temperature in the productivity (Table 2.14). A higher temperature when active provides the lichens with a more efficient photosynthetic performance (higher KF) as long as the temperature remains within the suboptimal range which is what they usually experience in the field (Schroeter *et al.*, 1995; Green *et al.*, 1995), thus making it possible for them to have a more active metabolism, which, combined with a higher N status, leads to the higher amounts of sugars, amino acids, pigments, that we could observe in this gradient. It has been demonstrated that the tree line, and hence the alpine zone, follow mean temperature at all latitudes (Körner & Paulsen, 2004). In our analysis, the most important temperature seems to be the average of the coldest month (Table 2.14), and not the average of the warmest month. This would suggest that winter is the key time for these organisms, as it is a period outside the growing season *per se* and the possibility of becoming active in this time of year could make an important difference. Length of the active period would influence the effectiveness of all other factors that influence productivity. A longer active time would easily explain the greater productivity and amount of metabolites, but time when active can also be important, e.g., activity during a warm night can cause large respiratory losses (Lange, 2003a; Reiter *et al.*, 2008). As poikilohydric organisms, their active time is limited by water availability. The more constant climatic conditions towards the Equator provide plants with a longer growing season (Körner & Paulsen, 2004). The frequent presence of fog would allow longer active periods due to the humidity it provides, as well as to the helpful sunscreen which avoids the fast drying out of the thalli under full sunlight. Temperate regions with a strong seasonal contrast only have some periods of the year when fog is prone to be formed, whilst in tropical areas this can occur everyday. The contrast of temperatures between winter and summer is also very important. In tropical areas the temperature regime could be very adequate for lichen growth, as temperatures during the day tend to be warm, allowing a good productivity, while they tend to be low during the night, which minimises the carbon loss by respiration. In temperate areas temperatures can be high in summer, also during the night, causing an important carbon respiratory loss. In winter most precipitation is in the form of snow, making the water unavailable for photosynthesis. In Mediterranean areas no photosynthesis is possible in summer during the day, due to the characteristic summer drought. This limits very much the active time. In fact, Körner & Paulsen (2004) measured an even shorter growing season in Mediterranean than in boreal areas.

Which are the reasons for K being excluded of this gradient? It is possible that the samples were somehow damaged before they were studied in the laboratory. This could have occurred during the transport process between the field and their arrival to the lab, and/or the samples could have been already damaged when they were collected. As an alpine lichen, *U. decussata* might be expected to be very tolerant to desiccation, but not all the lichens can cope effectively with drying. Green *et al.* (1991) showed a high mortality of *Pseudocyphellaria dissimilis* samples when exposed to very short periods at 5–16% RH. Indeed, this rainforest species turned out to be more

sensitive to desiccation than aquatic lichens. Coxson (1987) also reported the extreme sensitivity to drying of *Cora glabrata* (under *Cora pavonia*), a basidiolichen from the cloud/mist zone of a tropical volcano. However, samples of the same species (under *Dictyonema glabratum*) were found to have photosynthetic activity after complete drying by Larcher & Vareschi (1988), thus showing a different tolerance to desiccation within the same species. In spite of the obvious differences between an alpine chlorolichen and basidiolichens or rainforest cyanolichens, coming from a misty environment, our **K** population could have suffered more than any other population from the effects of desiccation, previous to freezing and measurements. This is supported by the lowest TSW value found in these samples, which suggests that the lichen is used to a moist environment (further discussion below), not requiring to invest any resources in the reinforcement of its thallus. We cannot discard the possibility of prior damage of these thalli. Kilimanjaro forests are in regression due to land use changes, logging and fire, especially since the early sixties (Soini, 2005). It has been established that land use in the vicinity of montane regions alters topographically generated circulation patterns, as well as temperature and moisture of lowland air masses that ultimately impact orographic cloud formation (Lawton *et al.*, 2001; Nair *et al.*, 2003). This fact has been linked to a differential change on precipitation and rainfall regime between the treeline and the summit (Hemp, 2009; Fairman *et al.*, 2011). This way, the vegetation of this region is suffering from the rapid change in water regime they are experiencing (Hemp, 2009). Therefore, the population of *Umbilicaria decussata* could be in retreat in this locality. This is supported by the low values found in Chl $a$  fluorescence, compared to the other populations. The good recovery dynamics may indicate that the damage was not due to manipulation prior to measurement, but already present when samples were collected.

We will now discuss in detail the changes in every parameter shown by the studied populations.

### **Gas exchange and water relations**

We have found interesting differences in the ecophysiology of these seven populations of this single species, which may be attributable to the different climatic conditions they live in.

**M** shows the highest NP rates irrespective of light intensity or temperature when calculated on a dry weight basis (Figs. 2.2, 2.3 and 2.5). This trend is not maintained when calculations are based on Chl content or surface area (Figs. 2.3 and 2.5), where values become much more similar among populations, excepting **K**, which always shows the lowest value.

A thallus with a high surface to weight ratio (low TSW) might have a more efficient light harvest, as self-shading of Chl molecules is less likely to occur. With the same Chl content on a dry weight basis, it would reach higher NP rates by Chl content, as Chl molecules would be all fully exposed to light. But its water content would be smaller, as found here (Fig. 2.9). **K** population possesses the thinnest thalli, taking into



account that its TSW (Table 2.6) is lowest, which partly explains its lowest photosynthetic yield when calculated on a surface area basis (Fig. 2.5). Similarly, although its Chl content per dry weight is one of the highest, it is the lowest on a surface area basis, and a very important proportion of this Chl (40%) belongs to Chl**b**, resulting in a high harvesting efficiency, but a low energy transport by Chl**a** (Dale & Causton, 1992). When NP is calculated on a Chl content basis, **K** shows the lowest value as well, significantly lower than **CL**, which has a similar Chl content by surface area unit, but much lower on a dry weight basis. This could indicate that, in spite of the Chl content and its enhanced light harvesting capacity, and taking into account its thinnest thallus, which would discard self-shading effects, its Chl could be less efficient due to degradation. This is further supported by phaeophytinization quotient (PQa, data not shown), which was lowest for **K** individuals (0.96, when optimal value should be between 1.3 and 1.4, according to Garty *et al.*, 1985). As extraction and measuring processes were identical for all samples, this suggests a previous degradation.

On the other hand, the high NP rate of **M** population both on a dry weight and a surface area bases is mostly explained by its high Chl content, which indicates a higher investment in photosynthetic apparatus (Figs. 2.5 and 2.10). Indeed, its NP rate on a dry weight basis is the highest compared to the other six populations. However, it is not so when NP is related to Chl content. In this case, the values are similar for the seven populations. This could be due to a relatively constant amount of Chl per active centre. But in **M** population there could also be a self-shading effect, decreasing the potential efficiency of Chl (PQa values are now normal). This is suggested by the comparison with **CL** population, which displays rather average values, with little Chl content and a NP rate not very high. Its NP rate on a Chl content basis is higher than the one of **M**, explaining the lower rates on a dry weight basis by the difference on Chl content and also by the higher TSW value of **CL**, considering that an increase on TSW is likely to be mostly due to the fungal partner. NP rates are very similar on a surface area basis, although **M** has higher Chl content per m<sup>2</sup>. Therefore, it seems that **CL** uses its available Chl in a more efficient way, supporting the hypothesis of a possible self-shading in **M** algal population.

In our study, T<sub>cl</sub> and T<sub>cu</sub> (Table 2.3) were calculated from the adjusted equation, they are not empirical values. Already Lange (1965) proved the capacity of this species to have an important photosynthetic performance at low temperatures, and the populations which seem to be more tolerant to cold are **M** and **CH**, which have the highest NP at 0 °C, with a very similar DR. However, at least **M** population seems to be hardly ever exposed to such low temperatures in the field (Table 2.1). Laboratory studies have been found to be good predictors of the behaviour of lichens in their natural habitat, thus allowing to interpret field data (Lange *et al.*, 2001, Reiter *et al.*, 2008), but they cannot give any indication of field performance. For this reason, these populations would deserve further field studies to be able to estimate accurately actual CO<sub>2</sub> gain under field conditions. It is remarkable that **SC** and **SP**, the populations with the lowest T<sub>cl</sub> value, come from the coldest places, with 160 days of frost and 168

days with snow cover per year at the meteorological station, 500 m below the place of collection (data for **SC**). Taking into account that in these two localities precipitation is mostly in the form of snow (100 days per year for **SC**), it is likely that they are not very active in winter, not being limited by temperature, but by water availability. However, they seem to be well prepared to fix CO<sub>2</sub> in winter, taking advantage of snow melting during cold, but sunny days, which often happen in Mediterranean mountains and are not rare in Pyrenees. **SC** is also the population which displays the highest value of Tcu, thus having the broadest temperature activity range (45.66 °C vs. 29.52 °C for **K**), followed by **M** and **SP** (41.94 and 37.36 °C, respectively). This is a further indication of the versatility of this species, which must be enhanced in this Mediterranean high mountain population, as the diurnal temperature and RH changes make alpine environments more extreme than arctic environments (Kappen, 1988). We can also have an idea of the potential productivity that each population would have in the studied range of temperatures by comparing the area under the temperature curve (Fig. 2.2 and Table 2.3). **SC** and **SP**, although having broad ranges, are not the most efficient, because their productivity is not as large as in other populations with a narrower temperature range (e.g., **CH**). However, **M** has both a wide range and a high productivity, thus being by far the most effective over the measured temperature range.

**SC** shows the highest TSW value, which partly explains its low photosynthetic efficiency per dry weight unit, but much higher per surface area unit and Chl content. The thickness of the thalli (pers. obs.) characterise this population, distinguishing it from the others in many aspects and greatly influencing its physiological response.

**CL** and **CH** populations are geographically very close to each other, compensating their difference in altitude with the difference in latitude (Fig. 2.1). Their NP rates are fairly similar, regardless to the basis of calculation, but some differences can be observed. **CH** always shows higher values of A<sub>max</sub> at all temperatures measured (Fig. 2.6). This is in part due to the higher Chl content of **CH** samples, but this pattern can be observed as well in the photosynthetic efficiency quotient (KF) (Fig. 2.8, Table 2.7). Differences, although non significant, are clearly higher at lower temperatures, suggesting better acclimation to low temperatures in **CH**, as expected. The effects of living in a higher place, thus, with a higher light level (Körner, 2007) can also be observed in the PPFD compensation and saturation values (Green *et al.*, 2008). Although **CL** values for temperatures other than 15 °C should be considered with reservations for the reasons detailed in Material and Methods, it is remarkable the switch that can be observed in the pattern of P<sub>c</sub>. Namely, at low temperatures **CH** seems to reach compensation at lower PPFD, being thus more efficient between 0 and 10 °C; but at 15 °C, it is **CL** which compensates before, indicating that it lives under a lower irradiance environment. This is confirmed as well by P<sub>s</sub> values, where a significant difference can be found between these two populations at 15 °C. This response to the light environment has already been described (Kershaw, 1985; Green & Lange, 1991; Green *et al.*, 1997). **CH** is in fact significantly different from all other 6 populations regarding this PPFD saturation value at 15 °C (Table 2.5). Although there

are populations from similar (**SP** and **SC**) and even higher altitudes (**K** and **M**), this result is not very surprising; **SP** and **SC** come from places where high irradiances hardly ever coincide with water availability, so lichens are usually not active under high PPFD (although, as mentioned above, **SC** population seems to be adapted to take advantage of cold and sunny days, but irradiances are not so strong in winter). **M** and **K** grow in an often cloudy and/or foggy environment (Beaman *et al.*, 1962; Duane *et al.*, 2008). **A** and **CL** populations come from localities at similar altitude and latitude, so it is not surprising that they show similar photosynthetic behaviour, with similar  $P_c$ ,  $P_s$  and apparent quantum yield ( $\Phi$ ) values (Tables 2.4, 2.5).

The two Spanish populations, **SP** and **SC**, have similar light regime and photoperiod, but the climate is very different, despite their close proximity. The main difference is the rain regime, which for **SP** is much more even across the year, as the climate is actually eurosiberian, whereas for **SC**, rain in summer is very rare and often absent, being a typically Mediterranean climate area. They show similar Chl content on a dry weight basis; but, on a surface area basis, although the difference is not significant, **SC** value is clearly higher. This difference is explained by the significantly higher TSW of **SC** (450 vs. 311 g m<sup>-2</sup>), which allows a better water storage and hence, an increase on the length of active periods. The same is true for photosynthetic response. **SC** always shows higher values (Fig. 2.5), but the biggest difference can be found when calculations are based on a surface area basis. As it can be seen in Fig. 2.4, photosynthetic behaviour against temperature is quite similar in both populations, but **SP** always has lower values of  $A_{max}$  (Table 2.2, Fig. 2.6), as well as lower  $K_F$  (Table 2.7) and higher  $P_c$  and  $P_s$  values at all the temperatures measured (Tables 2.4 and 2.5), some of them significantly different. It is then likely that, in their natural habitat, **SC** samples are usually active under lower irradiances than **SP** samples. All this data, together with the higher water retention capacity of **SC**, lead to think that this latter is well adapted to its environment, where a higher water retention is very suitable, taking into account the more uneven rain episodes. This is further supported by the more whitish aspect of the thalli from this population, which do not absorb as much radiation as the darker thalli, allowing for a longer water retention time (Sancho & Kappen, 1989; Valladares, 1993). Pintado and her coworkers described a differential behaviour between sun and shade forms of *Ramalina capitata* (Pintado, 1996; Pintado *et al.*, 1997) as well as of *Diploschistes diacapsis* (Pintado *et al.*, 2005), which could well be applicable in this case. She observed that south-facing populations of *R. capitata* had a higher water holding capacity and longer retention time, which was explained as a consequence of the shorter duration periods of activity on the south face of the rocks, compared to the north face, where evaporative forces are lower. In the case of *D. diacapsis*, she measured a higher NP rate on sun populations. Both strategies aim to maximise the photosynthetic performance on the periods of metabolic activity, briefer in the sun exposed niches. Also fluorescence results indicate a lower efficiency of **SP** (Table 2.12, Figs. 2.15 and 2.16). We find significantly higher PS II quantum yield values for **SC**.

The highest efficiency (KF, Table 2.7, Fig. 2.8) does not coincide in any population either with optimal NP temperature or with optimal gross photosynthesis (GP) temperature (which was not reached over the measured temperature range, being above 25 °C). Far from that, the highest efficiency is reached, depending on populations, at 0 or 5 °C. This is clearly due to the higher sensitivity of respiratory metabolism to cold temperatures, compared to NP, which is also lower at lower temperatures, but it is not as much affected as DR (Lange, 1965; Schroeter *et al.*, 1994; Lange & Green, 2005, 2006).

In our data, **M** and **K**, which live, as stated above, in an often foggy and cloudy environment (Figs. 2.19 and 2.20), show a low water holding capacity and short retention time, related as well to their low TSW, because they do not need to retain water, as it is frequently available. It may be also a strategy to avoid excessive radiation by drying out quickly when clouds and fog clear up. On the other hand, **SC** shows the highest water holding capacity related to surface area, as shown in Fig. 2.9, and it also has one of the highest water retention times (Table 2.8). This is in agreement with its TSW, and the previous discussion about environmental conditions. We can infer that it is likely that wetting events are more infrequent for **SC** than for **M** and **K**. This would explain the lower NP rates shown by **K** when compared to **SC** (and almost to every other population, indeed). Moreover, **K** shows the lowest Chl*a* to *b* ratio, so we could say it behaves consistently as a shade acclimated lichen (see below). But **M** population is remarkable by its outstanding values in every parameter measured (see also below). It could be argued, similarly to the previous discussion about **SC** population, that **M** also would show these high photosynthetic rates to try to maximise its productivity during brief active periods, but this is not likely in this case, due to the low water retention capacity and TSW value of this population. The rainfall is seasonal, the wet period extends from May to October. During it, storms are frequently daily, and they alternate with sunny periods. This population would then become active almost every day during six months. Therefore, not only its active time in the field is thought to be longer than most of the other populations, but it also displays the highest values of NP, with a very large Chl content, and the highest photosynthetic efficiency. This population seems to be beyond any rule, due to the combination of mild environmental parameters, with relatively warm temperatures, not a high variation along the year and a very convenient moist regime. All of them assure a very long active time throughout the year in very suitable conditions for growth and development.

As previously stated, field measurements and microclimatic monitoring studies would highly improve our understanding of these situations.

### **Subcellular components**

#### **Chlorophyll**

Chl*a* has been extensively used as a proxy for the quantity of the algal partner in the lichen symbiosis (e.g., Raven, 1992; Tretiach & Carpanelli, 1992; Enríquez *et al.*, 1996; Palmqvist *et al.*, 2002; Dahlman & Palmqvist, 2003; but see Strobl & Türk, 1990;

Valladares *et al.*, 1996). The values we have obtained are well within the range measured for foliose boreal temperate green algal lichens (Palmqvist *et al.*, 2002), as well as for members of *Umbilicariaceae* (Valladares *et al.*, 1996) (Fig. 2.10). Chl $a$  has been found to correlate both with NP and DR between species (Tretiach & Carpanelli, 1992; Green *et al.*, 1997; Palmqvist *et al.*, 1998; Palmqvist & Sundberg, 2000; Palmqvist *et al.* 2002). This fact led Palmqvist (2000) to suggest that mycobiont carbohydrate demand might regulate the amount and/or activity of the photobiont, for a range of lichen species. Palmqvist *et al.* (2002) showed, in a broad range study with 75 lichen species, that photosynthetic capacity appears to increase more than respiration with increasing Chl $a$ , in an adequate response implying a higher carbon gain to support the increased maintenance respiration of a thallus which probably has a higher N content, taking into account the positive relationship between N and Chl $a$ . We could ascertain for the first time the maintenance of this pattern within a single species as well. Indeed, the Pearson's product-moment correlation coefficient between Chl $a$  and DR at 10 °C is  $r = 0.5$  ( $p = 0.01$ ), whereas it is  $r = 0.82$  ( $p = 0$ ), for the regression between Chl $a$  and Amax (data not shown). Chl $a$  is also related to KF ( $r = 0.60$ ,  $p = 0.001$ , at 5 °C), as Palmqvist & Dahlman (2006) suggested for the foliose chlorolichen species *Platismatia glauca*, but could not confirm, for they lacked CO $_2$  exchange data.



Fig. 2.19: Place of collection of **K** samples. Photo: Dr. Lucia Muggia.

There are significant differences between populations regarding Chl $a$  to  $b$  ratio, with the highest value belonging to **CH** (4.3) and the lowest to **K** (1.4). A high amount of Chl $b$  has been used as a measure of pollution damage, for Chl $a$  is more sensitive to air contaminants, being converted to phaeophytin $a$  more easily than Chl $b$  to phaeophytin $b$  (Garty *et al.*, 1985, 1993; Weissman *et al.*, 2006). But for our data, this should not be the case, as Kilimanjaro is 200 km away of Nairobi, whereas Iztaccihuatl volcano is only 60 km away of Mexico D.F., so the increase of relative Chl $b$  is more likely due to light conditions. This is further supported by the results of Pc, Ps and the apparent quantum yield ( $\Phi$ , data not shown). This latter parameter is highest in **K** ( $0.055 \pm 0.002$  at 15 °C), and lowest in **CH** ( $0.02 \pm 0.002$ ), inversely related to Pc and Ps,



as shown in Green *et al.* (1997). This high value found in **K** is caused by the combination of its highest DR rate and the fact that  $P_c$  is quite low. But, as shown in Kershaw (1985) and Palmqvist (2000), high values of  $\Phi$  and low values of  $P_s$  are indicators of low  $A_{max}$ . Therefore, although its NP rates are lowest, this is compensated by its highest apparent efficiency, which allows this population to reach its maximal rates before, with lower light intensities. All these facts would indicate a more intense light habitat for the populations with higher values of  $Chl a$  to  $b$  ratio,  $P_c$ ,  $P_s$  and lower values of  $\Phi$ . Indeed, **K** habitat is described as having a 40% of cloudy days at noon (Duane *et al.*, 2009), thus reducing considerably the irradiation at the brightest time of the day. Hence, as stated above, we could consider **K** a shadow acclimated population. **M** also has a fairly high  $\Phi$  ( $0.04 \pm 0.001$  at  $15^\circ C$ ), and a lower  $P_c$  than **K** (Table 2.4), which, added to its much lower DR, makes of it a much more productive population, leading to an increase in  $P_s$ , as explained by Kershaw (1985) and Palmqvist (2000). This means that, even when its habitat is also described as usually foggy, it seems to be adapted to take advantage of the moments when fog clears and higher irradiance is available.



Fig. 2.20:  
Iztaccihuatl  
volcano, where  
**M** samples were  
collected. Photo:  
Sarah Leen. ©  
2005 National  
Geographic  
Society.

### **Ergosterol and chitin**

Ergosterol (Erg) values are similar in our populations, within the range for foliose boreal temperate lichens, as described in Palmqvist *et al.*, 2002, with the exception of **M**, which is the highest and significantly different from 4 other populations. Chitin contents are also within normal values (Palmqvist *et al.*, 2002), but it is **SC** population the one which stands out, showing the highest chitin to Erg ratio as well. This may be just a reflection of the strategy of **SC** population to cope effectively with strong winds and heavy snow (Kappen, 1988). Its investment in structure and resistance tissues is highest. There is actually a positive significant correlation between TSW and chitin content per area ( $r=0.72$ ,  $p<0.001$ ).

Erg was found to be tightly related with DR rates (Sundberg *et al.*, 1999). We pooled the data of all populations, and, when considering *U. decussata*'s DR and Erg

per dry weight, we could not find any relationship, but with surface area-basis calculated data, there is a statistically significant trend at every temperature, with  $r$  (Pearson's) ranging from 0.31 (0 °C) to 0.59 (10 °C), showing a clear tendency for increased respiration with higher Erg content. It is likely that we would have got a higher  $r$ , as in Sundberg *et al.* (1999), had we had more data. It is interesting to see that the pattern found by those authors with 8 different species is maintained in many ways within a single species. In agreement with that study, we found that samples with high thallus C to N ratio had lower Erg content and lower DR rates ( $r = -0.75$ ,  $p < 0.001$ , for Erg *vs.* C/N). Unlike other studies centred on a single species (Sundberg *et al.*, 2001; Dahlman *et al.*, 2002, Dahlman & Palmqvist, 2003; Gaio-Oliveira *et al.*, 2005; Palmqvist & Dahlman, 2006), we found a tight relationship between Erg and total N content ( $r = 0.82$ ,  $p < 0.001$ ), so, at least *U. decussata* does not satisfy the proposed theory about a possible constant concentration of active fungal hyphae in relation to thallus mass and irrespective to N content. Thallus nitrogen content was also a very good predictor of DR at every temperature, especially when calculations were referred to surface area ( $r$  from 0.36 at 0 °C to 0.76 at 10 °C,  $p$  always  $< 0.01$ ). This means that samples with low respiration seem to be relatively rich in carbon compounds that contribute to biomass, but with low metabolic turnover and energy demands, and a high N content would lead to an even higher energy requirement related to protein turnover (Palmqvist, 2000; Lambers, 1985). Indeed, we found higher amount of total amino acids (Taa) in the samples with higher N content, and, consequently, Taa was also related with DR at every temperature from 5 to 25 °C, with  $r$  between 0.61 and 0.71, and  $p < 0.01$ , as well as with Amax ( $r = 0.67$ ,  $p < 0.001$ ), again supporting the relationship between energy demand and Amax. Chl $a$  content was also slightly, but significantly related to DR from 5 to 25 °C, in agreement with Palmqvist *et al.* (1998), Palmqvist & Sundberg (2000), and Palmqvist *et al.* (2002) ( $r$  from 0.47 to 0.67, and  $p$  always  $< 0.02$ ).

### **Nitrogen and amino acids**

**SP** population has been found to have the lowest N amount, with the logical consequence of the lowest total amino acid (Taa) content. However, it is the population with the greatest relative investment in Arg (Fig. 2.12), a 7% of total aa content (data not shown), while the other populations have between 3 and 4%. Arg % is inversely related to the NH $_4^+$  content, as expected ( $r = -0.39$ ,  $p = 0.05$ ). Therefore, **SP** population might be more sensitive to N (Dahlman *et al.*, 2002, Dahlman & Palmqvist, 2003), although, according to its N content, its habitat is not at all N-enriched. Hovenden (2000) reported a maximum N content for Antarctic samples of *U. decussata* of 7.72 mg g $^{-1}$ , slightly lower than our **SP** samples, but the half of N content found in **M** population.

### **Sugar alcohols**

We found a relatively constant amount of ribitol with **M** having the highest value (2.7 mg g $^{-1}$  dry weight) and **K** the lowest (1.12 mg g $^{-1}$ ). Arabitol content differed little among populations. In contrast, mannitol is lowest in **K**, which is also the only population which has more arabitol than mannitol. This fact makes its having the

highest ribitol to mannitol ratio. If we calculate the ratio ribitol to arabitol+mannitol, i.e., algal vs. fungal sugars, **K** still has the highest value, but now it is more similar to the rest. Arabitol is depleted more rapidly than mannitol under stress conditions, therefore, it may function as a short-term carbohydrate reserve (Palmqvist *et al.*, 2008). All the populations seem to need a similar absolute amount of disposable carbohydrates for their metabolism, irrespective to the different levels of the rest of sugars. This demand seems to be too large to allow **K** population to accumulate mannitol. Arabitol shows no relationship with Amax, whereas both ribitol and mannitol content do, with higher *r* and slope between ribitol and Amax ( $r=0.62$ ,  $p=0.001$  and slope=2 for ribitol;  $r=0.46$ ,  $p=0.02$  and slope=0.3 for mannitol). Palmqvist & Dahlman (2006) showed in a previous study with *Platismatia glauca* a much higher amount of arabitol, both in a relative and an absolute content. However, excepting **K** population, values for ribitol are very similar and mannitol is higher in our dataset. This might be a specific feature, but we do not have enough data to be sure. It is also true that *U. decussata* and *P. glauca* have contrasting habitats, which may partly explain this difference. Living in such harsh environments, *U. decussata* may need more polyols to protect its cells against desiccation, thanks to their function as regulators of osmotic pressure and turgor (Farrar, 1988; Ahmadjian, 1993; Green *et al.*, 2011a). Living in forests, *P. glauca* likely has more infrequent desiccation-rehydration cycles. Moreover, alternating drying and wetting of thalli was required for polyol metabolism and translocation in *Hypogymnia physodes*, according to Farrar (1976). Finally, it is also true that our samples had slightly higher amounts of N, Chl and Erg than *Platismatia glauca*, which would provide them with a higher photosynthetic productivity, leading then to the found higher sugar content, but this is a hypothesis that can not be tested, as that study did not include CO<sub>2</sub> exchange data (Palmqvist & Dahlman, 2006).

### Fluorescence

Results from Chl<sub>a</sub> fluorescence measurements showed lower ΦPSII absolute values for **K**, **SP** and **CL** populations (Fig. 2.16, table 2.12). This fact further supports the observed rates of gas exchange, especially the low values for **K** and **SP** populations. Photoinhibition may likely explain the values of **SP**, which would be supported by its lower ability to recover the initial yield value during the recovery curve (Fig. 2.16) (Barták *et al.*, 2008). But in the case of **K** population, the reason could be different, as, although having lower values, its recovery is as good as in all the other populations. This would indicate a very efficient quenching system for the protection against the high light.

### Statistical regression

The best regression (Tables 2.13 and 2.14) found by us shows the critical importance of Chl<sub>a</sub> in the photosynthetic performance of *Umbilicaria decussata*. As explained above, this result is in accordance with many studies, both between and within lichen species (Tretiach & Carpanelli, 1992; Green *et al.*, 1997; Palmqvist *et al.*, 2002). Chl<sub>a</sub> accounts for the 32% in NP variation (Table 2.13; 33% for the model without **K** population, in Table 2.14). As shown in Palmqvist *et al.* (2002, 2008), this could seem surprising, for only a 0.37–0.85% of N is invested in Chl<sub>a</sub> (data not shown).



But this fact is actually indicating that investments on Chl $a$  covary with total investments on photosynthetic apparatus, suggesting that the ratio between Chl $a$  and other photosynthetic proteins may be constant in lichen photobionts (Palmqvist *et al.*, 1998). Therefore, Chl $a$  appears to be an easy to assess, proxy for photosynthetic units (PSU), which might not be related to number of photobiont cells, at least in *Umbilicariaceae*, according to Valladares *et al.* (1996).

When **K** population was excluded from the dataset (Table 2.14), Chl $a$  was still found to be the most explaining variable, but other parameters had also become significant. The most striking of them is latitude, whose influence rose from a 1.22% of variance explained to 10.24%.

All climatic factors included in the model accounted together for the 16% of the variance of Amax, but only Tc was significant. C to N ratio was on the border of statistical significance. C/N is negatively correlated, indicating that the higher the N with respect to C is, the higher the Amax, which is easily understood taking into account that lichens get their N by passive wet or dry deposition, and are usually N limited (Crittenden *et al.* 1994; Johansson *et al.*, 2010).

Polar and alpine areas are suggested to be especially sensitive to climate change and global warming (IPCC, 2007; Beniston, 2003). Predictions of IPCC report for these habitats include temperature and CO $_2$  atmospheric level increases, glacier retreat and change in snowfall/rainfall regime. Looking at our results, on the one hand, the predicted temperature and CO $_2$  concentration increases might seem positive for *U. decussata*, as we could see that optimal temperatures for Amax are much higher than in the field. Nevertheless, temperature is not a major influence on photosynthetic rates at the usual irradiances to which lichens are exposed in natural conditions than it is at 1200  $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , the highest irradiation of experimental conditions, which very rarely occurs in the field. Moreover, fungi have been described as capable to acclimate their respiration rates to changes in temperature (Lange & Green, 2005). And they would also generally benefit from the predicted N-deposition increase, living in habitats where N is highly limiting. But, on the other hand, in spite of these three facts, it seems more likely that the distribution of this species would be negatively affected. The niche modeling analysis for the future conditions (Fig. 2.18) shows an increase of the distribution of this species in polar regions due to glacier retreat, but a decrease or even disappearance in temperate and subtropical regions. And the retreat of the potential area of this species from the LGP until nowadays is clearly seen. A warmer scenario would not be favourable to any of the studied populations. Indeed, an increase of 5  $^{\circ}\text{C}$  would cause a decrease of KF, from the 8% of the maximal KF for **CL** to the 34% for **M** (calculated from KF decrease from 10 to 15  $^{\circ}\text{C}$ ). This way, the population which seemed to be better adapted to its environment by a higher productivity and a more active metabolism, is the one with lowest phenotypic plasticity, in agreement with Valladares *et al.* (2007), and may be more vulnerable to environmental changes. In addition, precipitation in Central America is expected to decline by between 10 and 20% for the period 2090–2099 respective to the period 1980–1999 (IPCC 2007). The

same will be true for Andean range and especially, for Mediterranean area, which is in a high risk of desertification. In contrast, precipitations in Kilimanjaro area are expected to increase a 10% between December and February for the same period, although it is likely that the forest removal would actually have a major influence, reversing this prediction. In the eastern part of Australia a slight decrease in precipitation is expected (IPCC, 2007). Therefore, only our **K** population would be theoretically favoured by precipitation regime change, but it is likely that at the end, the increase of rainfall would cause also its retreat, for, combined with the increase of temperatures, it would allow the colonisation by more competitive species. According to Davis *et al.* (1998), biotic interactions, which are not taken into account for ecological niche modelling, might play a prominent role in determining the distribution of species under changing climate conditions. It is generally assumed that global warming leads to shifts in species distribution towards higher latitudes and elevations. Some recent studies, however, point to an inverse trend, which is explained as a result of competitive interactions (Lenoir *et al.*, 2010), human land use modification (Archaux, 2004), specific responses (Millar *et al.*, 2004) and, interestingly, to the interaction between changes in temperature and water balance (Crimmins *et al.*, 2010). Nonetheless, in the case of lichens, and specifically, of *Umbilicaria decussata*, it could be that the influence of temperature change would have a more marked effect on its possible distribution shift than water balance, in comparison with other organisms, due to its poikilohydric nature and tolerance to desiccation. But the interactions of all the cited factors would be determinant for the response of this species. We had hypothesised about a possible higher phenotypic plasticity of temperate populations, which would provide them with more possibilities of survival under the new scenarios forced by climate change, irrespective of its nature. From our results, we cannot reach a simple general conclusion. **SC** population seems to be better prepared than **SP** for the expected changes in Mediterranean area (IPCC, 2007), having a slightly lower loss of KF with increasing temperature (20 vs. 31%), and especially, due to its higher water retention ability (Green & Lange, 1991). But, irrespective to their plasticity, they might not be capable to cope with competition pressure, as they cannot escape from it by going higher, for they already are at the top of the mountains of their distribution area. In this sense, **A** would have the same problem, but **CL**, **CH**, **K** and **M** would still have the possibility to find a higher altitude niche. Taking this into account, **CL** and **CH** seem to have more possibilities to survive, having also the lowest loss of KF by temperature increase.

In progress genetic analysis of population structure of both mycobiont and photobiont could be helpful to understand the differences in adaptation ability of these populations.



**3. RESPUESTA ECOFISIOLÓGICA DE DOS ESPECIES  
SIMPÁTRICAS DE *LASALLIA* A GRADIENTES ALTITUDINALES EN LAS  
MONTAÑAS MEDITERRÁNEAS**



## INTRODUCCIÓN

Los gradientes ecológicos proporcionan una apasionante oportunidad para la investigación de la capacidad de adaptación de los organismos. Los gradientes altitudinales son especialmente útiles para comprobar las respuestas ecológicas y evolutivas de los seres vivos ante las cambiantes influencias abióticas, que en estos casos a menudo suceden en un espacio geográfico muy pequeño. A lo largo de un gradiente altitudinal cambian varios parámetros. Entre ellos, hay algunos fenómenos geofísicos que son específicos de la altitud, como la presión atmosférica, la temperatura, la turbidez de la atmósfera y la radiación UV-B. Pero otros parámetros pueden ser completamente distintos en diferentes lugares, como la humedad, el régimen lumínico, el viento, la duración de las estaciones, la geología y los usos del suelo (Körner, 2007), lo cual complica considerablemente los estudios en este campo.

Se ha estudiado ampliamente la estructura de las comunidades vegetales y su biodiversidad a lo largo de gradientes altitudinales (Whittaker, 1975; Körner, 1999). Igualmente, existen multitud de estudios sobre la respuesta fisiológica de las plantas vasculares a la elevación (v.gr., Lévesque *et al.*, 1997; Fitter *et al.*, 1998; Cordell *et al.*, 1998; Craine *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2004, 2006, 2007). La mayoría de ellos se han llevado a cabo con experimentos de invernadero, que proporcionan la posibilidad de diferenciar entre adaptación fenotípica y diferencias genotípicas.

Aunque no tan abundantes, también hay muchos estudios centrados en la estructura de las comunidades de plantas no vasculares a lo largo de transectos altitudinales (v.gr. Watson 1980, 1981; Grau *et al.*, 2007; Kessler, 2000; Frahm, 1990; Grytnes *et al.*, 2006; Loppi *et al.*, 1997; Pirentos *et al.*, 1993, 1995; Pintado *et al.*, 2001), lo cual no es sorprendente, teniendo en cuenta que los briófitos y los líquenes constituyen la vegetación más abundante de las zonas más altas, donde, al no ser las plantas vasculares ya competitivas, dominan el paisaje (Ahmadjian, 1995). Muchos de ellos, además, pueden ocupar un amplio rango altitudinal. Y, sin embargo, son escasos los estudios centrados en la respuesta fisiológica de especies concretas a lo largo de estos gradientes (Pirentos *et al.*, 2011; Sonesson, 1986; Swanson *et al.*, 1996; Larcher & Vareschi, 1988; Türk, 1983; Adams, 1971), a pesar de la enorme información que podrían proporcionar acerca de las estrategias de adaptación de los líquenes, ya que en este caso no es posible hacer experimentos en invernadero a largo plazo, pues estos organismos no son fácilmente cultivables y cuando esto se consigue, tienen un crecimiento extremadamente lento.

*Lasallia pustulata* (L.) Mérat es una especie ampliamente distribuida en la región Eurasiática (Nimis, 1993; Pérez-Ortega, 2004). Aparece desde el nivel del mar hasta alrededor de los 2.000 m de altitud en la Península Ibérica (Sancho, 1986; este estudio). *Lasallia hispanica* (Frey) L.G. Sancho & A. Crespo es un endemismo de la zona mediterránea, restringida a la alta montaña, pues aparece desde los 900 m de altitud hasta las cumbres más altas de su área de distribución (Sancho & Crespo, 1989;

Codogno & Sancho, 1991). Ambas especies crecen en bloques graníticos soleados, pero, cuando coexisten, parecen mostrar preferencia por distintos nichos: *L. pustulata* a menudo se encuentra en lugares más protegidos, donde hay más humedad y ésta se mantiene más tiempo, mientras que *L. hispanica* es capaz de sobrevivir con las condiciones de mayor sequedad de un hábitat más expuesto, en paredes verticales. Estas distintas estrategias se ven reflejadas en su distribución altitudinal (Sancho, 1986; Sancho & Crespo, 1989). Parece claro que *L. pustulata* es incapaz de soportar las duras condiciones de la alta montaña, pues es una especie bastante termófila y no tolera el viento (Sancho, 1986). Pero, ¿por qué *L. hispanica* no crece por debajo de los 900 m de altitud? ¿Está adaptada al régimen ambiental específico de la alta montaña? ¿O es acaso gradualmente excluida en altitudes más bajas, de condiciones más favorables, por *L. pustulata*, más competitiva y de crecimiento más rápido? ¿Es la competencia con *L. pustulata* y otras especies la barrera que ha impedido a *L. hispanica* colonizar una distribución más amplia? ¿Qué condiciones definen el óptimo de cada especie?

Con el fin de acercarnos a las respuestas a estas preguntas hemos analizado varios parámetros ecofisiológicos y subcelulares en poblaciones de ambas especies recolectadas a lo largo de tres transectos altitudinales en la Sierra de Gredos, en el Sistema Central español, para averiguar sus óptimos ecológicos para la fotosíntesis, así como sus estrategias de adaptación a lo largo del gradiente altitudinal. Hemos realizado un estudio exhaustivo de su fijación potencial de CO<sub>2</sub>, por medio de medidas de intercambio gaseoso bajo distintas condiciones controladas de iluminación y temperatura. El hábitat de *L. hispanica* nos llevó a plantear la hipótesis de que su rendimiento fotosintético sería mejor a temperaturas más bajas y a irradiaciones más altas, teniendo en cuenta su tolerancia a mayores altitudes (Sancho & Kappen, 1989). Del mismo modo, esperaríamos un mayor peso específico en el talo (IPE) de esa especie (Kappen, 1988). En la misma línea, medimos el contenido de quitina, como marcador de la masa fúngica total (Palmqvist *et al.*, 2002) y su relación con la cantidad de ergosterol, el esteroide más abundante de la membrana plasmática fúngica (Sundberg *et al.*, 1999). Esperábamos una mayor cantidad con la creciente altitud, en relación con el incremento de IPE y como resultado de la mayor protección necesaria en los ambientes más duros. Pensábamos que la altitud podría inducir un engrosamiento del córtex superior también, con el objeto de proteger la capa algal frente al exceso de luz y frente a la desecación, en un intento de extender el tiempo de actividad en hábitats más expuestos.

Parecía probable que *L. hispanica* mostrara valores más altos de polioles, debido a su papel protector frente a la frecuencia de periodos de desecación-rehidratación (Farrar, 1976), y de ácido girofórico, suponiendo que este metabolito secundario tuviera una actividad protectora frente al exceso de irradiación (Solhaug & Gauslaa, 1996). Este razonamiento podía aplicarse también al caso de los carotenoides, que parecen tener una actividad protectora ante el exceso de luz visible (Fahselt, 1994). Se esperaba un descenso de la cantidad de Chl con la altitud, especialmente de la Chl *b*, captadora de luz en las antenas, y, por tanto, un descenso de la relación Chl *a/b*. Se

llevó a cabo un análisis de aminoácidos con el fin de comprobar el posible papel de la arginina como molécula inmovilizadora del exceso de  $\text{NH}_4^+$  tóxico (Dahlman *et al.*, 2002; Dahlman & Palmqvist, 2003). Esperábamos cantidades más altas de este aminoácido en altitudes mayores, como consecuencia de la acumulación de la nieve, que provoca un incremento de deposición de N en la forma de  $\text{NH}_4^+$ .

Aunque ambas especies cubren un rango altitudinal relativo parecido en esta zona (700–800 m), no esperábamos que *L. pustulata* mostrara los cambios descritos de manera tan marcada como *L. hispanica*. La razón, como se ha dicho, es el hábitat más protegido en el que se encuentra aquella especie.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Material liquénico

*Lasallia pustulata* es una especie común en la zona Euroasiática (Fig. 3.1, arriba), que aparece desde el nivel del mar hasta los 2000 m de altitud, normalmente en hábitats protegidos (Sancho, 1986; Nimis, 1993; Pérez–Ortega, 2004). *Lasallia hispanica*, como se ha dicho, es un endemismo de la cuenca mediterránea, encontrada hasta la fecha en Italia, Francia, Marruecos, Portugal y España (Fig. 3.1, abajo; Sancho & Crespo, 1989). En la Península Ibérica aparece desde los 900 m de altitud hasta las cumbres más altas del Sistema Central (Almanzor, 2592 m; obs. pers.), en superficies verticales, expuestas al viento y xéricas. Se puede encontrar una descripción completa de esta especie en Sancho & Crespo (1989). El material de estudio se recogió a lo largo de tres transectos altitudinales en la cara sur de la Sierra de Gredos. El transecto 1 comenzaba en el Santuario de Chilla, a 700 m.s.n.m. y alcanzaba la Portilla Bermeja, a 2.416 m.s.n.m.; el transecto 2 discurría por el camino de Las Hiruelas hasta el Cerro de la Cagarruta, de 875 a 2.300 m.s.n.m.; por último, el transecto 3 arrancaba en Guisando, a 900 m.s.n.m. y llegaba a la cumbre de La Mira, a 2.341 m.s.n.m. (Fig. 3.2). En la tabla 3.1 pueden encontrarse los detalles completos de cada punto de recolección de muestras. A cada uno de estos puntos se alude en el texto siguiente como “población”. Cada población se denomina según su lugar de recolección de acuerdo al siguiente código: Tn–mx, donde n indica el número del transecto, de oeste a este, m la altitud en hectómetros sobre el nivel del mar y x codifica la especie, Lh para *L. hispanica* y Lp para *L. pustulata*.

Tras la recolección, los talos se secaron al aire a 20 °C y se almacenaron en oscuridad a –21 °C hasta el momento de uso. La recolección se llevó a cabo intentando cubrir toda la variabilidad presente en cada localidad, eligiendo talos de diferentes rocas y de diferente tamaño. A menos que se especifique lo contrario, se utilizaron 4 conjuntos de entre 2 y 6 talos para cada población para los análisis de intercambio gaseoso. Otras muestras de cada punto de muestreo se destinaron a análisis subcelulares y, de nuevo, se utilizaron 4 conjuntos de entre 2 y 6 talos.





Fig. 3.1: Mapa de distribución de *Lasallia pustulata* (arriba, fuente: [www.gbif.org](http://www.gbif.org)) y *Lasallia hispanica* (abajo, elaboración propia). Las citas de *Lasallia pustulata* fuera de Europa son muy dudosas.

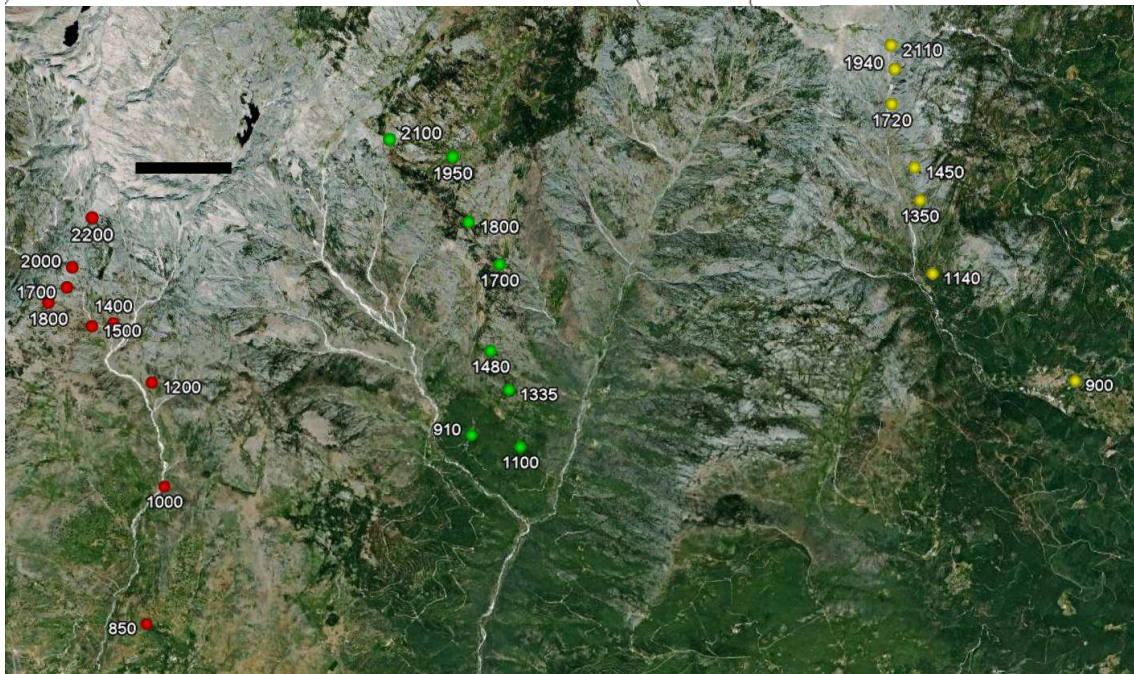
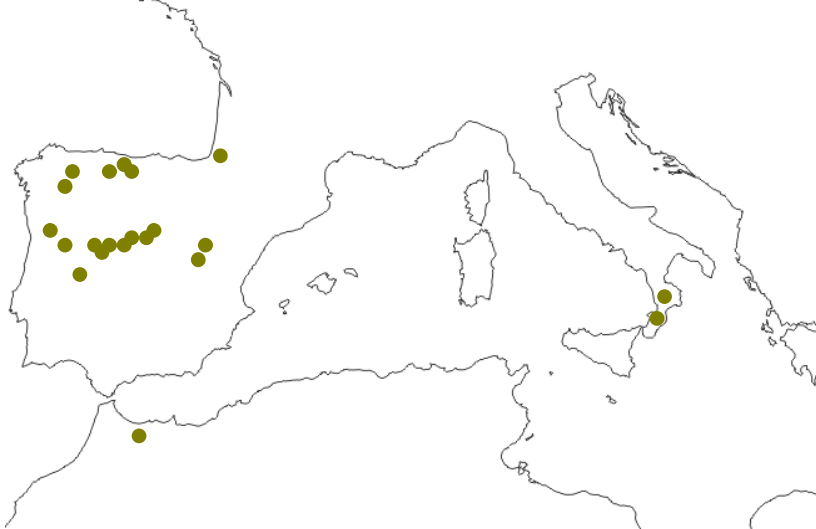


Fig. 3.2: Área de estudio con las localidades de recolección. Rojo, transecto 1; verde, transecto 2; amarillo, transecto 3. En cada punto se indica la altitud. La barra negra representa 1 Km. Mapa de Google Earth.

Transecto	Fecha y recolectores	<i>L. hispanica</i>		<i>L. pustulata</i>	
1	5-6/07/2010 M. Vivas & G. Amo de Paz	2200 m (T1-22Lh)	N 40°14'26,1" O 5°18'1,7"	1700 m (T1-17Lp)	N 40°13'57" O 5°18'26"
		2000 m (T1-20Lh)	N 40°14'05,7" O 5°18'20,7"	1400 m (T1-14Lp)	N 40°13,4'6" O 5°18'7"
		1800 m (T1-18Lh)	N 40°13'50" O 5°18'36,9"	1200 m (T1-12Lp)	N 40°13'14" O 5°17'44"
		1700 m (T1-17Lh)	N 40°13'57" O 5°18'26"	1000 m (T1-10Lp)	N 40°12'24" O 5°17'41"
		1500 m (T1-15Lh)	N 40°13'40,1" O 5°17'16,3"	850 m (T1-9Lp)	N 40°11'17" O 5°17'53"
2	10-11/07/2010 M. Vivas, S. Pérez Ortega & M. Arróniz	2100 m (T2-21Lh)	N 40°15'03" O 5°15'12,7"	1700 m (T2-17Lp)	N 40°14'11" O 5°14'10"
		1950 m (T2-20Lh)	N 40°14'57" O 5°14'37"	1480 m (T2-15Lp)	N 40°13'31" O 5°14'15"
		1800 m (T2-18Lh)	N 40°14'29" O 5°14'28"	1335 m (T2-13Lp)	N 40°13'13" O 5°14'4"
		1700 m (T2-17Lh)	N 40°14'11" O 5°14'10"	1100 m (T2-11Lp)	N 40°12'46" O 5°13'57"
		1480 m (T2-15Lh)	N 40°13'31" O 5°14'15"	910 m (T2-9Lp)	N 40°12'51" O 5°14'28"
		1335 m (T2-13Lh)	N 40°13'13" O 5°14'04"		
3	15-16/07/2010 M. Vivas & J. Palá	2110 m (T3-21Lh)	N 40°15'48" O 5°10'23"	1720 m (T3-17Lp)	N 40°15'25" O 5°10'18"
		1940 m (T3-19Lh)	N 40°15'38" O 5°10'20"	1450 m (T3-15Lp)	N 40°14'58" O 5°10'1"
		1720 m (T3-17Lh)	N 40°15'25" O 5°10'18"	1380 m (T3-14Lp)	N 40°14'44" O 5°9'55"
				1140 m (T3-11Lp)	N 40°14'11" O 5°9'43"
				900 m (T3-9Lp)	N 40°13'21" O 5°8'5"

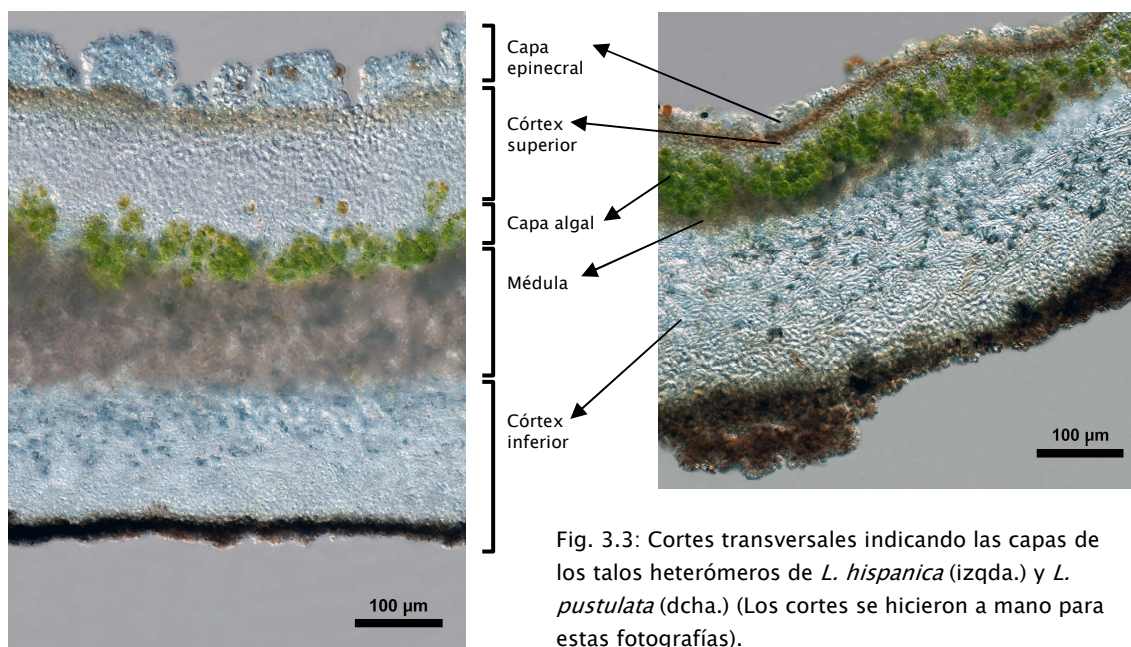
Tabla 3.1: Fecha, recolectores y coordenadas de cada punto de muestreo. El código de nomenclatura de los puntos es Tn-mx, donde n indica el número del transecto, de oeste a este, m la altitud en hectómetros y x codifica la especie: Lh para *L. hispanica* y Lp para *L. pustulata*.

### Tamaño y fertilidad de los talos

Medimos el diámetro de 100 talos de cada especie de *Lasallia* presente en cada localidad y, en el caso de *L. hispanica*, también contamos el número de apotecios en esos 100 talos. No encontramos ningún talo fértil de *L. pustulata*.

### Medidas anatómicas

Seleccionamos cinco talos de cada localidad e hicimos cinco cortes transversales en cada uno de ellos para medir el grosor total del talo y de cada una de sus capas (capa epinecral, córtex superior, capa algal, médula y córtex inferior; Fig. 3.3). En el caso de *L. hispanica* también medimos la longitud y anchura de 10 esporas en cada uno de los cinco cortes transversales de apotecio hechos en muestras de cada punto de recolección. Los cortes transversales se hicieron con un microtomo de congelación Slee MTC (Maguncia). Las secciones, de 15  $\mu\text{m}$  de grosor, se obtuvieron a partir de talos y apotecios hidratados con agua desionizada durante 4 horas, y se congelaron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  dentro del microtomo. Los cortes se montaron, se observaron y midieron en agua. Las fotografías de la Fig. 3.3 se tomaron de cortes hechos a mano con una cuchilla bajo una lupa binocular Nikon SMZ 1500, a 50 aumentos. Se montaron en agua y se fotografiaron con una cámara Nikon DS-Fi1+DS-L1 acoplada a un microscopio de campo claro Nikon Eclipse 80i, utilizando contraste de fases interdifereencial Nomarski, a 200 aumentos. Se tomaron varias fotos de cada corte y se combinaron posteriormente con el programa informático libre Combine ZP (Hadley, 2010). Estas fotografías se realizaron gracias a la amable ayuda del Dr. Víctor J. Rico (UCM).



### Medidas de intercambio gaseoso

Los talos se reactivaron durante tres días en una cámara a  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$  con un fotoperiodo de 12h en oscuridad/12 h a  $100\text{ }\mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  de luz fotosintéticamente activa (PPFD), y pulverizando con agua mineral una vez al día. Las



medidas de intercambio gaseoso se llevaron a cabo con un sistema compacto de minicubeta CMS 400 (Walz, Effeltrich, Alemania) y un analizador de gases infrarrojo IRGA (Binos 100, Leybold-Heraeus, Alemania) bajo condiciones controladas de temperatura, humedad e irradiación, y a la concentración de CO<sub>2</sub> ambiental (350 ppm, aprox.). Se puede encontrar una descripción completa de este método en Schroeter *et al.* (1994). Antes de las medidas, los líquenes se hidrataron completamente pulverizándolos con agua mineral hasta la saturación y se retiró el exceso de agua suavemente con un papel absorbente. Se hicieron curvas de respuesta a la luz a 15 °C con cada población recolectada, obteniendo un valor de respiración en oscuridad inicial (RO), manteniendo la muestra sin luz hasta que se alcanzaba un valor estable y, en ese momento, se iba incrementando la PPFD consecutivamente desde 25 hasta 1500  $\mu\text{moles de fotones} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  (25, 50, 100, 200, 400, 800, 1200 y 1500). Además, en algunas poblaciones seleccionadas en cada transecto, se hacían curvas de luz suplementarias a 5, 10, 20 y 25 °C y el mismo régimen lumínico, excepto en el caso de las muestras T2-9Lp, que se midieron a 0, 10, 20 y 30 °C. Antes y después de cada serie de medidas, los talos se pesaron para determinar el contenido de agua del talo en función del peso seco. Las tasas se calcularon por unidad de peso seco, de superficie y de clorofila, mediante las ecuaciones de von Caemmerer & Farquhar (1981). Las curvas de respuesta a la luz se analizaron mediante un ajuste estadístico a una función de Smith, según se detalla en Green *et al.* (1997). Este ajuste nos proporciona los siguientes parámetros: P<sub>c</sub> (punto de compensación de luz, PPF<sub>S</sub> a la que la fotosíntesis neta (FN) es 0, es decir, la fotosíntesis bruta compensa la respiración en oscuridad), P<sub>s</sub> (punto de saturación de luz, calculado como la PPF<sub>D</sub> a la que se alcanza el 90% de la máxima fotosíntesis neta medida, Amáx) y  $\Phi$  (rendimiento cuántico aparente para la luz incidente, que es la pendiente primaria de la curva de respuesta a la luz). También calculamos el coeficiente de eficiencia fotosintética, KF, como  $KF = (Amáx + RO) / RO$  (Larcher, 1995). La temperatura óptima y los puntos de compensación superior e inferior (T<sub>cs</sub> y T<sub>ci</sub> respectivamente, es decir, los valores de temperatura a los que la FN es igual a 0, de manera que no se alcanza compensación a temperaturas más bajas que el T<sub>ci</sub> ni más altas que el T<sub>cs</sub>) se calcularon mediante el ajuste de las curvas de respuesta a la temperatura a funciones polinómicas de segundo grado.

Tras las medidas de intercambio gaseoso se determinó la superficie de las muestras cuando los talos estaban húmedos y completamente expandidos, haciendo una fotografía y analizándola con el software libre ImageJ 1.42q (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA). Todas las muestras se secaron entonces en gel de sílice durante 72 horas y se determinó su peso seco con una precisión de décima de miligramo. A partir de ello, se calculó el índice de peso específico (IPE, en  $\text{g m}^{-2}$ ) de cada muestra.

### **Análisis subcelulares**

Los talos utilizados para las medidas de intercambio gaseoso se usaron también para el análisis de pigmentos según el método de Barnes *et al.* (1992). Las muestras se lavaron repetidas veces con acetona saturada con carbonato cálcico para eliminar las

sustancias liquénicas, que pueden interferir con la medida, y los pigmentos se extrajeron con dimetil sulfóxido (DMSO) saturado con CaCO<sub>3</sub>. La absorbancia de los extractos se midió con un espectrofotómetro UV-visible (Uvikon XL, NorthStar Scientific, Reino Unido). La turbidez se comprobó a 750 nm y sólo se tuvieron en cuenta las muestras con un valor menor de 0'010 unidades de absorbancia. Otras longitudes de onda medidas fueron 664'9, 648'2, 480, 435 y 415 nm, y los valores obtenidos se utilizaron para calcular las concentraciones (expresadas en µg mg<sup>-1</sup> de peso seco) de clorofilas *a* y *b* (**Chl*a*** y **Chl*b***) y carotenos totales (**Car**) con las ecuaciones propuestas por Barnes *et al.* (1992) y Wellburn (1994). La degradación de la clorofila se calculó con la proporción entre absorbancia a 435 nm y a 415 nm, según Ronen & Galun (1984). Otro conjunto de muestras se utilizó para llevar a cabo el análisis de quitina, ergosterol, aminoácidos, azúcares, ácido girofórico y C/N. Para ello, los talos se molieron hasta convertirlos en un polvo homogéneo poco antes de analizarlos. La Chl*a* se utilizó como marcador de las células de fotobionte (Raven 1992; Enríquez *et al.* 1996). Para evaluar la masa fúngica total se midió la quitina, y el ergosterol (Erg) se valoró como indicador de la biomasa fúngica, pues es el esteroil más abundante en la membrana plasmática de los hongos (Weete, 1973; Palmqvist *et al.*, 2002). Esta molécula se ha utilizado como marcador de la actividad metabólica fúngica en asociaciones micorrizógenas con plantas (Ekblad & Näsholm, 1996; Ekblad *et al.*, 1998) así como en líquenes (Palmqvist *et al.*, 1998, 2002; Gaio-Oliveira *et al.*, 2004). Tanto la quitina como el ergosterol se cuantificaron mediante HPLC, según Dahlman *et al.* (2001). Brevemente, se mezclaron 20 mg de líquen pulverizado con 1 ml de etanol, se agitó la mezcla vigorosamente en un vórtex y se incubó en agitación durante 30 min. a 5 °C. Tras centrifugar (14.000 rpm, 15 min.) se determinó el Erg en el sobrenadante mediante un cromatógrafo Waters (Milford, EEUU) con una columna ODS-ultra sphere (250 mm de longitud x 4'6 mm de diámetro interno, tamaño de partícula 5 µm) para la separación de las moléculas y en una elución isocrática con 100% de metanol como fase móvil. Todo el proceso tuvo lugar en oscuridad para evitar la degradación del compuesto. Se midió la absorción del Erg a 280 nm mediante un detector UV. Los datos se corrigieron para un rendimiento de extracción del 80% (Dahlman *et al.*, 2001). La quitina se midió en el precipitado que quedó tras la extracción de Erg. Se comprobó que no hubiera pérdida de quitina durante ese proceso comparando el contenido con el de algunas muestras en las que no se extrajo previamente el Erg (datos no mostrados). Las muestras se lavaron con NaOH 0'2 M para eliminar los aminoácidos y proteínas que pueden interferir con la medida. Se realizó una hidrólisis ácida en HCl 6M para liberar los residuos de glucosamina, que se convirtieron en derivados fluorescentes al tratarlos con 9-fluorenilmetilcloroformato (FMOC), y fueron entonces analizados por HPLC de fase reversa mediante elución en gradiente. Los datos se corrigieron para un rendimiento de extracción del 83% (Dahlman *et al.*, 2001; Ekblad & Näsholm, 1996).

### **Análisis de Carbono y Nitrógeno, Aminoácidos, Azúcares y ácido Girofórico**

Estos análisis se realizaron mediante los mismos procedimientos descritos en el Capítulo 2.

### **Modelado de nicho**

El modelo de máxima entropía ejecutado por el programa MaxEnt v.3.3.3 (Phillips *et al.*, 2004, 2006) se utilizó para componer el nicho ambiental de *Lasallia hispanica* y *L. pustulata*, estimados a partir de datos de sólo presencia. El nicho de la especie se modelizó utilizando su distribución conocida y las siguientes variables ambientales: precipitación y temperatura anuales, precipitación en el mes más seco y estacionalidad en la temperatura. Edith *et al.* (2006) mostraron que MaxEnt es un programa más fiable que otros basados en datos de sólo presencia. Estos datos de presencia se descargaron de la base GBIF, donde había 23 registros georreferenciados para *Lasallia hispanica* y 79 para *L. pustulata*. Algunos se tuvieron que eliminar por estar incompletos y las localidades utilizadas en este estudio, además de otras recolecciones propias, se añadieron también, resultando en un total de 61 y 74 datos respectivamente. Los análisis se llevaron a cabo del mismo modo que en el capítulo anterior, aunque únicamente con las condiciones ambientales actuales.

### **Análisis estadístico**

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa informático libre R 2.10.0 (R Development Core Team, 2009), con la ayuda adicional de las librerías multcomp (Hothorn *et al.*, 2008), Hmisc (Harrell, 2012) y FactoMineR (Lê *et al.*, 2008). Se realizaron ANOVAs seguidos por el análisis *a posteriori* Tukey HSD con el objeto de comprobar las diferencias dentro de cada especie. Se realizaron análisis mediante la *t* de Student para establecer las diferencias entre las dos especies. Se elaboraron matrices de correlación (basadas en coeficientes de correlación de Pearson) para observar las relaciones entre las variables. Algunas de esas relaciones se representaron gráficamente y se ajustaron por regresión lineal simple. Se llevaron a cabo Análisis de Componentes Principales (ACP) para agrupar las variables. Los gráficos de intercambio gaseoso, los ajustes a la función de Smith y los gráficos de los componentes subcelulares se hicieron con SigmaPlot 10.0 (Chicago, Illinois, EEUU). Los gráficos de los ACPs se obtuvieron en R.

## **RESULTADOS**

### **Medidas de intercambio de CO<sub>2</sub>**

Uno de nuestros objetivos era caracterizar el comportamiento fotosintético de estas dos especies de *Lasallia* presentes en la Península Ibérica a lo largo de un gradiente altitudinal. Con este propósito medimos la fotosíntesis neta bajo diferentes condiciones experimentales. Los resultados se muestran en las Figs. 3.4 a 3.15.

Aunque la tasa absoluta cambia, es digno de mención que la temperatura óptima para la fotosíntesis fue la misma a lo largo de los transectos altitudinales (Figs. 3.5, 3.7, 3.9, 3.11, 3.13, 3.15, Tablas 3a.2, 3a.4, 3a.6, 3a.8, 3a.10, 3a.12, en el Apéndice 3).

Los resultados del primer transecto de *Lasallia hispanica* se muestran en las Figs. 3.4 y 3.5. Las poblaciones T1-22Lh, T1-18Lh y T1-15Lh (de 2200, 1800 y 1500

m.s.n.m.) se estudiaron en detalle, haciendo curvas de respuesta a la luz a 5 temperaturas. Mostraron un comportamiento similar y un incremento esperado en RO y punto de compensación de luz (Pc) con la temperatura. T1-22Lh y T1-15Lh tenían tasas muy parecidas, mientras que T1-18Lh tenía tasas más altas a todas las temperaturas. La diferencia principal residía en la respuesta de T1-18Lh a 25 °C, que estaba fuertemente influenciada por la alta RO. Este descenso puede verse también en las curvas de respuesta a la temperatura de estas tres poblaciones (Fig. 3.5). La curva de T1-18Lh es mucho más pronunciada, lo que refleja la mayor variación de los valores de Amáx con la temperatura. Por esta razón, Tci y Tcs no difieren mucho entre poblaciones, aunque el área total bajo la curva es obviamente mucho mayor para T1-18Lh (Tabla 3a.2). La respuesta fotosintética a la luz a 15 °C para todos los puntos de muestre del primer transecto se representan también en la Fig. 3.4, donde podemos ver tasas parecidas para T1-22Lh, T1-22Lh y T1-15Lh, mientras que T1-18Lh muestra tasas más altas y mayores valores de eficiencia,  $\Phi$  (Tabla 3a.1).

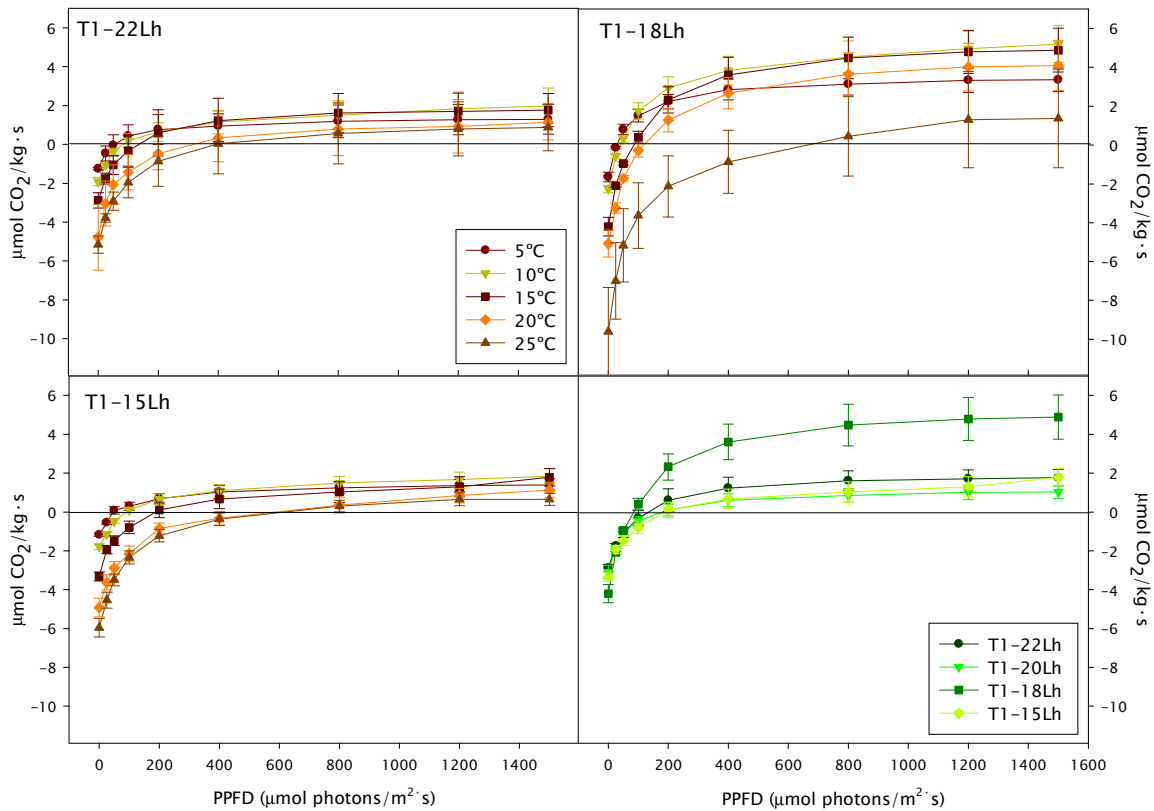


Fig. 3.4: Curvas de respuesta a la luz del intercambio gaseoso de muestras de *Lasallia hispanica* del primer transecto a distintas temperaturas, tasas por peso seco. Arriba izqda.: T1-22Lh; arriba dcha.: T1-18Lh y abajo izqda.: T1-15Lh. Abajo dcha.: Curvas de luz de todas las muestras del primer transecto a 15°C.

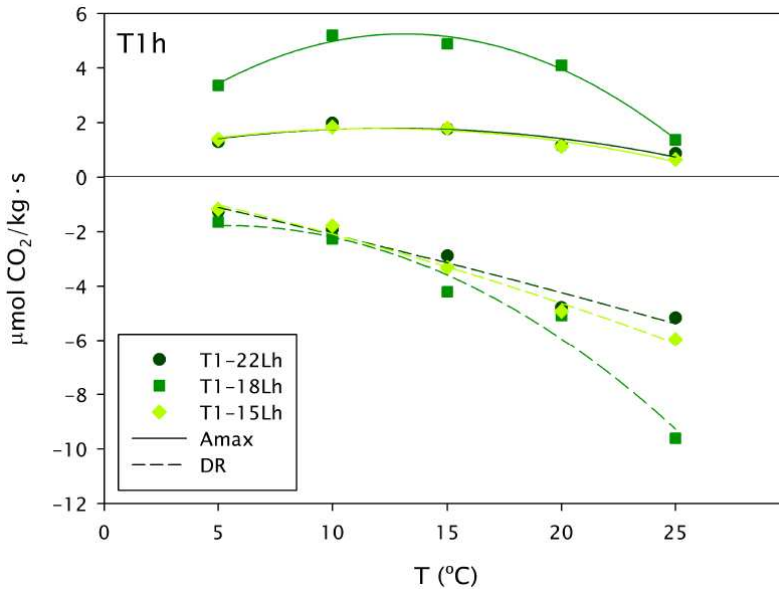


Fig. 3.5: Curvas de respuesta a la temperatura de las muestras de *Lasallia hispanica* del primer transecto, tasas por peso seco. Amax (líneas continuas, fotosíntesis neta a 1500  $\mu\text{mol}$  fotones  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y RO (líneas discontinuas, respiración en oscuridad, a 0  $\mu\text{mol}$  fotones  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) a todas las temperaturas de medida. Los datos se ajustaron a una parábola ( $r^2 > 0.95$ ).

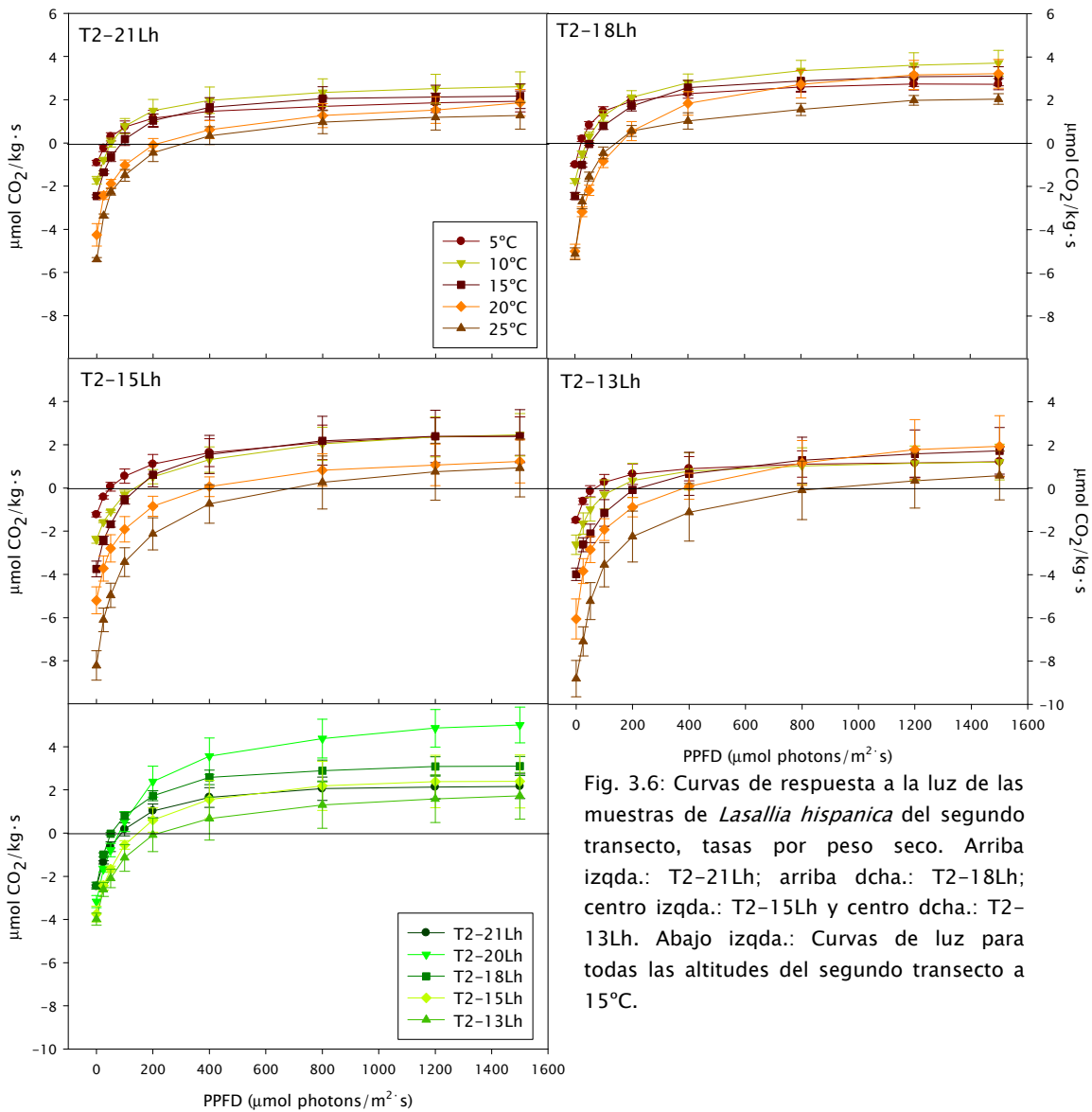


Fig. 3.6: Curvas de respuesta a la luz de las muestras de *Lasallia hispanica* del segundo transecto, tasas por peso seco. Arriba izqda.: T2-21Lh; arriba dcha.: T2-18Lh; centro izqda.: T2-15Lh y centro dcha.: T2-13Lh. Abajo izqda.: Curvas de luz para todas las alturas del segundo transecto a 15°C.



Las Figs. 3.6 y 3.7 y la Tabla 3a.3 muestran los resultados del segundo transecto. En este caso, medimos cuatro poblaciones en detalle: T2-21Lh, T2-18Lh, T2-15Lh y T2-13Lh (de 2100, 1800, 1480 y 1335 m respectivamente). Las dos más bajas, T2-15Lh y T2-13Lh muestran una mayor respuesta de la RO a la temperatura. No hay grandes diferencias en Tci, Tcs o área, pero la temperatura óptima para Amáx aumenta con el descenso de altitud. La comparación de las curvas de luz para todas las poblaciones del segundo transecto a 15 °C muestra que la que tiene una mayor eficiencia cuántica,  $\Phi$ , es T2-20Lh (1950 m), que se destaca claramente.

En el tercer transecto sólo pudimos recoger tres poblaciones (Figs. 3.8 y 3.9), de las que dos fueron medidas a 5 temperaturas: T3-21Lh y T3-17Lh (2110 y 1720 m, respectivamente). Sus respuestas a la temperatura fueron muy parecidas (Figs 3.8 y 3.9), pero T3-21Lh siempre mostraba tasas más altas, así como menor Tci, mayor Tcs y mayor área bajo la curva. Las curvas de respuesta a la luz de las tres poblaciones mostraban un comportamiento similar a 15 °C.

Los resultados de Amáx por peso y por superficie de los tres transectos juntos se ajustaron a una parábola, que mostró una altitud óptima a 1800 m aprox., con valores en descenso más arriba y más abajo. La RO también mostró una tendencia significativa, lineal en este caso, a descender (valores menos negativos) con el incremento de altitud, cuando la tasa se calculó en función de peso seco. Esta tendencia desaparecía en el cálculo de las tasas por superficie (Fig. 3a.32, en el Apéndice 3).

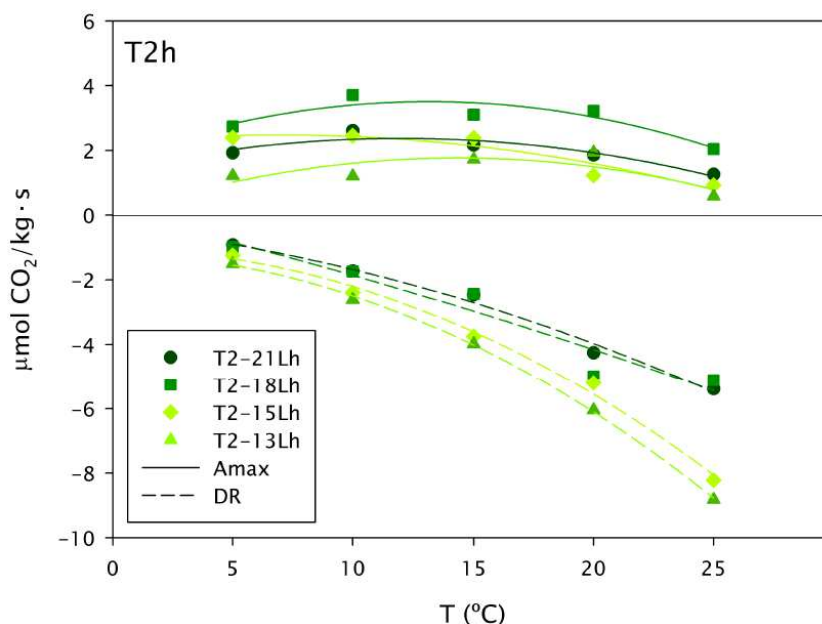


Fig. 3.7: Curvas de respuesta a la temperatura de las muestras de *Lasallia hispanica* del segundo transecto, tasas por peso seco. Amáx (líneas continuas, fotosíntesis neta a 1500  $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y RO (líneas discontinuas, respiración en oscuridad, a 0  $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) a todas las temperaturas de medida. Los datos se ajustaron a una parábola ( $r^2 > 0.95$ ).

Los resultados de las medidas de intercambio gaseoso para *L. pustulata* se muestran en las Figs. 3.10 a 3.15 y las Tablas 3a.7 a 3a.12. En el primer transecto se midieron tres poblaciones en detalle: T1-17Lp, T1-12Lp y T1-9Lp (1700, 1200 y 850 m, respectivamente). Sus respuestas a la temperatura fueron bastante parecidas, así como su T<sub>opt</sub>, pero T1-12Lp mostró tasas mucho menores a todas las temperaturas, su rango entre T<sub>ci</sub> y T<sub>cs</sub> era más estrecho y el área bajo la curva menor. Sin embargo,

las tasas de RO eran casi idénticas para las tres poblaciones. Cuando se comparan las curvas de luz a 15 °C para las cinco poblaciones de este transecto (Fig. 3. 10) se puede observar que la respuesta de T1-14Lp es parecida a la de T1-12Lp, en lo que respecta a Amáx y  $\Phi$ , mientras que T1-10Lp se comporta de manera parecida a T1-17Lp y T1-9Lp, aunque con un valor de Amáx ligeramente superior.

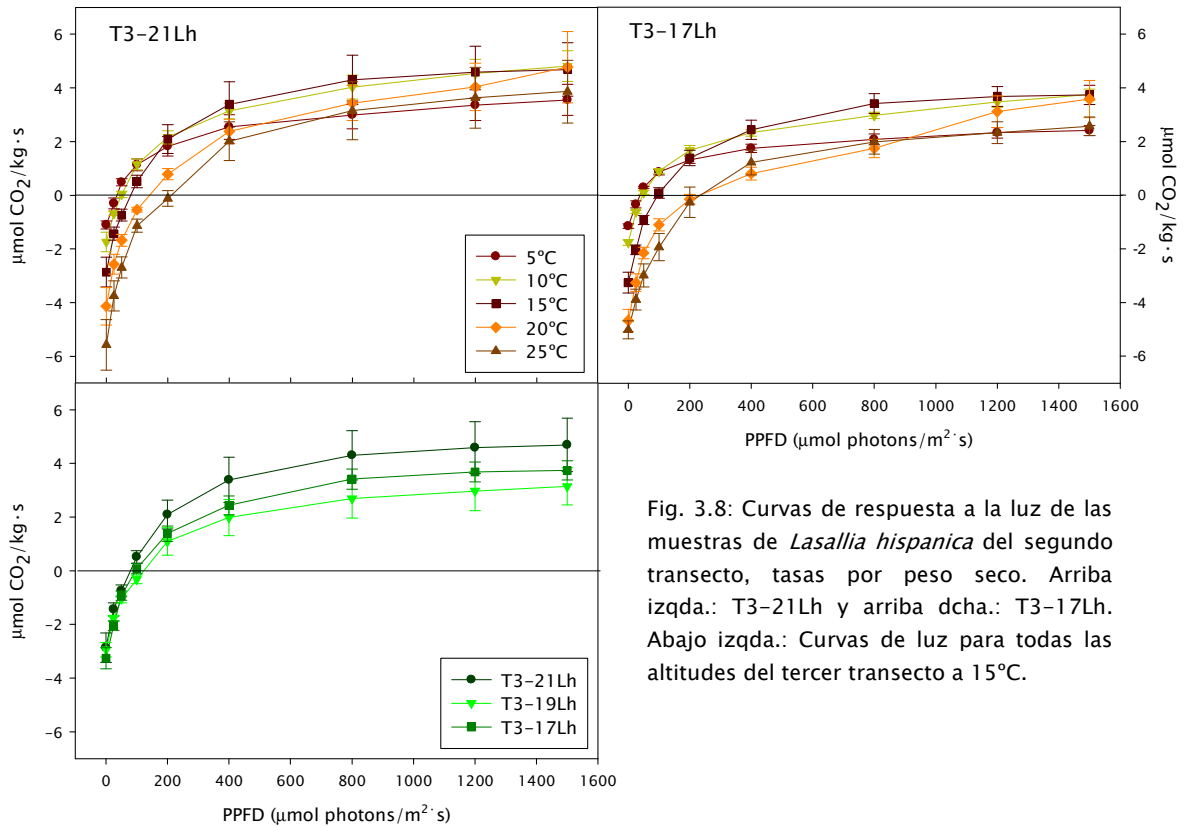


Fig. 3.8: Curvas de respuesta a la luz de las muestras de *Lasallia hispanica* del segundo transecto, tasas por peso seco. Arriba izqda.: T3-21Lh y arriba dcha.: T3-17Lh. Abajo izqda.: Curvas de luz para todas las altitudes del tercer transecto a 15°C.

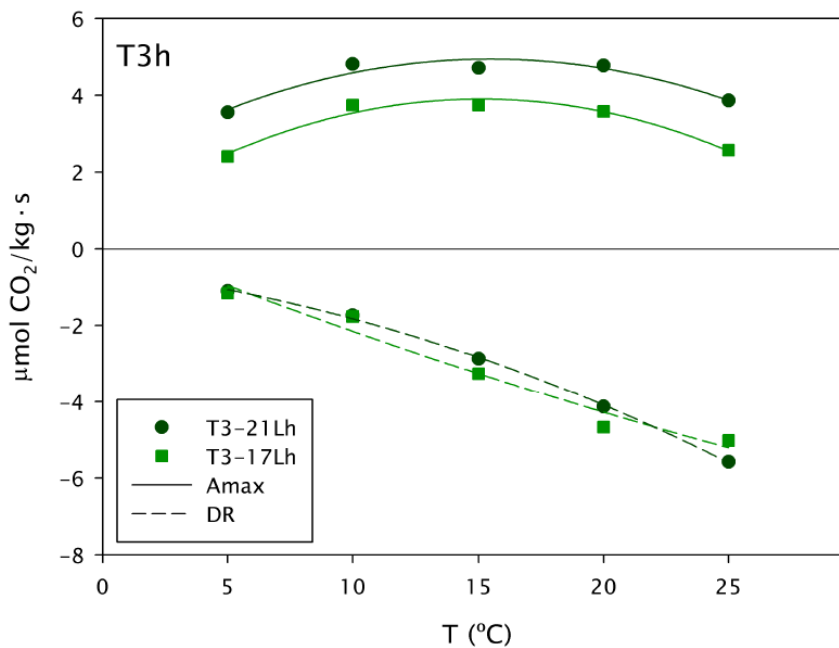


Fig. 3.9: Curvas de respuesta a la temperatura de las muestras de *Lasallia hispanica* del tercer transecto, tasas por peso seco. Amáx (líneas continuas, fotosíntesis neta a 1500  $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y RO (líneas discontinuas, respiración en oscuridad, a 0  $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) a todas las temperaturas de medida. Los datos se ajustaron a una parábola ( $r^2 > 0.95$ ).

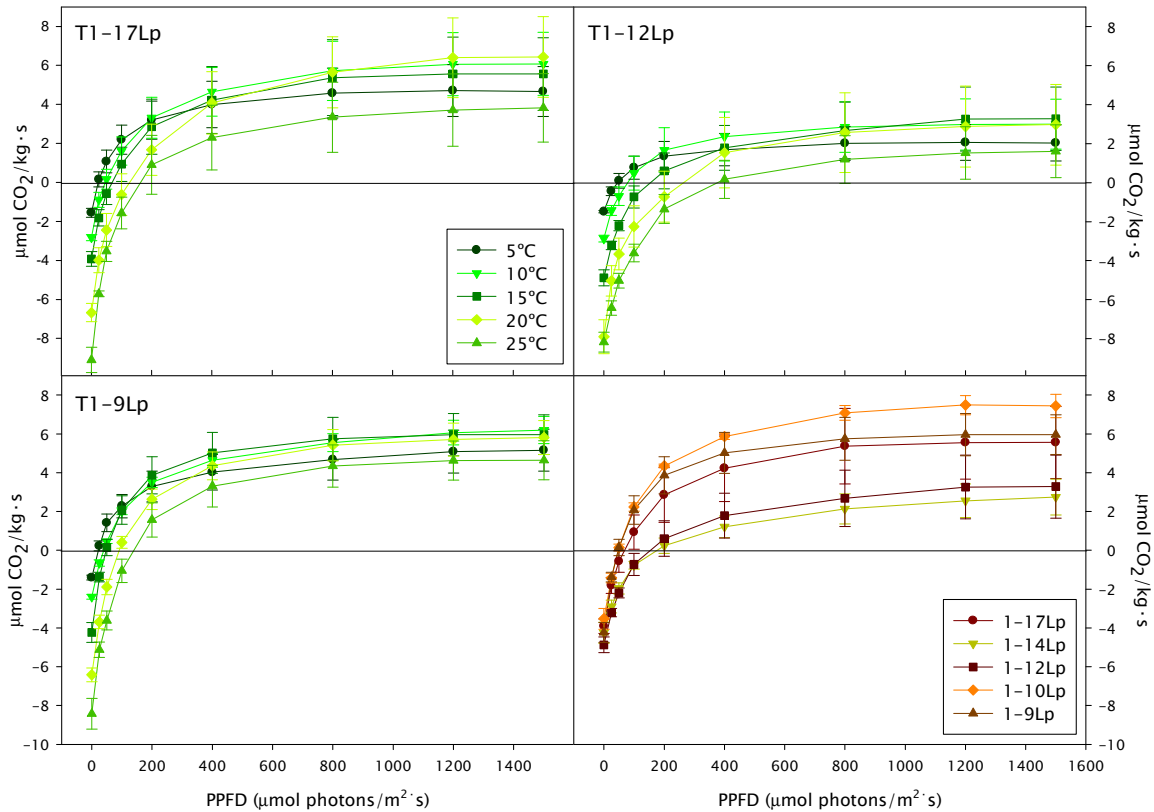


Fig. 3.10: Curvas de respuesta a la luz de las muestras de *Lasallia pustulata* del primer transecto, tasas por peso seco. Arriba izqda.: T1-17Lp; arriba dcha.: T1-12Lp y abajo izqda.: T1-9Lp. Abajo dcha.: Curvas de luz para todas las altitudes del primer transecto a 15°C.

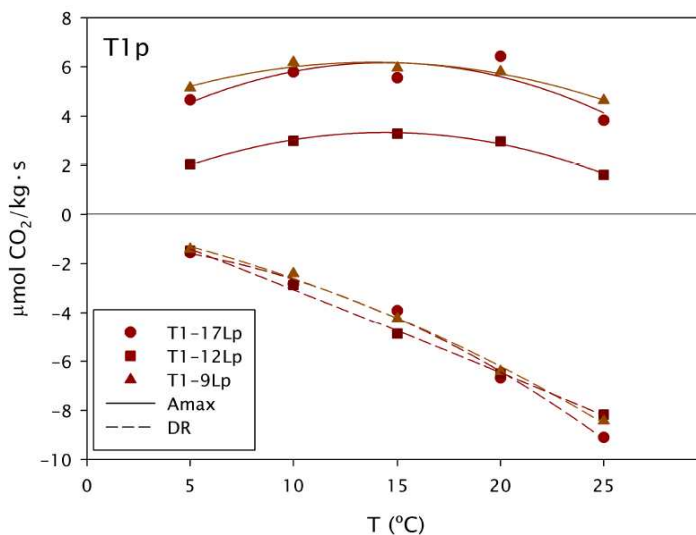


Fig. 3.11: Curvas de respuesta a la temperatura de las muestras de *Lasallia pustulata* del primer transecto, tasas por peso seco.  $A_{\text{max}}$  (líneas continuas, fotosíntesis neta a  $1500 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) y RO (líneas discontinuas, respiración en oscuridad, a  $0 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) a todas las temperaturas de medida. Los datos se ajustaron a una parábola ( $r^2 > 0.95$ ).

En el segundo transecto (Figs. 3.12 y 3.13 y Tablas 3a.9 y 3a.10), las poblaciones T2-17Lp y T2-13Lp (1700 y 1335 m respectivamente), se midieron a 5, 10, 15, 20 y 25  $^{\circ}\text{C}$ , mientras que T2-9Lp (910 m) se midió a 0, 10, 20 y 30  $^{\circ}\text{C}$ . T2-9Lp se comporta de manera muy diferente. Su productividad es mayor a todas las temperaturas (Fig. 3.13) y el rango de temperatura en el que alcanza FN es mayor. De hecho, T2-17Lp apenas alcanza FN a 20  $^{\circ}\text{C}$  y no compensa para nada a 25  $^{\circ}\text{C}$ , mientras que T2-13Lp sólo es capaz de compensar la RO a 5 y 10  $^{\circ}\text{C}$ . Obviamente, el área efectiva bajo la curva es mucho mayor para T2-9Lp. Esta población muestra también un valor mayor

de  $T_{opt}$ . Al comparar las curvas de respuesta a la luz a 15 °C se observa una gran diferencia entre el grupo que contiene T2-17Lp a T2-11Lp y los valores de T2-9Lp, aunque el último se midió a 10 °C, lo que quiere decir que su tasa a 15 °C hubiera sido incluso mayor, teniendo en cuenta su  $T_{opt}$ .

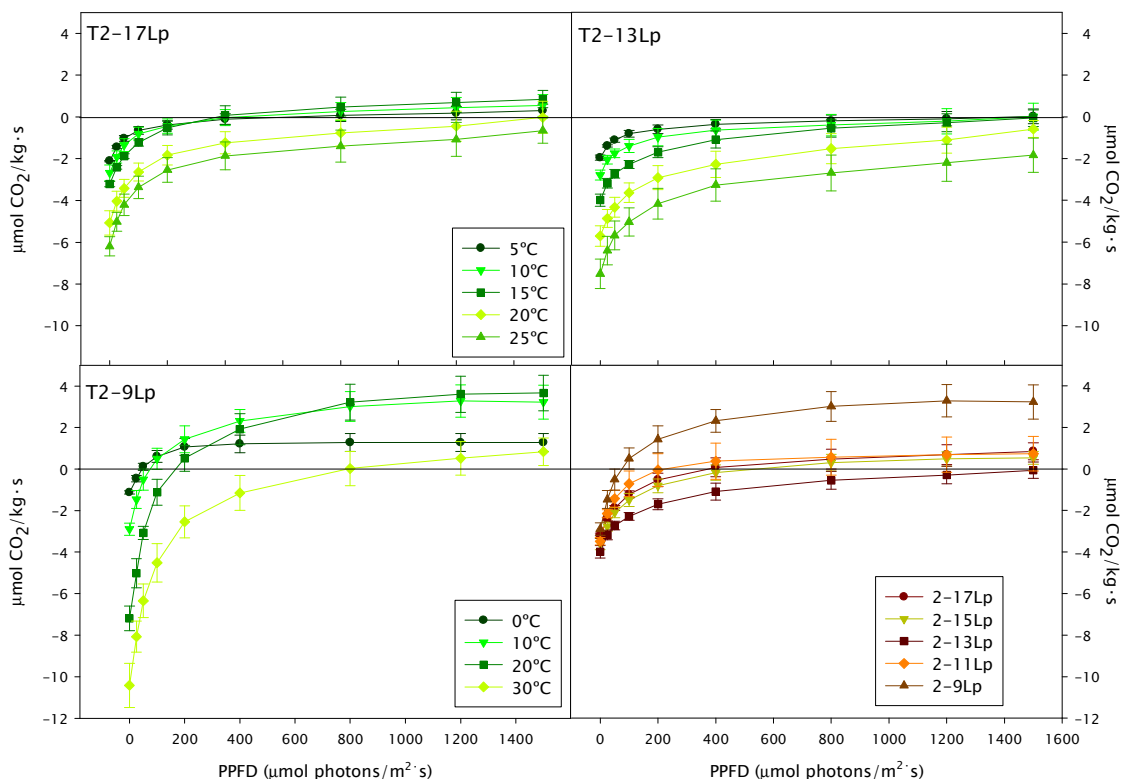


Fig. 3.12: Curvas de respuesta a la luz de las muestras de *Lasallia pustulata* del segundo transecto, tasas por peso seco. Arriba izqda.: T2-17Lp; arriba dcha.: T2-13Lp y abajo izqda.: T2-9Lp. Abajo dcha.: Curvas de luz de todas las altitudes muestreadas en el segundo transecto a 15 °C, con excepción de T2-9Lp, cuya curva se midió a 10 °C.

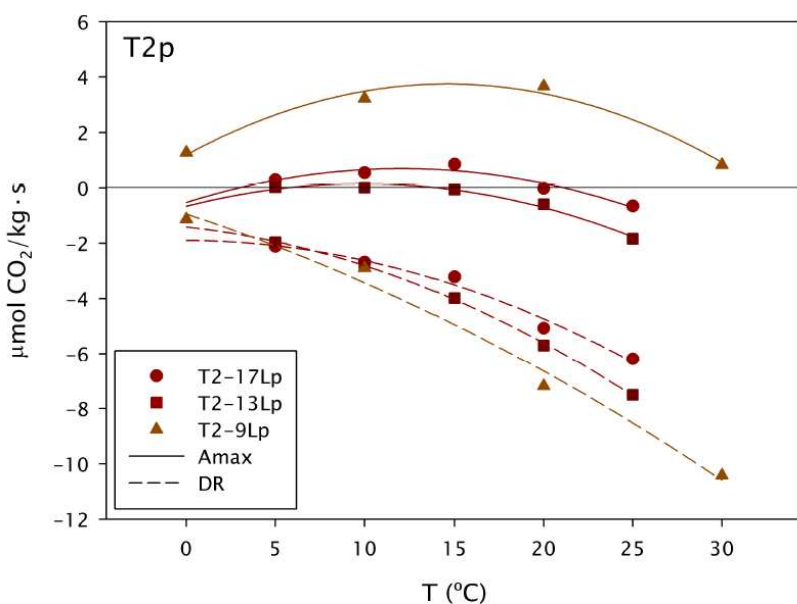


Fig. 3.13: Curvas de respuesta a la temperatura de las muestras de *Lasallia pustulata* del segundo transecto, tasas por peso seco. Amáx (líneas continuas, fotosíntesis neta a 1500  $\mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y RO (líneas discontinuas, respiración en oscuridad, a 0  $\mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) a todas las temperaturas de medida. Los datos se ajustaron a una parábola ( $r^2 > 0.95$ ).

Para el tercer transecto (Figs. 3.14 y 3.15, Tablas 3a.11 y 3a.12), aunque recogimos muestras de cinco puntos, como en el caso de *L. hispanica*, sólo pudimos

hacer medidas de intercambio gaseoso en tres poblaciones, porque no encontramos más con suficiente número de individuos. De esas tres poblaciones, T3-14Lp y T3-9Lp (1350 y 900 m respectivamente) se analizaron en detalle. Su comportamiento es similar a bajas temperaturas, pero difiere ligeramente a 20 y 25 °C, T2-13Lp siempre mostraba tasas más altas y una Tcs mayor. Cuando T3-11Lp (1140 m) se añade a la gráfica de la respuesta a la luz a 15 °C, se puede ver que esta población tiene mayores valores de RO, FN y  $\Phi$  que las otras.

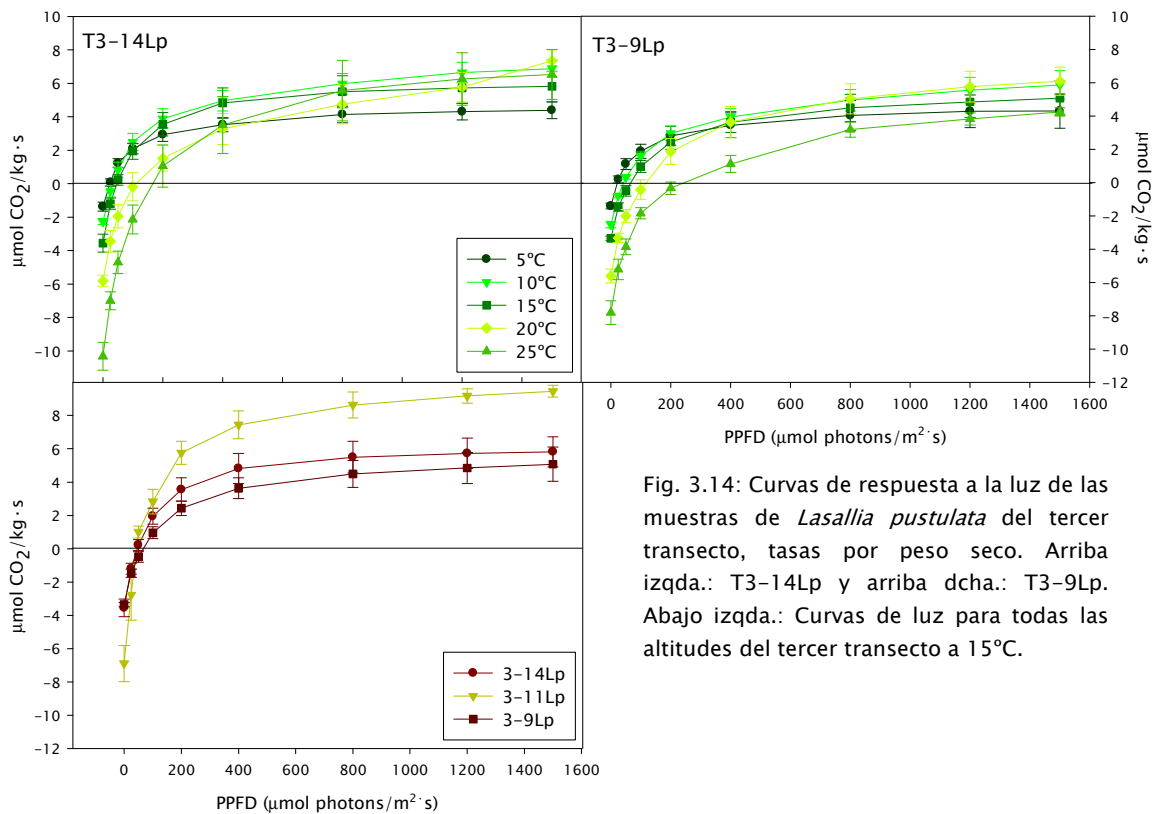


Fig. 3.14: Curvas de respuesta a la luz de las muestras de *Lasallia pustulata* del tercer transecto, tasas por peso seco. Arriba izqda.: T3-14Lp y arriba dcha.: T3-9Lp. Abajo izqda.: Curvas de luz para todas las altitudes del tercer transecto a 15°C.

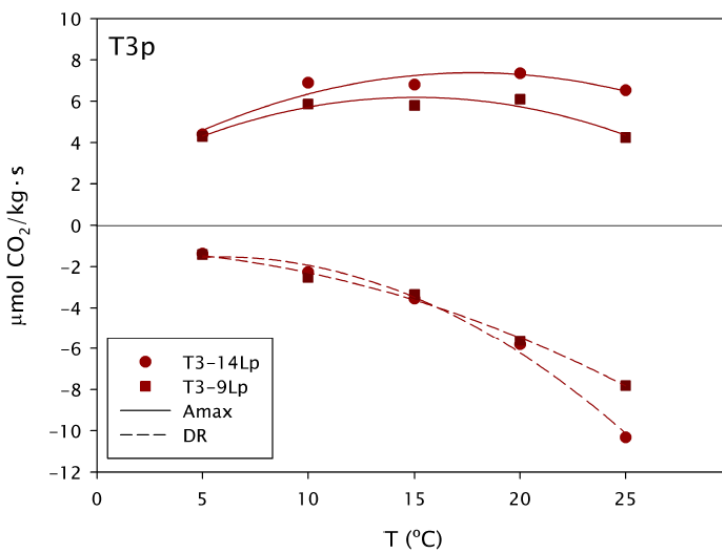


Fig. 3.15: Curvas de respuesta a la temperatura de las muestras de *Lasallia pustulata* del tercer transecto, tasas por peso seco. Amáx (líneas continuas, fotosíntesis neta a 1500  $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y RO (líneas discontinuas, respiración en oscuridad, a 0  $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) a todas las temperaturas de medida. Los datos se ajustaron a una parábola ( $r^2 > 0.95$ ).

La Fig. 3.16 muestra el coeficiente de eficiencia KF para todas las poblaciones (los valores numéricos están en las Tablas 3a.1 a 3a.11). En la mayoría de los casos, KF es máximo a bajas temperaturas y disminuye con el aumento de éstas.

En el Apéndice 3 (Figs. 3a.1 y 3a.2) se muestra una comparación ente ambas especies a altitudes similares. *L. hispanica* muestra siempre un valor de KF menor que *L. pustulata* en el primer transecto (Fig. 3a.1), pero la diferencia no es estadísticamente significativa. Por el contrario, cuando se comparan los resultados obtenidos para el transecto 2, el patrón se invierte, y *L. hispanica* muestra valores mayores de KF que *L. pustulata*, con diferencias significativas entre T2-18Lh y T2-17Lp (Fig. 3a.2). Amás se compara de la misma manera en las Figs. 3a.3 y 3a.4).

### **Tamaño y fertilidad de los talos**

Como se muestra en la Fig. 3.17, no encontramos relación entre la altitud y el número de apotecios en *L. hispanica*. Del mismo modo, tampoco se encontró relación entre el tamaño del talo y la altitud para ninguna de las dos especies (Figs. 3.17 y 3.18).

### **Medidas anatómicas**

Los talos de *L. hispanica* del primer y tercer transectos mostraron un descenso general del grosor de todas las capas hacia altitudes mayores (Fig. 3.19). Sin embargo, en el segundo transecto la tendencia era opuesta. Estos cambios fueron estadísticamente significativos en muchos casos (Figs. 3a.5 a 3a.7). El tamaño de las esporas era menor tanto en anchura como en longitud a 2000 m en los tres transectos, pero no había una respuesta clara a la altitud (Fig. 3.20).

*L. pustulata* en el primer transecto mostraba tendencia a tener talos más gruesos en zonas más bajas (Fig. 3.21) y el grosor total del talo se correlacionaba negativa y significativamente con la altitud. Con la excepción de la capa algal, las correlaciones entre todas las capas y la altitud eran negativas, aunque de manera significativa sólo en el caso de la médula y el córtex inferior (Fig. 3a.10). Los resultados fueron muy uniformes a lo largo del segundo transecto, sin mostrar correlaciones con la altitud (Fig. 3a.11) y, en el tercer transecto se encontró una tendencia a tener capas más delgadas en zonas más bajas, con la excepción del punto más bajo, que mostró un grosor mayor de lo esperado (Fig. 3a.12).

Las medidas anatómicas de ambas especies de *Lasallia* no mostraban una tendencia clara con respecto a la altitud (Figs. 3.19 a 3.21 y 3a.5 a 3a.12) y las diferencias encontradas en el grosor del talo y sus capas dependen más probablemente de las condiciones concretas de cada punto que de su altitud.

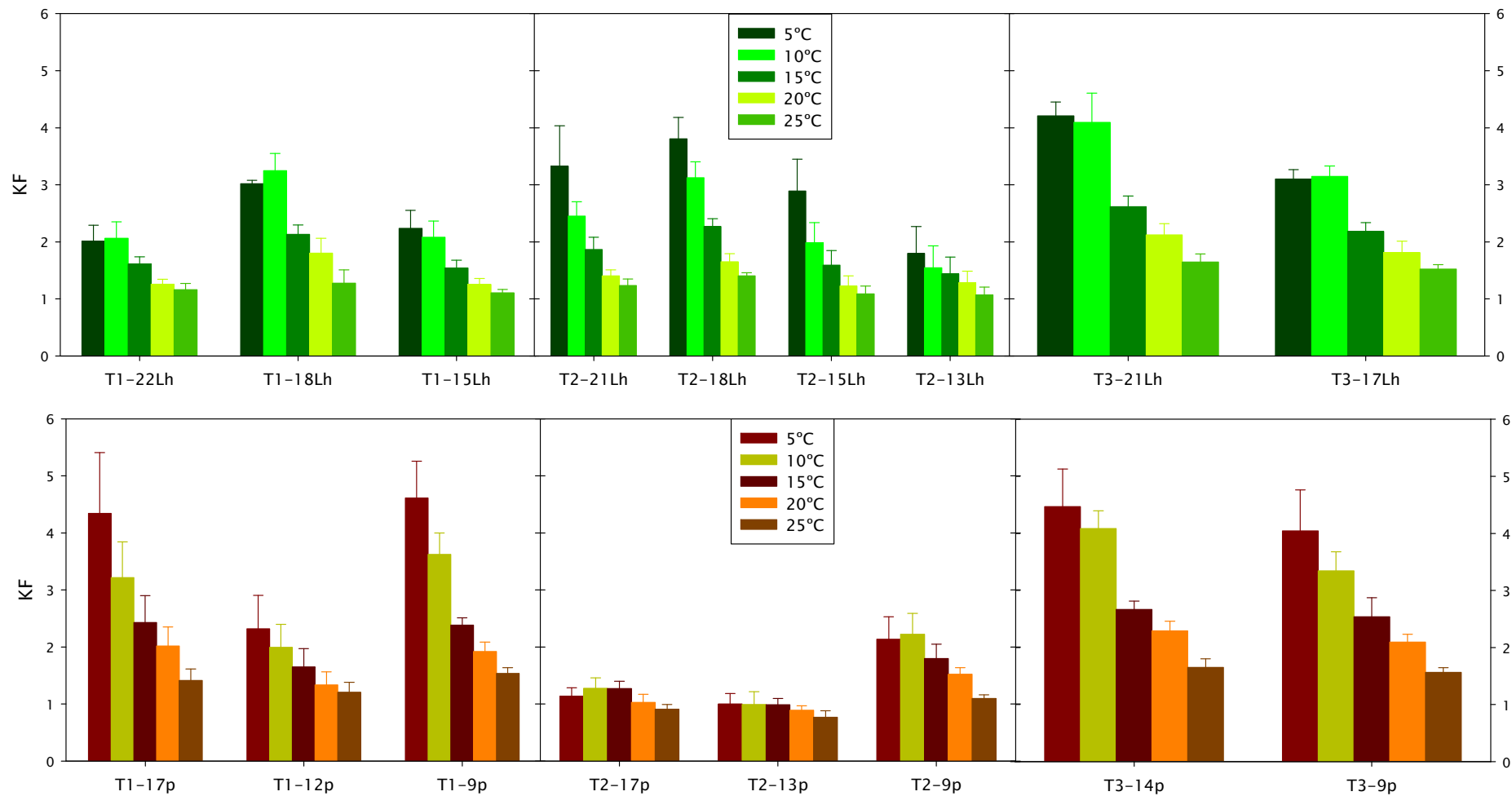


Fig. 3.16: Coeficiente de eficiencia fotosintética para los tres transectos de *Lasallia hispanica* (arriba) y *Lasallia pustulata* (abajo) a todas las temperaturas de medida.

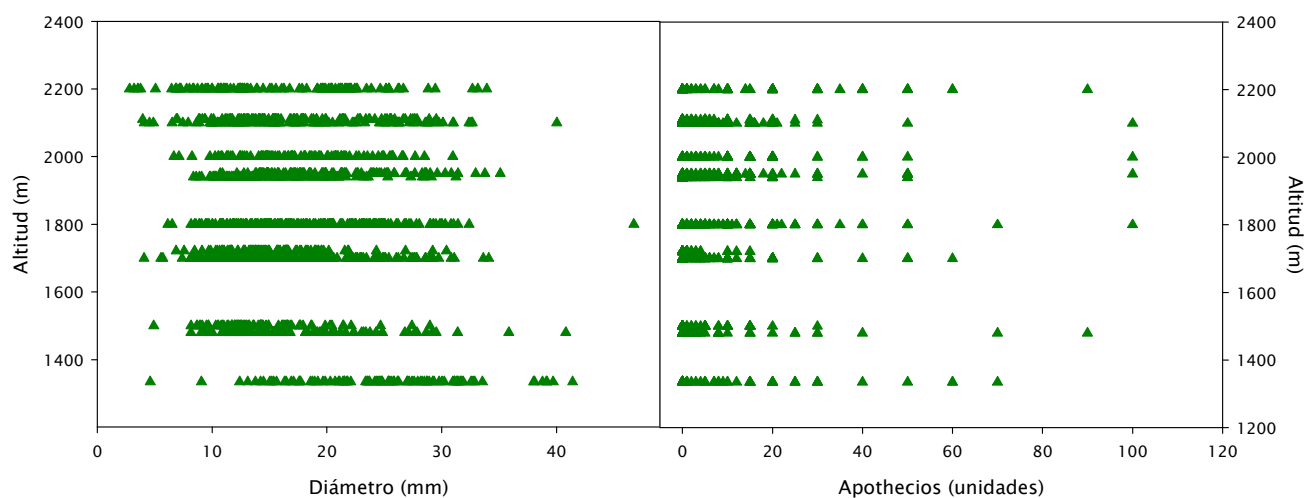


Fig. 3.17: Gráficas entre altitud y diámetro del talo (izqda.) y altitud y número de apotecios (dcha.) de *Lasallia hispanica*.

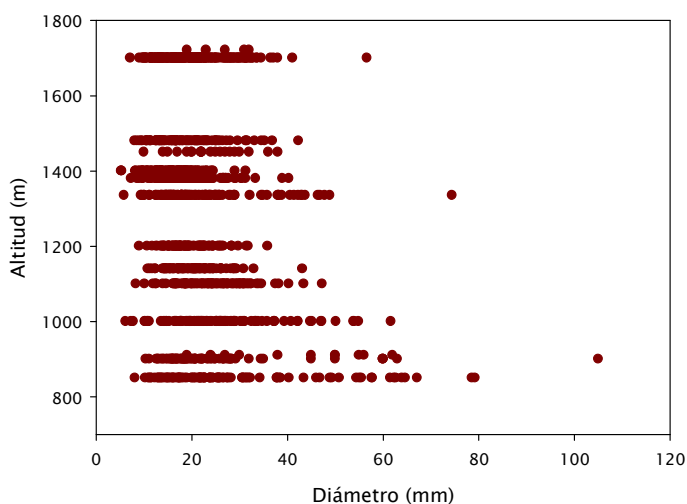


Fig. 3.18: Gráfica entre altitud y diámetro del talo de *Lasallia pustulata*.

### Análisis subcelulares

Los datos de los tres transectos se juntaron para explorar la posible existencia de relaciones lineales entre la altitud y algunos de los componentes subcelulares medidos. En la mayoría de los casos el ajuste no era muy bueno, pero se encontraron algunas tendencias, a menudo estadísticamente significativas. En ambas especies el incremento en altitud se relacionaba con un incremento en IPE, Quit, Quit/Erg y Taa, y con un descenso en sacarosa. Las dos especies mostraban respuestas a la altitud opuestas en N, Glu y rib/man. En *L. pustulata* la altitud se relacionaba también con un incremento en Chl*b*, Chl total y carotenos y con un descenso de Gir y fruc. Para *L. hispanica*, la altitud estaba directamente relacionada con Arg e inversamente con Erg, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, C, C/N y rib (Figs. 3a.29 a 3a.36, en el Apéndice 3, y 3.23 a 3.25).



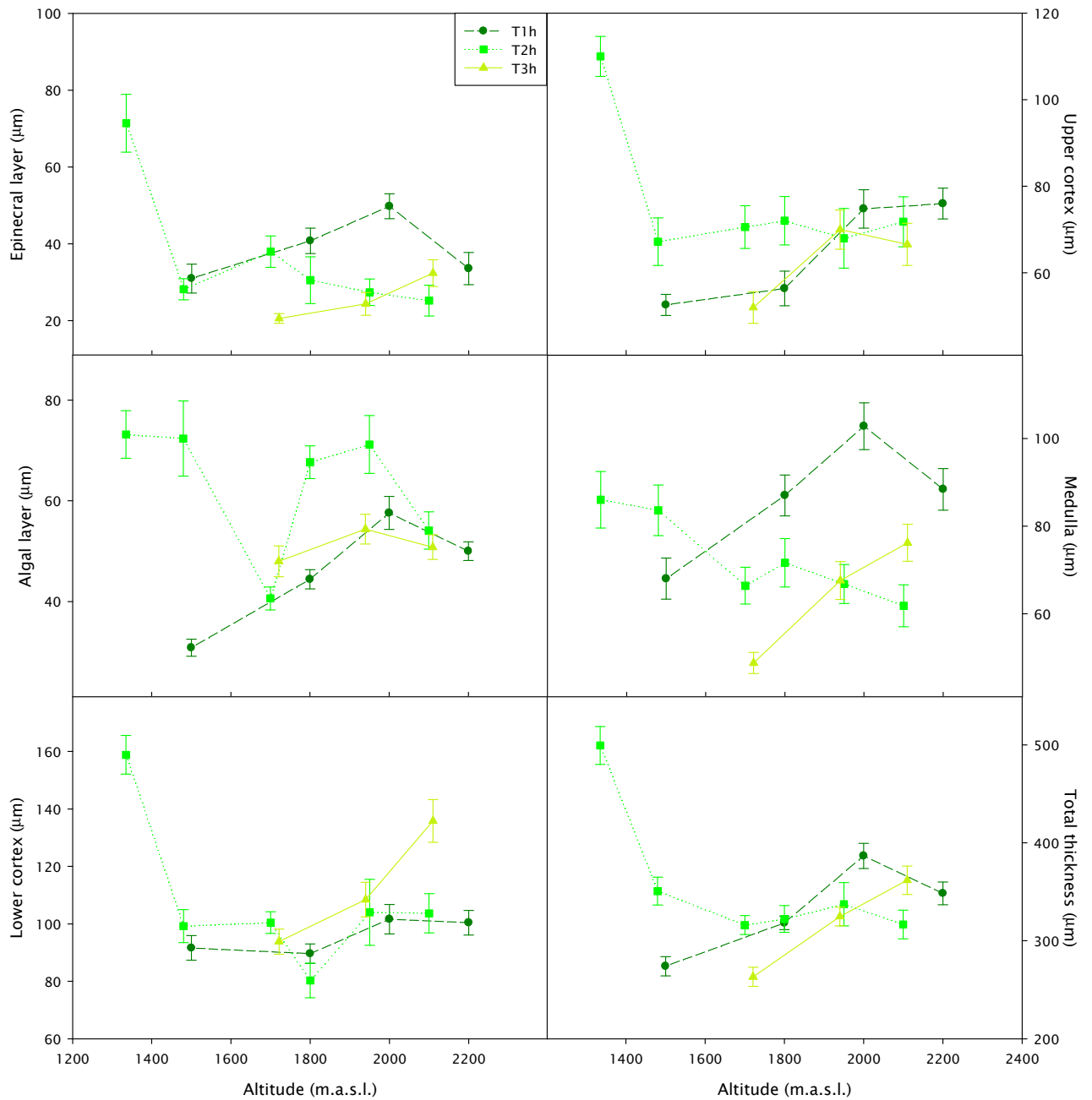


Fig. 3.19: Medidas anatómicas de los talos de *L. hispanica* vs. altitud. De izqda. a dcha. y de arriba a abajo: capa epinecral, córtex superior, capa algal, médula, córtex inferior y grosor total (in μm). Círculos verde oscuro: resultados del primer transecto; cuadrados verde claro: resultados del segundo transecto; triángulos amarillo verdosos: tercer transecto.

### Análisis multivariante

De todas las variables medidas para cada localidad de la Fig. 3.2 un total de 34 se incluyeron en las matrices de correlación preliminares mostradas en las Figs. 3a.13 a 3.20. Las variables que mostraban coeficientes de correlación mayores, se emplearon para hacer ACPs.

Los ACPs de *Lasallia hispanica* se hicieron con variables elegidas de acuerdo a las matrices de las Figs. 3a.15 a 3a.17. Estas variables fueron: Altitud, IPE (TSW), Chla,

carotenoides, Erg, contenido total de aa, % de arginina,  $\text{NH}_4^+$ , cociente C/N, ácido girofórico, cociente rib/man+arab, contenido total de azúcares, Amáx y RO, ésta última en valor absoluto y a 15 °C. Se elaboró un ACP consenso (Fig. 3.26), así como un ACP único para cada transecto (Figs. 3a.37 a 3a.39, en el Apéndice 3).

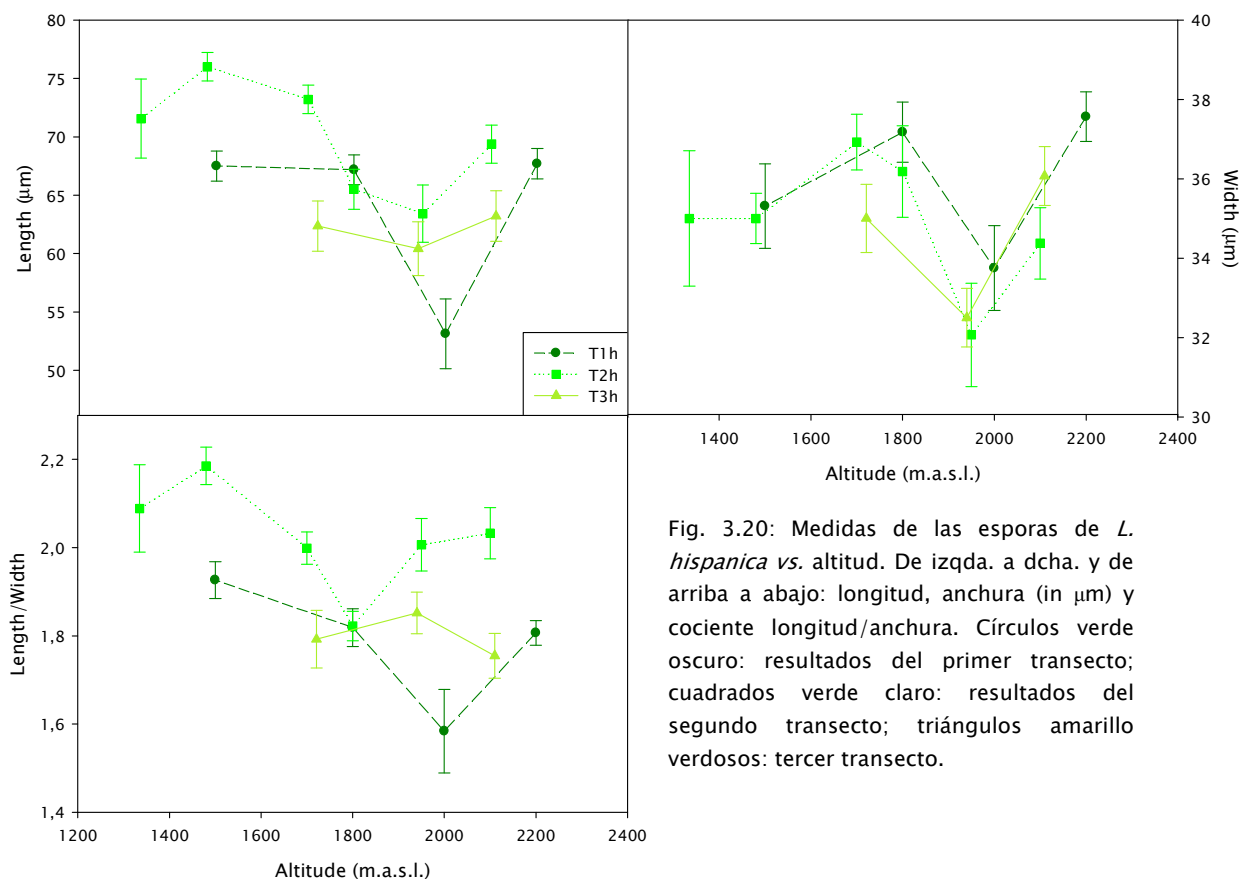


Fig. 3.20: Medidas de las esporas de *L. hispanica* vs. altitud. De izqda. a dcha. y de arriba a abajo: longitud, anchura (in  $\mu\text{m}$ ) y cociente longitud/anchura. Círculos verde oscuro: resultados del primer transecto; cuadrados verde claro: resultados del segundo transecto; triángulos amarillos verdosos: tercer transecto.

El efecto de la altitud fue muy influyente en el primer eje (Fig. 3.26), y no mostraba relación con Amáx, que era a su vez muy influyente en el segundo eje y se correlacionaba con Ch1a, carotenos y Taz. La altitud se relacionaba positivamente con IPE y RO y negativamente con rib/(m+a), C/N y Gir.

Los ACPs para *Lasallia pustulata* se hicieron con las variables seleccionadas de acuerdo con las matrices de correlación de las Figs. 3a.18 a 3a.20. Estas variables fueron: Altitud, IPE, Ch1a, carotenos, Erg, Quit, contenido total de aa, % de arginina,  $\text{NH}_4^+$ , N, ácido girofórico, rib/(m+a), Taz, Amáx y RO, ésta última en valor absoluto a 15 °C.

En este caso (Fig. 3.27), los dos primeros ejes explicaban un porcentaje de la varianza parecido. La altitud tenía poca influencia en el primer eje, a diferencia de lo que ocurría en *L. hispanica*, pero se oponía a Gir. Amáx no aparecía relacionada con la altitud y tampoco estaban relacionados con ella RO o IPE. Los ACPs particulares para cada transecto pueden verse en las Figs. 3a.40 a 3a.42.

### Modelado de nicho

El área potencial de *Lasallia hispanica*, tras los análisis con MaxEnt se muestran en la Fig. 3.28. El área de esta especie parece restringirse a las mayores elevaciones de la Península Ibérica. *Lasallia pustulata* (Fig. 3.29) tiene un área más amplia, que a menudo solapa con la de *L. hispanica*. La variable ambiental más influyente es la temperatura media anual para ambas especies, con mayor influencia en *L. hispanica* (Tabla 3.2). Le sigue la precipitación de mes más seco, que en este caso es más importante para la determinación del área potencial de *L. pustulata*.

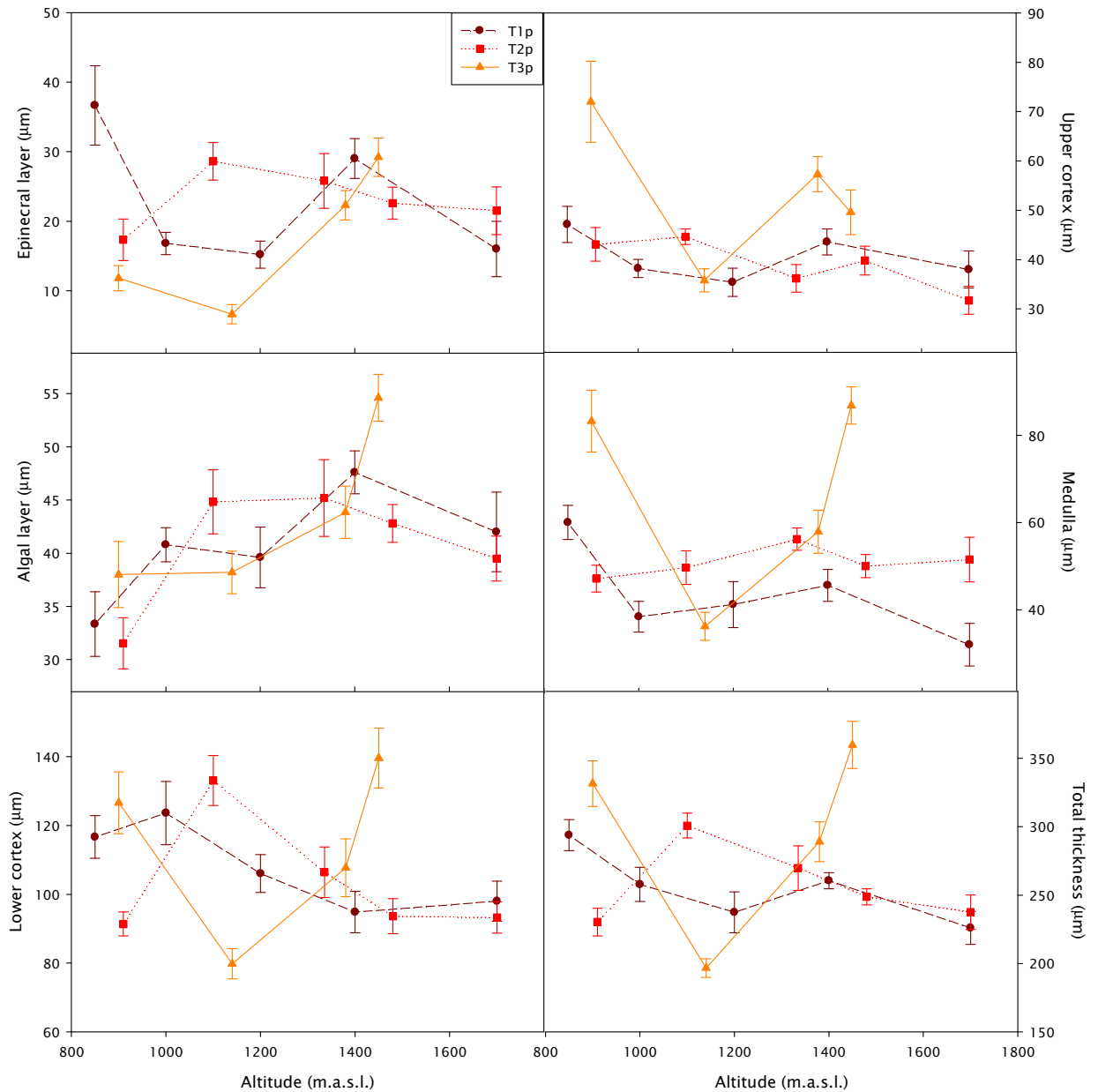


Fig. 3.28: Medidas anatómicas de los talos de *L. pustulata* vs. altitud. De izqda. a dcha. y de arriba a abajo: capa epinecral, córtex superior, capa algal, médula, córtex inferior y grosor total (in  $\mu\text{m}$ ). Círculo rojo oscuro: resultados del primer transecto; cuadrados rojos: resultados del segundo transecto; triángulos naranjas: tercer transecto.

## DISCUSIÓN

La vida vegetal a grandes altitudes se ve principalmente limitada por los efectos directos e indirectos de las bajas temperaturas, la radiación, el viento y las tormentas, o la insuficiencia de agua disponible (Körner & Larcher, 1988). Teniendo en cuenta las diferencias en su distribución, *L. hispanica* parece capaz de hacer frente a estas condiciones adversas de manera mucho más efectiva que *L. pustulata*.

El principal objetivo de este estudio fue identificar los cambios fisiológicos provocados por la altitud en estas dos especies simpátricas de *Lasallia* con el objeto de comprender un poco mejor sus distintos patrones de distribución altitudinal. Tras el minucioso estudio de su comportamiento ecofisiológico, la primera impresión es que *L. hispanica* posee una mayor plasticidad y muestra una respuesta más marcada a la altitud en muchos de los parámetros medidos, en comparación con *L. pustulata*. Esta plasticidad en su respuesta parece permitir a *L. hispanica* la conservación de un balance de carbono positivo bajo distintas condiciones, en las que *L. pustulata* no es capaz de alcanzar compensación, y a menudo muestra eficiencias mejores que las de esta última especie (Figs. 3.4 a 3.9, Figs. 3a.2, 3.25).

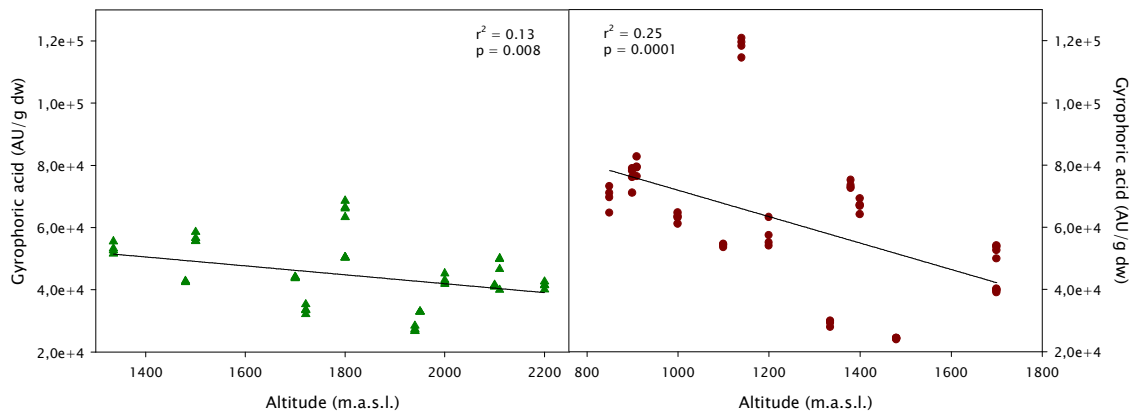


Fig. 3.22: Regresión lineal entre altitud y ácido girofórico por peso seco en *Lasallia hispanica* (izqda.) y *Lasallia pustulata* (dcha.).

### Efecto de la altitud

El efecto de la altitud en estas dos especies es similar para algunas variables e inverso para otras. En general, como se ha dicho antes, se encontraron efectos más marcados y más abundantes en *L. hispanica*. Esta observación se ve respaldada por los resultados de los ACPs (ver más abajo). Para *Lasallia pustulata* sólo una variable (el ácido girofórico) mostraba un coeficiente de correlación con la altitud mayor o igual a 0,5 (en valor absoluto), y 15 variables acusaban significativamente el efecto de la altitud ( $p < 0.05$ , Fig. 3a.14), mientras que en el caso de *L. hispanica* 10 variables tenían un coeficiente de correlación mayor que  $|0.5|$ , y la altitud era significativamente influyente en 21 variables (Fig. 3a.13). Esta mayor plasticidad de *L. hispanica* en respuesta a la altitud es probablemente la razón que explica su éxito en ambientes tan duros. *Lasallia pustulata* tiene mayor capacidad fotosintética cuando las condiciones son favorables para ello, pero su plasticidad es mucho menor que la de *L. hispanica*,

que, a pesar de tener tasas de FN mucho más modestas (véase abajo), es más hábil a la hora de regular y reajustar su metabolismo para poder hacer frente a las condiciones cambiantes que un gradiente altitudinal implica. Las diferencias en la respuesta a la altitud de Amáx, RO y  $\Phi$  de cada especie son especialmente interesantes (Figs. 3a.3, 3a.4, 3.25). La eficiencia cuántica ( $\Phi$ ) disminuyó significativamente con la altitud en *L. pustulata* mostrando la dificultad de esta especie para adaptarse a zonas altas, pero no cambió en *L. hispanica*. El patrón para Amáx es similar, *L. pustulata* muestra tasas en regresión al aumentar la altitud, mientras *L. hispanica* tiene una respuesta unimodal, con un máximo hacia los 1800–2000 m. Se ha podido observar un comportamiento parecido en muchas plantas vasculares que también ocupan amplios gradientes altitudinales (Li *et al.*, 2006, 2007), así como en algunos líquenes (Larcher & Vareschi, 1988). Li *et al.* (2006) estudiaron la respuesta de *Quercus aquifolioides* en un gradiente de 1600 m (desde 2000 a 3600 m) en el Himalaya. Estos autores concluyeron que 2800 m era la altitud óptima, en la que el crecimiento y metabolismo eran los más vigorosos, según indicaban el poco grosor de las hojas, el mayor tamaño de los estomas y los valores más negativos de  $\delta^{13}\text{C}$  y observaron un descenso de crecimiento y tasas metabólicas según los árboles se alejaban del óptimo.

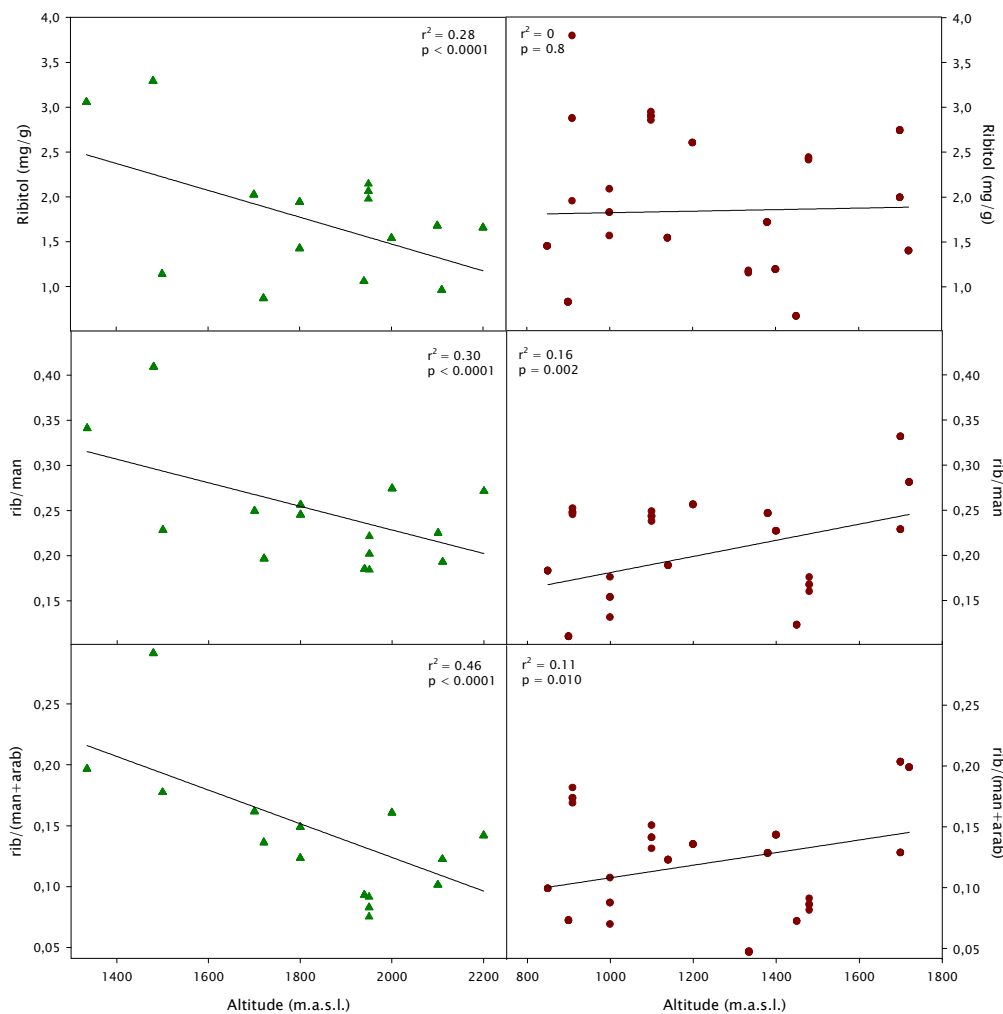


Fig. 3.23: Regresiones lineales entre altitud y ribitol (arriba), cociente rib/manitol (centro) y cociente rib/(man+arabitol) (abajo) para *Lasallia hispanica* (izqda.) y *Lasallia pustulata* (dcha.).

La respuesta de los polioles a la altitud también difiere entre estas dos especies. Pudimos observar en *L. pustulata* un incremento del cociente rib/man con la altitud (Fig. 3a.35), que podría interpretarse como un intento de proteger las células del alga de la desecación (Farrar, 1976). Pero es más probable que a mayores altitudes los procesos de crecimiento se vean limitados más rápidamente que la ganancia de carbono, por lo que habría un incremento de azúcares (Körner, 1999). De media, ambas *Lasalliae* mostraban valores similares ( $0'21 \pm 0'07$  y  $0'25 \pm 0'06$  mg g<sup>-1</sup> para *L. pustulata* y *L. hispanica* respectivamente), pero la correlación entre este cociente y la altitud es positiva en *L. pustulata* y negativa en *L. hispanica* (Fig. 3.24). Se encontró la misma respuesta para el cociente rib/(man+arab) (es decir, azúcares del alga frente a azúcares fúngicos), y, mientras que para *L. hispanica* el descenso del cociente estaba relacionado con un descenso de ribitol, para *L. pustulata* no encontramos un incremento significativo de este poliol a lo largo del gradiente, por lo que el incremento del cociente es una consecuencia del descenso de los azúcares fúngicos. Esto podría estar relacionado con la tendencia a protegerse frente a las duras condiciones que debe afrontar a mayores altitudes. Al estar más expuesta a estas mayores altitudes, *L. pustulata* debe hacer frente a vientos más fuertes y por tanto su valor de IPE y su cantidad de quitina aumentan, proporcionando resistencia al talo (Fig. 3a.33, Kappen 1988), pero podría ser que ese aumento de quitina sucediera a costa de los azúcares fúngicos. También se observó un aumento de IPE y quitina en *L. hispanica* (Fig. 3a.29), pero en este caso no se observó reducción en los azúcares fúngicos, aunque había una tendencia significativa a reducir el contenido de ribitol y aumentar el de glucosa con la altitud (Fig. 3a.31). Según Palmqvist *et al.* (2008), la glucosa es un producto directo de la fotosíntesis, así como un precursor del metabolismo respiratorio de ambos componentes de la simbiosis líquénica y su aumento puede indicar un aumento de la degradación de ribitol en el fotobionte, pero la cantidad absoluta no es muy alta, especialmente si se compara con los resultados obtenidos en *L. pustulata*. Carecemos de información suficiente para dilucidar si se trata de una respuesta específica, ya que no hemos realizado análisis genéticos del fotobionte.

Otra consecuencia del aumento de altitud es una mayor intensidad lumínica (Körner & Larcher, 1988), que se correlaciona con un incremento de carotenos en *L. pustulata* (Fig. 3a.33). Se ha demostrado que los carotenos tienen actividad protectora frente al exceso de luz visible (Fahselt, 1994b). Es probable que el aumento de la irradiación también afecte al ácido girofórico, que disminuye con la altitud en ambos casos, pero la correlación no es tan alta para *L. hispanica* como para *L. pustulata*, y la pendiente de la recta es menor (Fig. 3.22). Esto indica probablemente una mayor sensibilidad de esta última especie al aumento de radiación UV. Swanson & Fahselt (1997) describieron la existencia de un proceso de fotodegradación de dépsidos con la altitud. Pero también sugirieron que el descenso de dépsidos en *Umbilicaria americana* podía ser sólo aparente, pues el incremento de UV-B podía estar tanto provocando la disminución de la síntesis de los dépsidos como convirtiéndolos a una forma no extraíble. En algunas especies de briófitos se ha descrito una disminución de los efectos del UV-B en condiciones de baja disponibilidad de agua (Arróniz-Crespo *et al.*, 2011), y Solhaug *et al.* (2003) encontraron en el líquen *Xanthoria parietina* una

ralentización del metabolismo de los compuestos secundarios cuando los talos estaban inactivos. El hábitat más expuesto de *L. hispanica* provoca una deshidratación más rápida que en el caso de la más protegida *L. pustulata*, por tanto, su tiempo de actividad es con toda probabilidad más corto. Por esta razón, el efecto de la altitud en la síntesis de carotenos y en la degradación de ácido girofórico puede ser menos marcado en *L. hispanica*.

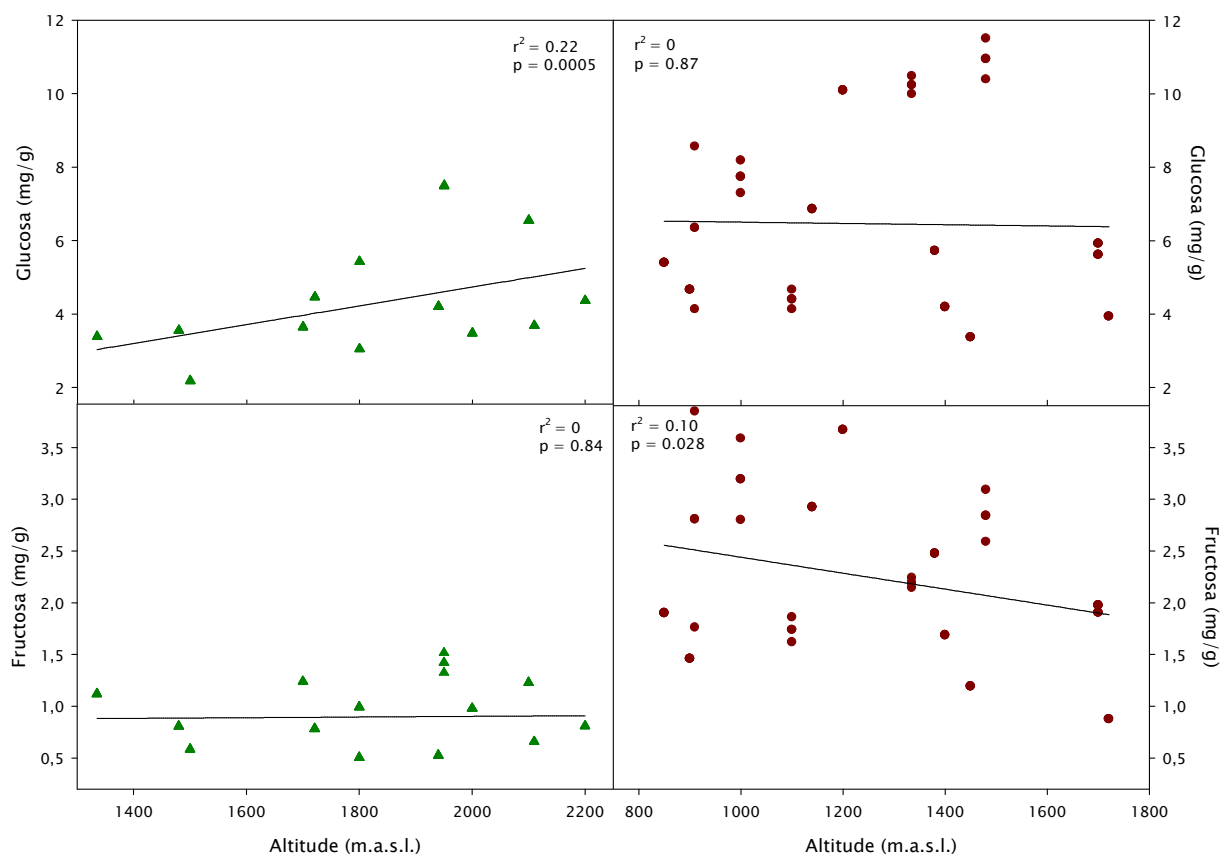


Fig. 3.24: Regresiones lineales entre altitud y glucosa (arriba) y fructosa (abajo) para *Lasallia hispanica* (izqda.) y *Lasallia pustulata* (dcha.).

Ambas especies mostraron un descenso del cociente C/N, causado por el efecto significativo de la altitud en el contenido en ( $r = -0.42$ ,  $p < 0.005$ , Fig. 3a.13, para *L. hispanica* y  $r = -0.27$ ,  $p = 0.04$ , Fig. 3a.14, para *L. pustulata*). También encontramos un descenso de fructosa y sacarosa en *L. pustulata* (Fig. 3a.35). En esta especie, aunque la correlación no era alta cuando se juntaron todos los datos, había una disminución significativa de Amáx y  $\Phi$  con la altitud, como se ha dicho anteriormente (Fig. 3a.14 y 3a.36). Todos estos resultados podrían sugerir que al aumentar la altitud, el rendimiento fotosintético de *L. pustulata* se ve afectado y necesita redistribuir sus recursos e invertir más en moléculas protectoras (carotenos) o mantener la inversión en otras (ribitol), a costa del descenso de otras moléculas y de su eficiencia fotosintética. El contenido total de Chl también aumenta ligeramente con la altitud en *L. pustulata*, el aumento de Chl**b** es significativo. Este comportamiento se había observado ya en otros líquenes mediterráneos (Pintado, 1996), lo que indica que, aunque la irradiación es más intensa en lugares más altos, la radiación real a la que los líquenes se encuentran activos es más baja, ya que la hidratación tiene lugar cuando el

tiempo es nuboso o neblinoso, Se ha demostrado que el exceso de irradiación puede dañar de manera severa el aparato fotosintético de los líquenes, incluso cuando están inactivos y a pesar de sus mecanismos de fotoprotección (Gauslaa & Solhaug, 1999; Heber & Lüttge, 2011). También se ha visto que la resistencia al calor es específica de cada especie, y muestra una estrecha relación con la ecología de la especie (MacFarlane & Kershaw, 1978). Nuestros resultados sugieren la existencia de una sensibilidad distinta a la luz y al calor en estas dos especies, resultando *L. hispanica* menos afectada por estas condiciones.

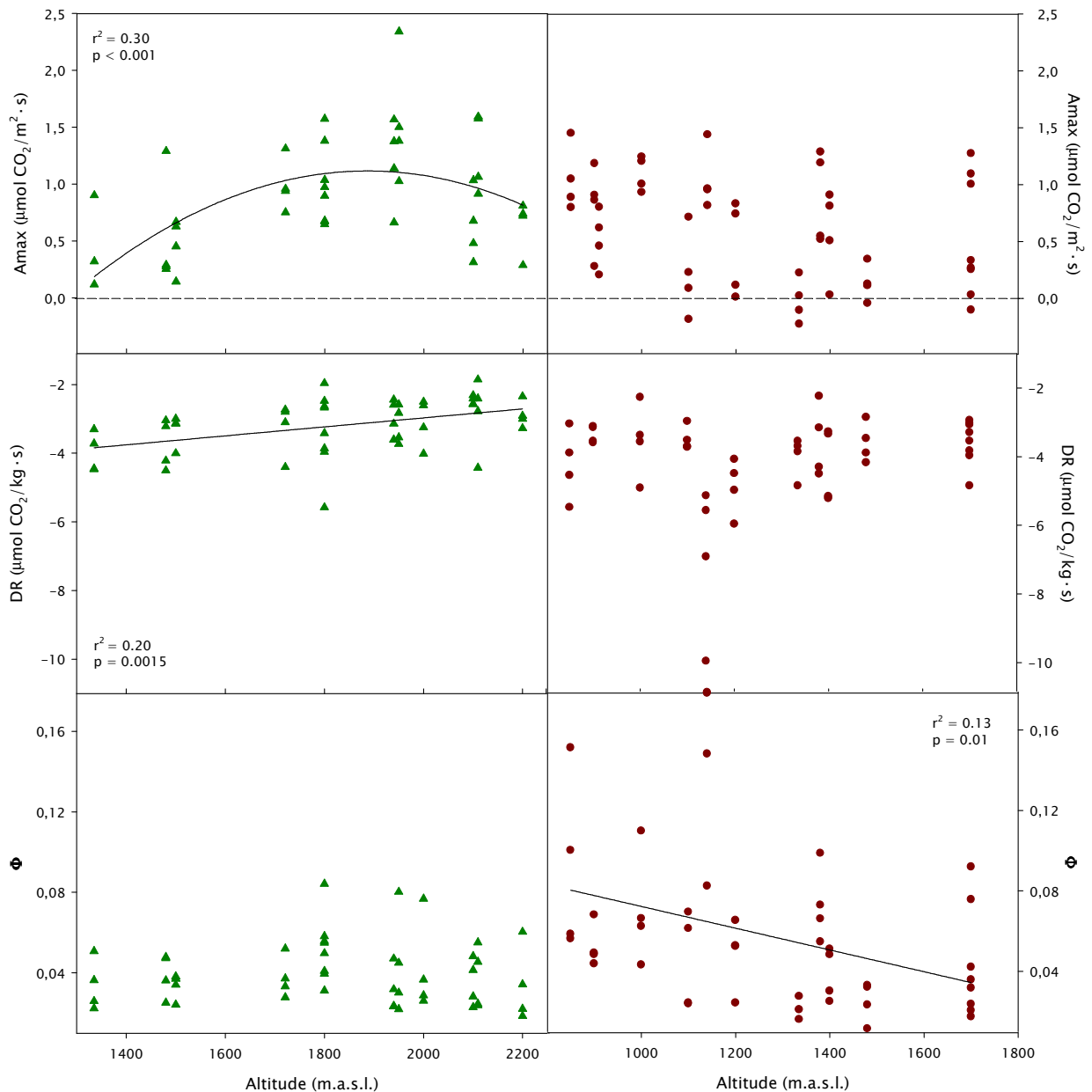


Fig. 3.25: Altitud vs. Amáx por unidad de área (arriba, la línea discontinua indica compensación, es decir, fotosíntesis neta = 0) y respiración en oscuridad por peso seco (centro); altitud vs. eficiencia fotosintética ( $\Phi$ ) (abajo) de *Lasallia hispanica* (triángulos verdes, izqda.) y *Lasallia pustulata* (puntos rojos, dcha.).

Ambas especies mostraron una correlación positiva entre altitud y N (aunque para *L. pustulata* no era significativa, Fig. 3a.34; Fig. 3a.30), y también una cantidad



total de aa mayor. Esto puede ser una consecuencia de la mayor y más larga acumulación de nieve hacia la cumbre, que llevaría a un enriquecimiento en N. en el caso de *L. hispanica*, también encontramos un incremento significativo de Arg hacia mayores altitudes (Fig. 3a.30). La síntesis de Arg se ha interpretado como un mecanismo para evitar la toxicidad del  $\text{NH}_4^+$  (Dahlman *et al.*, 2002; Dahlman & Palmqvist, 2003), y de hecho se pudo observar un descenso de  $\text{NH}_4^+$  en esta especie con la altitud (Fig. 3a.30). Pero las reservas de Arg también se han interpretado como una fuente de C y N al degradarse (Planelles & Legaz, 1987; Fahselt, 1994a). El  $\text{NH}_4^+$  incrementa la permeabilidad de la membrana de las células del fotobionte, facilitando por tanto la exportación de fotosintatos (Vicente & Filho, 1979). Sin embargo, no se ha demostrado que este mecanismo suceda a las concentraciones de  $\text{NH}_4^+$  presentes normalmente en condiciones naturales (Fahselt, 1994a).

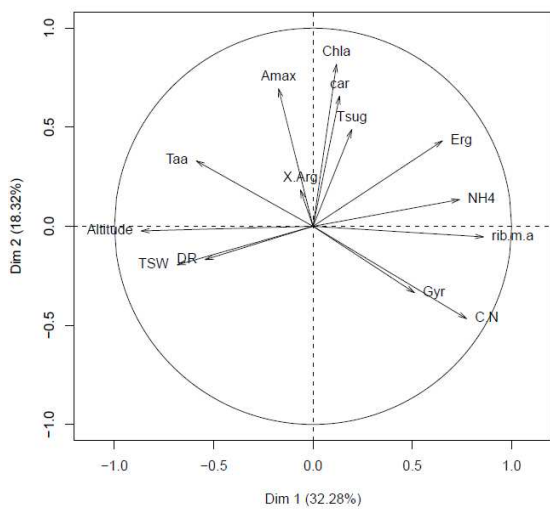


Fig. 3.26: ACP consenso de los tres transectos de *Lasallia hispanica*.

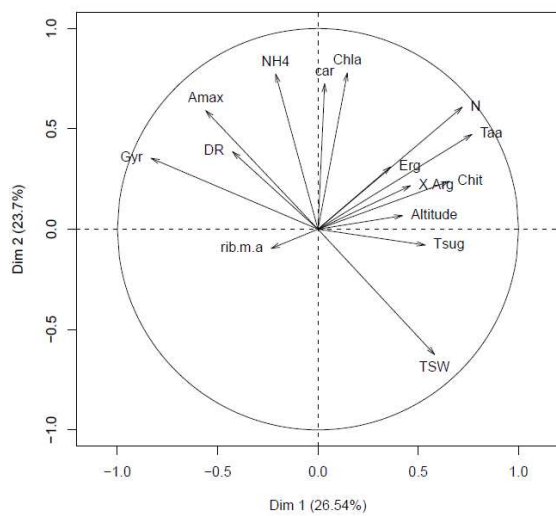


Fig. 3.27: ACP consenso de los tres transectos de *Lasallia pustulata*.

Hay una tendencia clara en ambas especies a mostrar valores mayores de IPE con la altitud (Figs. 3a.29 y 3a.33), pero el rango para *L. hispanica* va desde aproximadamente  $200 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2}$  a 1300 m hasta  $370 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2}$  a 2200 m, mientras que en *L. pustulata* el rango es mucho más estrecho, entre  $200 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2}$  a 800 m y 220 a 1700 m. Esta mayor plasticidad de *L. hispanica* en la regulación del IPE puede ser muy importante para entender su capacidad de vivir en ambientes más duros y con condiciones más cambiantes que *L. pustulata*. Diversos estudios han mostrado la relación entre IPE y tiempo de retención de agua (Larson & Kershaw, 1976; Kershaw, 1985; Valladares *et al.*, 1997; Gauslaa & Coxson, 2011; capítulo 2 de la presente memoria). De este modo, la capacidad de *L. hispanica* para aumentar su IPE hacia la cumbre en respuesta a la sequía y al viento le permiten colonizar hábitats en los que *L. pustulata* es incapaz de medrar. También se ha descrito la disminución del área foliar específica (SLA, por sus siglas en inglés, en unidad de área por peso) con el incremento de altitud en plantas vasculares (Li *et al.*, 2007), lo cual se relaciona también con la disponibilidad de agua.

### Rendimiento fotosintético y eficiencia

Al comparar ambas especies a las mismas altitudes, *L. hispanica* no tiene una menor productividad o eficiencia que *L. pustulata* (Figs. 3a.1 a 3a.4), que, por el contrario, en algunas ocasiones muestra valores significativamente más bajos (v.gr., Fig. 3a.2). Entonces ¿por qué está la primera ausente en zonas más bajas? Esto parece no estar relacionado con la temperatura, puesto que, aunque lógicamente el incremento de temperatura provoca un incremento de RO, y, por consecuencia, un descenso de FN y KF, *L. hispanica* siempre alcanzó compensación, a todas las temperaturas, independientemente de la altitud de procedencia de las muestras (Figs. 3.4 a 3.9). Esto sugiere que, al menos teóricamente, esta especie tendría un balance de carbono positivo a temperaturas más altas que a las que está expuesta en el campo de manera habitual. No ocurría lo mismo en el caso de *L. pustulata*. Algunas poblaciones no alcanzaron un valor positivo de FN por encima de 20 °C (Tabla 3a.9), y sus KF fueron en general parecidas o incluso menores que las de *L. hispanica*. Tomando estos datos en consideración, es notable que no encontramos ninguna población de *Lasallia hispanica* por debajo de 1335 m en esta zona. Esta especie no se ha encontrado nunca por debajo de los 900 m (Sancho & Crespo, 1989; Sancho & Codogno, 1991). Una explicación probable es que se ve desplazada por especies de crecimiento más rápido, *L. pustulata* entre ellas, tan pronto como las condiciones ambientales favorecen el desarrollo de éstas.

La disponibilidad de agua es probablemente el factor más importante que condiciona la distribución y abundancia de estas especies de *Lasallia*. *Lasallia pustulata* es más higrófila y más sensible a la desecación que *L. hispanica* (Sancho, 1986), y esta característica condiciona su distribución. En efecto, se ha descrito que *L. pustulata* tiene una mayor capacidad de retención de agua (350% vs. 220% en *L. hispanica*), gracias al mayor tamaño de sus pústulas y a la abundancia de sus isidios coraloides característicos (Sancho & Kappen, 1989; Valladares, 1993). *Lasallia pustulata* fue descrita como una especie sustrato-higrófila por Sancho & Kappen (1989), mientras que *L. hispanica* muestra una estrategia aero-higrófila, tomando agua principalmente de la lluvia, nieve, rocío o niebla. *Lasallia pustulata* tiene además la posibilidad de tomar agua de su sustrato, estando frecuentemente asociada con musgos. Pirintsos *et al.* (2011) observaron una depresión general del rendimiento fotosintético de *Evernia prunastri* y *Pseudevernia furfuracea*, en muestras transplantadas a lo largo de un gradiente altitudinal en Creta. Estos autores encontraron una disminución del contenido de pigmentos y de la eficiencia fotosintética, evaluada por medio de medidas de fluorescencia, según la altitud disminuía. Sugirieron que este efecto no estaba causado por la altitud propiamente dicha, sino por la disponibilidad de agua, el factor más importante en los ecosistemas mediterráneos, fuertemente condicionado por la sequía estival y el calor (Joffre *et al.*, 2007). En su área de estudio, observaron que la disponibilidad de agua era mayor en verano hacia la cumbre, debido a la presencia de nubes bajas y a la formación de rocío. El efecto de la sequía era más marcado en *Evernia prunastri*, que es una especie más hidrófila que *Pseudevernia furfuracea*.

Desgraciadamente no existen datos de precipitación para las distintas altitudes de muestreo, debido a la falta de estaciones meteorológicas en la zona. Sin embargo, parece que esta área es una de las que mayores precipitaciones tienen en toda España, gracias al efecto de barrera de las altas cumbres de la Sierra de Gredos (Sancho, 1986, 2001). Parece que la precipitación aumenta hacia las cumbres, teniendo en cuenta la cantidad de nieve que se acumula, la tendencia general de los ecosistemas montañosos y algunos datos meteorológicos de esta área (Gavilán, 1994). Aunque la precipitación total es mayor a mayores altitudes, al tener un marcado carácter estacional, la mayor parte es en forma de nieve, lo cual hace que el agua no sea disponible.

En cuanto hay nichos no disponibles para *L. pustulata* debido a las condiciones limitantes a mayor altitud, *L. hispanica* tiene más éxito. Pero en zonas bajas, al aumentar la temperatura y por tanto la disponibilidad de agua, todo está dominado por *L. pustulata*, cuyos talos son más grandes y de crecimiento más rápido con mucha probabilidad, teniendo en cuenta su tiempo de actividad más largo y sus mayores tasas de Amáx, y por tanto desplaza competitivamente a *L. hispanica*. *Lasallia hispanica* probablemente sería capaz de sobrevivir en zonas más bajas y más templadas, pero en este caso no es un problema de supervivencia, sino de eficiencia en la colonización y en la competencia por el espacio. Sería muy útil llevar a cabo experimentos con trasplantes recíprocos para poder confirmar esta hipótesis. Hestmark (1992, 1997) estudió la competencia entre especies de Umbilicariáceas y su establecimiento en nichos disponibles y observó que en poblaciones mixtas de *L. pustulata* y *Umbilicaria spodochoa* los talos solapaban a menudo, resultando en la muerte de las zonas de talo que quedaban tapadas por la otra especie, de manera que la especie de crecimiento más rápido se veía claramente favorecida. En el presente estudio hemos encontrado tasas de Amáx en *L. pustulata* más altas en zonas más bajas (en las que *L. hispanica* estaba ya ausente) que en zonas donde ambas especies coexistían (Tablas 3a.7, 3a.9 y 3a.11). Esta especie también mostraba normalmente mayores tasas que *L. hispanica* a temperaturas más altas. Y como los talos de *L. pustulata* son más grandes (Figs. 3.17 y 3.18; Sancho & Crespo, 1989; Hestmark *et al.*, 1997) y como vive en un hábitat más protegido (Sancho, 1986), retienen el agua durante más tiempo (Green *et al.*, 1985; Gauslaa & Solhaug, 1998; Vivas, resultados inéditos), teniendo de este modo periodos de actividad más largos. *Lasallia hispanica*, a su vez, es capaz de medrar en hábitats más expuestos, pues puede hacer frente a condiciones más cambiantes, periodos de sequía más largos y ciclos de hidratación-deshidratación más frecuentes.

La pregunta ahora es por qué *L. pustulata* desaparece a mayores altitudes. De nuevo, esto no parece ser consecuencia de la temperatura, ya que se ha comprobado que *L. pustulata* tiene valores bajos de Tci, así como tasas bastante altas de Amáx a 5 °C, la temperatura más baja medida (T2-9Lp se midió a 0°C, mostrando un valor de Amáx de  $1.28 \mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). De hecho, las tasas obtenidas en esta especie a 5°C y a 25°C eran parecidas en la mayoría de los casos (Figs. 3.11, 3.13 y 3.15). Además,

ambas especies parecen estar preparadas para regular ligeramente su temperatura, mejorando su rendimiento al cambiar el color del talo dependiendo de su estado de hidratación (Sancho & Kappen, 1989; Sancho *et al.*, 1994). Pero a mayor altitud la plasticidad relativamente más baja de *L. pustulata* no le permite prosperar bajo condiciones que se van haciendo más difíciles, no sólo por el descenso de temperatura, sino por la disminución de la disponibilidad de agua, la reducción del tiempo de actividad, la mayor exposición de los nichos a la acción erosiva del viento y la mayor irradiación.

### **Tamaño y abundancia de apotecios**

En algunos estudios se ha observado un descenso en la reproducción sexual de plantas vasculares hacia mayores altitudes (Lévesque *et al.*, 1997; Lord & Kelly, 1999; Li *et al.*, 2007). Dietrich & Scheidegger (1997) observaron un aumento en la proporción de especies de líquenes con reproducción asexual hacia mayores altitudes, pero hasta donde nosotros sabemos, no hay estudios que relacionen la altitud y la fertilidad en una misma especie de líquen. No pudimos encontrar ninguna tendencia entre altitud y número de apotecios en *L. hispanica* (Fig. 3.17). Hestmark (1992) describió una tendencia en *L. pustulata* (y también en *Umbilicaria spodochoa*, Ramstad & Hestmark, 2001, y *U. cylindrica*, *U. hyperborea*, *U. torrefacta* y *U. proboscidea*, Hestmark *et al.*, 2004) a desarrollar más apotecios en talos más grandes. Esa tendencia se observó en este estudio también en el caso de *L. hispanica* (datos no mostrados), pero no se encontraron apotecios en *L. pustulata* en ninguna localidad. En ambas especies observamos una tendencia a tener talos más pequeños a mayor altitud, pero esa tendencia no resultó estadísticamente significativa (Figs. 3.17 y 3.18).

### **Medidas anatómicas**

Para las medidas anatómicas y los análisis de componentes principales consideramos inicialmente los tres transectos por separado. De esta manera, pudimos evaluar qué variables estaban realmente relacionadas con la altitud y cuáles no, ya que algunas mostraban respuestas diferentes en cada transecto. Por tanto, la razón que explica la variación de esas variables no es la altitud, sino la diferencia en las condiciones ecológicas entre los transectos.

Para T1 y T3 de *L. hispanica* pudimos observar la misma tendencia a aumentar el grosor del talo hacia altitudes mayores, pero la causa parece ser distinta. En T1, se debe a un incremento del córtex superior y de la capa de algas, mientras que en T3 se debe principalmente al aumento del córtex inferior. Sería lógico esperar un aumento del grosor total del talo; hemos visto la tendencia de IPE a aumentar con la altitud y la hemos explicado como una estrategia de protección frente al viento, la fuerte irradiación y la sequía. Para hacer frente al viento no supondría ninguna diferencia incrementar el grosor del córtex superior o el del inferior, lo importante es que el talo sea más fuerte. Es interesante el aumento del grosor del córtex inferior en el transecto 3. Éste era probablemente el más seco de los tres, teniendo en cuenta la abundancia y diversidad de las plantas vasculares allí presentes (obs. pers.) y un incremento del grosor del córtex inferior sería muy útil para la retención de agua más prolongada. En

el caso de T2, el hecho de que IPE no varía con la altitud puede ser consecuencia de la menor variación de las condiciones en este transecto. Durante el trabajo de campo pudimos observar la mayor abundancia de árboles en este transecto, lo que indicaría que las condiciones son más suaves. Sería muy útil contar con datos microclimáticos para apoyar esta hipótesis.

Al juntar todos los datos de cada especie para comparar las medidas anatómicas entre ellas, encontramos un mayor grosor de todas y cada una de las capas del talo de *L. hispanica* comparadas con las de *L. pustulata* con la única excepción del córtex inferior (Fig. 3.3, datos numéricos no mostrados). Este resultado confirma nuestros resultados previos y nuestras hipótesis. *Lasallia hispanica* tiene una capa epinecral y un córtex superior más gruesos, muy útiles para proteger la capa de algas frente al exceso de irradiación. Una capa algal más gruesa favorece el aprovechamiento de los tiempos de actividad más breves y de los mayores niveles lumínicos y un incremento de la médula ayuda a retener el agua durante más tiempo. Todo esto está de acuerdo con el mayor IPE de *L. hispanica*.

### **Análisis multivariante**

El primer eje de *Lasallia hispanica* puede interpretarse como indicador de la productividad o del almacenamiento de productos, con Taz y Taa fuertemente relacionados con la altitud. Amáx parece ser independiente del primer eje y tampoco Gir muestra relación con la altitud. En *L. pustulata*, por el contrario, Amáx se opone a la altitud y, aunque el primer eje también podría representar almacenamiento de productos, en este caso no se relaciona con la altitud.

Cuando consideramos juntos los análisis de los tres transectos de *L. hispanica*, podemos ver que las variables que separan mejor las observaciones y que con mayores coeficientes en la primera componente explican gran parte de la varianza de nuestros datos, son la altitud y Taz en una dirección y el Erg y C/N en la dirección opuesta. En dos de los tres transectos también aparece Taa como una variable directamente relacionada con Alt y Taz, así como Gir y  $r/(m+a)$  estaban inversamente relacionados. La asociación de estas variables es consistente en los tres gradientes, y la posición de nuestras muestras se define en su mayor parte dependiendo de ellas.

Podría sugerirse que en el caso de *L. hispanica* el primer eje es resultado de la influencia de la altitud y de su relación con la productividad (Taz, Taa). Amáx no muestra relación con la altitud (como se esperaba tras la respuesta unimodal encontrada, Fig. 3.25), y tampoco la muestra Gir (indicando de esta manera que no tiene actividad protectora frente a los rayos UV). En el caso de *L. pustulata* Amáx tiende a oponerse a la altitud.

La influencia de la altitud en *L. hispanica* se pone de manifiesto de nuevo por el resultado de los ACPs, pues siempre tiene una gran influencia en el primer eje. Por el contrario, para *L. pustulata*, la altitud tiene un peso muy bajo en el primer eje de los tres transectos, así como en el ACP consenso. Otras variables eran más influyentes:

Chla, Car, Taa, N y Erg. En ambas especies la relación entre la altitud y el ergosterol era inversa, como sugieren las gráficas entre altitud y cociente Quit/Erg (Figs. 3a.29 y 3a.33), lo cual está de acuerdo con el incremento observado en IPE y la mayor inversión en estructura de las muestras de mayores altitudes.

Los ACPs también mostraron una frecuente asociación entre la Chla y Amáx, como se ha encontrado frecuentemente en otras especies de líquenes y de plantas vasculares (v.gr., Enríquez *et al.*, 1996; Green *et al.*, 1997; Palmqvist *et al.*, 2002). Del mismo modo, el contenido de Chla se relacionaba a menudo con el de carotenos. Pirintsos *et al.* (2011) describieron un efecto similar en *Evernia prunastri* y *Pseudevernia furfuracea*, y encontraron también un aumento de pigmentos hacia mayores altitudes, que relacionaron con la mayor disponibilidad de agua en las zonas montañosas. Asimismo, encontraron un descenso en el contenido de pigmentos en el seco verano mediterráneo respecto al invierno. Esta explicación está de acuerdo con nuestros datos y las diferencias en régimen hídrico de los transectos, y tiene un significado ecológico, como se ha explicado más arriba.

Es interesante destacar la influencia relativamente baja de la RO en las componentes. Como hemos podido ver antes, en las gráficas con todos los datos juntos (Fig. 3.25), la RO varía poco, mostrando estos líquenes una alta capacidad de aclimatación con respecto a su RO, de acuerdo con estudios previos (v.gr.: Larcher & Vareschi, 1988; Lange & Green, 2005).

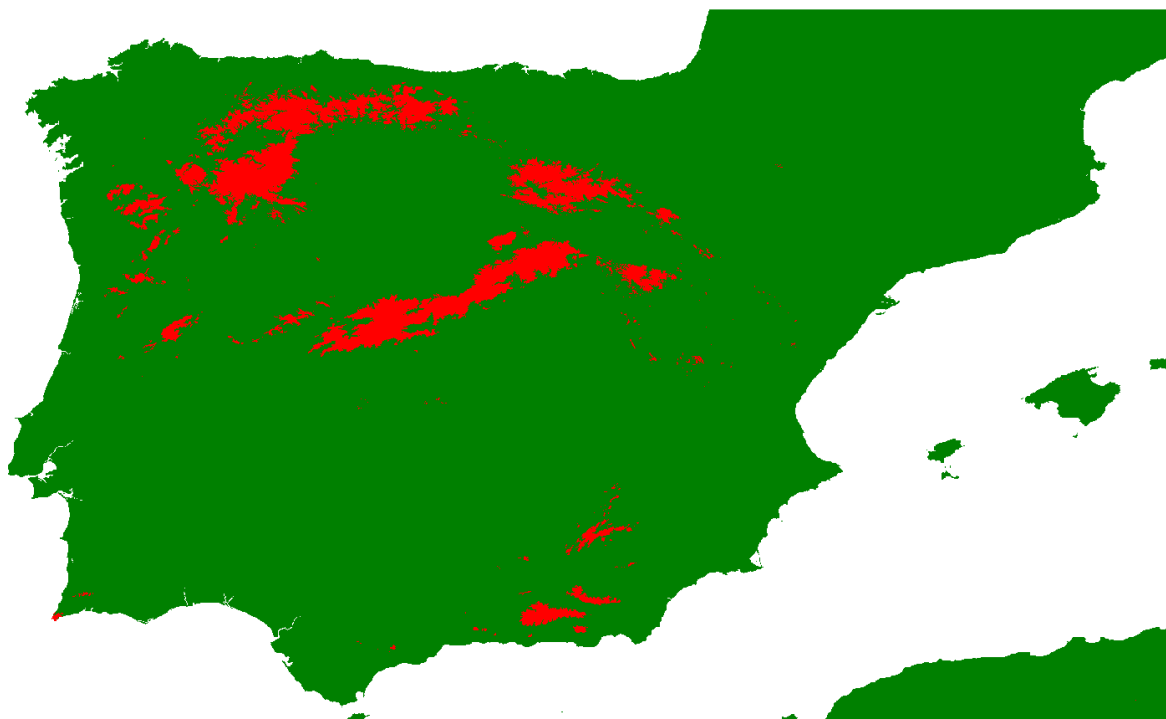


Fig. 3.28: Predicción del área de nichos potenciales para *Lasallia hispanica*, según el análisis de MaxEnt.

### Modelado de nicho

El nicho potencial de *Lasallia hispanica* (Fig. 3.28), muestra un área pequeña, restringida a las zonas más altas de la Península Ibérica. *Lasallia pustulata* (Fig. 3.29) tiene un área más amplia, que a menudo solapa con la de *L. hispanica*. La temperatura media anual es la variable ambiental más influyente para ambas especies, pero su influencia es mayor en *L. hispanica*, respaldando la interpretación de los resultados de los ACPs, ya que esta variable es realmente un indicador de la altitud (Tabla 3.2). Tras ella, la variable más influyente resultó ser la precipitación del mes más seco (ver el Capítulo 4), pero en este caso, tiene mayor peso en el área potencial de *L. pustulata*. Las curvas de respuesta para este parámetro son similares en ambas especies, indicando su tolerancia al régimen de lluvias marcadamente estacional del clima mediterráneo (Fig. 3a.37). Esta tolerancia parece ser importante para explicar su ausencia de los Pirineos, que en teoría ofrecerían un ambiente adecuado para su desarrollo, gracias a su sustrato silíceo en algunas zonas y a sus mayores altitudes, adecuadas para *L. hispanica*. Estas especies pueden verse desplazadas por especies más productivas en zonas donde el régimen hídrico es más constante a lo largo del año, y esto podría ser especialmente importante para *L. pustulata* porque *L. hispanica* elude la competencia con muchas especies gracias a su tolerancia a las mayores altitudes. La estacionalidad era mucho más influyente en el modelo de *L. pustulata*. La precipitación anual no resultó ser un factor determinante para la distribución de ambas especies, indicando que viven en lugares con regímenes hídricos distintos, pero con una fuerte sequía estival en común.



Fig. 3.29: Predicción del área de nichos potenciales para *Lasallia pustulata*, según el análisis de MaxEnt.

Variable	<i>L. hispanica</i> Contribución (%)	<i>L. pustulata</i> Contribución (%)
Tav	77.8	49
Pdm	21.5	38.6
Estac.	0.4	10.9
Prec. An.	0.2	1.5

Tabla 3.2: Contribución de las variables ambientales utilizadas para la modelización de nicho: Tav: temperatura media anual; Pdm: precipitación del mes más seco; Estac.: estacionalidad; Prec. An.: precipitación anual.

Estas dos especies simpátricas de *Lasallia* son capaces de coexistir en determinadas zonas gracias a su diferenciación de nicho, un fenómeno que fue descrito por primera vez en líquenes por Larson (1984). Parece claro que la ventaja adaptativa de *L. pustulata* reside en su mayor velocidad de crecimiento, mientras que *L. hispanica* es capaz de soportar condiciones más duras, colonizando de este modo hábitats donde *L. pustulata* no es capaz de prosperar. El estudio de las relaciones entre estas especies y su capacidad de adaptación nos proporciona un mayor entendimiento de la dinámica de las poblaciones y nos permite predecir su comportamiento bajo condiciones cambiantes. Si, según está predicho por el IPCC (2007), las temperaturas ascienden en su área de distribución común, las poblaciones de *L. hispanica* sufriría probablemente el incremento de la presión competitiva de otras especies, entre las que se encuentra *L. pustulata*, cuyo hábitat potencial se vería aumentado, teniendo en cuenta la mayor disponibilidad de agua provocada por el aumento de la lluvia en detrimento de la nieve y el incremento de la temperatura. Las zonas alpinas albergan una gran biodiversidad, muy rica en endemismos, que se ven especialmente amenazados por el cambio climático (Nash & Olafsen, 1995; Sala *et al.*, 2000; Lange & Green, 2005).





**3. ECOPHYSIOLOGICAL RESPONSE OF TWO SYMPATRIC SPECIES  
OF *LASALLIA* TO ALTITUDINAL GRADIENTS IN A  
MEDITERRANEAN MOUNTAIN**



## INTRODUCTION

Ecological gradients provide a stunningly interesting research field on the adaptative capacity of organisms. Altitudinal gradients are especially powerful for testing ecological and evolutionary responses of living beings to changing abiotic influences in an often narrow geographical space. Several parameters change along an altitudinal gradient. Among them, there are some general geophysical phenomena which are altitude specific, such as atmospheric pressure, temperature, clear-sky turbidity and UV-B radiation. But some others can be strongly contrasting on different places, such as moisture, light regime, wind, season length, geology and human land use (Körner, 2007), making the interpretation of studies on this field challenging.

Community structure and biodiversity of vegetation have been widely studied along altitudinal gradients (Whittaker, 1975; Körner, 1999) and the physiological response of vascular plants to altitudinal gradients has also received much attention (e.g.: Fitter *et al.*, 1998; Cordell *et al.*, 1998; Craine & Lee, 2003; Lévesque *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2004, 2006, 2007), mostly involving greenhouse experiments, which provide the possibility of discerning between responses caused by phenotypic plasticity or by genotypic differences.

Although not so abundant, there are also many studies focused on community structure of non vascular plants along altitudinal transects (e.g. Watson 1980, 1981; Grau *et al.*, 2007; Kessler, 2000; Frahm, 1990; Frahm & Gradstein, 1991; Grytnes *et al.*, 2006; Loppi *et al.*, 1997; Pirintsos *et al.*, 1993, 1995; Pintado *et al.*, 2001), which is not surprising when one considers that bryophytes and lichens constitute the most abundant vegetation of the highest altitudes, where, as vascular plants are no longer competitive, they dominate the landscape (Ahmadjian, 1995). Many of them can also occupy a wide altitudinal range, however, studies focused on the physiological response of single species along these altitudinal gradients are scarce (Pirintsos *et al.*, 2011; Sonesson, 1986; Swanson *et al.*, 1996; Larcher & Vareschi, 1988; Türk, 1983; Adams, 1971), although they could provide much information about adaptation strategies of lichens. It is not possible to perform long-term greenhouse experiments, for these organisms are difficult to cultivate and extremely slow-growing under culture conditions.

*Lasallia pustulata* (L.) Mérat is an Eurasian widely distributed lichen species (Nimis, 1993; Pérez-Ortega, 2004) and *Lasallia hispanica* (Frey) L.G. Sancho & A. Crespo is a Mediterranean endemic species, up to date collected in Italy, France, Morocco, Portugal and Spain (Fig. 3.1, bottom; Sancho & Crespo, 1989) and restricted to higher altitudes (Sancho & Crespo, 1989, Codogno & Sancho, 1991). Both species grow on sun exposed granitic boulders, but, when they coexist, they seem to have different niches. *L. pustulata* is often found on more protected sites, where thalli can get more humidity and dry out slower, while *L. hispanica* is able to cope with the drier conditions of a more exposed and vertical habitat (Sancho, 1986; Sancho & Crespo,

1989). It seems clear that *L. pustulata* can not stand the harsh conditions of high mountains, for it is rather thermophilic and does not tolerate the wind (Sancho, 1986). But, what is the reason for *L. hispanica* not growing lower than 900 m? Is it adapted to the specific environmental regime of high altitude? Or is it gradually excluded from lower latitudes with milder conditions by the faster growing and more competitive *L. pustulata*? Is the competition with *L. pustulata* and other species the barrier which has prevented *L. hispanica* colonising a wider distribution?

In order to answer the previous questions, we have analysed several ecophysiological and subcellular parameters on populations of both species, collected along three altitudinal transects in Sierra de Gredos, Central Spain, trying to find their ecological optimal conditions for photosynthetic productivity, as well as their adaptation strategies along the altitudinal gradient. We have made a thorough study of their potential CO<sub>2</sub> fixation by means of gas exchange measurements under controlled conditions of irradiation and temperature. The habitat of *L. hispanica* and its tolerance to higher altitudes led us to hypothesise that its photosynthetic performance would be better at lower temperatures and higher irradiances (Sancho & Kappen, 1989). We also expected a higher thallus specific weight for this species (Kappen, 1988). In this direction, we measured the content on chitin, as a quantifier of total fungal mass (Palmqvist *et al.*, 2002) and its relationship with the amount of ergosterol, the most abundant sterol of the fungal membrane, as an indicator of total fungal living mass (Sundberg *et al.*, 1999). We expected a higher amount of chitin with increasing elevation, in relation with the increase of TSW and as a result of the higher protection needed in harsher environments. We thought that altitude might induce changes on the thickness of the upper cortex as well, in order to protect the algal layer against excessive light and against desiccation, in an attempt to extend the active time in more exposed habitats.

It seemed likely that *L. hispanica* would show higher values of sugar alcohols, due to their protective role in desiccation (Farrar, 1976), and of gyrophoric acid, under the assumption that this secondary metabolite would protect the lichen against high light intensities (Solhaug & Gauslaa, 1996). This reasoning could also apply to the case of carotenoids, which are said to protect against the excess of visible light (Fahselt, 1994b). The amount of chlorophyll was therefore expected to decrease with altitude, especially the light harvesting Chl**b**, causing an increase in the Chl**a/b** ratio. Amino acid analysis was performed to check the possible role of arginine as an immobilising molecule of excess of the toxic NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (Dahlman *et al.*, 2002, 2003). We expected higher amounts of this amino acid with increasing elevation, as a consequence of snow accumulation, which produces an increase in N deposition in the form of NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.

Although both species cover a similar altitude range in this area (700–800 m), we did not expect *Lasallia pustulata* to show the described changes as markedly as *L. hispanica*. The reason is, as said, that the former usually appears in more sheltered niches.

## MATERIAL AND METHODS

### Lichen material

*Lasallia pustulata* is a common mainly Eurasiatic distributed species (Fig. 3.1, top), appearing from the sea level until 2000 m.a.s.l., usually in protected habitats (Sancho, 1986; Nimis, 1993; Pérez-Ortega, 2004). *Lasallia hispanica* is, as said, an endemic Mediterranean species, up to date known from Italy, France, Morocco, Portugal and Spain, the centre of its distribution (Fig. 3.1, bottom; Sancho & Crespo, 1989). In the Iberian Peninsula it grows from 900 m.a.s.l. and reaches the highest summits of Iberian Sistema Central (Almanzor, 2592 m; pers, obs.), on vertical, exposed, xeric and windy surfaces. A full morphological and anatomical description of this species is given in Sancho & Crespo (1989). The study material was collected across three elevational transects in the southern face of Sierra de Gredos. Transect 1 started in Santuario de Chilla, at 700 m.a.s.l. and reached la Portilla Bermeja, at 2416 m.a.s.l.; transect 2 followed Las Hiruelas pathway to Cerro de la Cagarruta, from 875 m.a.s.l. until 2300 m.a.s.l.; and transect 3 ranged from Guisando, at 900 m.a.s.l. to La Mira peak, at 2341 m.a.s.l. (Fig. 3.2). Full details of places of collection along the altitudinal gradient can be found in Table 3.1. Lichens from each sampling site are referred below as a population and each population is named after its place of origin with the following code: Tn–mx, where n indicates the number of the transect, from west to east, m the altitude in hectometres above sea level and x codes the species, Lh for *L. hispanica* and Lp for *L. pustulata*.

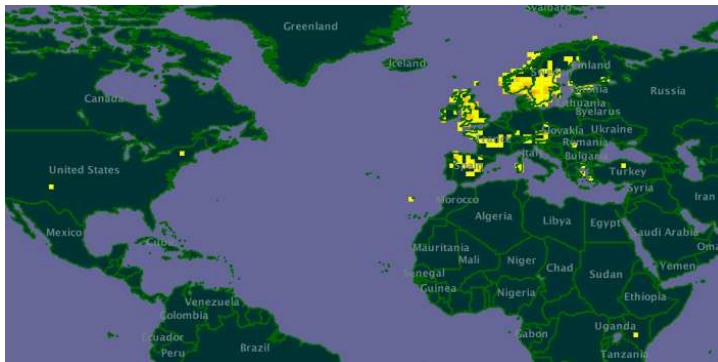
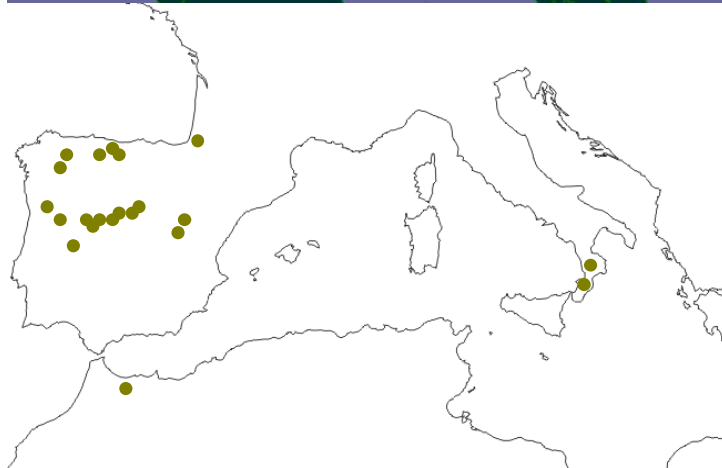


Fig. 3.1: Distribution map of *Lasallia pustulata* (top, source: [www.gbif.org](http://www.gbif.org)) and *Lasallia hispanica* (bottom). The occurrences of *Lasallia pustulata* outside Europe are highly doubtful.



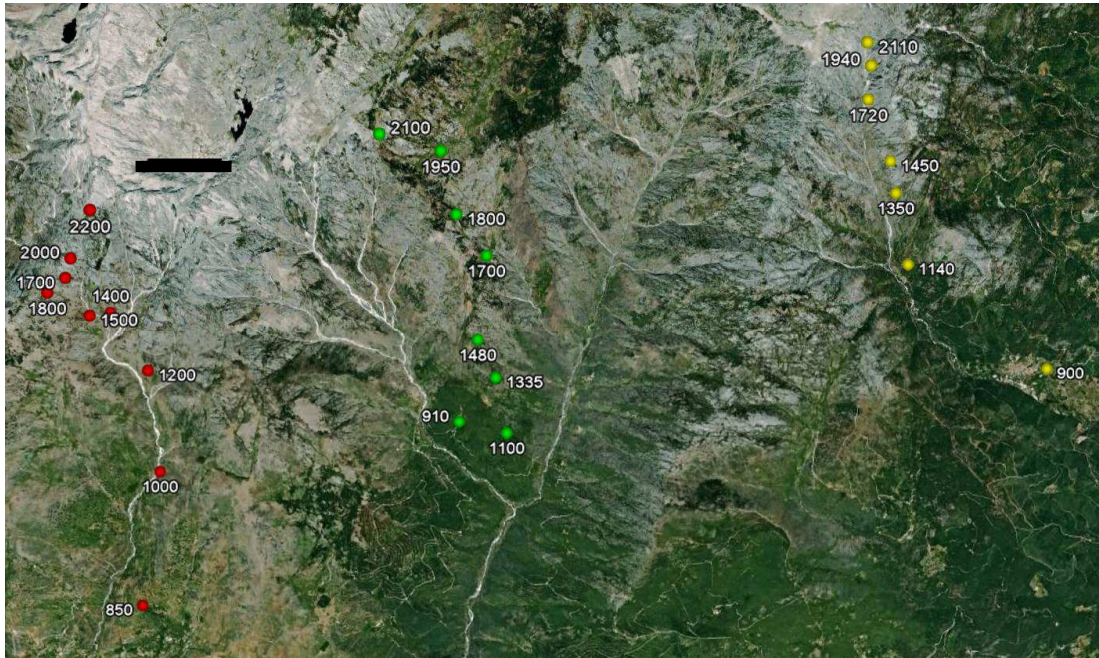


Fig. 3.2: Study area with location of collection samples. Red, transect 1; green, transect 2; yellow, transect 3. Labels indicate altitude. The black bar is the scale for 1 km. Map from Google Earth.

After collection, the thalli were air dried at 20 °C and subsequently stored in darkness at -21 °C until use. Collections were made trying to cover all the variability at each locality, taking thalli from different rocks and with different sizes. Unless otherwise stated, 4 sets of 2 to 6 thalli were made for each population for gas exchange analyses. Other samples from each point of sampling were destined to subcellular analyses and again 4 sets of between 2 and 6 thalli were made for this purpose.

#### Size and fertility of thalli

We measured the diameter of 100 thalli of the *Lasallia* species at each locality and, in the case of *L. hispanica*, we also counted the number of apothecia in those 100 thalli. We did not find any fertile thalli of *L. pustulata*.

#### Anatomical measurements

We selected five thalli from each locality and made five cross-sections in each one of them in order to measure the thickness of the whole thallus and of its layers (epinecral layer, upper cortex, algal layer, medulla and lower cortex, Fig. 3.3). For *L. hispanica* we also measured the length and width of 10 spores in each of five cross-sections of apothecia from each locality. Cross sections were made by means of a freezing microtome Slee MTC (Mainz). The sections (15 µm thick) were obtained from thalli and apothecia hydrated with deionized water for 4 h, and were frozen at -20 °C inside the microtome. Sections were mounted, observed and measured in water. Pictures of Fig. 3.3 were made in cross sections made by hand with a razor blade under a dissecting microscope (Nikon SMZ1500) at magnification X50, mounted in water and were observed and photographed under light microscopy (Nikon Eclipse 80i) using Nomarski differential interference contrast optics at magnification X200, and with a Nikon DS-Fi1+DS-L1 camera. Several pictures of each cross-section were made

and they were combined by means of the free software Combine ZP (Hadley, 2010). These pictures were made with the kind help of Dr. Víctor J. Rico.

Transect	Date and collectors	<i>L. hispanica</i>		<i>L. pustulata</i>	
1	5-6/07/2010 M. Vivas & G. Amo de Paz	2200 m	N 40°14'26,1"	1700 m	N 40°13'57"
		(T1-22Lh)	W 5°18'1,7"	(T1-17Lp)	W 5°18'26"
		2000 m	N 40°14'05,7"	1400 m	N 40°13,4'6"
		(T1-20Lh)	W 5°18'20,7"	(T1-14Lp)	W 5°18'7"
		1800 m	N 40°13'50"	1200 m	N 40°13'14"
		(T1-18Lh)	W 5°18'36,9"	(T1-12Lp)	W 5°17'44"
		1700 m	N 40°13'57"	1000 m	N 40°12'24"
		(T1-17Lh)	W 5°18'26"	(T1-10Lp)	W 5°17'41"
		1500 m	N 40°13'40,1"	850 m	N 40°11'17"
		(T1-15Lh)	W 5°17'16,3"	(T1-9Lp)	W 5°17'53"
2	10-11/07/2010 M. Vivas, S. Pérez Ortega & M. Arróniz	2100 m	N 40°15'03"	1700 m	N 40°14'11"
		(T2-21Lh)	W 5°15'12,7"	(T2-17Lp)	W 5°14'10"
		1950 m	N 40°14'57"	1480 m	N 40°13'31"
		(T2-20Lh)	W 5°14'37"	(T2-15Lp)	W 5°14'15"
		1800 m	N 40°14'29"	1335 m	N 40°13'13"
		(T2-18Lh)	W 5°14'28"	(T2-13Lp)	W 5°14'4"
		1700 m	N 40°14'11"	1100 m	N 40°12'46"
		(T2-17Lh)	W 5°14'10"	(T2-11Lp)	W 5°13'57"
		1480 m	N 40°13'31"	910 m	N 40°12'51"
		(T2-15Lh)	W 5°14'15"	(T2-9Lp)	W 5°14'28"
		1335 m	N 40°13'13"		
		(T2-13Lh)	W 5°14'04"		
3	15-16/07/2010 M. Vivas & J. Palá	2110 m	N 40°15'48"	1720 m	N 40°15'25"
		(T3-21Lh)	W 5°10'23"	(T3-17Lp)	W 5°10'18"
		1940 m	N 40°15'38"	1450 m	N 40°14'58"
		(T3-19Lh)	W 5°10'20"	(T3-15Lp)	W 5°10'1"
		1720 m	N 40°15'25"	1380 m	N 40°14'44"
		(T3-17Lh)	W 5°10'18"	(T3-14Lp)	W 5°9'55"
				1140 m	N 40°14'11"
				(T3-11Lp)	W 5°9'43"
				900 m	N 40°13'21"
				(T3-9Lp)	W 5°8'5"

Table 3.1: Date, collectors and coordinates of each point of sampling. The code for each sampling point is Tn-mx, where n indicates the number of the transect, from west to east, m the altitude in hectometres above sea level and x codes the species, Lh for *L. hispanica* and Lp for *L. pustulata*.



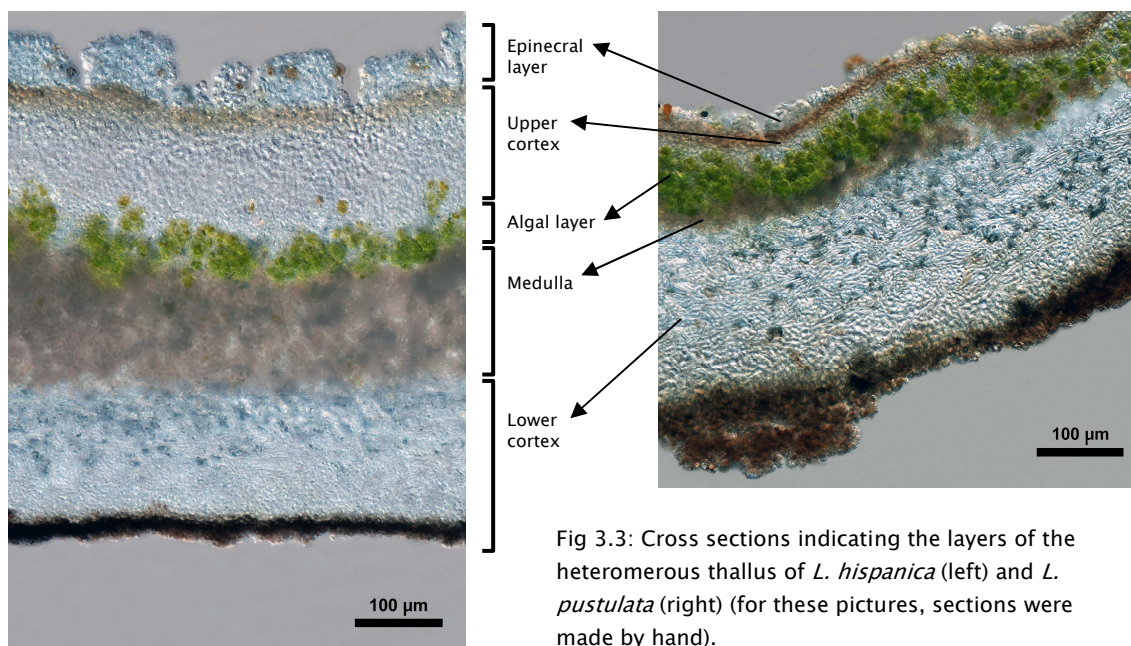


Fig 3.3: Cross sections indicating the layers of the heteromorous thallus of *L. hispanica* (left) and *L. pustulata* (right) (for these pictures, sections were made by hand).

### Gas-exchange measurements

Thalli were reactivated for three days in a chamber at 10 °C, 12h at a photosynthetically active photon flux density (PPFD) of 100  $\mu\text{mol photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , followed by 12h in darkness, sprayed once a day with mineral water. CO<sub>2</sub> exchange measurements were performed using a Compact Minicuvette System (CMS 400, Walz, Effeltrich, Germany) and a differential IRGA (Binos 100, Leybold-Heraeus, Germany) at fully controlled conditions of temperature, humidity and PPFD and at ambient CO<sub>2</sub> (350 ppm, approx.). A full description of the method is given elsewhere (Schroeter *et al.* 1994). Prior to measurements, lichens were fully hydrated by spraying with mineral water until saturation and then gently blotted with tissue paper to remove excess water. Light response curves were performed at 15 °C for every population collected, obtaining an initial dark respiration (DR) value in darkness until steady-state was reached, and then increasing PPFD stepwise from 25 to 1500  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  (25, 50, 100, 200, 400, 800, 1200 and 1500). In addition, for selected populations from each transect, supplementary light curves were made at 5, 10, 20 and 25 °C, except in the case of samples T2-9Lp, which were measured at 0, 10, 20 and 30 °C. Before and after each series of measurements, thalli were weighed so that thallus water content (as %DW) could be later determined. Rates were then calculated on a dry weight, a surface area and a chlorophyll content basis, according to von Caemmerer & Farquhar (1981). The PPFD response curves were analysed by statistical fitting to a Smith function, as detailed in Green *et al.* (1997). This fitting provided us with the following parameters: **Pc** (light compensation point, PPFD where net photosynthesis, **NP**, is 0, i.e., gross photosynthesis compensates dark respiration), **Ps** (light saturation point, calculated as PPFD where 90% of maximal measured net photosynthesis, **Amax**, is reached) and  $\Phi$  (apparent quantum yield for incident light, which is the initial slope of the light response curves). Photosynthetic efficiency quotient **KF** was also calculated as

$KF=(A_{max}+DR)/DR$  (Larcher, 1995). Temperature optima and temperature upper and lower compensation points (**T<sub>cu</sub>** and **T<sub>cl</sub>** respectively, i.e. temperatures where NP equals 0,) were calculated by fitting temperature response curves using 2<sup>nd</sup> degree polynomial functions.

After the gas-exchange measurements, thalli surface area of the samples was determined when the thallus was wet and fully expanded by taking a photograph and analysing it with ImageJ 1.42q software (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA). All samples were then dried in Silica Gel for 72 hours and their dry weight determined to the nearest 0.1 mg. Thallus specific weight (**TSW**, in  $g \cdot m^{-2}$ ) was calculated.

### Subcellular analyses

Thalli used for gas exchange were also used for the pigment analyses, according to Barnes *et al.* (1992). In brief, samples were repeatedly washed with CaCO<sub>3</sub> saturated acetone to remove lichen substances, and pigments extracted in CaCO<sub>3</sub> saturated DMSO. Absorbance of the extracts was measured using a UV-visible spectrophotometer (Uvikon XL, NorthStar Scientific, UK). Turbidity was checked at 750 nm and only samples with values lower than 0.010 absorbance units were taken into account. Other wavelengths measured were 664.9, 648.2, 480, 435 and 415 nm, and values obtained were used to calculate concentrations (expressed in  $\mu g \cdot mg^{-1}$  dry weight) of chlorophylls *a* and *b* (**Chl<sub>a</sub>** and **Chl<sub>b</sub>**) and total carotenoids (**Car**) with the equations proposed by Barnes *et al.* (1992) and Wellburn (1994). Chlorophyll degradation was calculated by the ratio between absorbance at 435 and 415 nm (OD<sub>435/415</sub>), as suggested by Ronen & Galun (1984). Chl<sub>a</sub> was used as a proxy for the number of photobiont cells (Raven, 1992; Enríquez *et al.* 1996). The other set of samples was used to perform chitin, ergosterol, aminoacid, sugars, gyrophoric acid and C/N analysis. To assess total fungal mass, the fungal cell wall component chitin (**Chit**) was used as a proxy for total fungal mass and ergosterol (**Erg**) as an indicator of fungal living biomass. Ergosterol is the dominant sterol in fungal plasma membrane (Weete 1973; Palmqvist *et al.*, 2002) and has been used as a proxy for the metabolic activity of fungi in mycorrhizal associations with plants (Ekblad & Näsholm, 1996; Ekblad *et al.*, 1998) as well as in lichens (Palmqvist *et al.*, 1998, 2002; Gaio-Oliveira *et al.*, 2004). Both chitin and ergosterol were quantified by HPLC techniques, according to Dahlmann *et al.*, 2001. Samples were first milled to a homogeneous powder shortly before analysis. 20 mg of powder were mixed with 1 ml ethanol, shaken intensively on a Vortex and incubated on a shaker at 5 °C for 30 min. After centrifugation (14000 rpm, 15 min) Erg was determined in the supernatant by HPLC (Waters, Milford, USA), using an ODS-ultra sphere column (250 mm x 4.6 mm; particle size 5  $\mu m$ ) as separator and isocratic elution with 100% methanol as mobile phase. The entire process was carried out in darkness to avoid degradation of the compound. Erg absorption at 280 nm was measured with a UV detector. Data were corrected for an extraction yield of 80% (Dahlman *et al.*, 2001). Chit was measured in the pellet remaining after Erg extraction. We checked that there was no loss of Chit during the Erg extraction by comparing the content with samples that had not been previously

extracted for Erg determination (data not shown). Samples were washed with 0.2 M NaOH to remove amino acids and proteins that could interfere with the results. Acid hydrolysis in 6M HCl was used to release the glucosamine residues, which were converted to fluorescent derivatives by treatment with 9-fluorenylmethylchloroformate (FMOC), and then analysed by RP-HPLC using gradient elution. Data were corrected for an extraction yield of 83% (Dahlmann *et al.*, 2001, Ekblad & Näsholm, 1996).

### **Carbon and Nitrogen, Amino acid, Sugar and Gyrophoric acid analyses**

These analyses were performed following the same procedures described in Chapter 2.

### **Niche modeling**

The maximum entropy model implemented in the program MaxEnt v.3.3.3 (Phillips *et al.*, 2004, 2006) was used to recover the environmental niche of *Lasallia hispanica* and *L. pustulata* estimated from presence-only data, in the same way as in the previous chapter. Presence data was retrieved from GBIF (<http://www.data.gbif.org>) from which 23 and 79 georeferenced records were obtained for *L. hispanica* and *L. pustulata* respectively. Some of these records were removed, because they were incomplete, and the localities studied in this chapter were also added, resulting in a total number of georeferenced records of 61 for *L. hispanica* and 74 for *L. pustulata*. Models were performed for the current environmental conditions. Analyses were performed in the same way than in the previous chapter, although only for current environmental conditions.

### **Statistics**

Statistical analyses were conducted in R 2.10.0 (R Development Core Team, 2009) with the help of the packages multcomp (Hothorn *et al.*, 2008), Hmisc (Harrell, 2012) and FactoMineR (Lê *et al.*, 2008). ANOVA followed by Tukey's HSD post-hoc test were performed to test the differences within the species. For differences between the species, t-tests were calculated. Significant differences were considered for  $p < 0.05$ . Correlation matrices provided understanding on the relationships between the variables. Some of these relationships were plotted and fitted by simple linear regression. Principal Component Analysis was performed to group the variables. Graphs for gas exchange, fittings to Smith function and graphs for subcellular components results were made using SigmaPlot 10.0 (Chicago, Illinois, USA). Graphs for PCAs were obtained in R.

## **RESULTS**

### **CO<sub>2</sub> exchange measurements**

One of our aims was to characterise the photosynthetic behaviour of the two species of *Lasallia* present in Iberian Peninsula along an altitudinal gradient. For this purpose, we measured net photosynthesis under different experimental conditions. The results are shown in Figs. 3.4 to 3.15.

Although the absolute rate changed, it is noteworthy that the optimal temperature for photosynthesis was similar along the altitudinal transects (Figs. 3.5, 3.7, 3.9, 3.11, 3.13, 3.15, Tables 3a.2, 3a.4, 3a.6, 3a.8, 3a.10, 3a.12, in the Appendix 3).

The results from the first transect of *Lasallia hispanica* are given in Figs. 3.4 and 3.5. Populations T1-22Lh, T1-18Lh and T1-15Lh (from 2200, 1800 and 1500 m.a.s.l.) were thoroughly studied, performing light curves at 5 temperatures. They show a similar behaviour and the expected increase in DR and light compensation point (Pc) with temperature. T1-22Lh and T1-15Lh had very similar rates, while T1-18Lh had higher rates at every temperature. The main difference lies in the response of T1-18Lh at 25 °C, which is strongly influenced by the high DR. This decline can also be seen in the temperature response curves of these three populations (Fig. 3.5). The curve for T1-18Lh is much more pronounced, which reflects a higher variation in Amax rates with temperature. For this reason, T<sub>cl</sub> and T<sub>cu</sub> are not very different among populations although the total area under the curve is obviously much higher for T1-18Lh (Table 3a.2). Photosynthetic response to light at 15 °C for all sample points on the first transect are also plotted in Fig. 3.4, where we can see similar rates for T1-22Lh, T1-22Lh and T1-15Lh, while T1-18Lh shows higher rates and higher quantum efficiency,  $\Phi$  (Table 3a.1).

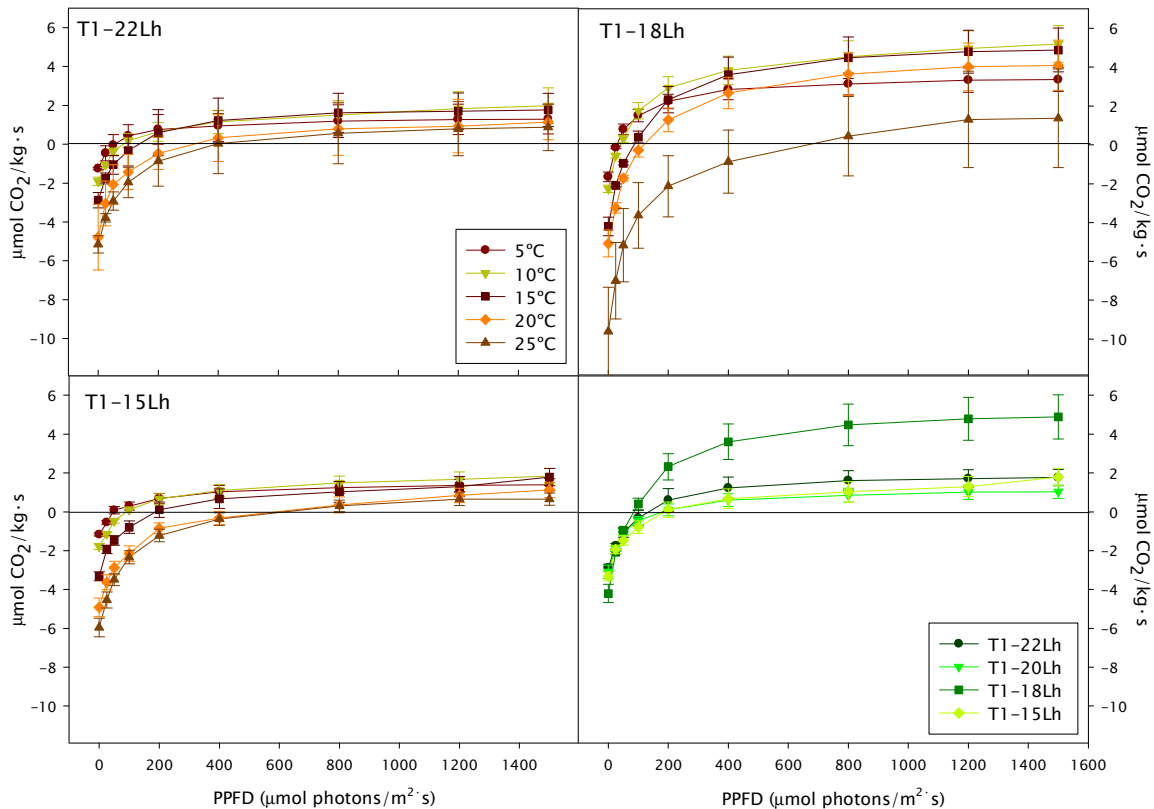


Fig. 3.4: Light response curves of gas exchange for *Lasallia hispanica* samples from the first transect, with rates on a dry weight basis. Top left: T1-22Lh samples; top right: T1-18Lh samples and bottom left: T1-15Lh samples response to light at different temperatures. Bottom right: Light curves of every altitude sampled in the first transect at 15 °C.

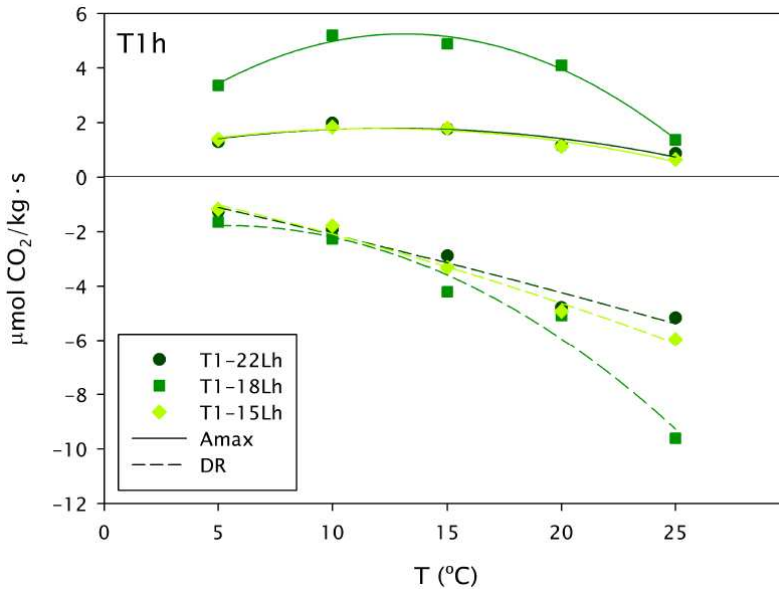


Fig. 3.5: Temperature response curves of gas exchange for *Lasallia hispanica* samples from the first transect, with rates on a dry weight basis. Amax (solid lines, net photosynthesis at  $1500 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) and DR (dashed lines, dark respiration, at  $0 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) at every measuring temperature.

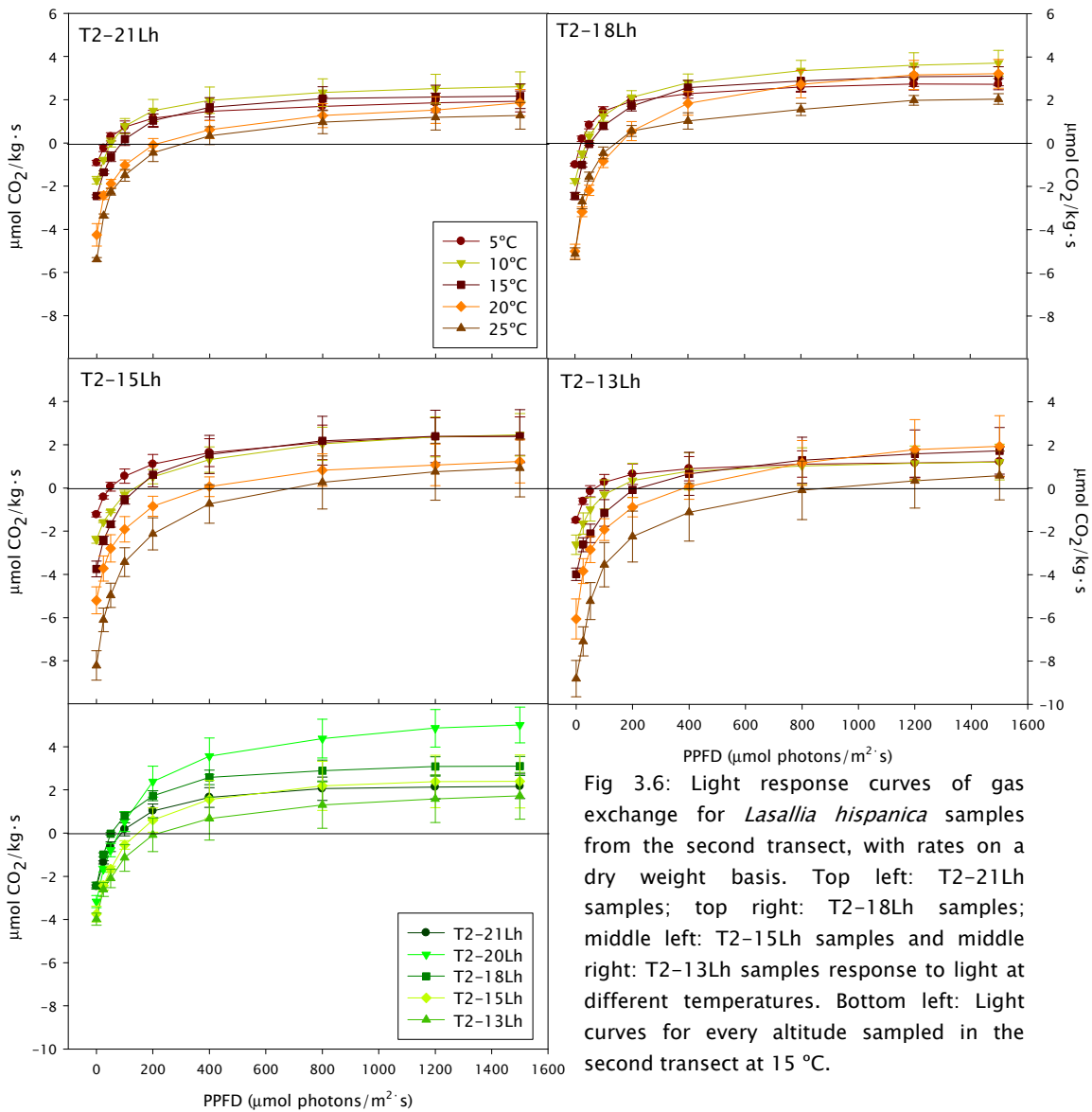


Fig 3.6: Light response curves of gas exchange for *Lasallia hispanica* samples from the second transect, with rates on a dry weight basis. Top left: T2-21Lh samples; top right: T2-18Lh samples; middle left: T2-15Lh samples and middle right: T2-13Lh samples response to light at different temperatures. Bottom left: Light curves for every altitude sampled in the second transect at  $15^\circ\text{C}$ .

Fig. 3.6 and 3.7 and Table 3a.3 show the results for the second transect. In this case, we measured four populations in detail: T2-21Lh, T2-18Lh, T2-15Lh and T2-13Lh (from 2100, 1800, 1480 and 1335 m.a.s.l. respectively). The two lowest populations, T2-15Lh and T2-13Lh show a greater response in DR to increase in temperature. There are no great differences on T<sub>cl</sub>, T<sub>cu</sub> or area, but optimal temperature for A<sub>max</sub> does increase with decreasing altitude. The comparison of the light curves of all the populations of the second transect at 15 °C shows that the one with highest quantum efficiency,  $\Phi$ , is T2-20Lh (1950 m), and clearly separated from the others.

On the third transect we would only collect three populations (Figs. 3.8 and 3.9), of which two were analysed at 5 temperatures: T3-21Lh and T3-17Lh (2110 and 1720 m, respectively). Their temperature responses were fairly similar (Figs. 3.8 and 3.9), but T3-21Lh always had higher rates, as well as lower T<sub>cl</sub>, higher T<sub>cu</sub> and higher area under the curve. The light response curves of the three populations showed similar behaviour at 15 °C.

We fitted A<sub>max</sub> of all the three transects of *L. hispanica* calculated both on a dry weight and on a surface area basis with a quadratic function and we found an optimal altitude at 1800 m.a.s.l. approx., with lower values at lower and higher altitudes. DR also showed a significant linear tendency to decrease (less negative values) with increase in altitude when calculated on a dry weight basis. This tendency disappeared when area based rates were used (Fig. 3a.32, in Appendix 3).

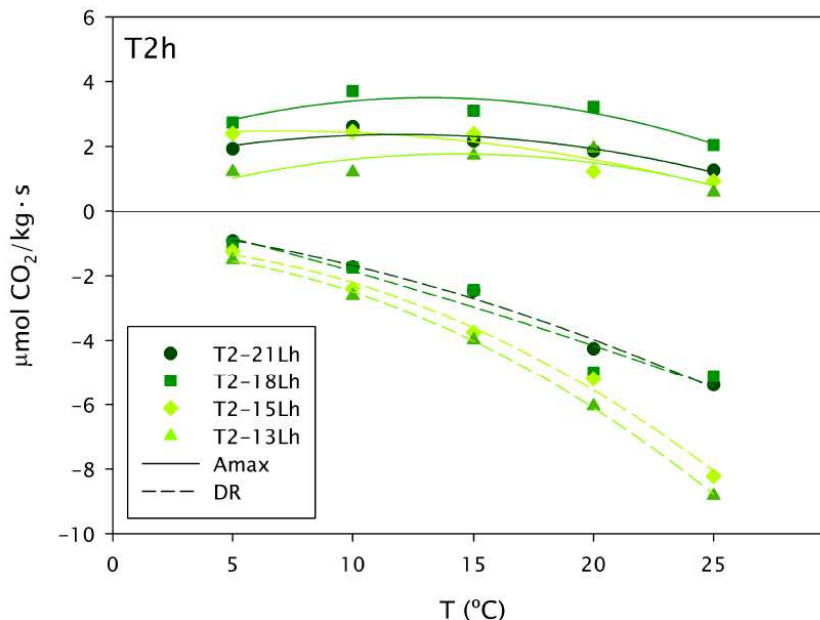


Fig 3.7: Temperature response curves of gas exchange for *Lasallia hispanica* samples from the second transect, with rates on a dry weight basis. A<sub>max</sub> (solid lines, net photosynthesis at 1500 μmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) and DR (dashed lines, dark respiration, at 0 μmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) at every measuring temperature. Data are fitted using polynomial regressions (2<sup>nd</sup> degree, R<sup>2</sup> always >0.95).

The results of the gas exchange measurements of *L. pustulata* are given in Figs. 3.10 to 3.15 and Tables 3a.7 to 3a.12. In the first transect, three populations were measured in detail: T1-17Lp, T1-12Lp and T1-9Lp (1700, 1200 and 850 m, respectively). Their responses to temperature were fairly similar, as well as their T<sub>opt</sub>, but T1-12Lp showed much lower rates at all the temperatures, its range between T<sub>cl</sub> and T<sub>cu</sub> was narrower, and the area under the curve was much smaller. However, DR



were all but identical for the three populations. When light curves at 15 °C for the five populations in this transect are compared (Fig. 3. 10) we can see that the response of T1-14Lp is similar to that of T1-12Lp, with respect to  $A_{max}$  and  $\Phi$ , while T1-10Lp behaves similarly to T1-17Lp and T1-9Lp, although with a slightly higher  $A_{max}$ .

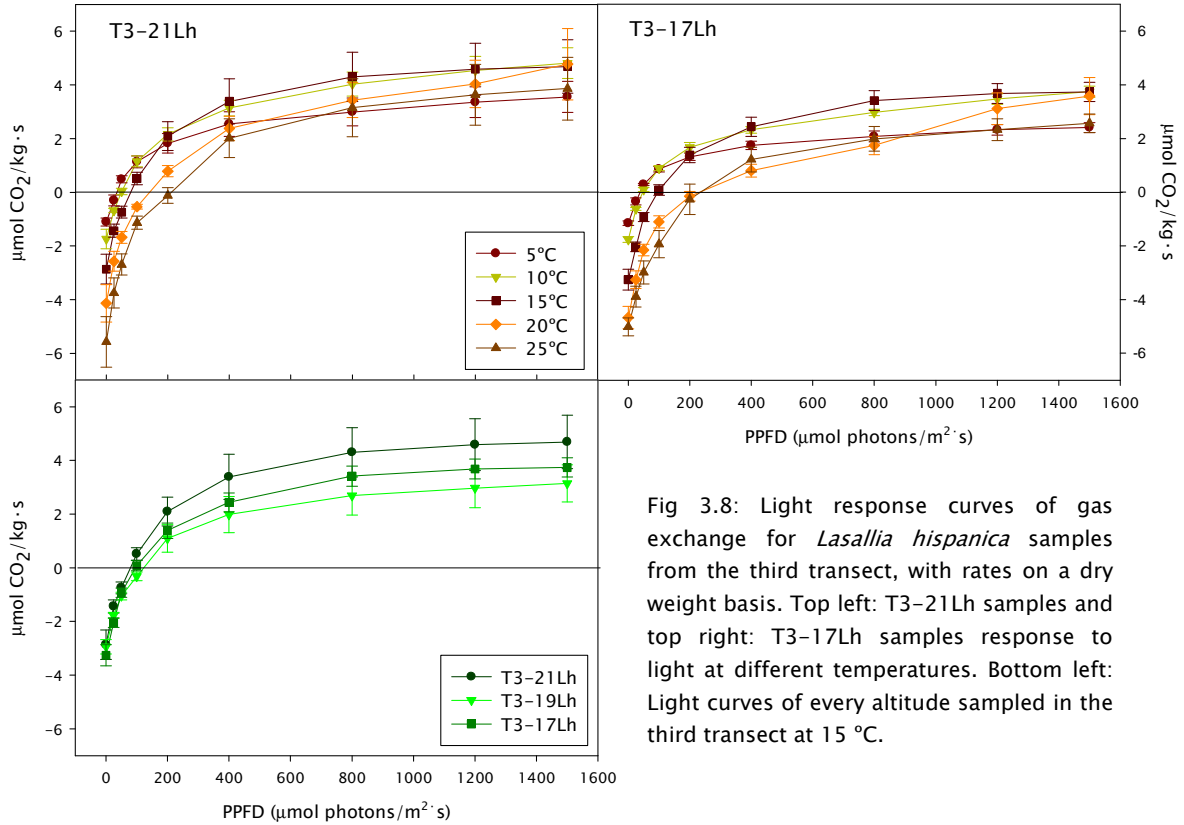


Fig 3.8: Light response curves of gas exchange for *Lasallia hispanica* samples from the third transect, with rates on a dry weight basis. Top left: T3-21Lh samples and top right: T3-17Lh samples response to light at different temperatures. Bottom left: Light curves of every altitude sampled in the third transect at 15°C.

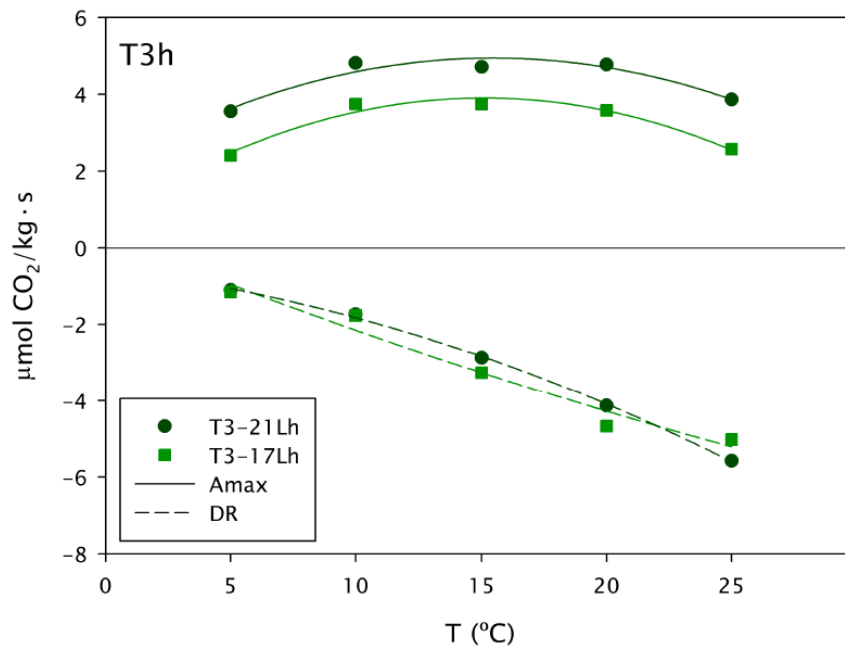


Fig 3.9: Temperature response curves of gas exchange for *Lasallia hispanica* samples from the third transect, with rates on a dry weight basis.  $A_{max}$  (solid lines, net photosynthesis at  $1500 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) and DR (dashed lines, dark respiration, at  $0 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) at every measuring temperature. Data are fitted using polynomial regressions (2<sup>nd</sup> degree,  $R^2$  always  $>0.95$ ).

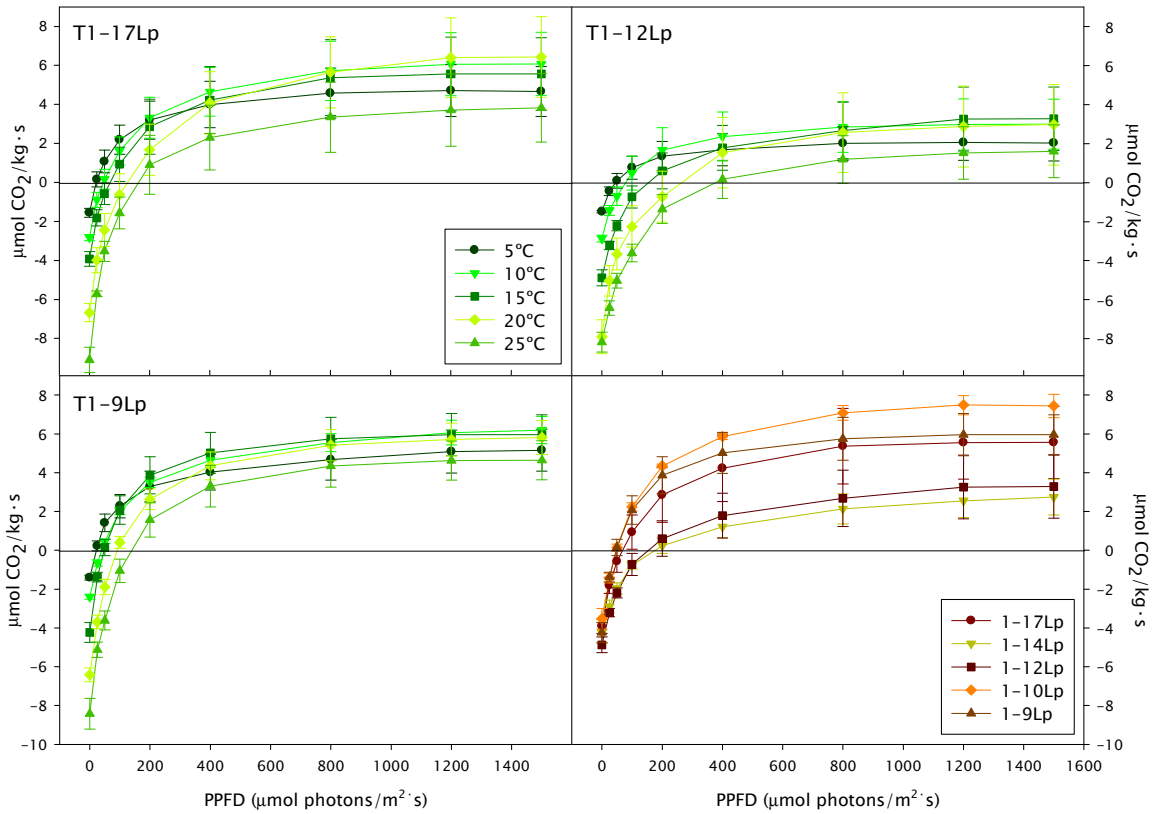


Fig. 3.10: Light response curves of gas exchange for *Lasallia pustulata* samples from the first transect, with rates on a dry weight basis. Top left: T1-17Lp samples; top right: T1-12Lp samples and bottom left: T1-9Lp samples response to light at different temperatures. Bottom right: Light curves of every altitude sampled in the first transect at 15 °C.

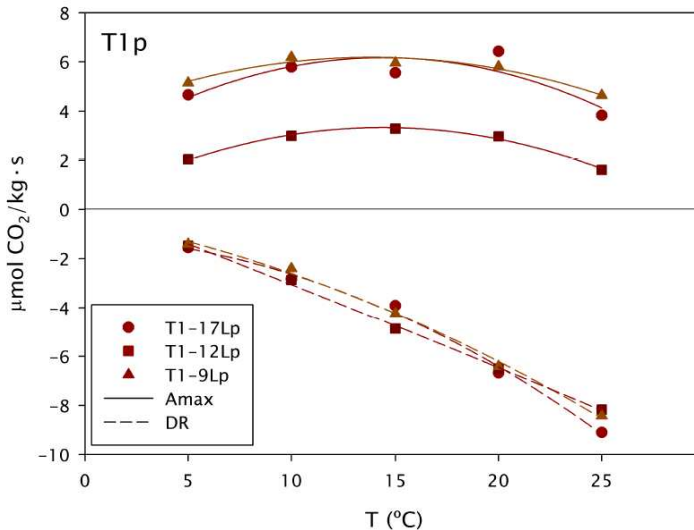


Fig. 3.11: Temperature response curves of gas exchange for *Lasallia pustulata* samples from the first transect, with rates on a dry weight basis. Amax (solid lines, net photosynthesis at 1500  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) and DR (dashed lines, dark respiration, at 0  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) at every measuring temperature. Data are fitted using polynomial regressions (2<sup>nd</sup> degree,  $R^2$  always >0.95).

On the second transect (Figs. 3.12 and 3.13 and Tables 3a.9 and 3a.10), T2-17Lp and T2-13Lp (1700 and 1335 m respectively), were measured at 5, 10, 15, 20 and 25 °C whilst T2-9Lp (910 m), which was measured at 0, 10, 20 and 30 °C. T2-9Lp, behaves very differently. Its productivity is higher at every temperature (Fig. 3.13) and its temperature range for NP is much broader. In fact, T2-17Lp barely reaches NP at 20 °C and does not reach it at all at 25 °C, while T2-13Lp only compensates DR at 5 and 10 °C. Obviously, the effective area under the curve of temperatures is much bigger for



T2-9Lp. It also shows a higher  $T_{opt}$ . When comparing the light response curves at 15° a big difference can be seen between the group containing T2-17Lp to T2-11Lp and T2-9Lp, although the latter was measured at 10 °C, meaning that its rate at 15 °C would be at least slightly higher, taking into account its  $T_{opt}$ .

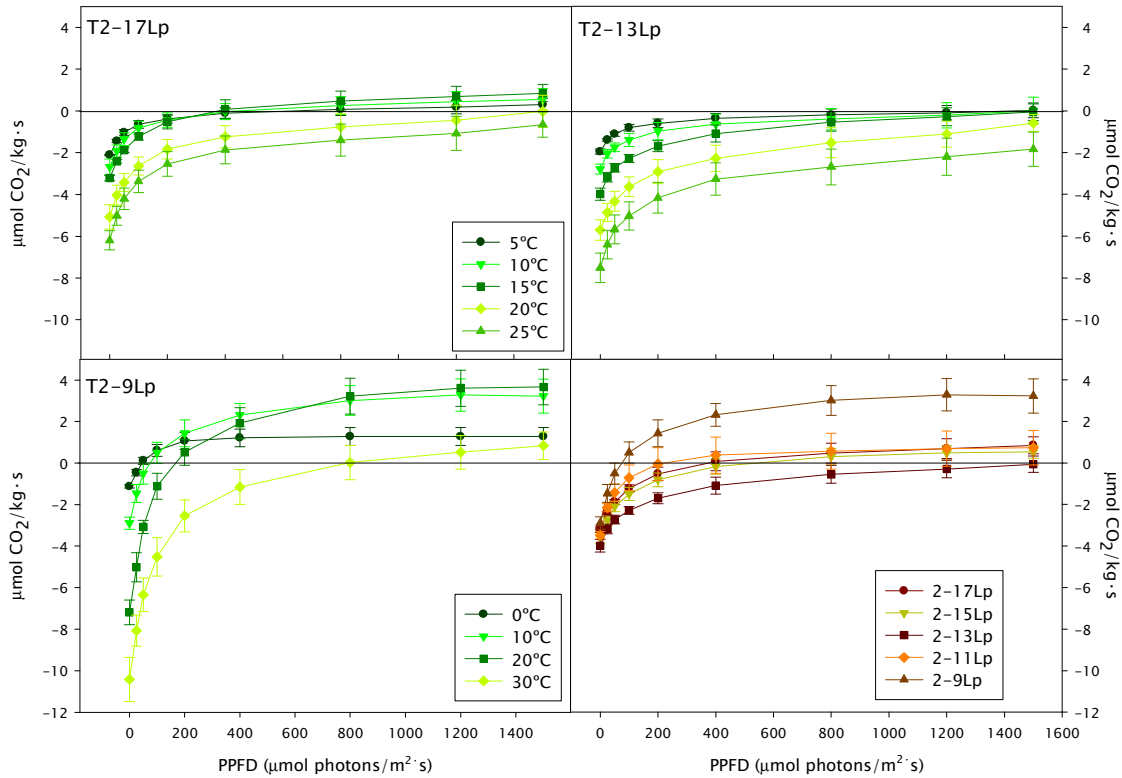


Fig. 3.12: Light response curves of gas exchange for *Lasallia pustulata* samples from the second transect, with rates on a dry weight basis. Top left: T2-17Lp samples; top right: T2-13Lp samples and bottom left: T2-9Lp samples response to light at different temperatures. Bottom right: Light curves of every altitude sampled in the second transect at 15 °C, with the exception of T2-9Lp, whose curve was measured at 10 °C.

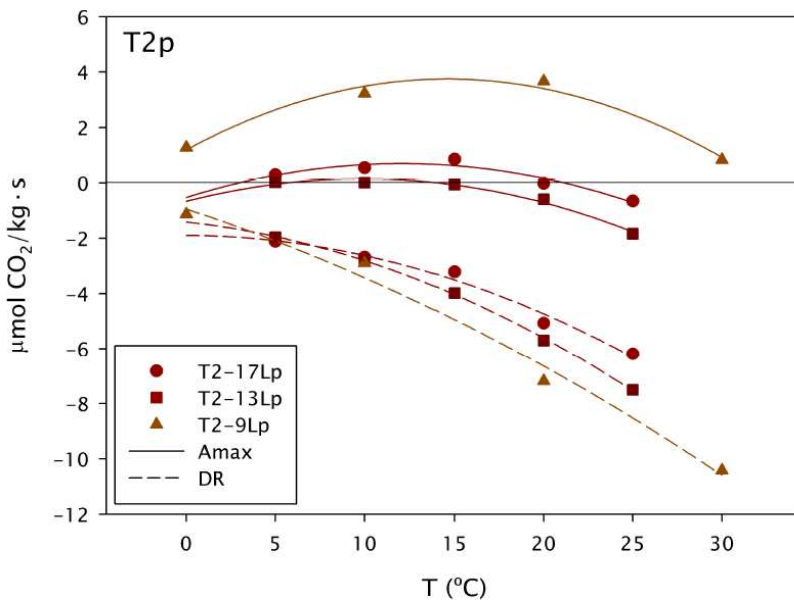


Fig 3.13: Temperature response curves of gas exchange for *Lasallia pustulata* samples from the second transect, with rates on a dry weight basis.  $A_{max}$  (solid lines, net photosynthesis at 1500  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) and DR (dashed lines, dark respiration, at 0  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) at every measuring temperature. Data are fitted using polynomial regressions (2<sup>nd</sup> degree,  $R^2$  always >0.95).

For the third transect (Figs. 3.14 and 3.15, Tables 3a.11 and 3a.12), although we collected samples on five points, as for *L. hispanica*, we could only make gas exchange

measurements on three populations, as there were no more populations with enough thalli in this transect. Among these three populations, T3-14Lp and T3-9Lp (1350 and 900 m respectively) were thoroughly analysed. Their behaviour is similar at low temperatures but differ slightly at 20 and 25 °C, with T2-13Lp always having higher rates and a higher Tcu. When T3-11Lp (1140 m) is added to the plot of light response at 15 °C, we can see that this population has higher DR, NP and  $\Phi$  than the others.

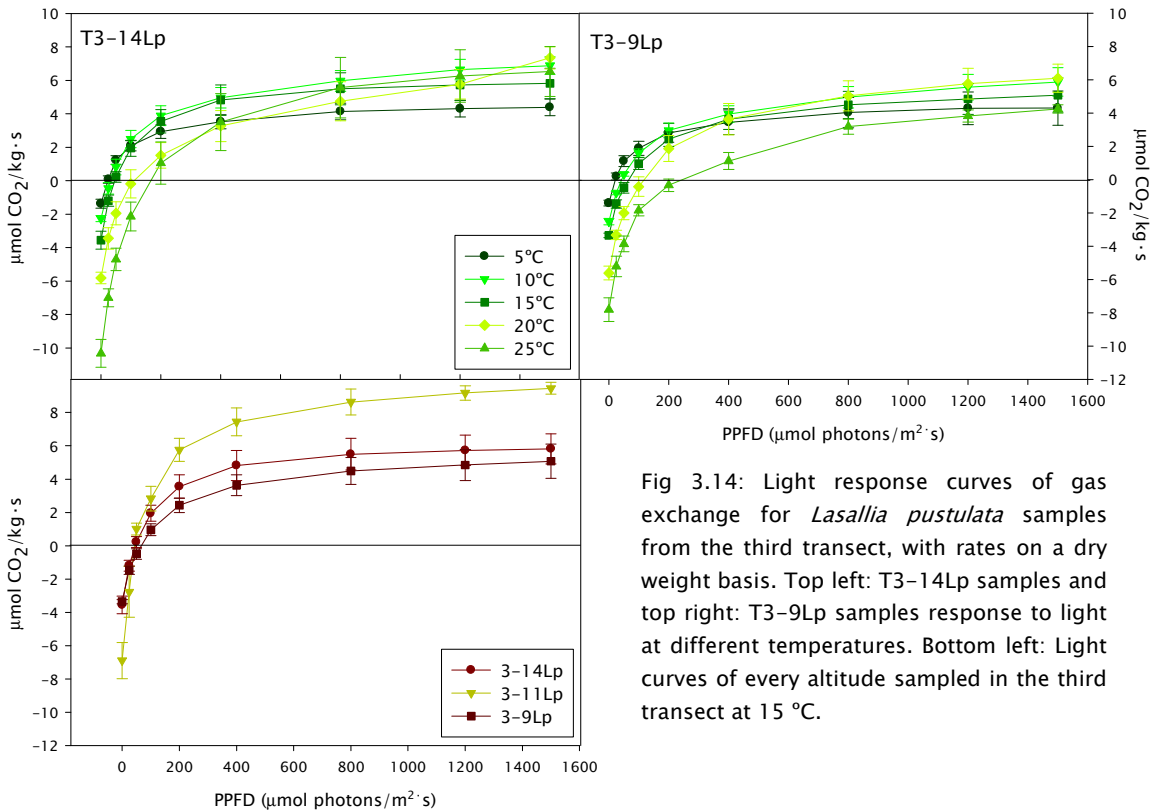


Fig 3.14: Light response curves of gas exchange for *Lasallia pustulata* samples from the third transect, with rates on a dry weight basis. Top left: T3-14Lp samples and top right: T3-9Lp samples response to light at different temperatures. Bottom left: Light curves of every altitude sampled in the third transect at 15 °C.

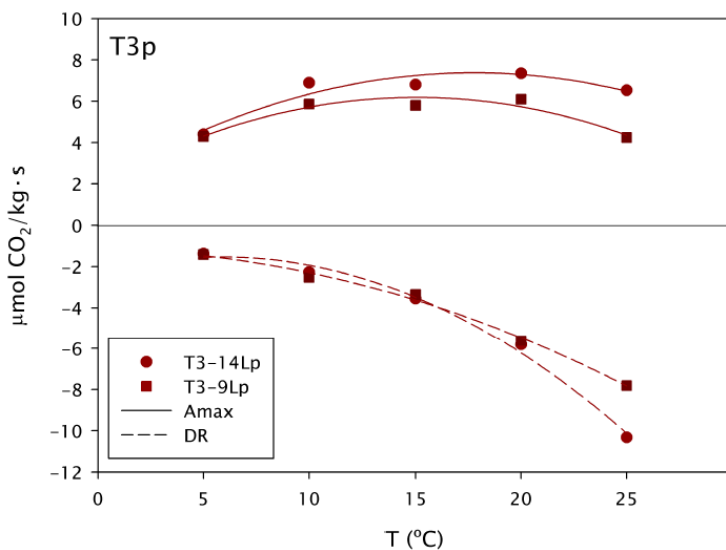


Fig 3.15: Temperature response curves of gas exchange for *Lasallia pustulata* samples from the third transect, with rates on a dry weight basis. Amax (solid lines, net photosynthesis at 1500  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) and DR (dashed lines, dark respiration, at 0  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) at every measuring temperature. Data are fitted using polynomial regressions (2<sup>nd</sup> degree,  $R^2$  always >0.95).

We can see in Fig. 3.16 the efficiency quotient KF for all the populations (numeric values are in Tables 3a.1 to 3a.11). In most cases, KF is maximal at the lowest temperature and decreases as temperature increases.

A comparison of KF between populations of both species from similar altitudes is shown on Appendix 3 (Figs. 3a.1 and 3a.2). *L. hispanica* always shows a lower KF than *L. pustulata* on the first transect (Fig. 3a.1), but the difference is not statistically significant. In contrast, when comparing the results obtained for the transect 2, the pattern is reversed, having *L. hispanica* higher values than *L. pustulata*, with statistically significant differences between T2-18Lh and T2-17Lp (Fig. 3a.2). Amax is compared on a similar fashion on Figs. 3a.3 and 3a.4).

### **Size and fertility of thalli**

As shown in Fig. 3.17, we found no relationship between altitude and number of apothecia of *L. hispanica*. Similarly, no relationship was found either between size of thalli and altitude for both species (Figs. 3.17 and 3.18).

### **Anatomical measurements**

*L. hispanica* thalli on the first and the third transects, showed a general decrease in the thickness of all thallus layers towards lower elevations (Fig. 3.19). However, the second transect showed the opposite trend. These changes were statistically significant in many cases (Figs. 3a.5 to 3a.7). Spore size had lower values in both length and width at 2000 m in all three transects but there was no clear pattern with altitude (Fig. 3.20).

*L. pustulata* in the first transect showed a tendency to have thicker thalli towards low elevations (Fig. 3.21) and total thallus thickness was significantly and negatively correlated with altitude. With the exception of the algal layer, the correlations between all the other layers and the elevation were negative, although significant only in the case of the medulla and the lower cortex (Fig. 3a.10). Results were very uniform along the second transect with no significant correlations with altitude (Fig. 3a.11) and, in the third transect, there was a tendency to thinner layers at lower sites with the exception of the lowest point which had a greater thickness than expected (Fig. 3a.12).

The anatomical measurements of both species of *Lasallia* showed no clear tendency with respect to altitude (Figs. 3.19 to 3.21 and 3a.5 to 3a.12) and the differences found in the thickness of the thalli and their layers are probably more dependent on the particular conditions of each point than on its altitude.

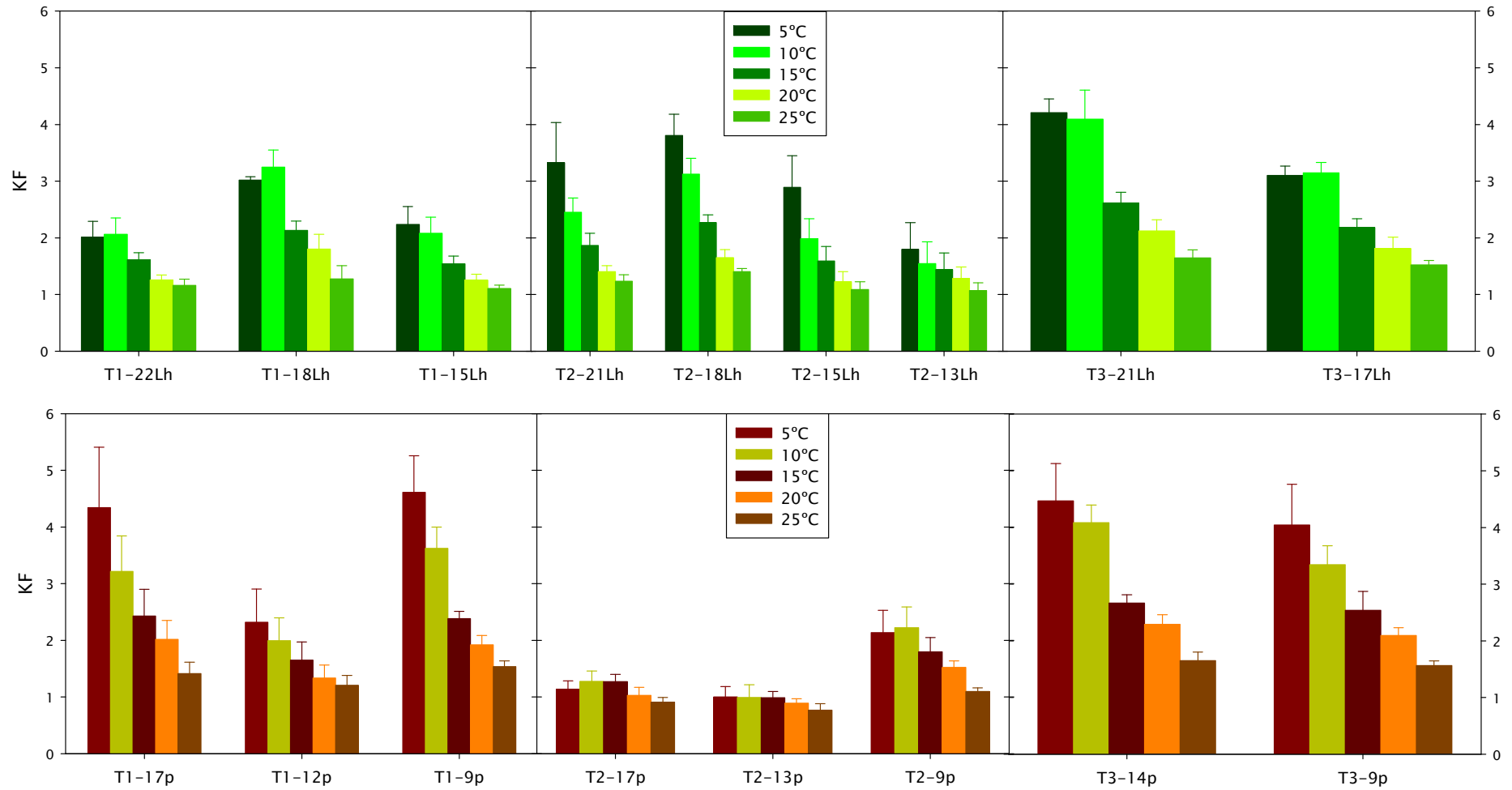


Fig. 3.16: Photosynthetic efficiency quotient for all the transects of *Lasallia hispanica* (top) and *Lasallia pustulata* (bottom) at every temperature measured.

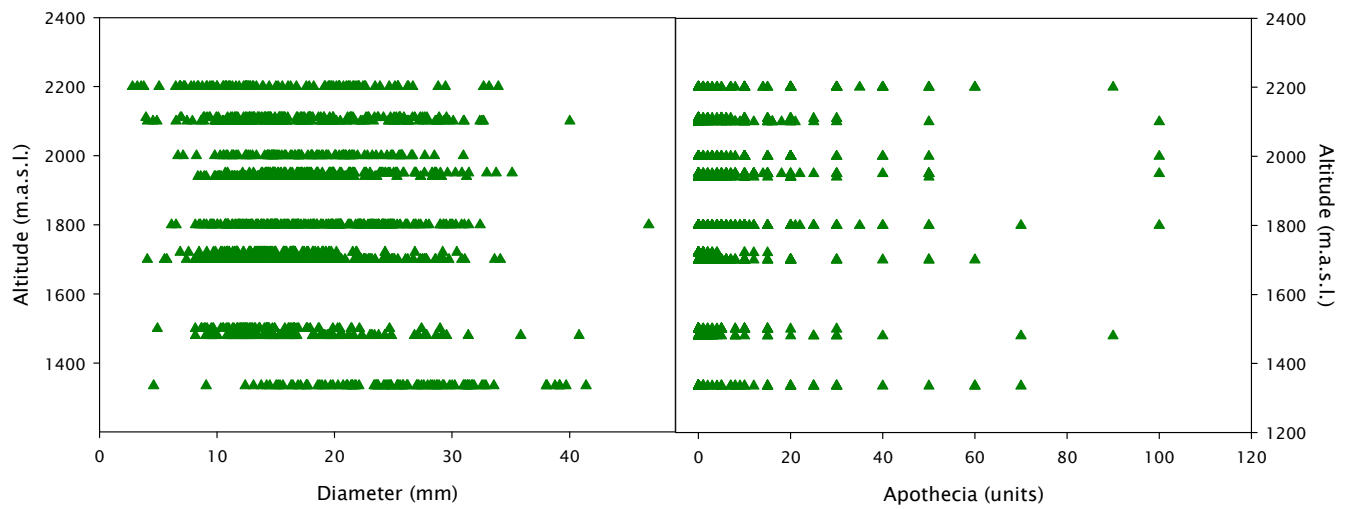


Fig. 3.17: Plots between altitude and thalli diameter (left) and altitude and number of apothecia (right) of *Lasallia hispanica*.

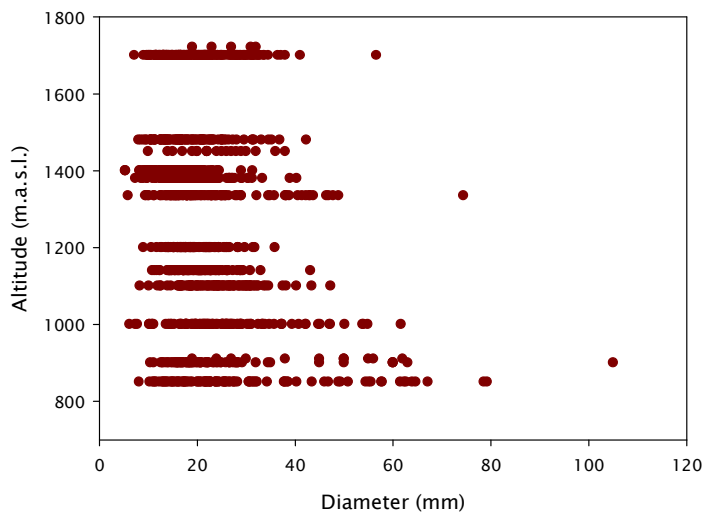


Fig. 3.18: Plot between altitude and thalli diameter of *Lasallia pustulata*.

### Subcellular analyses

Data from all the three transects was pooled for analysis to explore the possibility of linear relationships between altitude and some of the subcellular components measured. In most subcellular components there was not a very good fit with linear regression. However, some trends were found and were often statistically significant. In both species the increase in altitude is related with an increase in TSW, Chit, Chit/Erg and Taa, and with a decrease in sucrose. The species had opposite responses to altitude of N, Glu and rib/man. In *L. pustulata* elevation was also related with an increase of Chl*b*, total Chl and car and with a decrease of Gyr and fruc. For *L. hispanica*, altitude was directly related to Arg and inversely related to Erg, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, C, C/N and rib (Figs. 3a.29 to 3a.36, in the Appendix 3, and 3.23 to 3.25).

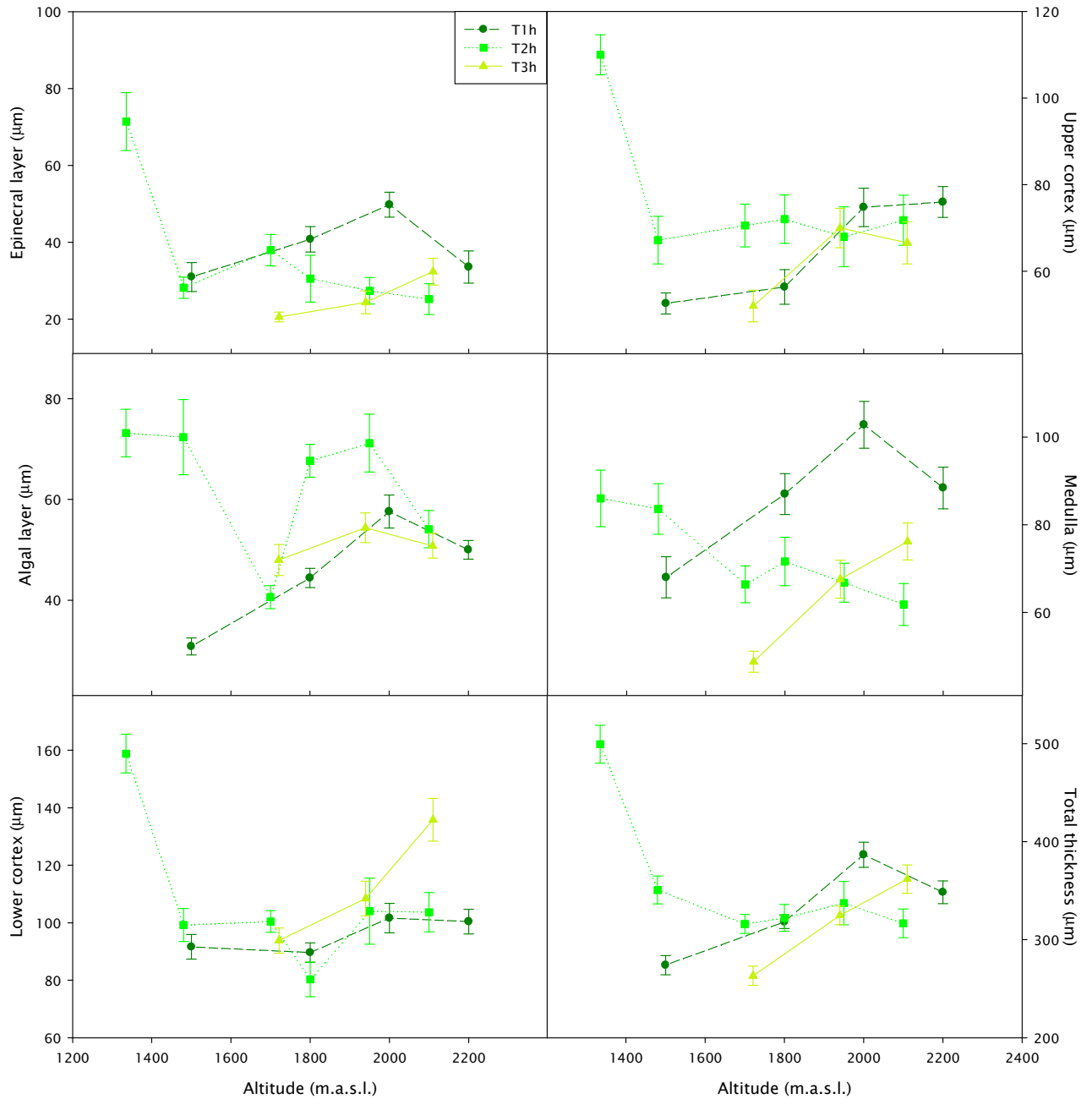


Fig. 3.19: Plots of anatomical measurements of the thalli for *L. hispanica* vs. altitude. From left to right and from top to bottom: epinecral layer, upper cortex, algal layer, medulla, lower cortex and total thickness. Deep green and circles: results for the first transect; light green and squares: results for the second transect; yellow green and triangles: third transect.

### Multivariate analyses

From all the variables measured for each locality of Fig. 3.2 a total of 34 were included in the preliminary correlation matrices shown on Figs. 3a.13 to 3.20. The variables which showed higher correlation coefficients were selected to make PCAs.

PCAs for *Lasallia hispanica* were performed with variables chosen according to the correlation matrices in Figs. 3a.15 to 3a.17. These variables were: Altitude, TSW, Chla, carotenoids, Erg, total aa, % of arginine,  $\text{NH}_4^+$ , C to N ratio, gyrophoric acid,

ribitol to mannitol plus arabitol ratio, total sugar content, Amax and DR, this latter in absolute value and at 15 °C. A consensus PCA (Fig. 3.26), as well as a single PCA for each transect were performed (Figs. 3a.37 to 3a.39, in Appendix 3).

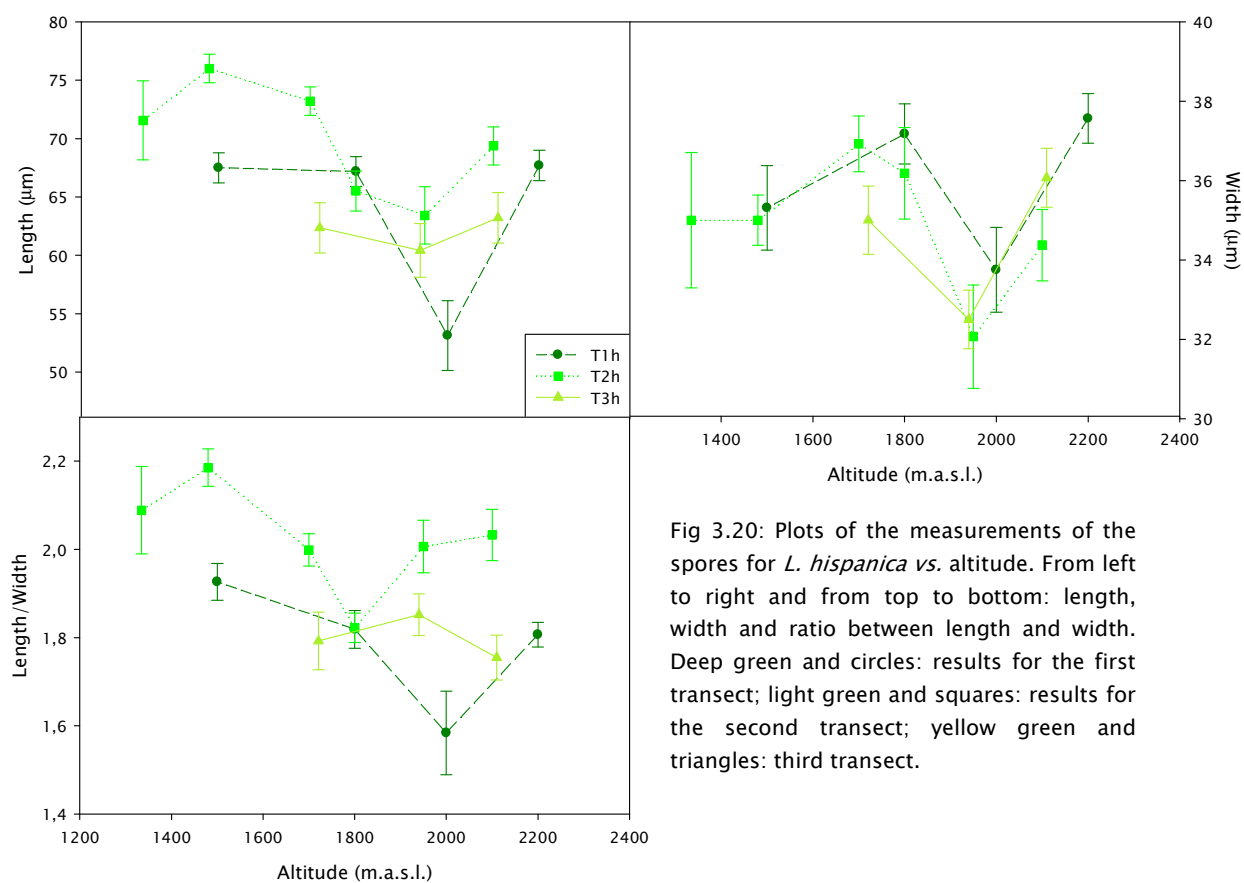


Fig 3.20: Plots of the measurements of the spores for *L. hispanica* vs. altitude. From left to right and from top to bottom: length, width and ratio between length and width. Deep green and circles: results for the first transect; light green and squares: results for the second transect; yellow green and triangles: third transect.

The effect of altitude was very influent on the first axis (Fig. 3.26), and had no relationship with Amax, which was in turn very influent on the second axis, and was correlated to Chla, carotenes and Tswg. Altitude was positively correlated to TSW and DR and negatively to rib/(m+a), C/N ratio and Gyr.

PCAs for *Lasallia pustulata* were performed with variables chosen according to the correlation matrices in Figs. 3a.18 to 3a.20. These variables were: Altitude, TSW, Chla, carotenoids, Erg, Chit, total aa, % of arginine, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, N, gyrophoric acid, ribitol to mannitol plus arabitol ratio, total sugar content, Amax and DR with this latter at 15 °C and in absolute value.

In this case (Fig. 3.27), the two first axes accounted for a similar percentage of the total variance. Altitude had little influence on the first axis, in contrast to *L. hispanica*, but was also opposed to Gyr. Amax appeared not related to Altitude, and neither were DR nor TSW. Single PCAs for each transect are shown in Figs. 3a.40 to 3a.42.

### Niche modeling

The potential area of *Lasallia hispanica*, after the analysis with MaxEnt is shown on Fig. 3.28. The area of this species seems to be restricted to the high elevations of Iberian Peninsula. *Lasallia pustulata* (Fig. 3.29) has a wider area, which often overlaps with that of *L. hispanica*. The annual average temperature is the most influential environmental variable for both species, with a higher influence on *L. hispanica* (Table 3.2). The second most influential variable for both is the precipitation of the driest month, which in this case has a higher weight on *L. pustulata* potential area.

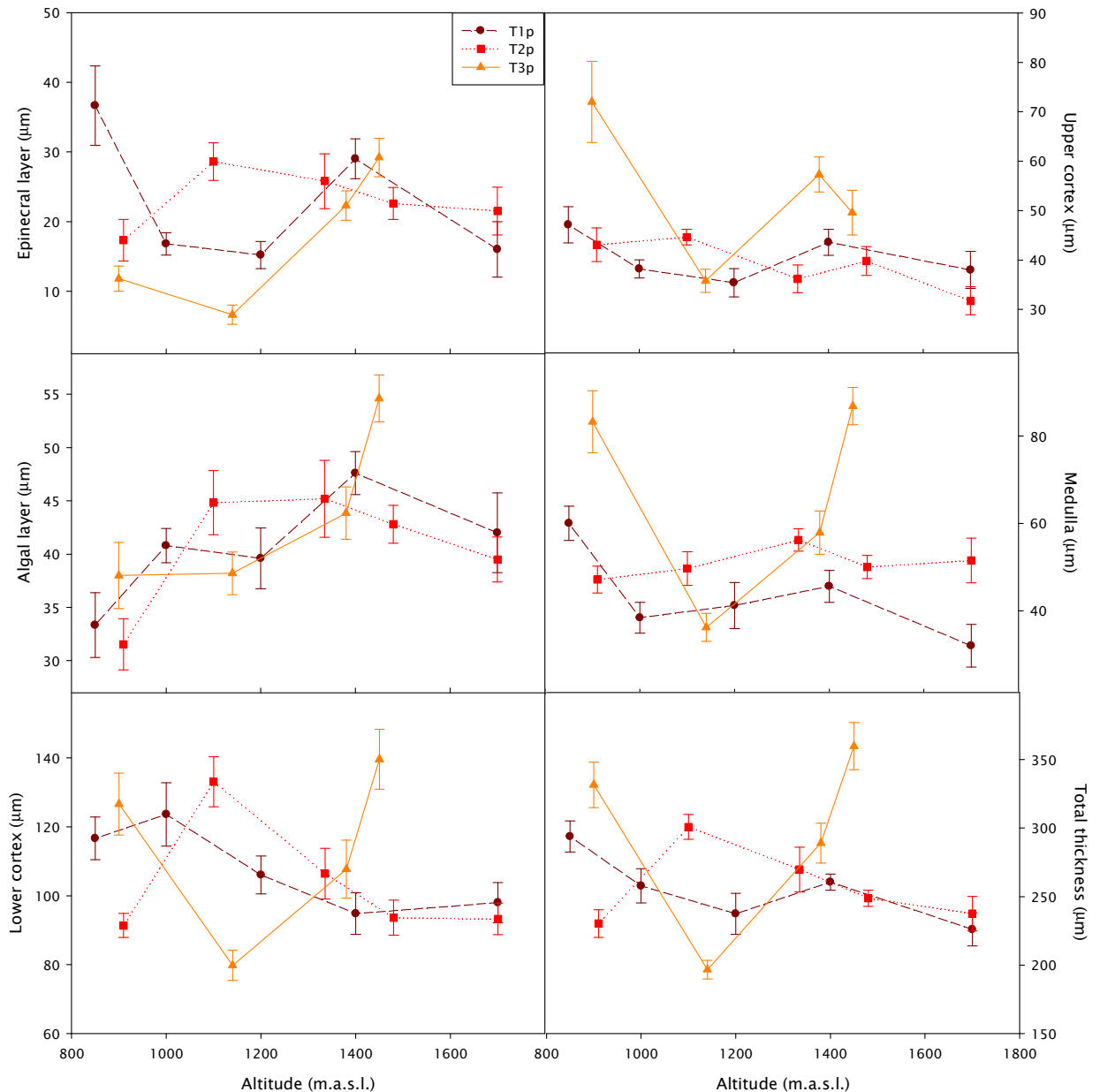


Fig. 3.28: Plots of anatomical measurements of the thalli for *L. pustulata* vs. altitude. From left to right and from top to bottom: epinecral layer, upper cortex, algal layer, medulla, lower cortex and total thickness (in μm). Deep red and circles: results for the first transect; bright red and squares: results for the second transect; orange and triangles: third transect.



## DISCUSSION

Plant life at high elevations is primarily constrained by direct and indirect effects of low temperatures, radiation, wind and storminess or insufficient water availability (Körner & Larcher, 1988). Taking into account their different distribution, *L. hispanica* seems to be able to deal with these harder conditions in much more an effective way than *L. pustulata*.

Our main objective in this study was to identify the physiological changes driven by altitude in these two closely related sympatric species of *Lasallia* in order to shed light on their different altitudinal distribution patterns. After the thorough study of their ecophysiological behaviour, the first impression is that *L. hispanica* shows higher plasticity and shows a more marked response to altitude in many parameters measured than *L. pustulata*. This plasticity seems to allow *L. hispanica* to maintain a positive carbon balance in contrasting conditions, under which *L. pustulata* is not able to reach compensation, and often showing better efficiencies than this species (Figs. 3.4 to 3.9, Figs. 3a.2, 3.25).

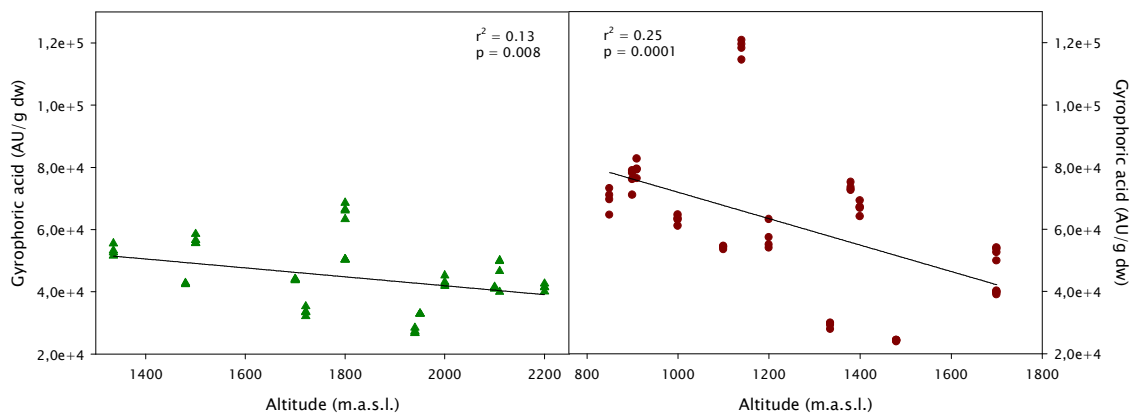


Fig. 3.22: Linear regression between altitude and gyrophoric acid on a dry weight basis for *Lasallia hispanica* (left) and *Lasallia pustulata* (right) samples.

### Effect of altitude

The effect of elevation in these two species is in the same direction for some variables and in opposite directions for some others. Overall, as previously stated, we found more marked and more abundant effects of altitude in *L. hispanica*. This observation is further supported by the results of PCAs (see below). *Lasallia pustulata* had only one variable (gyrophoric acid content) with a correlation coefficient with altitude higher or equal to 0.5 (in absolute value), and 15 variables with a significant effect of altitude ( $p < 0.05$ , Fig. 3a.14), whereas *L. hispanica* has 10 variables which respond to altitude with a correlation coefficient higher than  $|0.5|$ , and altitude has a significant effect on 21 variables (Fig. 3a.13). The much higher plasticity of *L. hispanica* in response to altitude is probably the reason for its success in such harsh environments. *Lasallia pustulata* shows better performance when conditions are favourable for it but its plasticity is much less than that of *L. hispanica*, which, although having a much more modest photosynthetic performance (see below), is

more capable of regulating and readjusting its metabolism to be able to cope with the changing conditions that an altitudinal gradient involves. The differences in the response to altitude of Amax, DR and  $\Phi$  of each species are especially interesting (Figs. 3a.3, 3a.4, 3.25). Quantum efficiency ( $\Phi$ ) significantly decreased with elevation in *L. pustulata* showing its difficulty to adapt but it did not change in *L. hispanica*. The pattern for Amax is similar with *L. pustulata* showing decreasing rates with increasing altitude, whilst *L. hispanica* has a unimodal response, with a maximum towards 1800–2000 m.a.s.l. Similar behaviour has been observed in many vascular plants that are also able to occupy wide altitudinal gradients (Li *et al.*, 2006, 2007), as well as in some lichens (Larcher & Vareschi, 1988). Li *et al.* (2006) studied the response of *Quercus aquifolioides* from Himalaya to altitude in a gradient of 1600 m (from 2000 to 3600 m). They concluded that 2800 m was the optimum altitudinal zone, where growth and metabolism were most vigorous, as indicated by thinner leaves, larger stomata and more negative  $\delta^{13}\text{C}$  values. They found that the growth and metabolic rates decreased with increasing distance from that optimum.

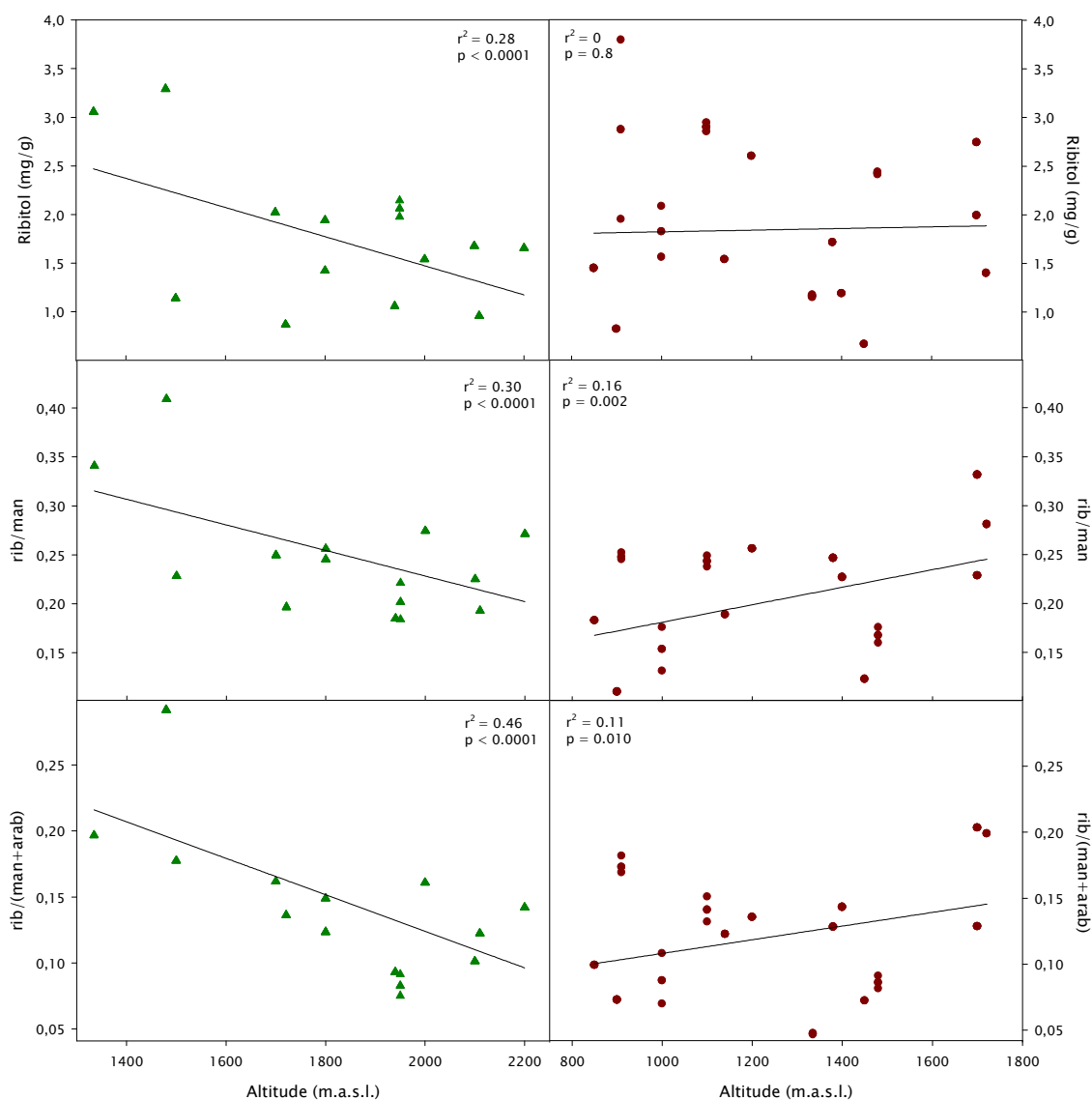


Fig. 3.23: Linear regressions between altitude and ribitol (top), ribitol to mannitol ratio (middle) and ribitol to mannitol+arabitol ratio (bottom) for *Lasallia hispanica* (left) and *Lasallia pustulata* (right) samples.

The response of sugar alcohols to elevation in these two species is contrasting as well. We observed in *L. pustulata* an increment of rib/man ratio with altitude (Fig. 3a.35), which could be interpreted as an attempt to protect the algal cells against desiccation (Farrar, 1976). But it is more likely that at higher altitudes growth processes become limited faster than carbon gain, so that there is an increase in sugars (Körner, 1999). On average, both *Lasalliae* had similar values ( $0.21 \pm 0.07$  and  $0.25 \pm 0.06$  mg g<sup>-1</sup> for *L. pustulata* and *L. hispanica* respectively), but the correlation between this ratio and altitude is positive for *L. pustulata* and negative for *L. hispanica* (Fig. 3.24). The same response was found for rib/(man+arab) (i.e., algal sugars respective to fungal sugars), and, whereas for *L. hispanica* the decrease of the ratio was related with a decrease of ribitol, for *L. pustulata* we found no significant increase of ribitol along the altitudinal gradient, that is, the increase of the ratio is a consequence of the decrease of fungal sugars. This might be related with the tendency to protect itself against the harsher conditions it needs to face with increasing altitude. Being more exposed there, *L. pustulata* has to cope with stronger winds, and consequently, its TSW and chitin content are higher, providing it with a more resistant thallus (Fig. 3a.33, Kappen 1988), but it could be that the increased allocation on chitin occurred at the expense of fungal sugars. An increase of TSW and chitin is also observed in *L. hispanica* (Fig. 3a.29), but in this case, no reduction in fungal sugars is seen, although there is a significant trend to reduce ribitol content with elevation and to increase glucose content (Fig. 3a.31). According to Palmqvist *et al.* (2008), glucose is a direct product of photosynthesis, as well as a precursor for the respiratory metabolism of both photobiont and mycobiont and its increase could indicate an increase of the degradation of ribitol in the algal partner, but the total amount is not high, especially compared to the results obtained from *L. pustulata*. We lack data to decide whether there is a species-specific response, as we have not yet analysed genetically the algal partner.

Other consequence of the rising elevation is the higher radiation intensity (Körner & Larcher, 1988), which correlates with an increase in carotenes in *L. pustulata* (Fig. 3a.33). Carotenes have been proved to protect against the excess of visible light (Fahselt, 1994b). It is likely that the increase of irradiation also affects gyrophoric acid content, which decreases with altitude in both cases, but the correlation is not as high in *L. hispanica* as it is in *L. pustulata*, and the slope of the line is lower (Fig. 3.22). This is probably indicating a higher sensitivity of the latter species to the increase in UV radiation. Photodegradation of depsides with altitude was described by Swanson & Fahselt (1997). But they also hypothesised that the decrease of depsides in *Umbilicaria americana* could be only apparent, as the increase of UV-B could both reduce the synthesis of depsides or convert them to an unextractable form. It has been described for some species of bryophytes a decrease of the effects of UV-B under dry conditions (Arróniz-Crespo *et al.*, 2011), and Solhaug *et al.* (2003) found in the lichen species *Xanthoria parietina* a slow down of the metabolism of secondary compounds when thalli were inactive. The exposed habitat of *L. hispanica* makes it dry out faster than the more protected *L. pustulata*, hence, its active time is most likely shorter. For this

reason, the effect of altitude both on carotene synthesis and on glyrophoric acid degradation might be less marked in *L. hispanica*.

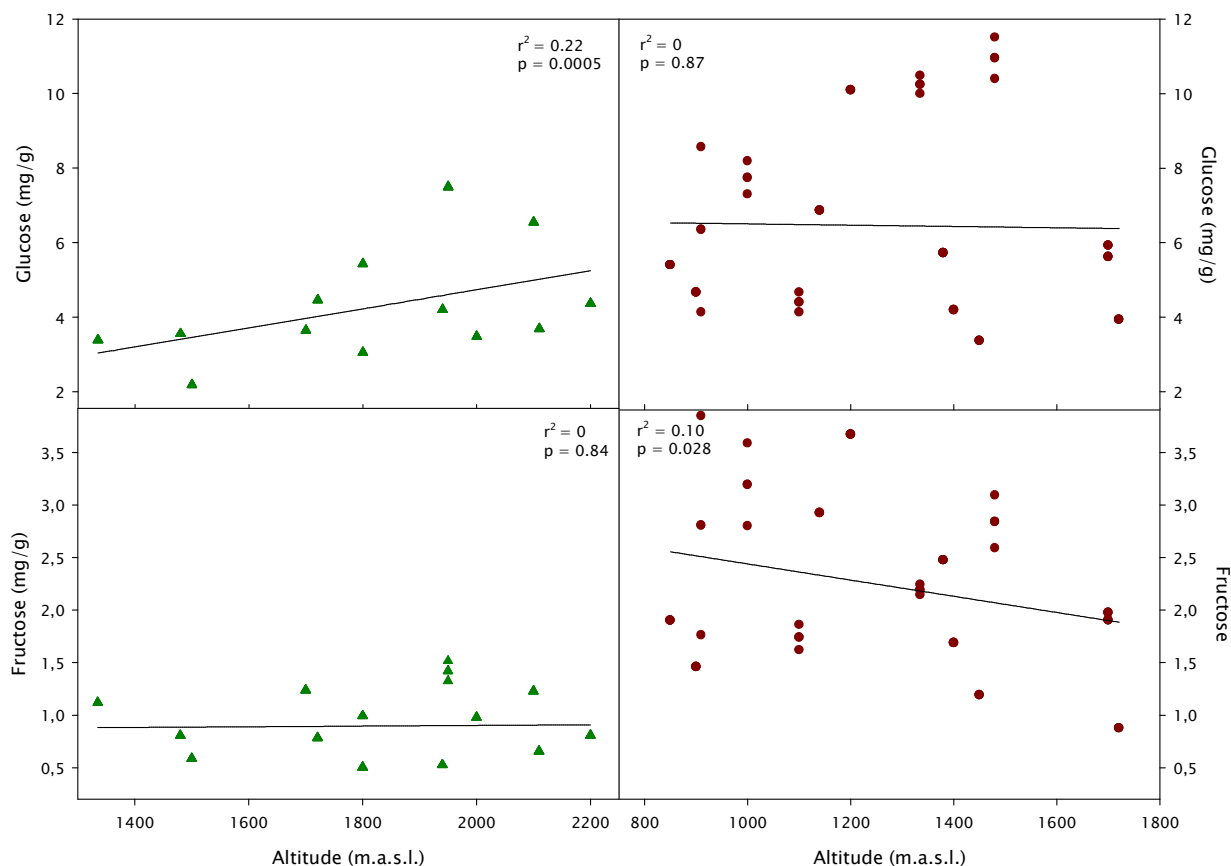


Fig. 3.24: Linear regressions between altitude and glucose (top) and fructose (bottom) for *Lasallia hispanica* (left) and *Lasallia pustulata* (right) samples.

Both species show a decrease of the C/N ratio, which is caused by the significant effect of altitude on C content ( $r=-0.42$ ,  $p<0.005$ , Fig. 3a.13, for *L. hispanica* and  $r=-0.27$ ,  $p=0.04$ , Fig. 3a.14, for *L. pustulata*). We also found a decrease of fructose and sucrose in *L. pustulata* (Fig. 3a.35). In this species, although the correlation was not high when all data was pooled, there was a significant decrease of Amax and  $\Phi$  with altitude, as previously stated (Fig. 3a.14 and 3a.36). All these results could lead to think that with increasing elevation, the performance of *L. pustulata* is affected, and it needs to reallocate its resources and invest more in protective molecules (carotenes) or maintain the investment in others (ribitol), at the expense of the decrease of other molecules, and of its photosynthetic efficiency. Total Chl content also increases slightly with elevation in *L. pustulata*, being the increase on Chl**b** significant. This behaviour had already been observed in Mediterranean lichens (Pintado, 1996), indicating that, although the irradiation is more intense in higher places, the usual light intensity under which the lichens are active is lower, because moisture occurs when the weather is foggy or cloudy. It has been shown that irradiation can severely damage lichen photosynthetic apparatus even when they are under inactivity periods, despite their photoprotective mechanisms (Gauslaa & Solhaug, 1999; Heber & Lüttge, 2011), and resistance to heat was shown to be species specific, showing a tight relationship with

the ecology of the species (MacFarlane & Kershaw, 1978). Our results suggest a different sensitivity of these two species to light and heat, being *L. hispanica* less affected by these conditions.

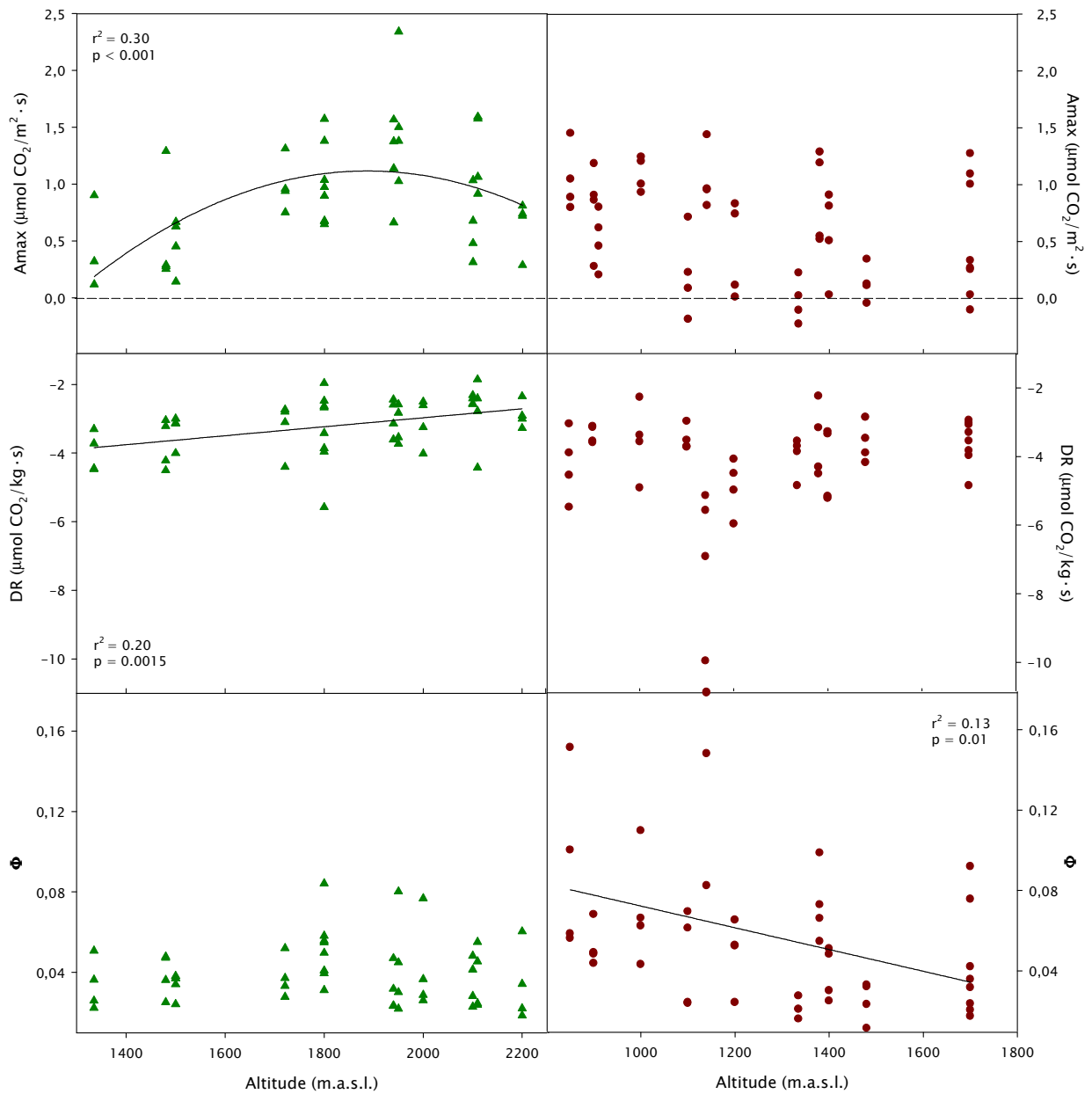


Fig. 3.25: Altitude vs. Amax on a surface area basis (top, dashed line indicates compensation, i.e., net photosynthesis = 0) and dark respiration on a dry weight basis (middle); altitude vs. photosynthetic efficiency ( $\Phi$ ) (bottom) for *Lasallia hispanica* (green triangles, left) and *Lasallia pustulata* (red dots, right) samples.

Both species show a positive correlation between altitude and N content (although for *L. pustulata* it is not significant, Fig. 3a.34; Fig. 3a.30), and also a higher total amino-acid amount. This could be a consequence of the longer and larger accumulation of snow towards the summit, which would lead to an enrichment on N. In the case of *L. hispanica*, we also found a significant increase of Arg towards higher elevations (Fig. 3a.30). The synthesis of Arg has been interpreted as a mechanism to

avoid  $\text{NH}_4^+$  toxicity (Dahlman *et al.*, 2002; Dahlman & Palmqvist, 2003), and indeed, we could observe a decrease of  $\text{NH}_4^+$  in this species with altitude (Fig. 3a.30). But also Arg pools have been found to be useful as a source of C and N through degradation (Planelles & Legaz, 1987; Fahselt, 1994a).  $\text{NH}_4^+$  has been found to increase the permeability of algal cells, thus promoting export of photosynthates (Vicente & Filho, 1979). Nevertheless, it has not been demonstrated that this mechanism occurs at normal field concentrations (see Fahselt, 1994a).

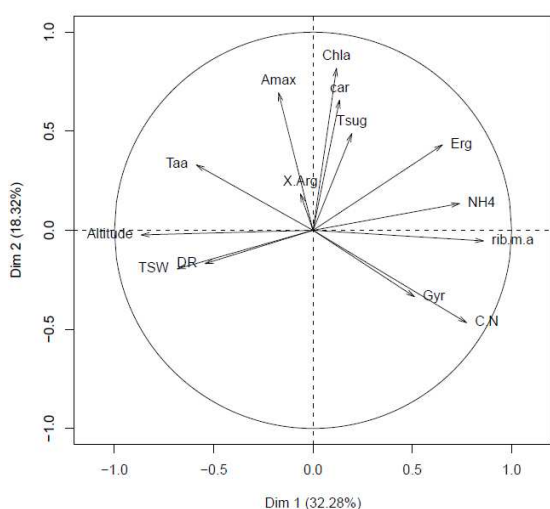


Fig. 3.26: Consensus PCA of the three transects of *Lasallia hispanica*.

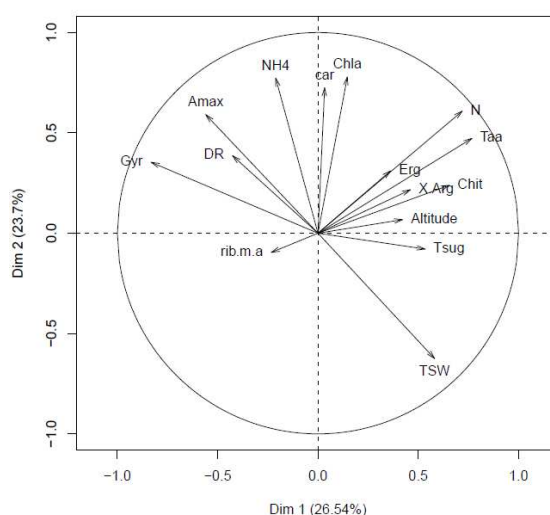


Fig. 3.27: Consensus PCA of the three transects of *Lasallia pustulata*.

There is a clear tendency in both species to increase their TSW with altitude (Figs. 3a.29 and 3a.33), but the range for *L. hispanica* is from aprox.  $200 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2}$  at 1300 m to  $370 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2}$  at 2200 m, whereas for *L. pustulata* we found a much narrower range, between  $200 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2}$  at 800 m and 220 at 1700 m. This higher plasticity of *L. hispanica* in the regulation of the TSW is likely very important to understand its capacity of living in harsher and more contrasting environments than *L. pustulata*. A relationship between TSW and water retention time has been widely found (Larson & Kershaw, 1976; Kershaw, 1985; Valladares *et al.*, 1997; Gauslaa & Coxson, 2011; chapter 2 of this thesis). This way, the capacity of *L. hispanica* to increase its TSW towards the summit in response to drought and wind allows it the colonisation of habitats which *L. pustulata* is not able to endure. It has also been described a decrease of specific leaf area (SLA in units of area per units of weight) with increasing elevation in vascular plants (Li *et al.*, 2007), also related to water availability.

### Photosynthetic yield and efficiency

When comparing both species at similar altitudes, *L. hispanica* does not have a lower productivity or efficiency quotient than *L. pustulata* (Figs. 3a.1 to 3a.4), which in contrast, in some occasions shows significantly lower values (e.g., Fig. 3a.2). Then, why is the former absent from lowland places? This appears not to be related with temperature, because, although obviously the increasing temperature provokes an

increase of DR, and subsequently, a decrease of both NP and KF, *L. hispanica* samples always reached compensation, at every temperature, no matter which altitude they came from (Figs. 3.4 to 3.9). This suggests that, at least theoretically, this species would have a positive carbon balance at higher temperatures than the ones under which it usually lives. The same was not true for *L. pustulata* samples from the same elevations. Indeed, some populations did not reach a positive NP above 20 °C (Table 3a.9), and their KF were in general, similar or even lower to those of *L. hispanica*. Considering this data it is remarkable that we could not find any population of *Lasallia hispanica* below 1335 m in this area. This species has never been found below 900 m (Sancho & Crespo, 1989; Sancho & Codogno, 1991). A likely explanation is that it is displaced by faster-growing species, *L. pustulata* among them, as soon as environmental conditions favour the development of these.

Water availability is likely the most important factor conditioning the distribution and abundance of these *Lasallia* species. *Lasallia pustulata* is more hygrophytic and more sensitive to drought than *L. hispanica* (Sancho, 1986), and this feature conditions their distribution. Indeed, it has been described that *L. pustulata* has a higher water retention capacity (350% vs. 220% in *L. hispanica*), due to the bigger size of its pustules and the abundance of its characteristic coralloid isidia (Sancho & Kappen, 1989; Valladares, 1993). *Lasallia pustulata* was described as a substrate-hygrophytic species by Sancho & Kappen (1989), whereas *L. hispanica* would have an aero-hygrophytic strategy, taking water mainly from rain, snow, dew or fog, while *L. pustulata* also relies on the moisture of its substrate, being usually found associated with mosses. Pirintsos *et al.* (2011) observed a general depression of the photosynthetic performance of *Evernia prunastri* and *Pseudevernia furfuracea*, with samples transplanted along an altitudinal gradient in Crete. They found a decrease of pigment content and photosynthetic efficiency, measured by means of Chl fluorescence, with decreasing elevation. They suggested that this effect is not caused by altitude itself, but by water availability, the most important driving factor in Mediterranean ecosystems, strongly conditioned by summer drought and heat (Joffre *et al.*, 2007). Indeed, in the study area, they reported higher water availability in summer towards the summit, due to low clouds and dew. The effect of drought was more marked in *Evernia prunastri*, which is more hygrophytic than *Pseudevernia furfuracea*.

Unfortunately, no precipitation data is available for the different altitudes where we have sampled, due to the lack of meteorological stations in the area. However, this area is thought to have one of the highest precipitations of Spain, due to the barrier effect of the high mountains of Sierra de Gredos (Sancho, 1986, 2001). Precipitation is thought to increase towards the summits, taking into account the amount of snow that accumulates, the general tendency of mountainous systems and some data for this area (Gavilán, 1994). Although the total precipitation is higher at higher altitudes, since it has a marked seasonal pattern, the most of it is in the form of snow, which makes the water unavailable.

As long as there are niches not available for *L. pustulata* due to the limiting conditions when altitude increases, *L. hispanica* is more successful. But at lower sites, as temperature and hence water availability increase, *L. pustulata* dominates in the habitat, as it is bigger and probably faster growing, taking into account its longer active time and higher Amax rates, and thus outcompetes *L. hispanica*. *Lasallia hispanica* might probably be able to survive in lower, warmer sites, but in this case it is not a matter of surviving, but of efficiency in colonising and competing for space. Transplantation experiments would be highly helpful to confirm this hypothesis. Competition between *Umbilicariaceae* species and establishment in available niches has been studied by Hestmark (1992, 1997), who observed that in mixed populations of *L. pustulata* and *Umbilicaria spodochoa* thalli usually overlap, resulting in the death of the parts of the thallus shaded by the other species, being clearly favoured the one which grows faster. Indeed, in our study, Amax rates of *L. pustulata* in lower sites, where *L. hispanica* is already absent, are higher than in sites where both coexist (Tables 3a.7, 3a.9 and 3a.11). This species also showed generally higher rates than *L. hispanica* at higher temperatures. And as the thalli of the former are bigger (Figs. 3.17 and 3.18; Sancho & Crespo, 1989; Hestmark *et al.*, 1997) and as they live in a more protected habitat (Sancho, 1986), they keep the water for longer (Green *et al.*, 1985; Gauslaa & Solhaug, 1998; Vivas, unpublished data), this way having longer activity periods. *Lasallia hispanica*, in turn, is able to thrive in more exposed habitats, as it can cope with more changing conditions, longer dry periods and more frequent drying-wetting cycles.

The question that now arises is why *L. pustulata* disappears at higher elevations. Again in this case, temperature does not seem to be a constraint, for *L. pustulata* was found to have low T<sub>cl</sub>, as well as fairly high rates of Amax at 5 °C, the lowest temperature measured (T<sub>2-9Lp</sub> was measured even at 0 °C, having an Amax of 1.28  $\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). In fact, rates were similar at 5 °C and 25 °C in most cases (Figs. 3.11, 3.13 and 3.15). Moreover, both species appear to be prepared to slightly regulate their temperature, improving their performance by changing the colour of their thalli depending on their moisture state (Sancho & Kappen, 1989; Sancho *et al.*, 1994). But with increasing elevation the relatively lower plasticity of *L. pustulata* does not allow it to thrive under conditions that become more and more difficult, not only due to the decrease of temperature, but also to the decrease of water availability, the reduction of the active time, the higher exposure of niches to wind erosion and the higher irradiation.

#### **Size and apothecia abundance**

Some studies have reported a decrease of sexual reproduction towards higher elevations in vascular plants (Levesque *et al.*, 1997; Lord & Kelly, 1999; Li *et al.*, 2007). Dietrich & Scheidegger (1997) reported an increase of the proportion of lichen species with asexual reproduction towards higher altitudes, but as far as we know, there are no studies relating fertility with altitude in the same species of lichen. We could not find any trend between elevation and number of apothecia in *L. hispanica* (Fig. 3.17). Hestmark (1992) described a tendency of *L. pustulata* (and also in *Umbilicaria*



*spodochroa*, Ramstad & Hestmark, 2001, and *U. cylindrica*, *U. hyperborea*, *U. torrefacta* and *U. proboscidea*, Hestmark *et al.*, 2004) to develop more apothecia in larger thalli. We could observe this tendency in *L. hispanica* (data not shown), but no apothecia were found in *L. pustulata* at any locality. For both *Lasallia* we observed in the field a tendency of the thallus size to decrease towards higher elevations, but this tendency was not statistically significant (Figs. 3.17 and 3.18).

### **Anatomical measurements**

We considered the three transects separately for both the anatomical measurements and the principal components analyses. This way, we could assess which variables might be really correlated with altitude and which are not, for they have different responses in each transect, being the reason for their variability the differences in ecological conditions among transects, in spite of their proximity, and not the different elevation of the points of sampling.

We could observe for T1 and T3 of *L. hispanica* the same trend to increase the thickness of the thalli towards higher elevations, but the cause is different. In T1, it is due to an increase of both upper cortex and algal layer, while in T3 it is mainly due to the increase of the lower cortex. A total increase in thickness would be expected; we have seen the tendency of TSW to increase and explained it as a strategy to protect against wind, stronger irradiation and drought. In order to cope with the wind, there would be no difference on increasing the upper or the lower cortex, the important thing is that the thallus gets stronger. It is interesting to see the special increase of the lower cortex in the third transect. This one was probably the driest of the three transects, taking into account the abundance and diversity of higher plants (pers. obs.), and an increase of the thickness of the lower cortex would be useful to retain water longer. In the case of T2, the contrasting response, not showing any increase in TSW could be a consequence of the conditions not being so changing along the altitudinal gradient as they were in the other transects. During the field work, we could indeed see more trees in this transect, which would indicate milder conditions. Microclimatic data would be highly useful to support this hypothesis.

When we pooled all the data of each species to compare the measurements between them, we found a significantly higher thickness of every layer of *L. hispanica* compared to the same layer in *L. pustulata* with the only exception of the lower cortex (Fig. 3.3, numeric data not shown). This result further confirms our previous findings and our hypotheses. *L. hispanica* has a thicker epinecral layer and upper cortex, highly useful to protect the algal layer against the excess of radiation. A thicker algal layer is good to take advantage of the shorter activity periods and of a higher light level, and an increase on the medulla would help to retain water longer. All of that is in accordance with the higher TSW of *L. hispanica*.

### **Multivariate analyses**

We could overall interpret the first axis of *Lasallia hispanica* as an indicator of productivity or product storage, with T<sub>1</sub> and T<sub>3</sub> strongly related to altitude. Amax

seems to be independent to this first axis, and also Gyr has no relation with altitude. In *L. pustulata*, on the contrary, Amax appears opposed to altitude, and, although the first axis could also represent product storage, in this case altitude is not related to it.

When we consider together the analyses for the three transects of *L. hispanica*, we can notice that the variables that best separate our observations, and which with high scores on the first component, explain a great part of the variance of our data, are altitude and Tsug in one direction, and Erg and C/N in the other direction. In two of the three transects also Taa appeared as a variable directly correlated to Alt and Tsug, as well as Gyr and  $r/(m+a)$  were inversely correlated. There is a high consistency of the association of these variables across the three gradients, and the position of our samples is mostly defined depending on them.

It could be suggested that in the case of *L. hispanica* the first axis is the result of the influence of altitude and its relationship with productivity (Tsug, Taa). Amax has no relationship with altitude (as expected after the unimodal response found, Fig. 3.25), and neither has Gyr (thus indicating it has no UV-protective effect). In the case of *L. pustulata* Amax tends to be opposed to altitude.

The influence of altitude in *L. hispanica* is stressed again by the result of PCAs, as it always has a high influence on the first component. In contrast, for *L. pustulata*, altitude had a comparatively very low weight on the first axis of the analysis for the three transects. as well as for the consensus PCA. Other variables had a higher influence, and these were Chla, car, Taa, N and Erg. In both species, the relationship between elevation and ergosterol was inverse, as suggested by the plots between altitude and Chit/Erg ratio (Figs. 3a.29 and 3a.33), which is consistent with the observed increase in TSW and the higher investment on structure of the samples from higher elevations.

The PCAs also showed a frequent association of Chla with Amax, as it has been widely found for other lichen species and vascular plants (e.g., Enríquez *et al.*, 1996; Green *et al.*, 1997; Palmqvist *et al.*, 2002). Likewise, Chla content was often correlated with carotenes as well. Pirintsos *et al.* (2011) described a similar effect on *Evernia prunastri* and *Pseudevernia furfuracea*, also finding an increase in pigments towards higher elevations, which they related to the higher water availability in the mountain sites. Also, they found a decrease in pigment content in the dry Mediterranean summer respective to winter. This explanation is in accordance with our data and the differences in water regime of the three transects studied, and has an ecological meaning, as seen above.

It is interesting to notice the relatively low influence of DR in the components. As we could also see before, in the plots with all the data pooled (Fig. 3.25), DR in fact shows little variation, having these lichens a high acclimation ability with respect to DR, in accordance with previous studies (e.g.: Larcher & Vareschi, 1988; Lange & Green, 2005).

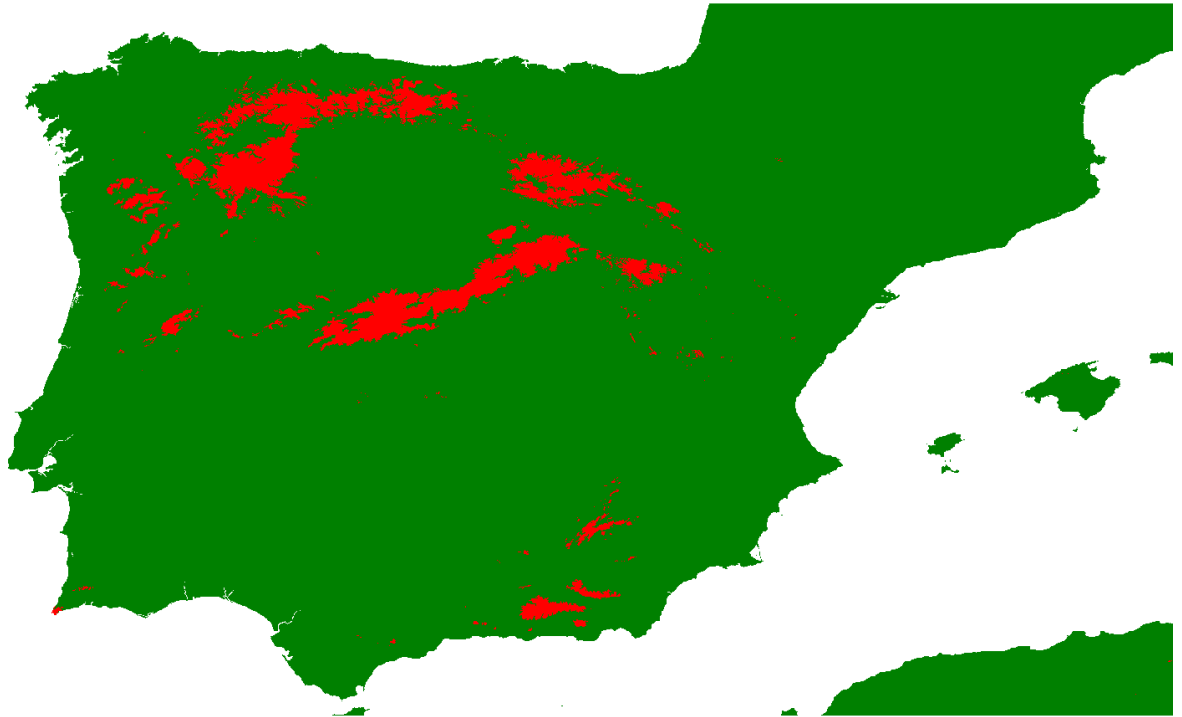


Fig. 3.28: MaxEnt prediction of potential distribution for *Lasallia hispanica*.

### Niche modeling

The niche modeling shows a small potential area of *Lasallia hispanica* (Fig. 3.28), restricted to the high elevations of Iberian Peninsula. *Lasallia pustulata* (Fig. 3.29) has a wider area, which often overlaps with that of *L. hispanica*. The annual average temperature is the most influent environmental variable for both species, but its influence is higher on *L. hispanica*, further supporting the interpretation of the results found in PCAs, as this variable is actually an indication of altitude (Table 3.2). The second most influent variable for both is the precipitation of the driest month (see Chapter 4), but in this case, it has a higher weight on *L. pustulata* potential area. The response curves for this parameter are similar in both species, indicating their tolerance to mediterranean seasonal rain regime (Fig. 3a.37). This tolerance seems to be important to explain their absence from Pyrenees, which would theoretically offer an adequate environment, as there are wide siliceous areas and high elevations suitable for *L. hispanica*. They might be outcompeted by more productive species in places where the water regime is more constant along the year, and this could be more important for *L. pustulata* because *L. hispanica* avoids many competitor species thanks to its tolerance to higher altitudes. The seasonality was much more influent in the model for *L. pustulata*. The annual precipitation was not found to be a determining factor for the distribution of both species, indicating that they live in places with different water regimes, but with a strong summer drought.



Fig. 3.29: MaxEnt prediction of potential distribution for *Lasallia pustulata*.

Variable	<i>L. hispanica</i> Percent contribution	<i>L. pustulata</i> Percent contribution
Tav	77.8	49
Pdm	21.5	38.6
Seas	0.4	10.9
Ann. Prec.	0.2	1.5

Table 3.2: Contribution of the environmental variables used for the niche modeling: Tav: mean annual temperature; Pdm: precipitation of the dryest month; Seas: seasonality; Ann. Prec.: annual precipitation.

These two sympatric species of *Lasallia* are able to coexist in particular areas because of their niche differentiation, a phenomenon that was first described in lichens by Larson (1984). It seems clear that the adaptive advantage of *L. pustulata* relies on its faster growing rate, whereas *L. hispanica* is able to endure harsher conditions, thus colonising habitats that are not suitable for *L. pustulata*. The study of the relationship between these species and their adaptation ability provides us with a better understanding of the population dynamics, and allows us to predict their behaviour under changing conditions. If, as predicted by the IPCC (2007), temperatures rise in their common distribution area, *L. hispanica* populations would probably suffer from the increased competitive pressure of other species, *L. pustulata* among them, whose potential habitat would be widened, taking into account the higher water availability caused by the increase on rain, at the expenses of snow, and the increase on temperature. Alpine areas harbour a high biodiversity, very rich in endemics, which are especially threatened by global change (Nash & Olafsen, 1995; Sala *et al.*, 2000; Lange & Green, 2005).



**3A. APÉNDICE**  
**APPENDIX**



	Amax5	Pc5	Ps5	Φ5	DR5	KF5
T1-22Lh	<b>1.26±0.22<sup>b</sup></b>	73±10	323±28	<b>0.026±0.004<sup>ab</sup></b>	1.25±0.02	<b>2.01±0.16<sup>b</sup></b>
T1-18Lh	<b>3.36±0.35<sup>a</sup></b>	37±3	254±20	<b>0.05±0.005<sup>a</sup></b>	1.65±0.15	<b>3.02±0.04<sup>a</sup></b>
T1-15Lh	<b>1.39±0.18<sup>b</sup></b>	70±9	340±15	<b>0.022±0.001<sup>b</sup></b>	1.17±0.04	<b>2.24±0.18<sup>ab</sup></b>

	Amax10	Pc10	Ps10	Φ10	DR10	KF10
T1-22Lh	<b>1.98±0.26<sup>b</sup></b>	<b>89±5<sup>b</sup></b>	<b>411±14<sup>ab</sup></b>	<b>0.027±0.001<sup>b</sup></b>	1.91±0.06	<b>2.06±0.17<sup>b</sup></b>
T1-18Lh	<b>5.2±0.55<sup>a</sup></b>	<b>52±3<sup>a</sup></b>	<b>358±7<sup>a</sup></b>	<b>0.048±0.004<sup>a</sup></b>	2.27±0.11	<b>3.25±0.17<sup>a</sup></b>
T1-15Lh	<b>1.84±0.23<sup>b</sup></b>	<b>100±7<sup>b</sup></b>	<b>456±11<sup>b</sup></b>	<b>0.023±0.001<sup>b</sup></b>	1.78±0.09	<b>2.08±0.16<sup>b</sup></b>

	Amax15	Pc15	Ps15	Φ15	DR15	KF15
T1-22Lh	<b>1.77±0.21<sup>a</sup></b>	148±21	527±47	0.034±0.005	2.88±0.1	<b>1.61±0.06<sup>ab</sup></b>
T1-20Lh	<b>1.03±0.17<sup>a</sup></b>	112±77	415±25	0.042±0.006	3.09±0.17	<b>1.32±0.05<sup>a</sup></b>
T1-18Lh	<b>4.89±0.57<sup>b</sup></b>	87±3	431±7.4	0.058±0.005	4.2±0.24	<b>2.13±0.08<sup>b</sup></b>
T1-15Lh	<b>1.79±0.22<sup>a</sup></b>	186±26	586±46	0.033±0.002	3.32±0.12	<b>1.54±0.07<sup>a</sup></b>

	Amax20	Pc20	Ps20	Φ20	DR20	KF20
T1-22Lh	1.15±0.27	142±6	<b>492±13<sup>a</sup></b>	0.051±0.004	4.78±0.49	1.26±0.05
T1-18Lh	4.09±0.75	129±16	<b>519±38<sup>a</sup></b>	0.059±0.009	5.08±0.4	1.8±0.15
T1-15Lh	1.13±0.23	373±71	<b>943±87<sup>b</sup></b>	0.034±0.002	4.92±0.27	1.25±0.06

	Amax25	Pc25	Ps25	Φ25	DR25	KF25
T1-22Lh	0.87±0.35	305±65	731±81	0.04±0.005	5.16±0.13	1.16±0.07
T1-18Lh	1.36±1.46	186±3	629±9	0.076±0.009	9.61±1.31	1.27±0.14
T1-15Lh	0.65±0.18	241±61	1563±582	0.039±0.004	5.96±0.28	1.11±0.03

Tabla 3a.1: Tasa máxima de asimilación (Amax), punto de compensación de luz (Pc), punto de saturación de luz (Ps), rendimiento cuántico aparente (Φ), respiración en oscuridad (RO) y coeficiente de eficiencia fotosintética (KF) para todas las temperaturas medidas en muestras de *Lasallia hispanica* del primer transecto. De aquí en adelante, y, a menos que se indique lo contrario, los valores son las medias ± ES para n=4. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las poblaciones de distintas altitudes para p<0.05 por ANOVA seguido por el test post-hoc Tukey's HSD y están marcados en negrita.

Table 3a.1: Maximum assimilation rate (Amax), light compensation point (Pc), light saturation point (Ps), apparent quantum yield (Φ), dark respiration (DR) and photosynthetic efficiency quotient (KF) for all the temperatures measured on *Lasallia hispanica* samples from the first transect. From now on, and unless otherwise stated, values are the mean ± SE for n=4. Different letters indicate significant differences among populations from different altitudes for p<0.05 by ANOVA followed by Tukey's HSD post-hoc test and are marked in bold.

	Tcl (°C)	Topt (°C)	Tcu (°C)	Area
T1-22Lh	-3.87	12.45	28.77	30.35
T1-18Lh	-0.68	13.13	26.93	84.56
T1-15Lh	-4.02	11.94	27.89	29.67

Tabla 3a.2: Temperatura óptima para la fotosíntesis (Topt), puntos de compensación de temperatura inferior y superior (Tci y Tcs respectivamente) y área bajo la curva (calculada por integración de la función entre 5 y 25 °C) para el primer transecto de *L. hispanica*.

Table 3a.2: Temperature optimum of photosynthesis (Topt), lower and upper temperature compensation points (Tcl and Tcu respectively) and area under the curve (calculated by integration of the function between 5 and 25°C) for the first transect of *L. hispanica*.



	Amax5	Pc5	Ps5	Φ5	DR5	KF5
T2-21Lh	1.92±0.24	<b>48±6<sup>ab</sup></b>	<b>308±15<sup>ab</sup></b>	<b>0.023±0.001<sup>b</sup></b>	<b>0.92±0.06<sup>a</sup></b>	3.33±0.35
T2-18Lh	2.74±0.13	<b>27±26<sup>a</sup></b>	<b>227±14<sup>a</sup></b>	<b>0.04±0.002<sup>a</sup></b>	<b>0.99±0.03<sup>a</sup></b>	3.8±0.19
T2-15Lh	2.4±0.44	<b>69±64<sup>b</sup></b>	<b>416±19<sup>b</sup></b>	<b>0.021±0.002<sup>b</sup></b>	<b>1.24±0.05<sup>ab</sup></b>	2.89±0.28
T2-13Lh	1.23±0.34	<b>66±7<sup>ab</sup></b>	<b>308±12<sup>ab</sup></b>	<b>0.023±0.002<sup>ab</sup></b>	<b>1.5±0.05<sup>b</sup></b>	1.8±0.24

	Amax10	Pc10	Ps10	Φ10	DR10	KF10
T2-21Lh	2.61±0.34	66±6	356±14	0.033±0.004	1.73±0.09	<b>2.45±0.13<sup>a</sup></b>
T2-18Lh	3.71±0.3	50±3	346±15	0.038±0.002	1.74±0.06	<b>3.12±0.14<sup>a</sup></b>
T2-15Lh	2.46±0.5	146±11	605±24	0.022±0.001	2.39±0.08	<b>1.98±0.18<sup>ab</sup></b>
T2-13Lh	1.21±0.41	262±76	591±113	0.033±0.005	1.51±0.65	<b>0.78±0.24<sup>b</sup></b>

	Amax15	Pc15	Ps15	Φ15	DR15	KF15
T2-21Lh	2.16±0.25	94±7	417±23	0.035±0.003	<b>2.46±0.03<sup>a</sup></b>	<b>1.87±.01<sup>ab</sup></b>
T2-20Lh	5.01±0.37	93±8	506±32	0.044±0.006	<b>3.17±0.12<sup>ab</sup></b>	<b>2.56±0.08<sup>a</sup></b>
T2-18Lh	3.1±0.2	62±3	339±19	0.046±0.003	<b>2.44±0.073<sup>a</sup></b>	<b>2.27±0.06<sup>ab</sup></b>
T2-15Lh	2.39±0.55	144±9	536±15	0.039±0.002	<b>3.75±0.16<sup>b</sup></b>	<b>1.59±0.11<sup>ab</sup></b>
T2-13Lh	1.73±0.48	346±83	726±80	0.034±0.003	<b>3.98±0.13<sup>b</sup></b>	<b>1.44±0.13<sup>b</sup></b>

	Amax20	Pc20	Ps20	Φ20	DR20	KF20
T2-21Lh	1.86±0.31	224±43	615±63	0.044±0.004	4.25±0.29	1.4±0.05
T2-18Lh	3.22±0.33	142±10	544±23	0.049±0.004	5±0.16	1.65±0.07
T2-15Lh	1.23±0.5	303±42	998±119	0.045±0.004	5.2±0.31	1.23±0.09
T2-13Lh	1.94±0.71	346±50	955±92	0.053±0.005	6.05±0.46	1.29±0.1

	Amax25	Pc25	Ps25	Φ25	DR25	KF25
T2-21Lh	1.26±0.31	171±13	552±28	0.062±0.003	<b>5.4±0.05<sup>a</sup></b>	1.23±0.06
T2-18Lh	2.05±0.12	105±6	378±19	0.08±0.004	<b>5.12±0.14<sup>a</sup></b>	1.4±0.03
T2-15Lh	0.93±0.67	1386±431	913±118	0.06±0.007	<b>8.22±0.34<sup>b</sup></b>	1.09±0.07
T2-13Lh	0.58±0.57	368±84	769±102	0.066±0.01	<b>8.82±0.42<sup>b</sup></b>	1.07±0.07

Tabla 3a.3: Amáx, Pc, Ps, Φ, RO y KF para todas las temperaturas medidas en muestras de *Lasallia hispanica* del segundo transecto.

Table 3a.3: Amax, Pc, Ps, Φ, DR and KF for all the temperatures measured on *Lasallia hispanica* samples from the second transect.

	Tcl	Topt	Tcu	Area
T2-21Lh	-6.52	12.04	30.59	41.86
T2-18Lh	-5.4	13.13	31.66	62.52
T2-15Lh	-14.83	6.99	28.82	39.4
T2-13Lh	-0.04	14.42	28.88	29.82

Tabla 3a.4: Temperatura óptima para la fotosíntesis (Topt), puntos de compensación de temperatura inferior y superior (Tci y Tcs respectivamente) y área bajo la curva (calculada por integración de la función entre 5 y 25 °C) para el segundo transecto de *L. hispanica*.

Table 3a.4: Temperature optimum of photosynthesis (Topt), lower and upper temperature compensation points (Tcl and Tcu respectively) and area under the curve (calculated by integration of the function between 5 and 25°C) for the second transect of *L. hispanica*.

	Amax5	Pc5	Ps5	Φ5	DR5	KF5
T3-21Lh	3.55±0.41	47±4	395±20	0.025±0.003	1.1±0.11	<b>4.21±0.17<sup>a</sup></b>
T3-17Lh	2.41±0.13	47±2	321±11	0.026±0.001	1.15±0.06	<b>3.1±0.12<sup>b</sup></b>
	Amax10	Pc10	Ps10	Φ10	DR10	KF10
T3-21Lh	4.81±0.41	61±2	492±24	0.029±0.004	1.74±0.26	4.09±0.36
T3-17Lh	3.74±0.15	64±2	419±19	0.03±0.002	1.76±0.07	3.15±0.13
	Amax15	Pc15	Ps15	Φ15	DR15	KF15
T3-21Lh	4.69±0.58	87±5	496±21	0.037±0.004	2.87±0.32	2.62±0.11
T3-19Lh	3.14±0.4	121±9	548±20	0.031±0.003	2.94±0.15	2.09±0.13
T3-17Lh	3.74±0.21	101±5	497±11	0.038±0.003	3.26±0.23	2.18±0.09
	Amax20	Pc20	Ps20	Φ20	DR20	KF20
T3-21Lh	4.09±0.36	133±2	598±24	0.037±0.004	4.14±0.5	2.12±0.14
T3-17Lh	3.15±0.13	179±14	658±61	0.039±0.007	4.67±0.3	1.81±0.14
	Amax25	Pc25	Ps25	Φ25	DR25	KF25
T3-21Lh	3.86±0.83	170±15	625±49	0.047±0.009	5.57±0.67	1.65±0.10
T3-17Lh	2.57±0.24	229±38	711±69	0.035±0.005	5.02±0.23	1.52±0.06

Tabla 3a.5: Amáx, Pc, Ps, Φ, RO y KF para todas las temperaturas medidas en muestras de *Lasallia hispanica* del tercer transecto.

Table 3a.5: Amax, Pc, Ps, Φ, DR and KF for all the temperatures measured on *Lasallia hispanica* samples from the third transect.

	Tcl	Topt	Tcu	Area
T3-21Lh	-4.87	15.52	35.91	90.96
T3-17Lh	-1.65	15.08	31.81	68.58

Tabla 3a.6: Temperatura óptima para la fotosíntesis (Topt), puntos de compensación de temperatura inferior y superior (Tci y Tcs respectivamente) y área bajo la curva (calculada por integración de la función entre 5 y 25 °C) para el tercer transecto de *L. hispanica*.

Table 3a.6: Temperature optimum for photosynthesis (Topt), lower and upper temperature compensation points (Tcl and Tcu respectively) and area under the curve (calculated by integration of the function between 5 and 25°C) for the third transect of *L. hispanica*.

---

Amax5	Pc5	Ps5	Φ5	DR5	KF5
-------	-----	-----	----	-----	-----

---

T1-17Lp	4.66±0.74	39±8	295±10	0.051±0.006	1.55±0.13	4.34±0.62
T1-12Lp	2.04±0.54	84±18	362±39	0.033±0.005	1.48±0.03	2.32±0.34
T1-9Lp	5.15±0.62	32±3	295±12	0.05±0.006	1.41±0.07	4.61±0.37
	Amax10	Pc10	Ps10	Φ10	DR10	KF10
T1-17Lp	6.07±0.93	70±12	422±14	0.052±0.004	2.83±0.09	3.22±0.36
T1-12Lp	2.99±0.74	140±38	497±73	0.045±0.009	2.87±0.1	2±0.23
T1-9Lp	6.19±0.4	49±2	386±26	0.052±0.004	2.4±0.07	3.63±0.22
	Amax15	Pc15	Ps15	Φ15	DR15	KF15
T1-17Lp	5.56±0.83	68±5	437±26	0.061±0.006	3.92±0.17	<b>2.43±0.21<sup>ab</sup></b>
T1-15Lp	2.74±0.42	813±304	730±78	0.039±0.003	4.25±0.24	<b>1.64±0.11<sup>a</sup></b>
T1-12Lp	3.28±0.73	175±29	1016±184	0.049±0.004	4.88±0.18	<b>1.65±0.14<sup>a</sup></b>
T1-10Lp	7.44±0.27	54±1	399±19	0.07±0.006	3.53±0.24	<b>3.29±0.18<sup>b</sup></b>
T1-9Lp	5.96±0.46	57±4	318±17	0.092±0.01	4.24±0.23	<b>2.39±0.06<sup>ab</sup></b>
	Amax20	Pc20	Ps20	Φ20	DR20	KF20
T1-17Lp	6.43±1.19	212±63	647±76	0.068±0.005	6.67±0.27	2.02±0.19
T1-12Lp	2.97±1.19	114±11	833±181	0.072±0.01	7.9±0.5	1.33±0.13
T1-9Lp	5.81±0.51	89±3	416±24	0.089±0.006	6.42±0.21	1.92±0.1
	Amax25	Pc25	Ps25	Φ25	DR25	KF25
T1-17Lp	3.82±1.01	115±12	451±38	0.11±0.01	9.1±0.37	1.41±0.11
T1-12Lp	1.61±0.78	200±13	600±21	0.056±0.004	8.18±0.29	1.21±0.1
T1-9Lp	4.64±0.58	134±14	500±37	0.097±0.012	8.42±0.45	1.54±0.06

Tabla 3a.7: Amáx, Amáx, Pc, Ps, Φ, RO y KF para todas las temperaturas medidas en muestras de *Lasallia pustulata* del primer transecto.

Table 3a.7: Amax, Pc, Ps, Φ, DR and KF for all the temperatures measured on *Lasallia pustulata* samples from the first transect.

	Tcl	Topt	Tcu	Area
T1-17Lp	-3.98	14.44	32.86	111.24
T1-12Lp	-0.5	14.39	29.28	56.42
T1-9Lp	-8.47	13.88	36.22	115.25

Tabla 3a.8: Temperatura óptima para la fotosíntesis (Topt), puntos de compensación de temperatura inferior y superior (Tci y Tcs respectivamente) y área bajo la curva (calculada por integración de la función entre 5 y 25 °C) para el primer transecto de *L. pustulata*.

Table 3a.8: Temperature optimum of photosynthesis (Topt), lower and upper temperature compensation points (Tcl and Tcu respectively) and area under the curve (calculated by integration of the function between 5 and 25°C) for the first transect of *L. pustulata*.

	Amax5	Pc5	Ps5	Φ5	DR5	KF5
T2-17Lp	0.3±0.18	195±22	<b>583±46<sup>a</sup></b>	0.022±0.002	2.11±0.02	<b>1.14±0.09<sup>ab</sup></b>
T2-13Lp	0.02±0.2	196±4	<b>605±0.9<sup>a</sup></b>	0.017±0.002	1.96±0.07	<b>1±0.11<sup>a</sup></b>
T2-9Lp	1.28±0.25	64±14	<b>293±32<sup>b</sup></b>	0.028±0.003	1.13±0.04	<b>2.14±0.23<sup>b</sup></b>

	Amax10	Pc10	Ps10	Φ10	DR10	KF10
T2-17Lp	<b>0.55±0.3<sup>a</sup></b>	167±10	565±20	<b>0.025±0.002<sup>ab</sup></b>	2.68±0.22	<b>1.28±0.11<sup>ab</sup></b>
T2-13Lp	<b>0.01±0.37<sup>a</sup></b>	141±12	1227±290	<b>0.018±0.002<sup>a</sup></b>	2.79±0.13	<b>0.99±0.13<sup>a</sup></b>
T2-9Lp	<b>3.23±0.47<sup>b</sup></b>	92±16	425±37	<b>0.043±0.004<sup>b</sup></b>	2.89±0.17	<b>2.22±0.21<sup>b</sup></b>

	Amax15	Pc15	Ps15	Φ15	DR15	KF15
T2-17Lp	0.85±0.21	204±11	661±23	0.023±0.002	3.21±0.07	1.27±0.07
T2-15Lp	0.53±0.15	256±18	1091±185	0.025±0.003	3.6±0.14	1.16±0.05
T2-13Lp	-0.06±0.2	NC	1147±79	0.019±0.002	3.99±0.15	0.99±0.05
T2-11Lp	0.73±0.42	163±35	489±71	0.045±0.006	3.48±0.09	1.2±0.11

	Amax20	Pc20	Ps20	Φ20	DR20	KF20
T2-17Lp	<b>-0.02±0.44<sup>a</sup></b>	NC	<b>946±39<sup>ab</sup></b>	<b>0.029±0.004<sup>a</sup></b>	5.07±0.34	<b>1.03±0.08<sup>a</sup></b>
T2-13Lp	<b>-0.58±0.25<sup>a</sup></b>	NC	<b>1818±248<sup>a</sup></b>	<b>0.02±0.003<sup>a</sup></b>	5.7±0.28	<b>0.89±0.04<sup>a</sup></b>
T2-9Lp	<b>3.66±0.49<sup>b</sup></b>	157±23	<b>543±41<sup>b</sup></b>	<b>0.074±0.004<sup>b</sup></b>	7.19±0.34	<b>1.52±0.07<sup>b</sup></b>

	Amax25	Pc25	Ps25	Φ25	DR25	KF25
T2-17Lp	-0.66±0.35	NC	1652±23	<b>0.035±0.002<sup>a</sup></b>	<b>6.2±0.27<sup>a</sup></b>	0.91±0.05
T2-13Lp	-1.83±0.47	NC	1403±45	<b>0.027±0.003<sup>a</sup></b>	<b>7.51±0.4<sup>ab</sup></b>	0.77±0.07
T2-9Lp	0.84±0.38	359±35	849±44	<b>0.073±0.004<sup>b</sup></b>	<b>10.42±0.62<sup>b</sup></b>	1.01±0.04

Tabla 3a.9: Amáx, Pc, Ps, Φ, DR y KF para todas las temperaturas medidas en muestras de *Lasallia pustulata* del segundo transecto. (NC, no alcanzó compensación.)

Table 3a.9: Amax, Pc, Ps, Φ, DR and KF for all the temperatures measured on *Lasallia pustulata* samples from the second transect. (NC, no compensation.)

	Tcl	Topt	Tcu	Area
T2-17Lp	2.94	12.07	21.2	8.23
T2-13Lp	5.65	9.82	13.99	0.81
T2-9Lp	-3.09	14.67	32.43	111.44

Tabla 3a.10: Temperatura óptima para la fotosíntesis (Topt), puntos de compensación de temperatura inferior y superior (Tci y Tcs respectivamente) y área bajo la curva (calculada por integración de la función entre 5 y 25 °C) para el segundo transecto de *L. pustulata*.

Table 3a.10: Temperature optimum of photosynthesis (Topt), lower and upper temperature compensation points (Tcl and Tcu respectively) and area under the curve (calculated by integration of the function between 5 and 25°C) for the second transect of *L. pustulata*.

	Amax5	Pc5	Ps5	Φ5	DR5	KF5
T3-14Lp	4.4±0.33	30±4	269±23	0.05±0.005	1.38±0.18	4.47±0.46
T3-9Lp	4.3±0.68	32±2	279±22	0.048±0.006	1.41±0.11	4.05±0.51

	Amax10	Pc10	Ps10	Φ10	DR10	KF10
T3-14Lp	6.89±0.38	47±9	377±39	0.056±0.005	2.27±0.13	4.09±0.22
T3-9Lp	5.87±0.61	57±3	403±28	0.048±0.004	2.53±0.13	3.34±0.24

	Amax15	Pc15	Ps15	Φ15	DR15	KF15
T3-14Lp	<b>5.82±0.52<sup>a</sup></b>	54±5	326±15	<b>0.073±0.005<sup>a</sup></b>	<b>3.55±0.31<sup>a</sup></b>	2.67±0.07
T3-11Lp	<b>9.46±0.2<sup>b</sup></b>	54±4	308±20	<b>0.147±0.013<sup>b</sup></b>	<b>6.89±0.63<sup>b</sup></b>	2.48±0.14
T3-9Lp	<b>5.08±0.59<sup>a</sup></b>	75±5	418±27	<b>0.052±0.003<sup>a</sup></b>	<b>3.35±0.07<sup>a</sup></b>	2.54±0.19

	Amax20	Pc20	Ps20	Φ20	DR20	KF20
T3-14Lp	7.35±0.46	115±18	499±58	0.067±0.008	5.82±0.24	2.29±0.12
T3-9Lp	6.09±0.6	122±13	548±34	0.058±0.007	5.61±0.29	2.09±0.1

	Amax25	Pc25	Ps25	Φ25	DR25	KF25
T3-14Lp	6.53±1.05	161±21	587±41	0.095±0.01	10.32±0.59	1.65±0.11
T3-9Lp	4.24±0.18	170±8	602±17	0.066±0.006	7.81±0.5	1.56±0.06

Tabla 3a.11: Amáx Amáx, Pc, Ps, Φ, RO y KF para todas las temperaturas medidas en muestras de *Lasallia pustulata* del tercer transecto.

Table 3a.11: Amax, Pc, Ps, Φ, DR and KF for all the temperatures measured on *Lasallia pustulata* samples from the third transect.

	Tcl	Topt	Tcu	Area
T3-14Lp	-3.01	17.75	38.52	133.47
T3-9Lp	-3.22	15.07	33.36	111.44

Tabla 3a.12: Temperatura óptima para la fotosíntesis (Topt), puntos de compensación de temperatura inferior y superior (Tci y Tcs respectivamente) y área bajo la curva (calculada por integración de la función entre 5 y 25 °C) para el tercer transecto de *L. pustulata*.

Table 3a.12: Temperature optimum of photosynthesis (Topt), lower and upper temperature compensation points (Tci and Tcu respectively) and area under the curve (calculated by integration of the function between 5 and 25°C) for the third transect of *L. pustulata*.

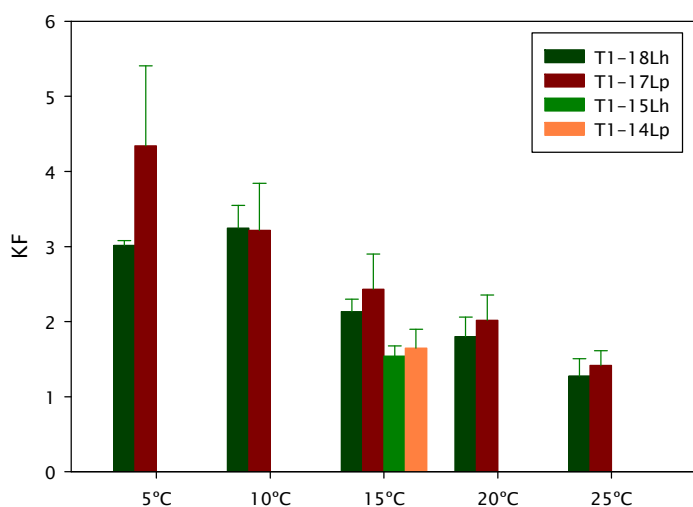


Fig 3a.1: Comparación de KF entre poblaciones de *L. hispanica* (verde oscuro y verde) y *L. pustulata* (rojo y naranja) de altitudes similares para el primer transecto.

Fig 3a.1: Comparison of KF between populations of *L. hispanica* (deep green and green) and *L. pustulata* (red and orange) from similar altitudes for the first transect.

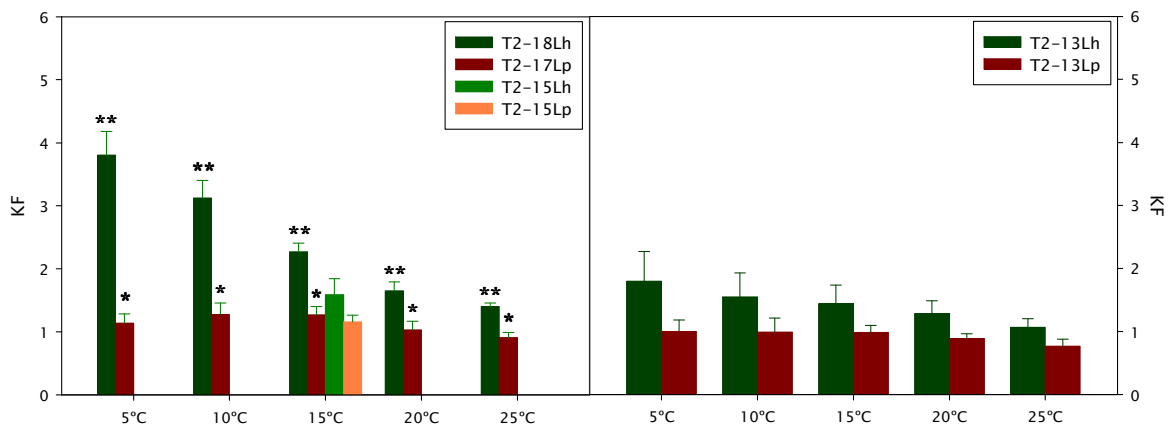


Fig 3a.2: Comparación de KF entre poblaciones de *L. hispanica* (verde oscuro y verde) y *L. pustulata* (rojo y naranja) de altitudes similares para el segundo transecto. El asterisco indica diferencias significativas entre T2-18Lh y T2-17Lp, por t-test para  $p < 0.05$ .

Fig 3a.2: Comparison of KF between populations of *L. hispanica* (deep green and green) and *L. pustulata* (red and orange) from similar altitudes for the second transect. The star indicates significant differences between T2-18Lh and T2-17Lp, by t-test with  $p < 0.05$ .

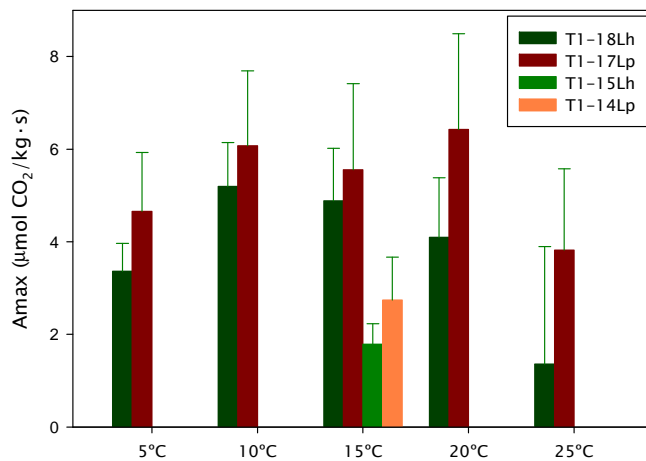


Fig 3a.3: Comparación de Amáx entre poblaciones de *L. hispanica* (verde oscuro y verde) y *L. pustulata* (rojo y naranja) de altitudes similares para el primer transecto.

Fig 3a.3: Comparison of Amax between populations of *L. hispanica* (deep green and green) and *L. pustulata* (red and orange) from similar altitudes for the first transect.

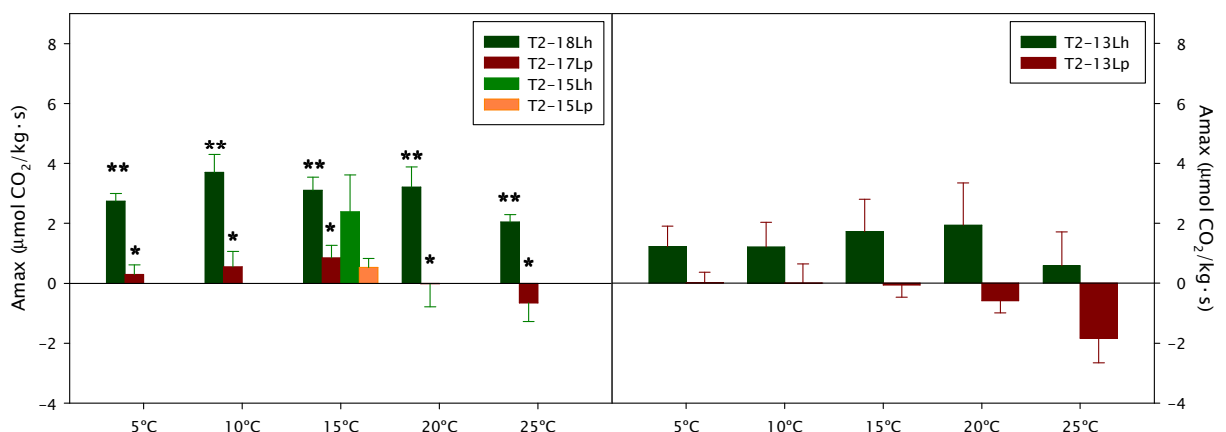


Fig 3a.4: Comparación de Amáx entre poblaciones de *L. hispanica* (verde oscuro y verde) y *L. pustulata* (rojo y naranja) de altitudes similares para el segundo transecto. El asterisco indica diferencias significativas entre T2-18Lh y T2-17Lp, por t-test para  $p < 0.05$ .

Fig 3a.4: Comparison of Amax between populations of *L. hispanica* (deep green and green) and *L. pustulata* (red and orange) from similar altitudes for the second transect. The star indicates significant differences between T2-18Lh and T2-17Lp, by t-test with  $p < 0.05$ .

	Alt	Epi	UppCor	Algal	Medulla	LowCor	TotThick	E/TT	A/TT	UL/TT	LC/TT	
Alt		<i>0,00</i>	0,08	0,18	0,59	0,10	<i>0,02</i>	<i>0,01</i>	0,38	<i>0,03</i>	0,98	Alt
Epi	<i>-0,2</i>		<i>0,00</i>	<i>0,00</i>	<i>0,00</i>	<i>0,00</i>	<i>0,00</i>	<i>0,00</i>	<i>0,00</i>	<i>0,00</i>	<i>0,00</i>	Epi
UppCor	-0,1	<i>0,33</i>		<i>0,00</i>	<i>0,00</i>	<i>0,00</i>	<i>0,00</i>	0,45	<i>0,01</i>	<i>0,00</i>	<i>0,00</i>	UppCor
Algal	-0,1	<i>0,18</i>	<i>0,29</i>		<i>0,00</i>	<i>0,00</i>	<i>0,00</i>	0,13	<i>0,00</i>	<i>0,00</i>	<i>0,00</i>	Algal
Medulla	0,03	<i>0,18</i>	<i>0,21</i>	<i>0,33</i>		<i>0,05</i>	<i>0,00</i>	0,46	0,32	<i>0,00</i>	<i>0,00</i>	Medulla
LowCor	-0,1	<i>0,24</i>	<i>0,33</i>	<i>0,3</i>	<i>0,11</i>		<i>0,00</i>	0,22	<i>0,00</i>	<i>0,00</i>	<i>0,00</i>	LowCor
TotThick	-0,1	<i>0,58</i>	<i>0,68</i>	<i>0,63</i>	<i>0,56</i>	<i>0,7</i>		<i>0,00</i>	0,76	<i>0,00</i>	0,27	TotThick
E/TT	<i>-0,2</i>	<i>0,88</i>	0,04	-0,08	-0,04	-0,07	<i>0,19</i>		<i>0,00</i>	<i>0,00</i>	<i>0,00</i>	E/TT
A/TT	0,05	<i>-0,22</i>	<i>-0,15</i>	<i>0,74</i>	-0,06	<i>-0,2</i>	-0,02	<i>-0,25</i>		<i>0,00</i>	<i>0,00</i>	A/TT
UL/TT	<i>-0,1</i>	<i>0,59</i>	<i>0,6</i>	<i>-0,16</i>	<i>-0,19</i>	<i>-0,18</i>	<i>0,18</i>	<i>0,65</i>	<i>-0,31</i>		<i>0,00</i>	UL/TT
LC/TT	0	<i>-0,25</i>	<i>-0,24</i>	<i>-0,23</i>	<i>-0,41</i>	<i>0,65</i>	-0,06	<i>-0,3</i>	<i>-0,28</i>	<i>-0,45</i>		LC/TT

Fig. 3a.5: Matriz de correlación para las medidas anatómicas de talos de *Lasallia hispanica*. Bajo la diagonal principal, coeficientes de correlación de Pearson. Los valores en añil y cursiva indican correlaciones significativas y positivas. Los valores en rojo indican correlaciones significativas y negativas. Sobre la diagonal principal, valor de significancia de la correlación. Significancias menores de 0'05 aparecen en morado y en cursiva. Valores en  $\mu\text{m}$ . Alt: Altitud; Epi: capa epinecral; UppCor: córtex superior; Algal: capa algal; Medulla: capa medular; LowCor: Córtex inferior. TotThick: grosor total del talo; E/TT: cociente capa epinecral/ grosor total; A/TT: cociente capa algal/grosor total; UL/TT: cociente capas superiores (córtex superior + epinecral)/grosor total; LC/TT: cociente córtex inferior/grosor total. (n=322.)

Fig. 3a.5: Correlation matrix for the anatomical measurements of thalli of *Lasallia hispanica*. Below the main diagonal, Pearson's product-moment correlation coefficients. Values marked by italics and indigo indicate positive significant correlations. Values in red indicate negative significant correlations. Above the main diagonal, significance of the correlation. Significances under 0.05 are marked by italics and purple colour. Values in  $\mu\text{m}$ . Alt: Altitude; Epi: epinecral layer; UppCor: upper cortex; Algal: algal layer; Medulla: medullary layer; LowCor: lower cortex. TotThick: total thallus thickness; E/TT: epinecral layer to total thickness ratio; A/TT: algal layer to total thickness ratio; UL/TT: upper layers (i.e. upper cortex + epinecral) to total thickness ratio; LC/TT: lower cortex to total thickness ratio. (n=322.)

	Alt	Epi	UppCor	Algal	Medulla	LowCor	TotThick	E/TT	A/TT	UL/TT	LC/TT	
Alt		0,22	<i>0,00</i>	<i>0,00</i>	<i>0,00</i>	0,06	<i>0,00</i>	0,42	<i>0,00</i>	0,37	<i>0,00</i>	Alt
Epi	0,12		<i>0,00</i>	<i>0,02</i>	<i>0,02</i>	0,18	<i>0,00</i>	<i>0,00</i>	0,08	<i>0,00</i>	<i>0,00</i>	Epi
UppCor	<i>0,47</i>	<i>0,35</i>		<i>0,00</i>	<i>0,00</i>	0,11	<i>0,00</i>	0,34	0,39	<i>0,00</i>	<i>0,00</i>	UppCor
Algal	<i>0,56</i>	<i>0,23</i>	<i>0,37</i>		<i>0,00</i>	0,39	<i>0,00</i>	0,94	<i>0,00</i>	0,71	<i>0,00</i>	Algal
Medulla	<i>0,34</i>	<i>0,24</i>	<i>0,34</i>	<i>0,5</i>		0,23	<i>0,00</i>	0,60	0,77	0,11	<i>0,00</i>	Medulla
LowCor	0,19	0,14	0,16	0,09	0,12		<i>0,00</i>	0,71	<i>0,01</i>	0,10	<i>0,00</i>	LowCor
TotThick	<i>0,51</i>	<i>0,6</i>	<i>0,69</i>	<i>0,64</i>	<i>0,74</i>	<i>0,49</i>		<i>0,01</i>	0,91	<i>0,01</i>	<i>0,00</i>	TotThick
E/TT	-0,08	<i>0,92</i>	0,1	-0,01	-0,05	-0,04	<i>0,26</i>		<i>0,04</i>	<i>0,00</i>	<i>0,01</i>	E/TT
A/TT	<i>0,36</i>	-0,18	-0,09	<i>0,75</i>	0,03	<i>-0,27</i>	0,01	<i>-0,21</i>		<i>0,01</i>	<i>0,01</i>	A/TT
UL/TT	0,09	<i>0,68</i>	<i>0,63</i>	-0,04	-0,16	-0,16	<i>0,27</i>	<i>0,69</i>	<i>-0,26</i>		<i>0,00</i>	UL/TT
LC/TT	<i>-0,29</i>	<i>-0,4</i>	<i>-0,46</i>	<i>-0,49</i>	<i>-0,58</i>	<i>0,57</i>	<i>-0,42</i>	<i>-0,28</i>	<i>-0,28</i>	<i>-0,41</i>		LC/TT

Fig. 3a.6: Matriz de correlación para las medidas anatómicas de los talos del primer transecto de *Lasallia hispanica*. Colores y abreviaturas como en la Fig. 3a.5 (n=100).

Fig. 3a.6: Correlation matrix for the anatomical measurements of thalli of the first transect of *Lasallia hispanica*. Colours and abbreviations have the same meaning than in Fig. 3a.5 (n=100).

	Alt	Epi	UppCor	Algal	Medulla	LowCor	TotThick	E/TT	A/TT	UL/TT	LC/TT	
Alt		0,00	0,00	0,05	0,00	0,00	0,00	0,01	0,02	0,05	0,89	Alt
Epi	-0,41		0,00	0,03	0,33	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,14	Epi
UppCor	-0,31	0,34		0,03	0,05	0,00	0,00	0,61	0,00	0,00	0,13	UppCor
Algal	-0,16	0,18	0,18		0,00	0,00	0,00	0,23	0,00	0,00	0,07	Algal
Medulla	-0,31	0,08	0,16	0,45		0,01	0,00	0,06	0,50	0,00	0,00	Medulla
LowCor	-0,34	0,33	0,38	0,35	0,23		0,00	0,94	0,00	0,04	0,00	LowCor
TotThick	-0,47	0,59	0,65	0,63	0,55	0,78		0,54	0,20	0,19	0,19	TotThick
E/TT	-0,22	0,86	0,04	-0,1	-0,16	-0,01	0,19		0,00	0,00	0,00	E/TT
A/TT	0,19	-0,25	-0,28	0,71	0,06	-0,23	-0,05	-0,26		0,00	0,00	A/TT
UL/TT	-0,16	0,56	0,58	-0,29	-0,32	-0,17	0,11	0,64	-0,4		0,00	UL/TT
LC/TT	-0,01	-0,12	-0,12	-0,15	-0,24	0,68	0,11	-0,24	-0,3	-0,4		LC/TT

Fig. 3a.7: Matriz de correlación para las medidas anatómicas de los talos del segundo transecto de *Lasallia hispanica*. Colores y abreviaturas como en la Fig. 3a.5 (n=147).

Fig. 3a.7: Correlation matrix for the anatomical measurements of thalli of the second transect of *Lasallia hispanica*. Colours and abbreviations have the same meaning than in Fig. 3a.5 (n=147).

	Alt	Epi	UppCor	Algal	Medulla	LowCor	TotThick	E/TT	A/TT	UL/TT	LC/TT	
Alt		0,00	0,02	0,43	0,00	0,00	0,00	0,62	0,00	0,63	0,45	Alt
Epi	0,33		0,06	0,06	0,14	0,06	0,00	0,00	0,19	0,00	0,07	Epi
UppCor	0,28	0,22		0,00	0,00	0,00	0,00	0,50	0,05	0,00	0,04	UppCor
Algal	0,09	0,22	0,38		0,00	0,06	0,00	0,90	0,00	0,99	0,01	Algal
Medulla	0,52	0,17	0,33	0,34		0,31	0,00	0,48	0,31	0,27	0,00	Medulla
LowCor	0,49	0,22	0,36	0,22	0,12		0,00	0,24	0,00	0,09	0,00	LowCor
TotThick	0,58	0,48	0,73	0,58	0,58	0,74		0,62	0,05	0,16	0,87	TotThick
E/TT	0,06	0,89	-0,08	-0,01	-0,08	-0,14	0,06		0,77	0,00	0,01	E/TT
A/TT	-0,44	-0,15	-0,23	0,64	-0,12	-0,43	-0,23	-0,03		0,19	0,00	A/TT
UL/TT	-0,06	0,5	0,61	0	-0,13	-0,2	0,16	0,53	-0,15		0,00	UL/TT
LC/TT	0,09	-0,21	-0,23	-0,3	-0,43	0,68	0,02	-0,3	-0,41	-0,48		LC/TT

Fig. 3a.8: Matriz de correlación para las medidas anatómicas de los talos del tercer transecto de *Lasallia hispanica*. Colores y abreviaturas como en la Fig. 3a.5 (n=75).

Fig. 3a.8: Correlation matrix for the anatomical measurements of thalli of the third transect of *Lasallia hispanica*. Colours and abbreviations have the same meaning than in Fig. 3a.5 (n=75).

	Alt	Epi	UppCor	Algal	Medulla	LowCor	TotThick	E/TT	A/TT	UL/TT	LC/TT	
Alt		0,10	0,00	0,00	0,92	0,04	0,47	0,02	0,00	0,33	0,01	Alt
Epi	0,09		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	Epi
UppCor	-0,17	0,16		0,01	0,00	0,00	0,00	0,63	0,00	0,00	0,00	UppCor
Algal	0,26	0,30	0,14		0,00	0,03	0,00	0,00	0,00	0,88	0,00	Algal
Medulla	-0,01	0,18	0,44	0,24		0,00	0,00	0,97	0,00	0,86	0,00	Medulla
LowCor	-0,11	0,27	0,36	0,12	0,22		0,00	0,55	0,00	0,05	0,00	LowCor
TotThick	-0,04	0,51	0,68	0,43	0,66	0,77		0,00	0,00	0,00	0,65	TotThick
E/TT	0,13	0,93	-0,03	0,16	0,00	0,03	0,24		0,13	0,00	0,00	E/TT
A/TT	0,28	-0,17	-0,35	0,64	-0,26	-0,52	-0,37	-0,08		0,00	0,00	A/TT
UL/TT	-0,05	0,57	0,59	0,01	-0,01	-0,11	0,23	0,59	-0,17		0,00	UL/TT
LC/TT	-0,14	-0,21	-0,22	-0,36	-0,46	0,60	-0,03	-0,25	-0,39	-0,44		LC/TT

Fig. 3a.9: Matriz de correlación para las medidas anatómicas de los talos de *Lasallia pustulata*. Values in  $\mu\text{m}$ . Colores y abreviaturas como en la Fig. 3a.5 (n=327).

Fig. 3a.9: Correlation matrix for the anatomical measurements of thalli of *Lasallia pustulata*. Values in  $\mu\text{m}$ . Colours and abbreviations have the same meaning than in Fig. 3a.5 (n=327).



	Alt	Epi	UppCor	Algal	Medulla	LowCor	TotThick	E/TT	A/TT	UL/TT	LC/TT	
Alt		0,19	0,41	0,00	0,04	0,01	0,02	0,76	0,00	0,73	0,12	Alt
Epi	-0,13		0,00	0,29	0,01	0,30	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	Epi
UppCor	-0,08	0,43		0,00	0,00	0,07	0,00	0,01	0,07	0,00	0,00	UppCor
Algal	0,31	0,11	0,33		0,02	0,17	0,00	0,58	0,00	0,17	0,00	Algal
Medulla	-0,21	0,24	0,42	0,23		0,65	0,00	0,35	0,03	0,33	0,00	Medulla
LowCor	-0,28	0,10	0,18	-0,14	0,05		0,00	0,46	0,00	0,01	0,00	LowCor
TotThick	-0,23	0,57	0,69	0,33	0,61	0,65		0,00	0,00	0,00	0,26	TotThick
E/TT	-0,03	0,95	0,25	0,06	0,09	-0,07	0,34		0,08	0,00	0,00	E/TT
A/TT	0,43	-0,27	-0,18	0,72	-0,22	-0,58	-0,39	-0,17		0,40	0,00	A/TT
UL/TT	0,04	0,79	0,64	0,14	0,10	-0,24	0,30	0,81	-0,09		0,00	UL/TT
LC/TT	-0,16	-0,37	-0,41	-0,50	-0,54	0,67	-0,11	-0,40	-0,41	-0,58		LC/TT

Fig. 3a.10: Matriz de correlación para las medidas anatómicas de los talos del primer transecto de *Lasallia pustulata*. Colores y abreviaturas como en la Fig. 3a.5 (n=101).

Fig. 3a.10: Correlation matrix for the anatomical measurements of thalli of the first transect of *Lasallia pustulata*. Colours and abbreviations have the same meaning than in Fig. 3a.5 (n=101).

	Alt	Epi	UppCor	Algal	Medulla	LowCor	TotThick	E/TT	A/TT	UL/TT	LC/TT	
Alt		0,76	0,00	0,09	0,33	0,09	0,38	0,35	0,00	0,09	0,11	Alt
Epi	0,03		0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,46	0,00	0,05	Epi
UppCor	-0,27	0,35		0,01	0,02	0,01	0,00	0,05	0,06	0,00	0,00	UppCor
Algal	0,15	0,44	0,24		0,00	0,08	0,00	0,00	0,00	0,20	0,00	Algal
Medulla	0,09	0,22	0,2	0,26		0,72	0,00	0,18	0,79	0,89	0,00	Medulla
LowCor	-0,15	0,44	0,23	0,15	-0,03		0,00	0,01	0,00	0,65	0,00	LowCor
TotThick	-0,08	0,75	0,57	0,57	0,44	0,75		0,00	0,24	0,00	0,93	TotThick
E/TT	0,08	0,94	0,18	0,31	0,12	0,23	0,52		0,67	0,00	0,01	E/TT
A/TT	0,28	-0,07	-0,17	0,74	-0,02	-0,39	-0,11	-0,04		0,14	0,00	A/TT
UL/TT	-0,15	0,6	0,73	0,12	-0,01	-0,04	0,33	0,63	-0,13		0,00	UL/TT
LC/TT	-0,15	-0,18	-0,27	-0,4	-0,54	0,64	-0,01	-0,24	-0,49	-0,42		LC/TT

Fig. 3a.11: Matriz de correlación para las medidas anatómicas de los talos del segundo transecto de *Lasallia pustulata*. Colores y abreviaturas como en la Fig. 3a.5 (n=125).

Fig. 3a.11: Correlation matrix for the anatomical measurements of thalli of the second transect of *Lasallia pustulata*. Colours and abbreviations have the same meaning than in Fig. 3a.5 (n=125).

	Alt	Epi	UppCor	Algal	Medulla	LowCor	TotThick	E/TT	A/TT	UL/TT	LC/TT	
Alt		0,00	0,05	0,00	0,91	0,37	0,22	0,00	0,11	0,96	0,68	Alt
Epi	0,53		0,46	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,05	0,01	0,16	Epi
UppCor	-0,19	0,08		0,74	0,00	0,00	0,00	0,17	0,00	0,00	0,65	UppCor
Algal	0,4	0,39	-0,03		0,03	0,01	0,00	0,04	0,00	0,02	0,14	Algal
Medulla	0,01	0,33	0,44	0,22		0,00	0,00	0,28	0,00	0,48	0,00	Medulla
LowCor	0,09	0,33	0,49	0,24	0,41		0,00	0,99	0,00	0,55	0,00	LowCor
TotThick	0,12	0,49	0,69	0,39	0,75	0,85		0,13	0,00	0,17	0,24	TotThick
E/TT	0,49	0,87	-0,14	0,21	0,11	0,00	0,15		0,48	0,00	0,00	E/TT
A/TT	0,16	-0,19	-0,57	0,49	-0,45	-0,58	-0,56	-0,07		0,00	0,00	A/TT
UL/TT	0	0,26	0,63	-0,23	-0,07	-0,06	0,14	0,33	-0,29		0,00	UL/TT
LC/TT	-0,04	-0,14	-0,05	-0,15	-0,32	0,59	0,12	-0,28	-0,32	-0,32		LC/TT

Fig. 3a.12: Matriz de correlación para las medidas anatómicas de los talos del tercer transecto de *Lasallia pustulata*. Colores y abreviaturas como en la Fig. 3a.5 (n=101).

Fig. 3a.12: Correlation matrix for the anatomical measurements of thalli of the third transect of *Lasallia pustulata*. Colours and abbreviations have the same meaning than in Fig. 3a.5 (n=101).

	Alt	TSW	Chla	Chlb	a+b	a/b	car	Erg	Chit	Ch/E	Arg	Taa	%Arg	NH4	N	C	C/N	Gyr	Amax	Pc15	Ps15	Φ15	DR15	inos	arab	rib	man	r/m	r/m+a	glu	gal	fru	suc	Tsug	
Alt		0,00	0,22	0,63	0,27	0,24	0,53	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,82	0,00	0,02	0,00	0,00	0,01	0,35	0,01	0,04	0,93	0,00	0,30	0,04	0,00	0,10	0,00	0,00	0,00	0,01	0,84	0,01	0,89	Alt
TSW	0,54		0,34	0,68	0,38	0,21	0,43	0,00	0,04	0,00	0,18	0,36	0,86	0,00	0,00	0,72	0,00	0,00	0,20	0,80	0,78	0,03	0,00	0,99	0,17	0,01	0,27	0,00	0,00	0,06	0,11	0,29	0,00	0,34	TSW
Chla	-0,17	-0,14		0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,35	0,47	0,39	0,85	0,32	0,51	0,01	0,04	0,03	0,16	0,00	0,15	0,53	0,10	0,10	0,24	0,53	0,14	0,30	0,30	0,43	0,14	0,33	0,84	0,35	0,11	Chla
Chlb	-0,07	-0,06	0,43		0,00	0,00	0,00	0,62	0,77	0,65	0,73	0,24	0,83	0,51	0,92	0,89	0,93	0,30	0,07	0,44	0,88	0,75	0,20	0,32	0,90	0,28	0,40	0,34	0,20	0,71	0,76	0,60	0,07	0,23	Chlb
a+b	-0,16	-0,12	0,92	0,75		0,09	0,00	0,04	0,58	0,47	0,63	0,72	0,41	0,44	0,04	0,11	0,10	0,13	0,00	0,16	0,65	0,16	0,08	0,20	0,69	0,12	0,26	0,24	0,26	0,21	0,56	0,94	0,14	0,09	a+b
a/b	-0,16	-0,18	0,56	-0,41	0,24		0,48	0,03	0,50	0,43	0,59	0,38	0,14	0,17	0,13	0,21	0,28	0,97	0,01	0,40	0,41	0,12	0,40	0,79	0,44	0,35	0,38	0,77	0,72	0,50	0,24	0,94	0,74	0,46	a/b
car	-0,09	-0,11	0,49	0,53	0,59	-0,10		0,01	0,66	0,24	0,62	0,77	0,33	0,89	0,22	0,10	0,37	0,26	0,01	0,30	0,69	0,48	0,32	0,15	0,54	0,09	0,26	0,13	0,12	0,12	0,48	0,57	0,15	0,08	car
Erg	-0,60	-0,44	0,35	0,07	0,29	0,30	0,34		0,30	0,00	0,39	0,55	0,56	0,00	0,88	0,00	0,12	0,36	0,48	0,23	0,64	0,79	0,49	0,49	0,76	0,00	0,00	0,00	0,00	0,65	0,72	0,04	0,00	0,00	Erg
Chit	0,41	0,29	0,13	-0,04	0,08	0,10	0,06	-0,15		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,52	0,00	0,03	0,01	0,01	0,03	0,62	0,00	0,00	0,00	0,00	0,66	0,00	0,00	0,00	0,00	0,39	0,00	0,67	Chit
Ch/E	0,62	0,51	-0,10	-0,06	-0,10	-0,11	-0,17	-0,73	0,75		0,00	0,01	0,22	0,00	0,00	0,13	0,00	0,01	0,05	0,03	0,21	0,77	0,03	0,02	0,03	0,00	0,13	0,00	0,00	0,01	0,01	0,36	0,00	0,09	Ch/E
Arg	0,53	0,19	0,12	-0,05	0,07	0,08	0,07	-0,12	0,59	0,46		0,00	0,99	0,01	0,00	0,38	0,00	0,00	0,01	0,07	0,22	0,56	0,06	0,00	0,00	0,29	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	Arg
Taa	0,56	0,13	0,03	-0,16	-0,05	0,12	-0,04	-0,09	0,52	0,36	0,89		0,92	0,04	0,00	0,71	0,00	0,09	0,02	0,11	0,24	0,77	0,04	0,00	0,00	0,03	0,77	0,00	0,00	0,00	0,03	0,01	0,20	0,20	Taa
%Arg	0,03	-0,02	0,14	0,03	0,12	0,21	-0,14	0,08	0,46	0,17	0,00	0,01		0,17	0,64	0,07	0,23	0,90	0,43	0,13	0,03	0,28	0,08	0,09	0,53	0,91	0,25	0,31	0,19	0,38	0,39	0,19	0,70	0,28	%Arg
NH4	-0,64	-0,44	0,09	0,09	0,11	0,19	-0,02	0,61	-0,42	-0,64	-0,36	-0,29	0,19		0,00	0,59	0,00	0,23	0,32	0,01	0,05	0,71	0,03	0,61	0,77	0,00	0,00	0,00	0,00	0,06	0,41	0,01	0,00	0,00	NH4
N	0,32	0,41	0,38	0,01	0,28	0,21	0,18	-0,02	0,70	0,53	0,61	0,54	0,07	-0,39		0,39	0,00	0,00	0,00	0,06	0,61	0,73	0,04	0,00	0,01	0,02	0,98	0,00	0,00	0,00	0,00	0,64	0,00	0,89	N
C	-0,42	-0,05	0,29	0,02	0,22	0,17	0,24	0,52	0,09	-0,21	0,12	0,05	-0,26	0,08	0,39		0,91	0,75	0,46	0,13	0,04	0,39	0,35	0,30	0,33	0,02	0,06	0,17	0,08	0,33	0,31	0,99	0,82	0,27	C
C/N	-0,54	-0,45	-0,30	-0,01	-0,23	-0,15	-0,13	0,22	-0,73	-0,65	-0,62	-0,58	-0,17	0,50	-0,92	-0,02		0,00	0,00	0,01	0,12	0,95	0,01	0,00	0,02	0,00	0,36	0,00	0,00	0,00	0,00	0,53	0,00	0,76	C/N
Gyr	-0,36	-0,44	-0,20	-0,15	-0,21	0,00	-0,16	0,13	-0,29	-0,36	-0,40	-0,24	0,02	0,17	-0,58	-0,04	0,59		0,80	0,45	0,81	0,15	0,03	0,46	0,03	0,37	0,46	0,03	0,02	0,00	0,01	0,06	0,09	0,21	Gyr
Amax	0,14	-0,19	0,58	0,27	0,55	0,38	0,40	-0,11	0,35	0,29	0,35	0,33	0,12	-0,15	0,46	0,11	-0,44	-0,04		0,00	0,07	0,00	0,02	0,02	0,28	0,19	0,95	0,03	0,05	0,14	0,15	0,58	0,12	0,89	Amax
Pc15	-0,37	-0,04	-0,21	-0,12	-0,21	-0,13	-0,16	0,18	-0,39	-0,33	-0,27	-0,24	-0,23	0,39	-0,28	0,22	0,40	0,11	-0,44		0,00	0,13	0,05	0,56	0,06	0,44	0,05	0,07	0,09	0,35	0,84	0,35	0,99	Pc15	
Ps15	-0,31	0,04	-0,09	0,02	-0,07	-0,13	-0,06	0,07	-0,32	-0,19	-0,19	-0,18	-0,32	0,30	-0,08	0,31	0,24	-0,04	-0,27	0,87		0,00	0,35	0,12	0,51	0,28	0,73	0,29	0,16	0,13	0,35	0,71	0,75	0,63	Ps15
Φ15	0,01	-0,32	0,24	0,05	0,21	0,23	0,11	-0,04	0,07	0,04	0,09	0,04	0,16	-0,05	-0,05	-0,13	-0,01	0,21	0,53	-0,38	-0,62		0,00	0,15	0,69	0,91	0,81	0,86	0,93	0,84	0,75	0,91	0,71	0,58	Φ15
DR15	0,44	0,48	-0,24	-0,19	-0,25	-0,12	-0,15	-0,10	0,44	0,32	0,27	0,30	0,26	-0,31	0,29	-0,14	-0,37	-0,31	-0,35	-0,23	-0,14	-0,58		0,44	0,18	0,07	0,85	0,01	0,00	0,01	0,07	0,21	0,05	0,83	DR15
inos	0,15	0,00	0,16	0,14	0,18	-0,04	0,21	0,10	0,56	0,32	0,63	0,41	0,24	-0,07	0,43	0,15	-0,41	-0,10	0,34	-0,29	-0,23	0,21	0,11		0,00	0,13	0,00	0,68	0,28	0,00	0,00	0,01	0,76	0,00	inos
arab	0,28	0,19	0,09	-0,02	0,06	0,11	0,09	0,04	0,43	0,30	0,71	0,42	0,09	-0,04	0,37	0,14	-0,33	-0,31	0,16	-0,09	-0,10	0,06	0,20	0,61		0,04	0,00	0,25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00	arab
rib	-0,53	-0,37	0,21	0,15	0,22	0,13	0,24	0,73	-0,39	-0,65	-0,15	-0,30	-0,02	0,72	-0,33	0,31	0,49	0,13	-0,19	0,28	0,16	0,02	-0,26	0,21	0,28		0,00	0,00	0,67	0,25	0,00	0,00	0,00	0,00	rib
man	-0,23	-0,16	0,15	0,12	0,16	0,12	0,16	0,48	0,06	-0,21	0,30	0,04	0,16	0,53	0,00	0,26	0,13	-0,10	0,01	0,12	0,05	0,04	-0,03	0,54	0,77	0,77		0,01	0,59	0,00	0,00	0,10	0,00	man	
r/m	-0,55	-0,41	0,15	0,13	0,17	0,04	0,22	0,63	-0,62	-0,75	-0,44	-0,48	-0,14	0,58	-0,55	0,19	0,66	0,30	-0,31	0,29	0,16	0,03	-0,36	-0,06	-0,16	0,86	0,36		0,00	0,02	0,04	0,54	0,00	0,00	r/m
r/m+a	-0,68	-0,47	0,11	0,18	0,16	-0,05	0,22	0,57	-0,64	-0,75	-0,60	-0,56	-0,18	0,54	-0,53	0,25	0,66	0,34	-0,28	0,27	0,21	-0,01	-0,40	-0,15	-0,50	0,65	0,08	1		0,00	0,00	0,27	0,00	0,46	r/m+a
glu	0,47	0,26	0,21	0,05	0,18	0,10	0,22	0,06	0,57	0,34	0,80	0,56	0,12	-0,26	0,57	0,14	-0,57	-0,53	0,22	-0,25	-0,23	0,03	0,37	0,56	0,87	0,06	0,55	-0,33	-0,59		0,00	0,00	0,01	0,00	glu
gal	0,35	0,23	0,14	-0,04	0,08	0,16	0,10	0,05	0,53	0,35	0,78	0,53	0,12	-0,12	0,50	0,14	-0,48	-0,38	0,21	-0,14	-0,14	0,05	0,27	0,59	0,98	0,16	0,68	-0,28	-0,60	0,93		0,00	0,00	0,00	gal
fru	0,03	-0,15	-0,03	0,07	0,01	0,01	0,08	0,29	0,12	-0,13	0,49	0,30	0,19	0,35	-0,07	0,00	0,09	-0,26	-0,08	0,03	-0,06	-0,02	0,18	0,38	0,72	0,47	0,80	0,09	-0,15	0,66	0,68		0,40	0,00	fru
suc	-0,38	-0,44	0,13	0,25	0,21	-0,05	0,21	0,54	-0,57	-0,73	-0,42	-0,37	0,05	0,62	-0,57	-0,03	0,58	0,24	-0,23	0,14	0,05	0,06	-0,28	-0,04	-0,33	0,70	0,23	0,86	0,85	-0,36	-0,42	0,12		0,01	suc
Tsug	-0,02	-0,14	0,22	0,17	0,24	0,10	0,25	0,49	0,06	-0,24	0,42	0,18	0,15	0,41	0,02	0,16	0,04	-0,18	0,02	0,00	-0,07	0,08	0,03	0,58	0,75	0,76	0,92	0,43	0,10	0,64					

	Alt	TSW	Chla	Chlb	a+b	a/b	car	Erg	Chit	Ch/E	Arg	Taa	%Arg	NH4	N	C	C/N	Gyr	Amax	Pc15	Ps15	Φ15	DR15	inos	arab	rib	man	r/m	r/m+a	glu	gal	fru	suc	Tsug		
Alt		0,01	0,16	0,00	0,05	0,36	0,02	0,12	0,01	0,00	0,19	0,00	0,45	0,40	0,10	0,04	0,00	0,00	0,02	0,30	0,08	0,01	0,37	0,39	0,86	0,80	0,07	0,00	0,01	0,87	0,93	0,03	0,01	0,12	Alt	
TSW	0,35		0,06	0,84	0,09	0,20	0,02	0,50	0,52	0,34	0,06	0,27	0,13	0,00	0,94	0,24	0,65	0,00	0,00	0,09	0,05	0,00	0,00	0,56	0,01	0,70	0,09	0,77	0,54	0,30	0,03	0,02	0,55	0,13	TSW	
Chla	0,20	-0,26		0,00	0,00	0,00	0,00	0,08	0,40	0,74	0,02	0,01	0,07	0,00	0,00	0,11	0,00	0,50	0,01	0,11	0,95	0,01	0,02	0,34	0,14	0,54	0,62	0,28	0,08	0,03	0,13	0,03	0,00	0,83	Chla	
Chlb	0,39	-0,03	0,40		0,00	0,00	0,00	0,18	0,67	0,47	0,18	0,20	0,45	0,98	0,21	0,76	0,06	0,86	0,47	0,08	0,13	0,80	0,15	0,37	0,75	0,31	0,46	0,81	1,00	0,39	0,75	0,87	0,01	0,06	Chlb	
a+b	0,27	-0,24	0,97	0,60		0,02	0,00	0,24	0,53	0,92	0,02	0,01	0,08	0,01	0,00	0,19	0,00	0,52	0,05	0,37	0,72	0,04	0,02	0,55	0,23	0,43	0,81	0,32	0,13	0,04	0,22	0,06	0,00	0,51	a+b	
a/b	-0,13	-0,18	0,54	-0,52	0,33		0,38	0,02	0,30	0,50	0,25	0,13	0,22	0,00	0,02	0,13	0,06	0,56	0,00	0,02	0,15	0,02	0,63	0,18	0,20	0,76	0,68	0,41	0,08	0,46	0,17	0,05	0,17	0,57	a/b	
car	0,33	-0,32	0,86	0,71	0,93	0,12		0,68	0,95	0,95	0,08	0,04	0,21	0,01	0,01	0,60	0,00	0,16	0,05	0,50	0,76	0,03	0,00	0,98	0,99	0,26	0,47	0,57	0,41	0,16	0,84	0,15	0,00	0,11	car	
Erg	-0,21	-0,10	0,25	-0,19	0,17	0,32	0,06		0,34	0,00	0,03	0,01	0,17	0,29	0,00	0,00	0,46	0,62	0,79	0,10	0,90	0,39	0,76	0,00	0,00	0,00	0,00	0,79	0,73	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	Erg	
Chit	0,35	0,09	0,12	-0,06	0,09	0,15	0,01	0,13		0,00	0,00	0,00	0,47	0,36	0,00	0,76	0,00	0,00	0,16	0,46	0,02	0,12	0,87	0,00	0,00	0,46	0,09	0,86	0,57	0,00	0,00	0,03	0,02	0,08	Chit	
Ch/E	0,40	0,14	-0,05	0,10	-0,01	-0,10	-0,01	-0,73	0,51		0,72	0,43	0,16	0,83	0,95	0,00	0,01	0,00	0,15	0,63	0,04	0,04	0,81	0,59	0,11	0,00	0,00	0,52	0,59	0,26	0,12	0,01	0,00	0,00	Ch/E	
Arg	0,17	0,26	0,32	0,19	0,33	0,16	0,24	0,29	0,40	-0,05		0,00	0,00	0,50	0,00	0,01	0,00	0,00	0,21	0,54	0,03	0,05	0,75	0,54	0,00	0,36	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00	0,06	Arg	
Taa	0,47	0,16	0,36	0,18	0,36	0,22	0,28	0,35	0,69	0,10	0,71		0,01	0,01	0,00	0,02	0,00	0,00	0,15	0,63	0,01	0,10	0,79	0,00	0,00	0,32	0,06	0,37	0,71	0,00	0,00	0,00	0,00	0,05	Taa	
%Arg	-0,10	0,21	0,25	0,11	0,25	0,17	0,18	0,18	0,10	-0,19	0,86	0,32		0,90	0,00	0,02	0,00	0,01	0,97	0,78	0,71	0,30	0,48	0,18	0,00	0,05	0,03	0,00	0,00	0,00	0,02	0,33	0,00	0,36	%Arg	
NH4	0,11	-0,62	0,43	0,00	0,37	0,45	0,38	0,14	0,12	-0,03	0,09	0,36	-0,02		0,01	0,06	0,01	0,00	0,00	0,53	0,10	0,00	0,03	0,35	0,03	0,91	0,01	0,01	0,02	0,36	0,09	0,07	0,13	0,03	NH4	
N	0,22	0,01	0,49	0,18	0,47	0,32	0,36	0,45	0,64	0,01	0,75	0,87	0,49	0,33		0,00	0,00	0,01	0,97	0,86	0,03	0,72	0,45	0,00	0,00	0,48	0,00	0,33	0,02	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	N	
C	-0,27	-0,17	0,23	-0,04	0,18	0,22	0,07	0,73	0,04	-0,65	0,32	0,32	0,30	0,25	0,49		0,49	0,51	0,41	0,22	0,58	0,09	0,36	0,03	0,00	0,01	0,00	0,76	0,78	0,00	0,00	0,00	0,14	0,00	C	
C/N	-0,43	-0,07	-0,49	-0,26	-0,49	-0,27	-0,42	-0,10	-0,66	-0,35	-0,70	-0,83	-0,43	-0,32	-0,90	-0,09		0,01	0,92	0,69	0,02	0,60	0,41	0,00	0,00	0,33	0,33	0,26	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,83	C/N	
Gyr	-0,50	-0,66	0,10	0,02	0,09	0,08	0,20	-0,07	-0,50	-0,39	-0,52	-0,45	-0,37	0,51	-0,35	0,09	0,36		0,00	0,55	0,00	0,00	0,00	0,04	0,00	0,08	0,00	0,91	0,27	0,00	0,00	0,43	0,46	0,00	Gyr	
Amax	-0,32	-0,61	0,34	-0,10	0,27	0,44	0,28	0,04	-0,20	-0,20	-0,18	-0,20	-0,01	0,56	0,01	0,12	-0,01	0,70		0,01	0,00	0,00	0,01	0,58	0,00	0,04	0,02	0,39	0,58	0,15	0,01	0,10	0,29	0,00	Amax	
Pc15	0,17	0,27	-0,25	0,28	-0,14	-0,37	-0,11	-0,26	-0,12	0,08	0,10	0,08	0,05	-0,10	-0,03	-0,20	-0,06	-0,10	-0,40		0,00	0,00	0,08	0,41	0,29	0,55	0,63	0,36	0,61	0,45	0,62	0,44	0,37	0,28	0,23	Pc15
Ps15	0,27	0,31	-0,01	0,23	0,06	-0,22	0,05	0,02	0,35	0,31	0,34	0,41	0,06	-0,26	0,34	-0,09	-0,35	-0,48	-0,63	0,71		0,00	0,51	0,04	0,01	0,14	0,03	0,96	0,73	0,00	0,01	0,21	0,49	0,04	Ps15	
Φ15	-0,37	-0,58	0,36	-0,04	0,30	0,34	0,32	0,13	-0,23	-0,30	-0,29	-0,24	-0,15	0,47	-0,05	0,25	0,08	0,75	0,76	-0,28	-0,50		0,00	0,29	0,01	0,13	0,04	0,69	0,94	0,18	0,07	0,14	0,53	0,04	Φ15	
DR15	0,13	0,40	-0,32	-0,21	-0,34	-0,07	-0,41	-0,05	0,02	0,04	0,05	-0,04	0,10	-0,31	-0,11	-0,13	0,12	-0,50	-0,39	0,14	0,10	-0,72		0,46	0,26	0,37	0,31	0,78	0,99	0,44	0,63	0,03	0,16	0,26	DR15	
inos	0,12	-0,08	0,14	-0,13	0,09	0,19	0,00	0,53	0,60	-0,07	0,08	0,48	-0,18	0,13	0,55	0,29	-0,38	-0,29	-0,08	-0,17	0,31	-0,16	0,11		0,00	0,00	0,00	0,04	0,33	0,00	0,00	0,00	0,14	0,00	inos	
arab	-0,02	0,38	0,21	-0,04	0,17	0,18	0,00	0,62	0,44	-0,21	0,64	0,55	0,47	-0,29	0,66	0,42	-0,48	-0,69	-0,39	-0,10	0,42	-0,36	0,17	0,53		0,01	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,60	0,00	arab	
rib	0,03	0,05	-0,09	-0,15	-0,11	-0,04	-0,16	0,57	0,10	-0,41	-0,12	0,13	-0,26	0,01	0,09	0,33	0,13	-0,25	-0,28	-0,08	0,23	-0,22	0,13	0,66	0,34		0,00	0,00	0,00	0,02	0,02	0,00	0,00	0,00	rib	
man	-0,24	0,24	0,07	-0,10	0,04	0,06	-0,10	0,75	0,23	-0,44	0,38	0,25	0,28	-0,33	0,40	0,46	-0,13	-0,48	-0,32	-0,15	0,34	-0,29	0,15	0,58	0,85	0,59		0,12	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	man	
r/m	0,40	-0,04	-0,15	-0,04	-0,14	-0,12	-0,08	0,04	0,02	-0,09	-0,33	0,12	-0,46	0,36	-0,13	0,04	0,15	0,02	-0,12	0,08	0,01	-0,06	0,04	0,27	-0,32	0,63	-0,21		0,00	0,07	0,03	0,90	0,00	0,79	r/m	
r/m+a	0,34	-0,09	-0,24	0,00	-0,21	-0,24	-0,12	-0,05	-0,08	-0,07	-0,43	-0,05	-0,51	0,31	-0,30	-0,04	0,30	0,16	-0,08	0,12	-0,06	-0,01	0,00	0,13	-0,49	0,54	-0,28	0,95		0,01	0,00	0,45	0,00	0,60	r/m+a	
glu	-0,02	0,15	0,30	0,12	0,29	0,10	0,20	0,55	0,54	-0,15	0,64	0,65	0,38	-0,12	0,76	0,41	-0,58	-0,44	-0,20	-0,08	0,49	-0,20	-0,11	0,64	0,84	0,32	0,76	-0,24	-0,36		0,00	0,00	0,42	0,00	glu	
gal	-0,01	0,30	0,21	-0,05	0,17	0,19	0,03	0,65	0,46	-0,21	0,56	0,62	0,32	-0,22	0,67	0,45	-0,48	-0,56	-0,34	-0,13	0,39	-0,26	0,07	0,56	0,96	0,31	0,79	-0,29	-0,47	0,85		0,00	0,41	0,00	gal	
fru	-0,29	-0,31	0,31	-0,02	0,26	0,27	0,20	0,61	0,29	-0,33	0,30	0,42	0,13	0,24	0,59	0,46	-0,38	0,11	0,23	-0,15	0,19	0,22	-0,32	0,68	0,52	0,50	0,61	0,02	-0,10	0,76	0,56		0,32	0,00	fru	
suc	-0,36	-0,08	-0,43	-0,35	-0,47	-0,20	-0,46	0,38	-0,31	-0,50	-0,46	-0,47	-0,37	-0,20	-0,47	0,20	0,71	0,10	-0,15	-0,17	-0,11	-0,09	0,21	0,20	-0,07	0,70	0,38	0,40	0,49	-0,11	-0,11	0,13		0,00	suc	
Tsug	-0,21	0,21	-0,03	-0,27	-0,09	0,08	-0,22	0,81	0,23	-0,50	0,25	0,26	0,12	-0,28	0,35	0,51	-0,03	-0,49	-0,40	-0,19	0,32	-0,29	0,17	0,62	0,78	0,72	0,91									

	Alt	TSW	Chla	Chlb	a+b	a/b	car	Erg	Chit	Ch/E	Arg	Taa	%Arg	NH4	N	C	C/N	Gyr	Amax	Pc15	Ps15	Φ15	DR15	inos	arab	rib	man	r/m	r/m+a	glu	gal	fru	suc	Tsug	
Alt		0,04	0,39	0,58	0,39	0,43	0,40	0,00	0,24	0,40	0,00	0,00	0,00	0,56	0,46	0,11	0,03	0,00	0,52	0,50	0,51	0,91	0,26	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	Alt
TSW	0,53		0,84	0,45	0,99	0,46	0,53	0,21	0,63	0,20	0,56	0,68	0,38	0,03	0,21	0,32	0,69	0,05	0,12	0,28	0,17	0,02	0,02	0,00	0,06	0,07	0,03	0,24	0,12	0,02	0,09	0,28	0,47	0,16	TSW
Chla	0,23	-0,06		0,05	0,00	0,00	0,00	0,15	0,30	0,79	0,88	0,85	0,38	0,58	0,46	0,49	0,03	0,28	0,17	0,34	0,04	0,03	0,74	0,11	0,26	0,18	0,36	0,02	0,35	0,13	0,28	0,35	0,22	Chla	
Chlb	0,15	0,2	0,5		0,00	0,65	0,26	0,40	0,37	0,12	0,92	0,73	0,68	0,49	0,42	0,86	0,22	0,36	0,36	0,53	0,70	0,90	0,96	0,30	0,49	0,37	0,64	0,15	0,52	0,35	0,40	0,66	0,48	Chlb	
a+b	0,23	0	0,98	0,68		0,01	0,01	0,15	0,52	0,87	0,92	0,80	0,40	0,51	0,40	0,53	0,03	0,25	0,15	0,33	0,07	0,07	0,79	0,11	0,26	0,17	0,37	0,02	0,34	0,13	0,25	0,37	0,23	a+b	
a/b	0,21	-0,2	0,79	-0,12	0,63		0,06	0,21	0,05	0,21	0,66	0,85	0,36	0,90	0,86	0,41	0,09	0,62	0,39	0,55	0,05	0,01	0,69	0,21	0,32	0,29	0,35	0,10	0,43	0,21	0,61	0,33	0,27	a/b	
car	-0,23	-0,17	0,67	0,3	0,65	0,47		0,58	0,40	0,21	0,14	0,10	0,31	0,40	0,16	0,42	0,95	0,10	0,11	0,24	0,07	0,07	0,77	0,77	0,47	0,69	0,33	0,74	0,49	0,67	0,04	0,34	0,47	car	
Erg	-0,94	-0,33	-0,38	-0,23	-0,38	-0,33	0,15		0,09	0,64	0,00	0,00	0,00	0,86	0,19	0,01	0,00	0,07	0,93	0,20	0,24	0,58	0,70	0,53	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	0,00	0,00	Erg
Chit	-0,31	0,13	-0,28	0,24	-0,17	-0,49	-0,22	0,43		0,00	0,36	0,51	0,16	0,92	0,60	0,25	0,13	0,86	0,07	0,19	0,26	0,10	0,11	0,68	0,11	0,16	0,17	0,17	0,06	0,26	0,11	0,93	0,15	0,13	Chit
Ch/E	0,23	0,34	-0,07	0,4	0	-0,33	-0,33	-0,13	0,84		0,39	0,36	0,52	0,99	0,85	0,87	0,91	0,21	0,05	0,52	0,60	0,15	0,04	0,40	0,65	0,49	0,55	0,49	0,98	0,42	0,63	0,17	0,56	0,55	Ch/E
Arg	0,78	0,16	0	-0,03	0	0,12	-0,38	-0,83	-0,25	0,23		0,00	0,00	0,06	0,00	0,00	0,00	0,01	0,27	0,32	0,22	0,86	0,35	0,81	0,01	0,00	0,01	0,00	0,08	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	Arg
Taa	0,7	0,11	-0,05	-0,09	-0,07	0,05	-0,42	-0,74	-0,18	0,25	0,99		0,00	0,02	0,00	0,00	0,01	0,00	0,17	0,40	0,25	0,96	0,29	0,68	0,03	0,00	0,03	0,00	0,24	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00	Taa
%Arg	0,89	0,24	0,23	0,11	0,23	0,25	-0,27	-0,96	-0,37	0,18	0,95	0,9		0,27	0,02	0,00	0,00	0,02	0,66	0,22	0,19	0,66	0,53	0,91	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	%Arg
NH4	-0,16	-0,54	-0,15	-0,19	-0,18	-0,03	-0,23	-0,05	-0,03	0	0,49	0,57	0,29		0,00	0,00	0,09	0,91	0,69	0,41	0,26	0,47	0,69	0,00	0,34	0,74	0,22	0,49	0,16	0,28	0,59	0,16	0,21	0,88	NH4
N	-0,2	0,33	0,2	0,22	0,22	0,05	0,37	0,35	0,14	-0,05	-0,74	-0,8	-0,58	-0,89		0,00	0,07	0,31	0,32	0,29	0,12	0,43	0,89	0,02	0,81	0,35	0,96	0,05	0,68	0,79	0,53	0,01	0,01	0,18	N
C	-0,42	0,26	-0,19	-0,05	-0,17	-0,22	0,22	0,64	0,31	-0,05	-0,84	-0,84	-0,78	-0,79	0,87		0,00	0,51	0,97	0,11	0,08	0,27	0,75	0,02	0,15	0,05	0,26	0,00	0,32	0,25	0,06	0,03	0,00	0,01	C
C/N	-0,53	0,11	-0,55	-0,32	-0,55	-0,44	-0,02	0,76	0,39	-0,03	-0,69	-0,62	-0,77	-0,44	0,46	0,84		0,92	0,25	0,12	0,21	0,30	0,49	0,12	0,01	0,01	0,04	0,00	0,01	0,07	0,01	0,30	0,00	0,00	C/N
Gyr	-0,69	-0,51	0,29	0,24	0,31	0,14	0,43	0,47	-0,05	-0,33	-0,66	-0,68	-0,57	0,03	0,27	0,18	0		0,01	0,51	0,75	0,18	0,02	0,02	0,07	0,01	0,03	0,01	0,48	0,00	0,06	0,00	0,04	0,03	Gyr
Amax	-0,17	-0,41	0,75	0,25	0,7	0,67	0,76	-0,02	-0,47	-0,5	-0,29	-0,36	-0,12	-0,11	0,27	-0,01	-0,31	0,62		0,04	0,13	0,00	0,00	0,26	0,84	0,74	0,94	0,64	0,30	0,59	0,91	0,01	0,74	0,85	Amax
Pc15	-0,19	0,3	-0,38	-0,25	-0,39	-0,24	-0,43	0,35	0,35	0,18	-0,28	-0,23	-0,34	-0,23	0,29	0,43	0,42	-0,19	-0,54		0,00	0,01	0,28	0,29	0,33	0,36	0,46	0,26	0,25	0,58	0,29	0,98	0,18	0,26	Pc15
Ps15	-0,19	0,37	-0,26	-0,18	-0,27	-0,17	-0,32	0,32	0,31	0,15	-0,34	-0,32	-0,36	-0,31	0,42	0,46	0,34	-0,09	-0,41	0,96		0,00	0,27	0,29	0,42	0,38	0,54	0,24	0,42	0,61	0,35	0,68	0,17	0,28	Ps15
Φ15	-0,03	-0,56	0,51	0,1	0,46	0,51	0,47	-0,15	-0,43	-0,37	0,05	0,01	0,12	0,2	-0,21	-0,29	-0,28	0,35	0,71	-0,66	-0,72		0,00	0,15	0,76	0,88	0,95	0,75	0,50	0,85	0,71	0,43	0,59	0,71	Φ15
DR15	0,3	0,56	-0,54	-0,03	-0,46	-0,6	-0,46	-0,11	0,42	0,52	0,25	0,28	0,17	-0,11	-0,04	0,09	0,19	-0,58	-0,81	0,3	0,3	-0,83		0,09	0,62	0,41	0,44	0,46	0,89	0,26	0,61	0,05	0,62	0,54	DR15
inos	-0,47	-0,72	0,09	-0,01	0,07	0,11	0,08	0,17	-0,11	-0,23	0,06	0,11	-0,03	0,84	-0,58	-0,58	-0,4	0,57	0,3	-0,29	-0,29	0,38	-0,44		0,11	0,16	0,04	0,61	0,18	0,02	0,20	0,48	0,92	0,40	inos
arab	0,96	0,48	0,41	0,27	0,42	0,33	-0,08	-0,95	-0,41	0,12	0,66	0,55	0,84	-0,25	-0,07	-0,38	-0,61	-0,46	0,05	-0,27	-0,22	0,08	0,13	-0,42		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10	0,00	0,00	arab
rib	0,99	0,46	0,3	0,19	0,3	0,27	-0,19	-0,98	-0,37	0,19	0,8	0,72	0,93	-0,09	-0,25	-0,5	-0,63	-0,61	-0,09	-0,26	-0,24	0,04	0,22	-0,37	0,97		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	rib
man	0,97	0,55	0,35	0,24	0,36	0,28	-0,11	-0,92	-0,36	0,16	0,64	0,53	0,81	-0,32	-0,01	-0,3	-0,51	-0,55	-0,02	-0,21	-0,17	0,02	0,21	-0,52	0,99	0,97		0,00	0,00	0,07	0,00	0,00	0,00	man	
r/m	0,94	0,31	0,24	0,13	0,24	0,25	-0,26	-0,98	-0,36	0,19	0,93	0,87	0,99	0,19	-0,49	-0,71	-0,73	-0,6	-0,13	-0,31	-0,32	0,09	0,2	-0,14	0,89	0,96	0,87		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	r/m
r/m+a	-0,82	-0,41	-0,56	-0,38	-0,57	-0,42	-0,09	0,87	0,47	-0,01	-0,45	-0,31	-0,69	0,37	-0,11	0,27	0,6	0,19	-0,28	0,32	0,23	-0,18	0,04	0,36	-0,95	-0,86	-0,93	-0,74		0,00	0,00	0,62	0,00	0,00	r/m+a
glu	0,99	0,58	0,25	0,17	0,25	0,21	-0,19	-0,91	-0,3	0,22	0,69	0,6	0,83	-0,29	-0,07	-0,3	-0,46	-0,67	-0,15	-0,16	-0,14	-0,05	0,3	-0,57	0,96	0,97	0,99	0,88	-0,85		0,00	0,02	0,00	0,00	glu
gal	0,97	0,44	0,39	0,25	0,4	0,33	-0,11	-0,98	-0,42	0,13	0,73	0,63	0,89	-0,15	-0,17	-0,48	-0,66	-0,49	0,03	-0,29	-0,26	0,1	0,14	-0,34	0,99	0,99	0,98	0,93	-0,93	0,96		0,05	0,00	0,00	gal
fru	0,66	0,29	-0,29	-0,23	-0,3	-0,14	-0,52	-0,56	0,02	0,36	0,87	0,91	0,73	0,37	-0,64	-0,54	-0,28	-0,9	-0,62	0,01	-0,12	-0,21	0,51	-0,19	0,43	0,62	0,47	0,72	-0,14	0,59	0,49		0,00	0,01	fru
suc	0,86	0,19	0,25	0,12	0,24	0,26	-0,26	-0,95	-0,38	0,16	0,95	0,9	1	0,33	-0,6	-0,82	-0,8	-0,52	-0,09	-0,36	-0,38	0,15	0,13	0,03	0,82	0,91	0,78	0,99	-0,68	0,79	0,88	0,71		0,00	suc
Tsug	0,96	0,37	0,32	0,19	0,32	0,29	-0,19	-1	-0,4	0,16	0,85	0,77	0,97	0,04	-0,36	-0,62	-0,72	-0,55	-0,05	-0,31	-0,3	0,1	0,17	-0,22	0,95	0,99	0,93	0,99	-0,84	0,93	0,98	0,62	0,96		Tsug

Fig. 3a.15: Matriz de correlación para el primer transect

	Alt	TSW	Chla	Chlb	a+b	a/b	car	Erg	Chit	Ch/E	Arg	Taa	%Arg	NH4	N	C	C/N	Gyr	Amax	Pc15	Ps15	Φ15	DR15	inos	arab	rib	man	r/m	r/m+a	glu	gal	fru	suc	Tsug	
Alt		0,01	0,08	0,22	0,08	0,94	0,04	0,01	0,03	0,00	0,00	0,00	0,39	0,00	0,07	0,37	0,00	0,15	0,62	0,08	0,32	0,86	0,02	0,78	0,00	0,00	0,58	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,70	Alt
TSW	0,58		0,24	0,16	0,14	0,95	0,52	0,12	0,03	0,01	0,01	0,00	0,68	0,01	0,04	0,75	0,01	0,18	0,94	0,32	0,35	0,75	0,17	0,21	0,01	0,05	0,21	0,02	0,01	0,00	0,00	0,04	0,00	0,24	TSW
Chla	-0,4	-0,27		0,03	0,00	0,21	0,39	0,06	0,69	0,77	0,92	0,83	0,88	0,82	0,18	0,01	0,49	0,98	0,04	0,66	0,17	0,79	0,02	0,09	0,76	0,02	0,55	0,06	0,11	0,66	0,73	0,06	0,30	0,20	Chla
Chlb	-0,29	-0,33	0,5		0,00	0,01	0,12	0,87	0,22	0,40	0,42	0,25	0,63	0,19	0,39	0,88	0,21	0,68	0,20	0,15	0,03	0,73	0,00	0,78	0,34	0,22	0,93	0,27	0,20	0,25	0,26	0,67	0,18	0,90	Chlb
a+b	-0,4	-0,34	0,89	0,84		0,61	0,16	0,22	0,70	0,53	0,72	0,47	0,88	0,41	0,71	0,10	0,84	0,84	0,05	0,39	0,07	0,95	0,00	0,36	0,49	0,03	0,67	0,07	0,09	0,38	0,42	0,16	0,17	0,38	a+b
a/b	-0,02	0,01	0,29	-0,59	-0,12		0,12	0,41	0,05	0,38	0,57	0,45	0,09	0,49	0,11	0,38	0,09	0,26	0,42	0,18	0,32	0,34	0,60	0,19	0,58	0,90	0,84	0,84	0,66	0,58	0,48	0,44	0,48	0,86	a/b
car	0,5	0,17	0,22	0,4	0,36	-0,39		0,93	0,94	0,94	0,28	0,18	0,08	0,04	0,41	0,46	0,33	0,42	0,86	0,97	0,64	0,32	0,53	0,96	0,30	0,37	0,78	0,51	0,28	0,11	0,23	0,63	0,19	0,64	car
Erg	-0,6	-0,36	0,42	0,04	0,29	0,2	0,02		0,29	0,00	0,02	0,03	0,92	0,52	0,76	0,05	0,44	0,01	0,09	0,21	1,00	0,88	0,32	0,58	0,01	0,00	0,02	0,00	0,00	0,03	0,01	0,00	0,00	0,47	Erg
Chit	0,49	0,48	0,09	-0,29	-0,09	0,44	0,02	-0,25		0,00	0,00	0,00	0,03	0,01	0,00	0,49	0,00	0,94	0,10	0,00	0,09	0,30	0,10	0,00	0,00	0,02	0,08	0,00	0,00	0,00	0,00	0,15	0,00	0,26	Chit
Ch/E	0,62	0,55	-0,07	-0,2	-0,15	0,21	0,02	-0,69	0,85		0,00	0,00	0,25	0,02	0,00	0,80	0,00	0,07	0,03	0,03	0,47	0,43	0,28	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,04	Ch/E	
Arg	0,69	0,57	0,02	-0,19	-0,08	0,13	0,28	-0,52	0,65	0,83		0,00	0,34	0,00	0,00	0,06	0,00	0,00	0,04	0,25	0,82	0,74	0,58	0,00	0,00	0,08	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	Arg
Taa	0,81	0,61	-0,05	-0,27	-0,17	0,18	0,34	-0,5	0,74	0,84	0,97		0,56	0,00	0,00	0,20	0,00	0,01	0,08	0,08	0,68	0,76	0,17	0,00	0,00	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	Taa	
%Arg	-0,21	-0,1	0,04	-0,11	-0,04	0,39	-0,44	-0,02	0,49	0,27	-0,22	-0,14		0,15	0,82	0,13	0,85	0,00	0,63	0,04	0,08	0,37	0,22	0,83	0,58	0,28	0,84	0,33	0,47	0,34	0,69	0,67	0,76	0,08	%Arg
NH4	-0,82	-0,56	0,05	0,31	0,2	-0,16	-0,49	0,15	-0,58	-0,52	-0,79	-0,88	0,33		0,00	0,15	0,00	0,15	0,55	0,07	0,35	0,89	0,02	0,10	0,00	0,03	0,42	0,02	0,00	0,00	0,00	0,11	0,00	0,10	NH4
N	0,41	0,46	0,31	-0,21	0,09	0,36	0,22	-0,07	0,74	0,68	0,87	0,85	-0,06	-0,75		0,00	0,00	0,06	0,01	0,14	0,96	0,39	0,82	0,00	0,00	0,61	0,00	0,17	0,04	0,00	0,00	0,28	0,00	0,00	N
C	-0,21	0,08	0,57	0,04	0,38	0,21	0,19	0,44	0,16	0,06	0,42	0,3	-0,35	-0,33	0,71		0,03	0,08	0,31	0,08	0,04	0,70	0,00	0,00	0,21	0,01	0,04	0,07	0,21	0,27	0,26	0,22	0,81	0,00	C
C/N	-0,61	-0,54	-0,16	0,29	0,05	-0,39	-0,25	0,18	-0,85	-0,76	-0,87	-0,92	-0,05	0,85	-0,95	-0,48		0,20	0,05	0,01	0,35	0,46	0,14	0,00	0,00	0,09	0,02	0,02	0,00	0,00	0,00	0,12	0,00	0,01	C/N
Gyr	-0,33	-0,31	0,01	-0,1	-0,05	0,26	-0,21	0,54	0,02	-0,41	-0,7	-0,54	0,65	0,34	-0,42	-0,4	0,3		0,15	0,41	0,08	0,91	0,22	0,02	0,00	0,95	0,00	0,32	0,29	0,01	0,01	0,00	0,15	0,00	Gyr
Amax	0,13	0,02	0,52	0,34	0,5	0,22	0,05	-0,44	0,43	0,54	0,52	0,45	0,13	-0,16	0,61	0,27	-0,5	-0,38		0,08	0,78	0,16	0,13	0,02	0,07	0,70	0,04	0,29	0,28	0,14	0,09	0,18	0,20	0,08	Amax
Pc15	-0,46	-0,27	0,12	0,38	0,23	-0,36	0,01	0,33	-0,72	-0,55	-0,3	-0,46	-0,51	0,46	-0,39	0,45	0,6	-0,22	-0,45		0,00	0,01	0,40	0,75	0,16	0,01	0,96	0,02	0,01	0,09	0,09	0,29	0,02	0,36	Pc15
Ps15	-0,26	-0,25	0,36	0,54	0,46	-0,27	0,14	0	-0,44	-0,19	0,06	-0,11	-0,45	0,25	-0,02	0,51	0,25	-0,46	0,08	0,82		0,00	0,31	0,41	0,96	0,09	0,22	0,24	0,22	0,67	0,72	0,94	0,28	0,05	Ps15
Φ15	-0,05	0,09	0,07	-0,09	0,02	0,26	-0,3	-0,04	0,28	0,21	0,09	0,08	0,24	0,04	0,23	0,1	-0,2	0,03	0,37	-0,65	-0,7		0,10	0,44	0,78	0,97	0,70	0,85	0,82	0,88	0,78	0,96	0,79	0,87	Φ15
DR15	0,58	0,36	-0,57	-0,71	-0,68	0,14	0,19	-0,26	0,43	0,29	0,15	0,36	0,33	-0,57	0,06	-0,73	-0,38	0,33	-0,4	-0,22	-0,27	-0,43		0,34	0,32	0,00	0,39	0,01	0,01	0,13	0,17	0,26	0,03	0,09	DR15
inos	0,07	0,29	0,39	-0,07	0,21	0,3	-0,01	-0,13	0,6	0,65	0,75	0,64	0,05	-0,37	0,88	0,75	-0,73	-0,52	0,57	-0,09	0,22	0,21	-0,25		0,00	0,57	0,00	0,50	0,32	0,01	0,00	0,31	0,08	0,00	inos
arab	0,75	0,6	-0,07	-0,22	-0,16	0,13	0,27	-0,6	0,7	0,88	0,99	0,98	-0,13	-0,78	0,82	0,29	-0,87	-0,64	0,47	-0,37	-0,02	0,08	0,27	0,7		0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	arab
rib	-0,85	-0,44	0,52	0,29	0,48	-0,03	-0,23	0,69	-0,53	-0,62	-0,4	-0,56	-0,26	0,48	-0,12	0,6	0,39	-0,01	-0,11	0,62	0,44	-0,01	-0,73	0,13	-0,53		0,99	0,00	0,01	0,01	0,00	0,00	0,26	rib	
man	0,13	0,29	0,14	0,02	0,1	0,05	-0,07	-0,51	0,4	0,7	0,74	0,58	-0,05	-0,19	0,64	0,47	-0,5	-0,75	0,52	0,01	0,32	0,1	-0,23	0,86	0,72	0		0,16	0,16	0,02	0,00	0,01	0,08	0,00	man
r/m	-0,85	-0,51	0,44	0,26	0,41	-0,05	-0,17	0,82	-0,63	-0,82	-0,62	-0,72	-0,23	0,51	-0,32	0,42	0,53	0,23	-0,28	0,58	0,31	-0,05	-0,6	-0,16	-0,74	0,94	-0,33		0,00	0,00	0,00	0,00	0,88	r/m	
r/m+a	-0,9	-0,56	0,37	0,3	0,39	-0,11	-0,28	0,74	-0,7	-0,84	-0,71	-0,82	-0,17	0,65	-0,45	0,29	0,66	0,25	-0,29	0,6	0,32	-0,06	-0,6	-0,23	-0,81	0,93	-0,33	0,98		0,00	0,00	0,00	0,67	r/m+a	
glu	0,86	0,62	-0,1	-0,27	-0,21	0,13	0,4	-0,5	0,67	0,79	0,95	0,99	-0,22	-0,91	0,8	0,26	-0,89	-0,55	0,39	-0,43	-0,12	0,04	0,39	0,55	0,96	-0,59	0,51	-0,73	-0,82		0,00	0,00	0,01	glu	
gal	0,8	0,61	-0,08	-0,26	-0,19	0,17	0,3	-0,55	0,75	0,88	0,97	0,99	-0,09	-0,83	0,83	0,27	-0,9	-0,55	0,44	-0,44	-0,1	0,08	0,36	0,65	0,99	-0,58	0,63	-0,76	-0,84	0,98		0,00	0,01	gal	
fru	0,72	0,46	-0,43	-0,1	-0,32	-0,18	0,13	-0,96	0,34	0,75	0,67	0,66	-0,1	-0,37	0,25	-0,29	-0,36	-0,63	0,35	-0,28	0,02	-0,01	0,3	0,24	0,75	-0,71	0,58	-0,86	-0,81	0,67	0,71		0,18	fru	
suc	-0,91	-0,61	0,24	0,31	0,32	-0,17	-0,33	0,63	-0,77	-0,87	-0,84	-0,93	-0,07	0,8	-0,65	0,06	0,82	0,33	-0,34	0,58	0,29	-0,07	-0,55	-0,4	-0,9	0,82	-0,4	0,91	0,97	-0,93	-0,94	-0,75		0,24	suc
Tsug	0,09	0,27	0,3	0,03	0,21	0,04	0,12	-0,17	0,26	0,46	0,75	0,58	-0,4	-0,38	0,75	0,8	-0,56	-0,81	0,45	0,24	0,49	0,04	-0,43	0,88	0,66	0,27	0,87	-0,04	-0,1	0,54	0,59	0,32	-0,28	Tsug	

Fig. 3a.16: Matriz de correlación para el segundo transecto de *Lasallia hispanica*. Los formatos y abreviaturas se explican en la p

	Alt	TSW	Chla	Chlb	a+b	a/b	car	Erg	Chit	Ch/E	Arg	Taa	%Arg	NH4	N	C	C/N	Gyr	Amax	Pc15	Ps15	Φ15	DR15	inos	arab	rib	man	r/m	r/m+a	glu	gal	fru	suc	Tsug	
Alt		0,53	0,00	0,02	0,00	0,17	0,00	0,33	0,31	0,27	0,32	0,08	0,00	0,00	0,54	0,22	0,28	0,05	0,44	0,52	0,94	0,93	0,50	0,00	0,33	0,07	0,11	0,22	0,22	0,00	0,59	0,06	0,64	0,00	Alt
TSW	0,2		0,36	0,93	0,49	0,30	0,31	0,02	0,49	0,27	0,06	0,14	0,07	0,82	0,02	0,05	0,01	0,28	0,01	0,03	0,41	0,08	0,15	0,78	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,93	0,02	0,02	0,04	0,86	TSW
Chla	-0,91	-0,29		0,03	0,00	0,07	0,00	0,18	0,56	0,25	0,64	0,27	0,00	0,00	0,13	0,17	0,09	0,18	0,73	0,96	0,45	0,65	0,53	0,00	0,18	0,03	0,05	0,12	0,12	0,00	0,34	0,03	0,99	0,00	Chla
Chlb	-0,65	0,03	0,62		0,00	0,32	0,01	0,55	0,12	0,23	0,50	0,27	0,08	0,02	0,90	0,33	0,63	0,14	0,59	0,39	0,85	0,57	0,33	0,02	0,55	0,27	0,32	0,45	0,45	0,03	0,75	0,26	0,74	0,04	Chlb
a+b	-0,91	-0,22	0,98	0,78		0,27	0,00	0,22	0,38	0,20	0,57	0,23	0,00	0,00	0,25	0,17	0,14	0,13	0,67	0,84	0,51	0,60	0,43	0,00	0,22	0,04	0,07	0,14	0,14	0,00	0,40	0,04	0,93	0,00	a+b
a/b	-0,42	-0,33	0,55	-0,31	0,35		0,45	0,42	0,46	0,92	0,99	0,75	0,17	0,21	0,06	0,62	0,18	0,85	0,95	0,48	0,51	0,93	0,83	0,21	0,42	0,28	0,30	0,37	0,37	0,23	0,52	0,27	0,82	0,28	a/b
car	-0,79	-0,32	0,88	0,75	0,92	0,24		0,23	0,39	0,19	0,73	0,37	0,01	0,01	0,17	0,33	0,16	0,25	0,85	0,98	0,77	0,53	0,35	0,00	0,23	0,06	0,09	0,16	0,16	0,01	0,38	0,06	0,94	0,02	car
Erg	-0,31	-0,68	0,41	0,19	0,38	0,26	0,38		0,61	0,00	0,00	0,02	0,00	0,71	0,00	0,00	0,00	0,07	0,38	0,12	0,20	0,44	0,71	0,65	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,87	0,00	0,00	0,00	0,82	Erg
Chit	0,32	-0,22	-0,19	-0,47	-0,28	0,24	-0,27	-0,17		0,02	0,91	0,74	0,34	0,34	0,92	0,95	0,93	0,50	0,09	0,33	0,95	0,54	0,73	0,33	0,61	0,46	0,49	0,56	0,56	0,35	0,70	0,46	0,95	0,39	Chit
Ch/E	0,34	0,35	-0,36	-0,38	-0,4	-0,03	-0,4	-0,84	0,67		0,03	0,12	0,01	0,55	0,05	0,04	0,01	0,28	0,80	0,62	0,39	0,90	0,98	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,67	0,00	0,00	0,01	0,92	Ch/E
Arg	0,32	-0,55	-0,15	-0,22	-0,18	0	-0,11	0,81	0,04	-0,62		0,00	0,34	0,11	0,02	0,03	0,01	0,00	0,16	0,04	0,22	0,48	0,97	0,13	0,00	0,03	0,02	0,00	0,00	0,07	0,00	0,03	0,00	0,02	Arg
Taa	0,52	-0,45	-0,35	-0,35	-0,38	-0,1	-0,29	0,66	0,11	-0,48	0,98		0,79	0,02	0,06	0,12	0,04	0,00	0,14	0,05	0,28	0,54	0,85	0,02	0,02	0,15	0,10	0,04	0,04	0,01	0,00	0,17	0,00	0,00	Taa
%Arg	-0,81	-0,54	0,82	0,52	0,8	0,42	0,72	0,81	-0,3	-0,73	0,3	0,09		0,01	0,03	0,00	0,00	0,95	0,95	0,61	0,42	0,60	0,51	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	0,01	0,00	0,13	0,08	%Arg
NH4	0,98	0,07	-0,87	-0,64	-0,87	-0,39	-0,75	-0,12	0,3	0,19	0,49	0,67	-0,68		0,88	0,47	0,61	0,01	0,32	0,33	0,87	0,95	0,53	0,00	0,71	0,23	0,32	0,54	0,54	0,00	0,96	0,22	0,29	0,00	NH4
N	0,2	0,68	-0,46	0,04	-0,36	-0,55	-0,42	-0,8	-0,03	0,58	-0,67	-0,56	-0,62	0,05		0,08	0,00	0,07	0,30	0,04	0,15	0,46	0,85	0,83	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,98	0,00	0,00	0,01	0,74	N
C	-0,38	-0,59	0,43	0,31	0,43	0,16	0,31	0,87	0,02	-0,61	0,63	0,47	0,77	-0,23	-0,53		0,00	0,24	0,38	0,22	0,12	0,21	0,34	0,43	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,60	0,00	0,00	0,01	0,85	C
C/N	-0,34	-0,72	0,52	0,15	0,46	0,42	0,43	0,95	0,03	-0,68	0,74	0,59	0,8	-0,16	-0,88	0,86		0,09	0,27	0,06	0,09	0,27	0,54	0,56	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,76	0,00	0,00	0,00	0,95	C/N
Gyr	0,58	-0,34	-0,42	-0,46	-0,46	-0,06	-0,36	0,55	0,22	-0,34	0,9	0,95	-0,02	0,71	-0,53	0,37	0,52		0,26	0,13	0,48	0,78	0,78	0,01	0,07	0,30	0,23	0,11	0,11	0,00	0,02	0,32	0,00	0,00	Gyr
Amax	0,25	-0,72	-0,11	-0,17	-0,14	-0,02	0,06	0,28	0,52	0,08	0,43	0,45	0,02	0,31	-0,33	0,28	0,34	0,35		0,01	0,37	0,01	0,10	0,34	0,38	0,57	0,52	0,43	0,43	0,29	0,30	0,59	0,19	0,24	Amax
Pc15	-0,21	0,62	-0,01	0,28	0,07	-0,23	-0,01	-0,47	-0,31	0,16	-0,6	-0,59	-0,16	-0,31	0,6	-0,39	-0,56	-0,47	-0,72		0,02	0,11	0,82	0,35	0,12	0,25	0,21	0,15	0,15	0,28	0,09	0,26	0,05	0,20	Pc15
Ps15	0,02	0,26	-0,24	-0,06	-0,21	-0,21	-0,09	-0,4	0,02	0,27	-0,38	-0,34	-0,26	-0,05	0,44	-0,47	-0,52	-0,22	-0,28	0,66		0,02	0,31	0,89	0,20	0,26	0,24	0,21	0,21	0,80	0,19	0,26	0,20	0,68	Ps15
Φ15	-0,03	-0,53	0,15	0,18	0,17	-0,03	0,2	0,25	0,19	-0,04	0,23	0,2	0,17	0,02	-0,23	0,39	0,35	0,09	0,69	-0,48	-0,66		0,00	0,97	0,44	0,48	0,47	0,45	0,45	0,91	0,43	0,48	0,45	0,84	Φ15
DR15	0,22	0,44	-0,2	-0,31	-0,25	0,07	-0,29	-0,12	-0,11	-0,01	0,01	0,06	-0,21	0,2	0,06	-0,3	-0,2	0,09	-0,5	0,07	0,32	-0,87		0,52	0,71	0,60	0,62	0,67	0,67	0,54	0,77	0,60	0,94	0,57	DR15
inos	0,99	0,09	-0,87	-0,65	-0,88	-0,39	-0,76	-0,15	0,31	0,21	0,47	0,65	-0,7	1	0,07	-0,25	-0,19	0,7	0,3	-0,29	-0,04	0,01	0,21		0,65	0,20	0,28	0,48	0,48	0,00	0,97	0,19	0,33	0,00	inos
arab	0,31	0,68	-0,41	-0,19	-0,38	-0,26	-0,38	-1	0,17	0,84	-0,81	-0,66	-0,81	0,12	0,8	-0,87	-0,95	-0,55	-0,28	0,47	0,4	-0,25	0,12	0,15		0,00	0,00	0,00	0,00	0,87	0,00	0,00	0,00	0,82	arab
rib	0,54	0,65	-0,61	-0,35	-0,59	-0,34	-0,55	-0,97	0,23	0,83	-0,63	-0,44	-0,93	0,37	0,76	-0,87	-0,93	-0,33	-0,18	0,36	0,36	-0,23	0,17	0,4	0,97		0,00	0,00	0,00	0,33	0,00	0,00	0,01	0,56	rib
man	0,49	0,66	-0,57	-0,31	-0,54	-0,32	-0,51	-0,98	0,22	0,84	-0,67	-0,49	-0,91	0,32	0,77	-0,87	-0,94	-0,38	-0,2	0,39	0,37	-0,23	0,16	0,34	0,98	1		0,00	0,00	0,43	0,00	0,00	0,00	0,69	man
r/m	-0,38	-0,67	0,48	0,24	0,45	0,29	0,43	1	-0,19	-0,84	0,76	0,59	0,85	-0,2	-0,79	0,87	0,95	0,48	0,25	-0,44	-0,39	0,24	-0,14	-0,22	-1	-0,98	-0,99		0,00	0,68	0,00	0,00	0,00	0,98	r/m
r/m+a	-0,38	-0,67	0,48	0,24	0,45	0,29	0,43	1	-0,19	-0,84	0,76	0,59	0,85	-0,2	-0,79	0,87	0,95	0,48	0,25	-0,44	-0,39	0,24	-0,14	-0,22	-1	-0,98	-0,99	1		0,68	0,00	0,00	0,00	0,98	r/m+a
glu	-0,97	-0,03	0,84	0,63	0,85	0,37	0,73	0,05	-0,29	-0,14	-0,55	-0,72	0,63	-1	0,01	0,17	0,1	-0,75	-0,33	0,34	0,08	-0,04	-0,2	-1	-0,05	-0,31	-0,25	0,13	0,13		0,80	0,31	0,20	0,00	glu
gal	0,17	0,67	-0,3	-0,1	-0,27	-0,21	-0,28	-0,99	0,13	0,82	-0,88	-0,75	-0,72	-0,01	0,8	-0,84	-0,94	-0,65	-0,33	0,52	0,41	-0,25	0,1	0,01	0,99	0,92	0,94	-0,98	-0,98	0,08		0,00	0,00	0,52	gal
fru	-0,55	-0,65	0,62	0,35	0,6	0,35	0,56	0,96	-0,24	-0,83	0,62	0,43	0,94	-0,39	-0,76	0,87	0,93	0,31	0,17	-0,35	-0,35	0,22	-0,17	-0,41	-0,96	-1	-1	0,98	0,98	0,32	-0,92		0,01	0,53	fru
suc	0,15	-0,61	0	-0,11	-0,03	0,07	0,02	0,9	-0,02	-0,71	0,99	0,92	0,46	0,33	-0,74	0,72	0,83	0,84	0,41	-0,58	-0,4	0,24	-0,02	0,31	-0,9	-0,75	-0,79	0,86	0,86	-0,4	-0,95	0,74		0,09	suc
Tsug	0,93	-0,06	-0,79	-0,61	-0,8	-0,34	-0,68	0,07	0,27	0,03	0,65	0,8	-0,53	0,98	-0,11	-0,06	0,02	0,82	0,37	-0,4	-0,13	0,07	0,18	0,98	-0,07	0,19	0,13	-0,01	-0,01	-0,99	-0,21	-0,2	0,51		Tsug

	Alt	TSW	Chla	Chlb	a+b	a/b	car	Erg	Chit	Ch/E	Arg	Taa	%Arg	NH4	N	C	C/N	Gyr	Amax	Pc15	Ps15	Φ15	DR15	inos	arab	rib	man	r/m	r/m+a	glu	gal	fru	suc	Tsug	
Alt		0,98	0,10	0,00	0,01	0,33	0,00	0,61	0,95	0,70	0,63	0,20	0,22	0,02	0,71	0,12	0,21	0,00	0,32	0,47	0,48	0,11	0,99	0,93	0,13	0,61	0,17	0,01	0,00	0,38	0,08	0,21	0,04	0,13	Alt
TSW	-0,01		0,07	0,45	0,16	0,17	0,22	0,01	0,03	0,82	0,07	0,05	0,99	0,01	0,00	0,01	0,01	0,02	0,14	0,14	1,00	0,16	0,09	0,00	0,01	0,00	0,01	0,71	0,71	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00	TSW
Chla	0,38	-0,41		0,90	0,00	0,00	0,00	0,13	0,41	0,72	0,29	0,25	0,91	0,02	0,08	0,20	0,09	0,00	0,50	0,13	0,60	0,65	0,80	0,07	0,26	0,04	0,22	0,31	0,58	0,28	0,41	0,52	0,29	0,24	Chla
Chlb	0,7	0,18	0,03		0,15	0,00	0,01	0,02	0,25	0,37	0,44	0,71	0,10	0,84	0,21	0,00	0,82	0,43	0,01	0,12	0,32	0,07	0,78	0,11	0,00	0,32	0,00	0,01	0,00	0,04	0,00	0,02	0,00	0,00	Chlb
a+b	0,57	-0,33	0,95	0,34		0,08	0,00	0,49	0,67	0,94	0,46	0,23	0,55	0,02	0,23	0,78	0,14	0,00	0,93	0,32	0,83	0,91	0,88	0,23	0,91	0,12	0,78	0,09	0,12	0,69	0,92	0,96	0,96	0,82	a+b
a/b	-0,23	-0,32	0,66	-0,71	0,4		0,67	0,00	0,23	0,28	0,14	0,68	0,18	0,20	0,04	0,00	0,21	0,15	0,02	0,06	0,28	0,14	0,48	0,03	0,00	0,07	0,00	0,21	0,03	0,04	0,01	0,05	0,00	0,00	a/b
car	0,78	-0,28	0,79	0,58	0,92	0,1		0,84	0,99	0,97	0,53	0,17	0,32	0,01	0,33	0,70	0,13	0,00	0,51	0,50	0,74	0,34	0,87	0,38	0,56	0,17	0,71	0,01	0,01	0,96	0,44	0,59	0,49	0,67	car
Erg	-0,12	-0,55	0,35	-0,53	0,16	0,62	0,05		0,06	0,08	0,00	0,17	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,06	0,05	0,16	0,60	0,50	0,32	0,00	0,00	0,01	0,00	0,07	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	Erg
Chit	-0,01	-0,49	0,2	-0,27	0,1	0,28	0	0,43		0,00	0,08	0,00	0,23	0,00	0,00	0,05	0,00	0,11	0,96	0,31	0,37	0,62	0,02	0,00	0,00	0,00	0,01	0,34	0,94	0,00	0,00	0,00	0,11	0,00	Chit
Ch/E	0,09	-0,05	-0,09	0,21	-0,02	-0,26	-0,01	-0,4	0,64		0,32	0,03	0,00	0,65	0,53	0,24	0,34	0,99	0,13	0,92	0,15	0,78	0,00	0,40	0,90	0,33	0,29	0,01	0,03	0,20	0,50	0,26	0,10	0,91	Ch/E
Arg	0,12	-0,42	0,25	-0,18	0,18	0,34	0,15	0,82	0,4	-0,23		0,01	0,04	0,00	0,00	0,10	0,00	0,08	0,34	0,70	0,84	0,52	0,34	0,02	0,02	0,08	0,00	0,29	0,33	0,02	0,05	0,00	0,01	0,01	Arg
Taa	0,3	-0,45	0,27	0,09	0,28	0,1	0,32	0,32	0,69	0,48	0,56		0,03	0,00	0,00	0,53	0,00	0,01	0,26	0,86	0,03	0,07	0,38	0,00	0,08	0,00	0,09	0,01	0,05	0,00	0,01	0,00	0,44	0,02	Taa
%Arg	-0,29	0	-0,03	-0,38	-0,14	0,31	-0,23	0,58	-0,28	-0,76	0,45	-0,48		0,60	0,78	0,15	0,54	0,44	0,01	0,42	0,03	0,16	0,05	0,38	0,42	0,14	0,06	0,00	0,00	0,35	0,94	0,74	0,03	0,52	%Arg
NH4	0,53	-0,55	0,52	0,05	0,5	0,3	0,54	0,63	0,61	0,11	0,72	0,83	-0,13		0,00	0,08	0,00	0,00	0,94	0,65	0,25	0,24	0,96	0,00	0,02	0,00	0,01	0,09	0,28	0,00	0,02	0,00	0,11	0,01	NH4
N	0,09	-0,64	0,4	-0,3	0,28	0,46	0,23	0,76	0,76	0,15	0,75	0,84	-0,07	0,89		0,00	0,00	0,00	0,79	0,39	0,24	0,57	0,79	0,00	0,00	0,00	0,00	0,44	0,91	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	N
C	-0,36	-0,55	0,3	-0,71	0,07	0,66	-0,09	0,82	0,45	-0,28	0,38	0,15	0,33	0,4	0,63		0,11	0,15	0,07	0,06	0,59	0,14	0,72	0,00	0,00	0,00	0,00	0,18	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	C
C/N	-0,3	0,56	-0,38	0,05	-0,35	-0,3	-0,35	-0,63	-0,7	-0,23	-0,8	-0,93	0,14	-0,94	-0,95	-0,37		0,00	0,85	0,76	0,14	0,22	0,76	0,00	0,01	0,00	0,00	0,18	0,43	0,00	0,00	0,00	0,07	0,00	C/N
Gyr	-0,66	0,53	-0,73	-0,19	-0,74	-0,33	-0,78	-0,43	-0,37	0	-0,41	-0,56	0,18	-0,84	-0,63	-0,33	0,66		0,96	0,36	0,33	0,67	0,92	0,00	0,14	0,00	0,13	0,03	0,14	0,07	0,23	0,21	0,36	0,12	Gyr
Amax	-0,23	-0,34	0,16	-0,56	-0,02	0,53	-0,16	0,44	0,01	-0,35	0,22	-0,27	0,55	-0,02	0,06	0,41	0,05	0,01		0,01	0,00	0,01	0,98	0,82	0,18	0,91	0,09	0,02	0,01	0,92	0,46	0,81	0,05	0,25	Amax
Pc15	0,18	0,36	-0,37	0,38	-0,25	-0,45	-0,17	-0,35	-0,25	0,03	-0,1	0,05	-0,2	-0,12	-0,21	-0,45	0,08	0,23	-0,6		0,00	0,15	0,42	0,24	0,10	0,30	0,12	0,44	0,19	0,31	0,16	0,40	0,09	0,13	Pc15
Ps15	0,17	0	-0,13	0,24	-0,05	-0,26	0,08	-0,13	0,22	0,35	0,05	0,5	-0,49	0,28	0,29	-0,13	-0,36	-0,24	-0,73	0,85		0,07	0,85	0,28	0,98	0,20	0,82	0,04	0,06	0,22	0,55	0,26	0,57	0,77	Ps15
Φ15	-0,37	-0,33	0,11	-0,42	-0,03	0,34	-0,23	0,16	0,12	-0,07	-0,15	-0,41	0,33	-0,27	-0,13	0,34	0,29	0,1	0,58	-0,35	-0,43		0,03	0,84	0,32	0,66	0,41	0,06	0,02	0,86	0,55	0,83	0,21	0,51	Φ15
DR15	0	0,38	0,06	-0,07	0,04	0,17	0,04	0,23	-0,51	-0,7	0,22	-0,21	0,45	-0,01	-0,06	0,09	0,07	0,02	0,01	0,2	-0,05	-0,48		0,57	0,87	0,53	0,60	0,17	0,36	0,44	0,56	0,55	0,46	0,94	DR15
inos	0,02	-0,65	0,42	-0,37	0,28	0,49	0,21	0,67	0,77	0,2	0,52	0,76	-0,21	0,81	0,94	0,74	-0,83	-0,64	0,05	-0,29	0,26	-0,05	-0,14		0,00	0,00	0,00	0,24	0,94	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	inos
arab	-0,35	-0,58	0,26	-0,71	0,03	0,66	-0,14	0,82	0,68	-0,03	0,5	0,4	0,19	0,52	0,79	0,93	-0,58	-0,34	0,31	-0,4	0,01	0,23	-0,04	0,85		0,00	0,00	0,33	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	arab
rib	0,12	-0,64	0,46	-0,24	0,36	0,41	0,32	0,55	0,69	0,23	0,4	0,77	-0,34	0,8	0,88	0,65	-0,78	-0,69	-0,03	-0,26	0,31	-0,11	-0,15	0,97	0,73		0,00	0,05	0,49	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	rib
man	-0,32	-0,59	0,29	-0,66	0,07	0,65	-0,09	0,95	0,54	-0,25	0,72	0,39	0,42	0,57	0,81	0,9	-0,63	-0,35	0,39	-0,38	-0,05	0,19	0,13	0,78	0,93	0,66		0,12	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	man
r/m	0,6	-0,09	0,24	0,55	0,39	-0,3	0,54	-0,42	0,23	0,59	-0,25	0,57	-0,91	0,39	0,18	-0,31	-0,31	-0,48	-0,51	0,19	0,48	-0,42	-0,32	0,28	-0,23	0,45	-0,36		0,00	0,43	0,76	0,93	0,05	0,50	r/m
r/m+a	0,68	0,09	0,13	0,75	0,36	-0,48	0,55	-0,56	-0,02	0,49	-0,23	0,45	-0,8	0,25	-0,03	-0,6	-0,19	-0,34	-0,55	0,32	0,44	-0,51	-0,22	-0,02	-0,53	0,17	-0,58	0,93		0,68	0,10	0,38	0,00	0,05	r/m+a
glu	-0,21	-0,6	0,25	-0,47	0,09	0,46	-0,01	0,62	0,8	0,3	0,5	0,77	-0,22	0,67	0,92	0,69	-0,79	-0,42	0,02	-0,25	0,3	-0,04	-0,18	0,95	0,86	0,89	0,78	0,19	-0,1		0,00	0,00	0,00	0,00	glu
gal	-0,41	-0,57	0,19	-0,67	-0,02	0,57	-0,18	0,69	0,75	0,16	0,45	0,55	-0,02	0,51	0,82	0,83	-0,63	-0,28	0,17	-0,34	0,14	0,14	-0,14	0,89	0,96	0,78	0,86	-0,07	-0,38	0,95		0,00	0,00	0,00	gal
fru	-0,29	-0,55	0,15	-0,5	-0,01	0,45	-0,13	0,66	0,79	0,26	0,62	0,75	-0,08	0,62	0,9	0,62	-0,8	-0,29	0,06	-0,21	0,27	-0,05	-0,14	0,87	0,85	0,77	0,8	0,02	-0,21	0,97	0,93		0,00	0,00	fru
suc	-0,47	-0,54	0,25	-0,72	0,01	0,65	-0,16	0,88	0,37	-0,37	0,55	0,18	0,48	0,37	0,65	0,93	-0,42	-0,22	0,44	-0,41	-0,14	0,29	0,18	0,67	0,87	0,58	0,95	-0,44	-0,64	0,67	0,79	0,67		0,00	suc
Tsug	-0,35	-0,62	0,28	-0,66	0,06	0,63	-0,1	0,83	0,67	-0,03	0,58	0,51	0,15	0,58	0,86	0,9	-0,67	-0,36	0,27	-0,37	0,07	0,15	-0,02	0,89	0,97	0,8	0,96	-0,16	-0,44	0,92	0,97	0,9	0,9		Tsug



	Alt	TSW	Chla	Chlb	a+b	a/b	car	Erg	Chit	Ch/E	Arg	Taa	%Arg	NH4	N	C	C/N	Gyr	Amax	Pc15	Ps15	Φ15	DR15	inos	arab	rib	man	r/m	r/m+a	glu	gal	fru	suc	Tsug	
Alt		0,00	0,37	0,07	0,26	0,61	0,06	0,05	0,04	0,00	0,28	0,02	0,43	0,00	0,14	0,01	0,02	0,00	0,02	0,68	0,64	0,09	0,36	0,50	0,36	0,42	0,26	0,57	0,95	0,24	0,28	0,42	0,01	0,58	Alt
TSW	0,65		0,18	0,40	0,18	0,38	0,21	0,81	0,10	0,07	0,03	0,00	0,04	0,00	0,03	0,72	0,01	0,00	0,03	0,91	0,98	0,91	0,59	0,98	0,02	0,12	0,69	0,26	0,09	0,08	0,02	0,61	0,00	0,65	TSW
Chla	0,21	0,31		0,01	0,00	0,00	0,05	0,08	0,47	0,02	0,00	0,04	0,10	0,00	0,07	0,01	0,00	0,04	0,99	0,10	0,58	0,30	0,50	0,00	0,22	0,01	0,01	0,00	0,01	0,00	0,53	0,00	0,03	Chla	
Chlb	0,41	0,2	0,59		0,00	0,65	0,00	0,92	0,02	0,03	0,01	0,00	0,04	0,00	0,58	0,00	0,01	0,36	0,17	0,12	0,02	0,97	0,14	0,00	0,14	0,05	0,03	0,01	0,00	0,00	0,10	0,00	0,51	Chlb	
a+b	0,27	0,31	0,99	0,72		0,10	0,05	0,29	0,01	0,00	0,02	0,04	0,00	0,10	0,00	0,00	0,05	0,75	0,08	0,34	0,37	0,38	0,00	0,17	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,38	0,00	0,05	a+b	
a/b	-0,12	0,21	0,73	-0,11	0,61		0,04	0,01	0,95	0,31	0,45	0,39	0,36	0,62	0,43	0,04	0,66	0,32	0,10	0,12	0,68	0,15	0,19	0,55	0,10	0,76	0,16	0,23	0,13	0,89	0,13	0,48	0,42	0,04	a/b
car	0,43	0,3	0,89	0,75	0,93	0,46		0,55	0,02	0,06	0,01	0,00	0,02	0,01	0,00	0,48	0,00	0,00	0,04	0,98	0,05	0,18	0,30	0,49	0,00	0,16	0,06	0,04	0,01	0,01	0,00	0,47	0,00	0,33	car
Erg	-0,45	-0,06	0,44	0,02	0,38	0,54	0,14		0,41	0,16	0,98	0,44	0,92	0,43	0,10	0,00	0,43	0,90	0,79	0,90	0,78	0,16	0,54	0,16	0,01	0,66	0,00	0,06	0,04	0,42	0,02	0,39	0,79	0,00	Erg
Chit	0,45	0,38	0,4	0,52	0,45	0,01	0,5	0,2		0,00	0,05	0,00	0,21	0,00	0,00	0,60	0,00	0,00	0,30	0,65	0,16	0,36	0,23	0,01	0,00	0,13	0,04	0,03	0,02	0,00	0,00	0,05	0,00	0,14	Chit
Ch/E	0,7	0,41	0,17	0,48	0,25	-0,24	0,43	-0,33	0,86		0,06	0,00	0,19	0,00	0,01	0,03	0,00	0,00	0,32	0,69	0,25	0,11	0,45	0,16	0,13	0,09	0,85	0,32	0,24	0,00	0,12	0,23	0,00	0,55	Ch/E
Arg	0,25	0,49	0,51	0,55	0,55	0,18	0,56	0,01	0,45	0,44		0,00	0,00	0,03	0,00	0,09	0,00	0,00	0,02	0,05	0,14	0,13	0,03	0,21	0,00	0,00	0,18	0,00	0,00	0,00	0,00	0,99	0,00	0,84	Arg
Taa	0,53	0,64	0,64	0,68	0,69	0,2	0,69	0,18	0,77	0,66	0,84		0,00	0,00	0,00	0,37	0,00	0,00	0,01	0,10	0,06	0,08	0,10	0,50	0,00	0,00	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,55	0,00	0,20	Taa
%Arg	0,19	0,46	0,47	0,46	0,5	0,22	0,51	-0,03	0,3	0,31	0,98	0,75		0,12	0,00	0,05	0,00	0,00	0,02	0,08	0,27	0,21	0,04	0,05	0,00	0,00	0,31	0,00	0,00	0,01	0,00	0,61	0,00	0,62	%Arg
NH4	-0,84	-0,61	-0,38	-0,63	-0,46	0,12	-0,55	0,19	-0,81	-0,88	-0,49	-0,81	-0,36		0,12	0,00	0,00	0,05	0,27	0,15	0,03	0,83	0,07	0,01	0,08	0,56	0,23	0,09	0,00	0,01	0,41	0,00	0,70	NH4	
N	0,34	0,5	0,63	0,69	0,69	0,19	0,62	0,38	0,82	0,58	0,75	0,95	0,63	-0,74		0,16	0,00	0,00	0,06	0,14	0,08	0,19	0,15	0,14	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,16	0,00	0,04	N
C	-0,58	-0,09	0,41	0,13	0,38	0,46	0,17	0,72	-0,12	-0,5	0,39	0,21	0,44	0,36	0,32		0,61	0,95	0,67	0,60	0,92	0,40	0,27	0,37	0,02	0,20	0,01	0,00	0,00	0,46	0,02	0,97	0,41	0,03	C
C/N	-0,51	-0,58	-0,58	-0,69	-0,64	-0,1	-0,63	-0,19	-0,87	-0,73	-0,75	-0,97	-0,62	0,86	-0,97	-0,12		0,00	0,04	0,14	0,06	0,09	0,18	0,15	0,00	0,00	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,20	0,00	0,15	C/N
Gyr	-0,78	-0,76	-0,6	-0,59	-0,64	-0,23	-0,68	-0,03	-0,67	-0,66	-0,68	-0,92	-0,61	0,87	-0,79	0,02	0,86		0,00	0,15	0,07	0,04	0,27	0,62	0,00	0,01	0,39	0,04	0,00	0,00	0,00	0,68	0,00	0,31	Gyr
Amax	-0,5	-0,47	-0,47	-0,22	-0,45	-0,38	-0,47	-0,06	-0,24	-0,23	-0,52	-0,59	-0,52	0,45	-0,43	-0,1	0,47	0,71		0,02	0,00	0,01	0,44	0,33	0,03	0,03	0,89	0,18	0,05	0,32	0,02	0,04	0,00	0,44	Amax
Pc15	0,15	-0,04	0	0,47	0,12	-0,52	-0,01	-0,05	0,16	0,14	0,64	0,54	0,58	-0,39	0,5	0,19	-0,5	-0,49	-0,74		0,00	0,01	0,99	0,60	0,20	0,04	0,55	0,16	0,14	0,13	0,16	0,55	0,07	0,91	Pc15
Ps15	0,15	0,01	0,5	0,47	0,53	0,13	0,58	0,09	0,44	0,36	0,45	0,56	0,35	-0,45	0,52	0,03	-0,55	-0,54	-0,76	0,97		0,03	0,52	0,41	0,13	0,16	0,28	0,14	0,13	0,06	0,14	0,16	0,07	0,66	Ps15
Φ15	-0,44	0,03	-0,15	-0,58	-0,25	0,38	-0,35	0,36	-0,24	-0,41	-0,4	-0,45	-0,33	0,54	-0,34	0,23	0,44	0,53	0,61	-0,75	-0,62		0,41	0,67	0,39	0,09	0,94	0,39	0,38	0,07	0,38	0,31	0,05	0,38	Φ15
DR15	0,25	-0,14	-0,28	-0,01	-0,24	-0,34	-0,27	-0,17	-0,32	-0,2	-0,53	-0,42	-0,53	0,06	-0,38	-0,3	0,35	0,29	0,21	0,01	-0,21	-0,22		0,39	0,18	0,05	0,27	0,03	0,04	0,17	0,21	0,61	0,10	0,87	DR15
inos	0,16	-0,01	0,16	0,34	0,21	-0,14	0,16	0,33	0,54	0,32	-0,29	0,16	-0,45	-0,41	0,34	-0,21	-0,33	-0,12	0,23	0,19	0,26	-0,12	0,23		0,24	0,04	0,01	0,79	0,91	0,06	0,22	0,00	0,94	0,01	inos
arab	0,22	0,5	0,74	0,63	0,77	0,38	0,66	0,55	0,65	0,35	0,73	0,89	0,65	-0,55	0,93	0,52	-0,86	-0,75	-0,49	0,45	0,47	-0,23	-0,35	0,28		0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,24	0,00	0,00	arab
rib	-0,19	-0,36	-0,29	-0,34	-0,32	-0,07	-0,33	0,11	-0,35	-0,39	-0,9	-0,7	-0,89	0,4	-0,61	-0,3	0,62	0,55	0,5	-0,67	-0,43	0,44	0,5	0,47	-0,5		0,98	0,00	0,00	0,02	0,03	0,34	0,00	0,46	rib
man	-0,26	0,09	0,57	0,45	0,58	0,32	0,42	0,72	0,45	0,05	0,32	0,45	0,24	-0,14	0,62	0,58	-0,49	-0,21	0,03	0,21	0,34	0,02	-0,3	0,55	0,76	-0,01		0,00	0,00	0,00	0,00	0,13	0,00	man	
r/m	0,14	-0,26	-0,55	-0,49	-0,58	-0,28	-0,46	-0,42	-0,48	-0,23	-0,86	-0,75	-0,82	0,28	-0,8	-0,67	0,71	0,46	0,31	-0,48	-0,45	0,23	0,53	0,06	-0,83	0,75	-0,65		0,00	0,00	0,26	0,00	0,20	r/m	
r/m+a	-0,02	-0,39	-0,64	-0,54	-0,67	-0,35	-0,56	-0,45	-0,53	-0,28	-0,89	-0,84	-0,84	0,39	-0,87	-0,65	0,79	0,61	0,45	-0,5	-0,46	0,24	0,51	0,03	-0,92	0,74	-0,66	0,98		0,00	0,00	0,42	0,00	0,09	r/m+a
glu	0,27	0,4	0,54	0,72	0,62	0,03	0,59	0,19	0,81	0,66	0,72	0,86	0,59	-0,71	0,91	0,18	-0,91	-0,64	-0,23	0,52	0,57	-0,46	-0,36	0,43	0,83	-0,52	0,68	-0,78	-0,79		0,00	0,00	0,26	glu	
gal	0,26	0,51	0,73	0,66	0,77	0,35	0,66	0,53	0,66	0,36	0,73	0,9	0,64	-0,58	0,93	0,51	-0,87	-0,77	-0,5	0,48	0,45	-0,23	-0,33	0,29	1	-0,49	0,74	-0,81	-0,9	0,82		0,27	0,00	0,00	gal
fru	-0,19	-0,12	0,15	0,38	0,21	-0,17	0,17	0,21	0,45	0,28	0	0,14	-0,12	-0,2	0,33	-0,01	-0,3	0,1	0,45	0,22	0,44	-0,27	-0,14	0,75	0,28	0,22	0,7	-0,26	-0,19	0,61	0,26		0,89	0,36	fru
suc	-0,57	-0,68	-0,62	-0,67	-0,67	-0,19	-0,69	-0,06	-0,68	-0,63	-0,89	-0,98	-0,82	0,79	-0,89	-0,2	0,93	0,93	0,63	-0,59	-0,55	0,5	0,43	-0,02	-0,84	0,76	-0,35	0,73	0,82	-0,8	-0,85	-0,03		0,47	suc
Tsug	-0,13	0,11	0,48	0,15	0,45	0,46	0,23	0,92	0,34	-0,14	-0,05	0,3	-0,12	-0,09	0,47	0,5	-0,33	-0,24	-0,18	0,04	0,14	0,23	0,04	0,55	0,61	0,18	0,68	-0,3	-0,38	0,27	0,6	0,22	-0,17		Tsug

Fig. 3a.19: Matriz de correlación para el segundo tran



	Alt	TSW	Chla	Chlb	a+b	a/b	car	Erg	Chit	Ch/E	Arg	Taa	%Arg	NH4	N	C	C/N	Gyr	Amax	Pc15	Ps15	Φ15	DR15	inos	arab	rib	man	r/m	r/m+a	glu	gal	fru	suc	Tsug	
Alt		0,87	0,50	0,70	0,68	0,11	0,93	0,27	0,00	0,01	0,02	0,00	0,03	0,01	0,09	0,37	0,00	0,88	0,69	0,10	0,12	0,58	0,90	0,36	0,34	0,26	0,00	0,00	0,00	0,10	0,51	0,14	0,00	0,00	Alt
TSW	-0,06		0,15	0,02	0,08	0,05	0,01	0,19	0,38	0,14	0,97	0,93	0,43	0,49	0,73	0,79	0,64	0,04	0,42	0,56	0,25	0,13	0,17	0,52	0,71	0,45	0,12	0,74	0,36	0,08	0,87	0,14	0,97	0,06	TSW
Chla	0,22	-0,44		0,00	0,00	0,91	0,00	0,01	0,09	0,00	0,63	0,58	0,09	0,13	0,35	0,54	0,27	0,00	0,00	0,11	0,22	0,01	0,04	0,55	0,86	0,11	0,02	0,36	0,06	0,00	0,50	0,00	0,63	0,00	Chla
Chlb	-0,12	-0,68	0,75		0,00	0,02	0,00	0,24	0,08	0,03	0,58	0,63	0,66	0,77	0,82	0,39	0,95	0,00	0,09	0,56	0,58	0,10	0,18	0,15	0,28	0,71	0,01	0,85	0,55	0,05	0,69	0,14	0,58	0,03	Chlb
a+b	0,13	-0,53	0,98	0,86		0,50	0,00	0,02	0,07	0,00	0,83	0,77	0,16	0,22	0,44	0,47	0,39	0,00	0,00	0,17	0,27	0,01	0,05	0,39	0,67	0,18	0,01	0,51	0,11	0,00	0,69	0,01	0,83	0,00	a+b
a/b	0,49	0,58	-0,04	-0,67	-0,22		0,18	0,39	0,41	0,98	0,10	0,10	0,20	0,17	0,34	0,75	0,17	0,49	0,51	0,44	0,70	0,85	0,89	0,09	0,09	0,19	0,24	0,12	0,23	0,77	0,11	0,51	0,10	0,94	a/b
car	0,03	-0,69	0,88	0,91	0,94	-0,41		0,05	0,05	0,00	0,92	0,98	0,29	0,37	0,68	0,67	0,59	0,00	0,02	0,41	0,30	0,02	0,04	0,24	0,46	0,32	0,00	0,74	0,21	0,00	0,93	0,02	0,92	0,00	car
Erg	-0,28	-0,41	0,72	0,37	0,66	0,27	0,58		0,46	0,00	0,01	0,03	0,10	0,00	0,00	0,00	0,86	0,04	0,04	0,06	0,04	0,02	0,07	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00	0,07	0,21	0,00	0,00	0,13	0,00	Erg
Chit	0,74	0,28	-0,51	-0,52	-0,54	0,26	-0,57	-0,19		0,03	0,01	0,01	0,94	0,06	0,16	0,84	0,04	0,00	0,04	0,81	0,95	0,07	0,04	0,04	0,53	0,34	0,00	0,00	0,00	0,05	0,54	0,04	0,16	0,07	Chit
Ch/E	0,6	0,45	-0,85	-0,61	-0,83	-0,01	-0,79	-0,91	0,5		0,30	0,54	0,02	0,23	0,16	0,00	0,20	0,00	0,00	0,31	0,22	0,00	0,00	0,11	0,06	0,02	0,00	0,74	0,94	0,00	0,01	0,00	0,01	0,00	Ch/E
Arg	0,54	-0,01	0,15	-0,18	0,07	0,5	-0,03	0,58	0,63	-0,26		0,00	0,45	0,00	0,00	0,03	0,01	0,71	0,83	0,11	0,14	0,72	0,96	0,00	0,43	0,00	0,58	0,00	0,00	0,20	0,14	0,36	0,72	0,37	Arg
Taa	0,63	-0,03	0,18	-0,16	0,09	0,49	-0,01	0,52	0,62	-0,16	0,96		0,74	0,00	0,00	0,00	0,78	0,77	0,11	0,13	0,66	0,99	0,00	0,15	0,00	0,43	0,00	0,00	0,23	0,04	0,23	0,15	0,57	Taa	
%Arg	-0,5	0,25	-0,51	-0,14	-0,43	-0,4	-0,34	0,4	-0,02	-0,56	0,19	-0,08		0,88	0,78	0,06	0,00	0,34	0,20	0,06	0,05	0,13	0,31	0,44	0,42	0,72	0,09	0,98	0,58	0,36	0,51	0,93	0,00	0,02	%Arg
NH4	0,56	-0,22	0,46	0,1	0,38	0,42	0,29	0,64	0,45	-0,3	0,94	0,96	-0,04		0,00	0,04	0,00	0,44	0,26	0,06	0,05	0,18	0,39	0,00	0,28	0,00	0,81	0,00	0,00	0,05	0,05	0,08	0,36	0,33	NH4
N	0,41	-0,11	0,29	0,07	0,25	0,3	0,13	0,65	0,34	-0,34	0,82	0,86	-0,07	0,89		0,00	0,00	0,70	0,55	0,08	0,04	0,28	0,56	0,00	0,07	0,00	0,79	0,00	0,00	0,03	0,01	0,03	0,34	0,18	N
C	-0,22	-0,09	0,2	0,27	0,23	-0,1	0,14	0,78	-0,05	-0,71	0,5	0,41	0,45	0,5	0,74		0,85	0,58	0,76	0,32	0,16	0,38	0,59	0,02	0,16	0,00	0,02	0,13	0,22	0,00	0,05	0,01	0,10	0,00	C
C/N	-0,85	0,15	-0,35	-0,02	-0,27	-0,42	-0,17	-0,05	-0,5	-0,31	-0,57	-0,75	0,68	-0,71	-0,69	-0,05		0,66	0,44	0,06	0,04	0,25	0,51	0,10	0,43	0,02	0,04	0,00	0,01	0,99	0,23	0,63	0,00	0,17	C/N
Gyr	-0,05	-0,59	0,85	0,76	0,87	-0,22	0,9	0,6	-0,78	-0,96	-0,12	-0,09	-0,3	0,25	0,12	0,18	-0,14		0,00	0,48	0,29	0,00	0,00	0,11	0,26	0,38	0,00	0,91	0,23	0,00	0,87	0,01	0,70	0,00	Gyr
Amax	0,13	-0,26	0,83	0,51	0,79	0,21	0,65	0,6	-0,6	-0,85	0,07	0,09	-0,4	0,36	0,19	0,1	-0,25	0,78		0,21	0,54	0,01	0,03	0,45	0,71	0,22	0,02	0,54	0,14	0,00	0,70	0,02	0,83	0,00	Amax
Pc15	-0,5	0,19	-0,48	-0,19	-0,43	-0,25	-0,26	-0,56	-0,08	0,32	-0,48	-0,49	0,56	-0,56	-0,53	-0,31	0,56	-0,23	-0,39		0,00	0,13	0,86	0,30	0,20	0,06	1,00	0,08	0,05	0,12	0,10	0,07	0,11	0,17	Pc15
Ps15	-0,48	0,36	-0,38	-0,18	-0,35	-0,12	-0,33	-0,61	-0,02	0,38	-0,45	-0,46	0,58	-0,57	-0,59	-0,43	0,6	-0,34	-0,2	0,82		0,03	0,35	0,42	0,28	0,05	0,73	0,09	0,04	0,06	0,12	0,04	0,14	0,08	Ps15
Φ15	0,18	-0,46	0,72	0,49	0,69	0,06	0,67	0,67	-0,54	-0,84	0,12	0,14	-0,46	0,42	0,34	0,28	-0,36	0,8	0,71	-0,47	-0,63		0,00	0,50	0,79	0,15	0,02	0,43	0,09	0,00	0,59	0,01	0,72	0,00	Φ15
DR15	-0,04	0,43	-0,6	-0,41	-0,58	-0,05	-0,59	-0,54	0,6	0,79	0,02	-0,01	0,32	-0,27	-0,19	-0,17	0,21	-0,76	-0,62	0,06	0,3	-0,88		0,30	0,52	0,34	0,01	0,73	0,23	0,01	0,91	0,03	0,95	0,00	DR15
inos	0,23	0,21	-0,19	-0,44	-0,27	0,51	-0,37	0,65	0,49	-0,39	0,85	0,86	0,19	0,75	0,75	0,54	-0,39	-0,49	-0,24	-0,33	-0,26	-0,22	0,32		0,01	0,00	0,67	0,00	0,04	0,10	0,00	0,10	0,72	0,06	inos
arab	-0,24	0,12	-0,06	-0,34	-0,14	0,51	-0,24	0,54	-0,16	-0,45	0,2	0,35	-0,2	0,27	0,43	0,34	-0,2	-0,35	-0,12	-0,4	-0,34	-0,08	0,21	0,62		0,05	0,04	0,77	0,27	0,02	0,00	0,00	0,31	0,01	arab
rib	0,28	-0,24	0,49	0,12	0,41	0,41	0,32	0,84	0,24	-0,56	0,88	0,88	0,09	0,95	0,89	0,65	-0,54	0,28	0,38	-0,56	-0,58	0,44	-0,3	0,81	0,47		0,31	0,00	0,00	0,00	0,00	0,82	0,02	rib	
man	-0,84	-0,48	0,66	0,7	0,7	-0,37	0,76	0,72	-0,73	-0,89	-0,14	-0,2	0,41	-0,06	0,07	0,54	0,5	0,9	0,64	0	-0,11	0,65	-0,69	0,11	0,5	0,25		0,21	0,11	0,00	0,02	0,00	0,01	0,00	man
r/m	0,72	-0,11	0,29	-0,06	0,21	0,47	0,11	0,44	0,67	-0,09	0,97	0,96	0,01	0,95	0,8	0,37	-0,72	0,04	0,2	-0,52	-0,51	0,25	-0,11	0,73	0,07	0,83	-0,31		0,00	0,41	0,32	0,58	0,31	0,92	r/m
r/m+a	0,71	-0,29	0,56	0,19	0,48	0,38	0,39	0,31	0,64	-0,02	0,87	0,79	0,14	0,84	0,64	0,3	-0,57	0,37	0,45	-0,57	-0,59	0,51	-0,37	0,48	-0,27	0,67	-0,38	0,93		0,71	0,77	0,85	0,77	0,71	r/m+a
glu	-0,41	-0,53	0,86	0,58	0,82	0,1	0,78	0,94	-0,47	-0,91	0,32	0,3	0,23	0,47	0,52	0,69	0	0,85	0,76	-0,48	-0,56	0,81	-0,72	0,4	0,55	0,71	0,84	0,21	0,09		0,00	0,00	0,19	0,00	glu
gal	-0,17	-0,05	0,21	-0,13	0,13	0,49	0,03	0,71	-0,16	-0,57	0,36	0,49	-0,17	0,47	0,6	0,48	-0,3	-0,05	0,12	-0,5	-0,48	0,17	-0,04	0,69	0,96	0,66	0,55	0,25	-0,08	0,71		0,00	0,40	0,00	gal
fru	-0,36	-0,46	0,78	0,45	0,73	0,21	0,66	0,85	-0,49	-0,79	0,23	0,3	-0,02	0,43	0,52	0,58	-0,12	0,7	0,67	-0,54	-0,6	0,73	-0,62	0,4	0,72	0,66	0,79	0,14	-0,05	0,96	0,84		0,74	0,00	fru
suc	-0,7	0,01	-0,15	0,18	-0,07	-0,5	0,03	0,37	-0,34	-0,62	-0,09	-0,35	0,93	-0,23	-0,24	0,4	0,81	0,12	-0,07	0,48	0,45	-0,12	-0,02	-0,09	-0,25	-0,06	0,59	-0,25	-0,07	0,33	-0,21	0,08		0,01	suc
Tsug	-0,66	-0,55	0,88	0,64	0,86	0,02	0,83	0,9	-0,44	-0,96	0,23	0,14	0,54	0,24	0,33	0,71	0,34	0,91	0,79	-0,43	-0,52	0,84	-0,76	0,46	0,58	0,53	0,92	0,03	-0,09	0,89	0,67	0,81	0,58		Tsug

Leyenda de las Figs. 3a.11 a 3a.20: Bajo la diagonal principal, coeficientes de correlación de Pearson. Los valores en añil y cursiva indican correlaciones significativas y positivas. Los valores en rojo indican correlaciones significativas y negativas. Sobre la diagonal principal, valor de significancia de la correlación. Significancias menores de 0'05 aparecen en morado y en cursiva. Legend of the Figs. 3a.11 to 31.20: Below the main diagonal, Pearson's product-moment correlation coefficients. Values marked by italics and indigo indicate positive significant correlations. Values in red indicate negative significant correlations. Above the main diagonal, significance of the correlation. Significances under 0.05 are marked by italics and purple colour.

Abreviaturas/Abbreviations used in Figs. 3a.11 to 3a.20: Alt: altitud/ altitude (m.a.s.l.); TSW: Índice de peso específico/ *Thallus specific weight* ( $g \cdot m^{-2}$ ); Chla: Clorofila *a*/ *Chlorophyll a* ( $mg \cdot g^{-1}$ ); Chlb: Clorofila *b*/ *Chlorophyll b* ( $mg \cdot g^{-1}$ ); a+b: Clorofila *a+b*/ *Chlorophyll a+b* ( $mg \cdot g^{-1}$ ); a/b: Clorofila *a/b*/ *Chlorophyll a/b*; car: carotenos/ *carotenoids* ( $mg \cdot g^{-1}$ ); Erg: ergosterol ( $mg \cdot g^{-1}$ ); Chit: quitina/ *chitin* ( $mg \cdot g^{-1}$ ); Ch/E: cociente quitina/ergosterol/ *chitin to ergosterol ratio*; Arg: arginina/ *arginine* ( $\mu mol \cdot g^{-1}$ ); Taa: aa totales/ *total aminoacids* ( $\mu mol \cdot g^{-1}$ ); %Arg: *percentage of arginine of the total aa content*; NH4:  $NH_4^+$  ( $\mu mol \cdot g^{-1}$ ); N: nitrogen ( $mg \cdot g^{-1}$ ); C: carbon ( $mg \cdot g^{-1}$ ); C/N: *carbon to nitrogen ratio*; Gyr: *gyrophoric acid* ( $CA \cdot g^{-1}$ ); Amax: tasa máxima de asimilación/ *maximal assimilation rate* ( $\mu mol CO_2 \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ ); Pc15: punto de compensación de luz a 15 °C/ *light compensation point at 15 °C* ( $\mu mol photons \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ ); Ps15: punto de saturación de luz a 15 °C/ *light saturation point at 15 °C* ( $\mu mol photons \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ );  $\Phi 15$ : eficiencia fotosintética a 15 °C/ *photosynthetic efficiency (non-dimensional)*; DR15: RO a 15°C/ *dark respiration at 15 °C* ( $\mu mol CO_2 \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ ); Inos: inositol ( $mg \cdot g^{-1}$ ); arab: arabitol ( $mg \cdot g^{-1}$ ); rib: ribitol ( $mg \cdot g^{-1}$ ); man: manitol ( $mg \cdot g^{-1}$ ); r/m: *ribitol to mannitol ratio*; r/m+a: *ribitol to mannitol+arabitol ratio*; glu: *glucose* ( $mg \cdot g^{-1}$ ); fru: *fructose* ( $mg \cdot g^{-1}$ ); suc: *sucrose* ( $mg \cdot g^{-1}$ ); Tsug: azúcares totales/ *total sugars* ( $mg \cdot g^{-1}$ ).

	Alt	UppLay	TSW	Chla	Chlb	a+b	a/b	car	Gyr	
Alt				0,22	0,63	0,27	0,24	0,35	<i>0,01</i>	Alt
UppLay	<i>-0,3</i>		0,07	0,35	0,12	0,17	0,09	<i>0,01</i>	0,06	UppLay
TSW	<i>0,54</i>	-0,25		0,34	0,68	0,38	0,21	0,94	<i>0,00</i>	TSW
Chla	-0,17	-0,13	-0,14		<i>0,00</i>	<i>0,00</i>	<i>0,00</i>	<i>0,00</i>	0,16	Chla
Chlb	-0,07	-0,22	-0,06	<i>0,43</i>		<i>0,00</i>	<i>0,00</i>	<i>0,00</i>	0,30	Chlb
a+b	-0,16	-0,19	-0,12	<i>0,92</i>	<i>0,75</i>		0,09	<i>0,00</i>	0,13	a+b
a/b	-0,16	0,24	-0,18	<i>0,56</i>	<i>-0,41</i>	0,24		0,77	0,97	a/b
car	0,14	<i>-0,35</i>	0,01	<i>0,47</i>	<i>0,46</i>	<i>0,56</i>	-0,04		0,10	car
Gyr	<i>-0,36</i>	0,26	<i>-0,44</i>	-0,20	-0,15	-0,21	0,00	-0,24		Gyr
	Alt	UppLay	TSW	Chla	Chlb	a+b	a/b	car	Gyr	

Fig. 3a.21: Matriz de correlación para los parámetros teóricamente más afectados por la irradiación en *Lasallia hispanica*. Bajo la diagonal principal, coeficientes de correlación de Pearson. Los valores en añil y cursiva indican correlaciones significativas y positivas. Los valores en rojo indican correlaciones significativas y negativas. Sobre la diagonal principal, valor de significancia de la correlación. Significancias menores de 0'05 aparecen en morado y en cursiva. Alt: altitud; UppLay: capa epinecral+ córtex superior; IPE: índice de peso específico; Chla: clorofila *a*; Chlb: clorofila *b*; a+b: Chla+Chlb; a/b: Chla/Chlb; car: carotenos; Gyr: ácido girofórico.

Fig. 3a.21: Correlation matrix for the parameters theoretically more affected by irradiation for *Lasallia hispanica*. Below the main diagonal, Pearson's product-moment correlation coefficients. Values marked by italics and indigo indicate positive significant correlations. Values in red indicate negative significant correlations. Above the main diagonal, significance of the correlation. Significances under 0.05 are marked by italics and purple colour. Alt: altitude; UppLay: epinecral layer+upper cortex; TSW: thallus specific weight; Chla: chlorophyll *a*; Chlb: chlorophyll *b*; a+b: Chla+Chlb; a/b: Chla/Chlb; car: carotenes; Gyr: gyrophoric acid.

	Alt	UppLay	TSW	Chla	Chlb	a+b	a/b	car	Gyr	
Alt				0,16	0,00	0,05	0,36	0,02	0,00	Alt
UppLay	-0,36		0,19	0,00	0,02	0,00	0,99	0,00	0,72	UppLay
TSW	0,35	0,19		0,06	0,84	0,09	0,20	0,02	0,00	TSW
Chla	0,2	-0,40	-0,26		0,00	0,00	0,00	0,00	0,50	Chla
Chlb	0,39	-0,32	-0,03	0,40		0,00	0,00	0,00	0,86	Chlb
a+b	0,27	-0,43	-0,24	0,97	0,60		0,02	0,00	0,52	a+b
a/b	-0,13	0,00	-0,18	0,54	-0,52	0,33		0,38	0,56	a/b
car	0,33	-0,49	-0,32	0,86	0,71	0,93	0,12		0,16	car
Gyr	-0,5	-0,05	-0,66	0,1	0,02	0,09	0,08	0,2		Gyr

Fig. 3a.22: Matriz de correlación para los parámetros teóricamente más afectados por la irradiación en *Lasallia pustulata*. Colores y abreviaturas como en la Fig. 3a.21.

Fig. 3a.22: Correlation matrix for the parameters theoretically more affected by irradiation for *Lasallia pustulata*. Colours and abbreviations have the same meaning than in Fig. 3a.21.

	Alt	UppLay	TSW	Chla	Chlb	a+b	a/b	car	Gyr	
Alt		0,00	0,04	0,39	0,58	0,39	0,43	0,40	0,00	Alt
UppLay	0,8		0,47	0,93	0,90	0,96	0,70	0,13	0,00	UppLay
TSW	0,53	0,19		0,84	0,45	0,99	0,46	0,53	0,05	TSW
Chla	0,23	0,03	-0,06		0,05	0,00	0,00	0,00	0,28	Chla
Chlb	0,15	-0,03	0,2	0,5		0,00	0,65	0,26	0,36	Chlb
a+b	0,23	0,01	0	0,98	0,68		0,01	0,01	0,25	a+b
a/b	0,21	0,1	-0,2	0,79	-0,12	0,63		0,06	0,62	a/b
car	-0,23	-0,39	-0,17	0,67	0,3	0,65	0,47		0,10	car
Gyr	-0,69	-0,7	-0,51	0,29	0,24	0,31	0,14	0,43		Gyr

Fig. 3a.23: Matriz de correlación para los parámetros teóricamente más afectados por la irradiación en el primer transecto de *Lasallia hispanica*. Colores y abreviaturas como en la Fig. 3a.21.

Fig. 3a.23: Correlation matrix for the parameters theoretically more affected by irradiation for the first transect of *Lasallia hispanica*. Colours and abbreviations have the same meaning than in Fig. 3a.21.

	Alt	UppLay	TSW	Chla	Chlb	a+b	a/b	car	Gyr	
Alt		0,00	0,00	0,27	0,99	0,46	0,18	0,01	0,00	Alt
UppLay	-0,68		0,01	0,68	0,17	0,33	0,05	0,05	0,00	UppLay
TSW	0,69	-0,5		0,27	0,57	0,31	0,26	0,14	0,01	TSW
Chla	-0,24	-0,09	-0,23		0,04	0,00	0,06	0,32	0,93	Chla
Chlb	0	-0,29	-0,12	0,43		0,00	0,00	0,04	0,23	Chlb
a+b	-0,16	-0,21	-0,22	0,88	0,8		0,90	0,07	0,50	a+b
a/b	-0,29	0,4	-0,24	0,4	-0,55	-0,03		0,10	0,05	a/b
car	0,58	-0,44	0,34	0,23	0,46	0,4	-0,37		0,10	car
Gyr	-0,61	0,68	-0,51	-0,02	-0,25	-0,14	0,4	-0,37		Gyr

Fig. 3a.24: Matriz de correlación para los parámetros teóricamente más afectados por la irradiación en el segundo transecto de *Lasallia hispanica*. Colores y abreviaturas como en la Fig. 3a.21.

Fig. 3a.24: Correlation matrix for the parameters theoretically more affected by irradiation for the second transect of *Lasallia hispanica*. Colours and abbreviations have the same meaning than in Fig. 3a.21.

	Alt	UppLay	TSW	Chla	Chlb	a+b	a/b	car	Gyr	
Alt										Alt
UppLay	<b>0,96</b>									UppLay
TSW	0,2	0,38								TSW
Chla	<b>-0,91</b>	<b>-0,91</b>	-0,29							Chla
Chlb	<b>-0,65</b>	<b>-0,62</b>	0,03	<b>0,62</b>						Chlb
a+b	<b>-0,91</b>	<b>-0,91</b>	-0,22	<b>0,98</b>	<b>0,78</b>					a+b
a/b	-0,42	-0,44	-0,33	0,55	-0,31	0,35				a/b
car	<b>-0,79</b>	<b>-0,8</b>	-0,32	<b>0,88</b>	<b>0,75</b>	<b>0,92</b>				car
Gyr	<b>0,58</b>	0,34	-0,34	-0,42	-0,46	-0,46	-0,06	-0,36		Gyr

Fig. 3a.25: Matriz de correlación para los parámetros teóricamente más afectados por la irradiación en el tercer transecto de *Lasallia hispanica*. Colores y abreviaturas como en la Fig. 3a.21.

Fig. 3a.25: Correlation matrix for the parameters theoretically more affected by irradiation for the third transect of *Lasallia hispanica*. Colours and abbreviations have the same meaning than in Fig. 3a.21.

	Alt	UppLay	TSW	Chla	Chlb	a+b	a/b	car	Gyr	
Alt										Alt
UppLay	-0,43									UppLay
TSW	-0,01	<b>0,57</b>								TSW
Chla	0,38	<b>-0,49</b>	-0,41							Chla
Chlb	<b>0,7</b>	0,03	0,18	0,03						Chlb
a+b	<b>0,57</b>	<b>-0,45</b>	-0,33	<b>0,95</b>	0,34					a+b
a/b	-0,23	-0,34	-0,32	<b>0,66</b>	<b>-0,71</b>	0,4				a/b
car	<b>0,78</b>	<b>-0,47</b>	-0,28	<b>0,79</b>	<b>0,58</b>	<b>0,92</b>	0,1			car
Gyr	<b>-0,66</b>	<b>0,79</b>	<b>0,53</b>	<b>-0,73</b>	-0,19	<b>-0,74</b>	-0,33	<b>-0,78</b>		Gyr

Fig. 3a.26: Matriz de correlación para los parámetros teóricamente más afectados por la irradiación en el primer transecto de *Lasallia pustulata*. Colores y abreviaturas como en la Fig. 3a.21.

Fig. 3a.26: Correlation matrix for the parameters theoretically more affected by irradiation for the first transect of *Lasallia pustulata*. Colours and abbreviations have the same meaning than in Fig. 3a.21.

	Alt	UppLay	TSW	Chla	Chlb	a+b	a/b	car	Gyr	
Alt										Alt
UppLay	<b>-0,57</b>									UppLay
TSW	<b>0,65</b>	-0,09								TSW
Chla	0,21	0,33	0,31							Chla
Chlb	<b>0,41</b>	-0,21	0,20	<b>0,59</b>						Chlb
a+b	0,27	0,24	0,31	<b>0,99</b>	<b>0,72</b>					a+b
a/b	-0,12	<b>0,63</b>	0,21	<b>0,73</b>	-0,11	<b>0,61</b>				a/b
car	0,43	0,02	0,3	<b>0,89</b>	<b>0,75</b>	<b>0,93</b>	<b>0,46</b>			car
Gyr	<b>-0,78</b>	0,13	<b>-0,76</b>	<b>-0,6</b>	<b>-0,59</b>	<b>-0,64</b>	-0,23	<b>-0,68</b>		Gyr

Fig. 3a.27: Matriz de correlación para los parámetros teóricamente más afectados por la irradiación en el primer transecto de *Lasallia pustulata*. Colores y abreviaturas como en la Fig. 3a.21.

Fig. 3a.27: Correlation matrix for the parameters theoretically more affected by irradiation for the first transect of *Lasallia pustulata*. Colours and abbreviations have the same meaning than in Fig. 3a.21.

	Alt	UppLay	TSW	Chla	Chlb	a+b	a/b	car	Gyr	
Alt		0,73	0,87	0,50	0,70	0,68	0,11	0,93	0,88	Alt
UppLay	-0,11		0,05	0,00	0,01	0,00	0,75	0,00	0,00	UppLay
TSW	-0,06	0,57		0,15	0,02	0,08	0,05	0,01	0,04	TSW
Chla	0,22	-0,88	-0,44		0,00	0,00	0,91	0,00	0,00	Chla
Chlb	-0,12	-0,71	-0,68	0,75		0,00	0,02	0,00	0,00	Chlb
a+b	0,13	-0,88	-0,53	0,98	0,86		0,50	0,00	0,00	a+b
a/b	0,49	0,1	0,58	-0,04	-0,67	-0,22		0,18	0,49	a/b
car	0,03	-0,87	-0,69	0,88	0,91	0,94	-0,41		0,00	car
Gyr	-0,05	-0,98	-0,59	0,85	0,76	0,87	-0,22	0,9		Gyr

Fig. 3a.28: Matriz de correlación para los parámetros teóricamente más afectados por la irradiación en el tercer transecto de *Lasallia pustulata*. Colores y abreviaturas como en la Fig. 3a.21.

Fig. 3a.28: Correlation matrix for the parameters theoretically more affected by irradiation for the third transect of *Lasallia pustulata*. Colours and abbreviations have the same meaning than in Fig. 3a.21.

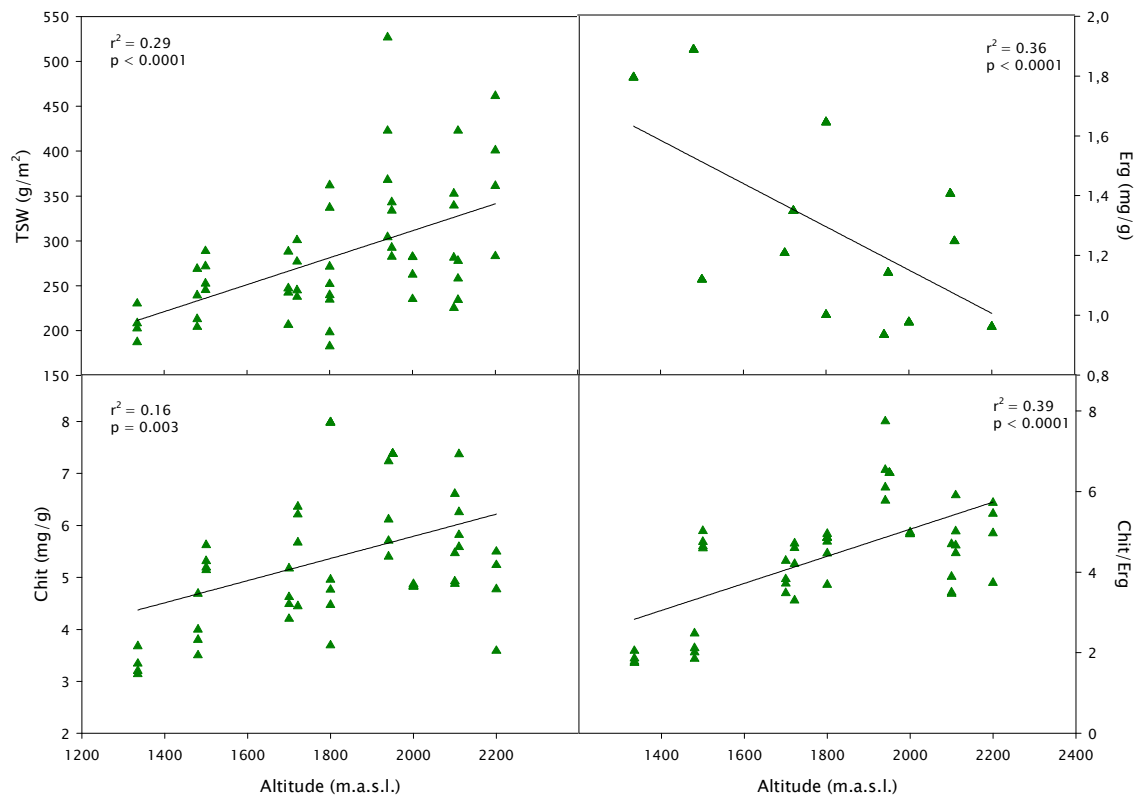


Fig. 3a.29: Regresión lineal entre altitud y TSW (IPE, arriba izqda.), Erg (arriba dcha.), Chit (quitina, abajo izqda.) y cociente Chit/Erg (Quit/Erg) (abajo dcha.) de *Lasallia hispanica*.

Fig. 3a.29: Linear regression between altitude and TSW (top left), Erg (top right), Chit (bottom left) and Chit to Erg ratio (bottom right) of *Lasallia hispanica* samples.

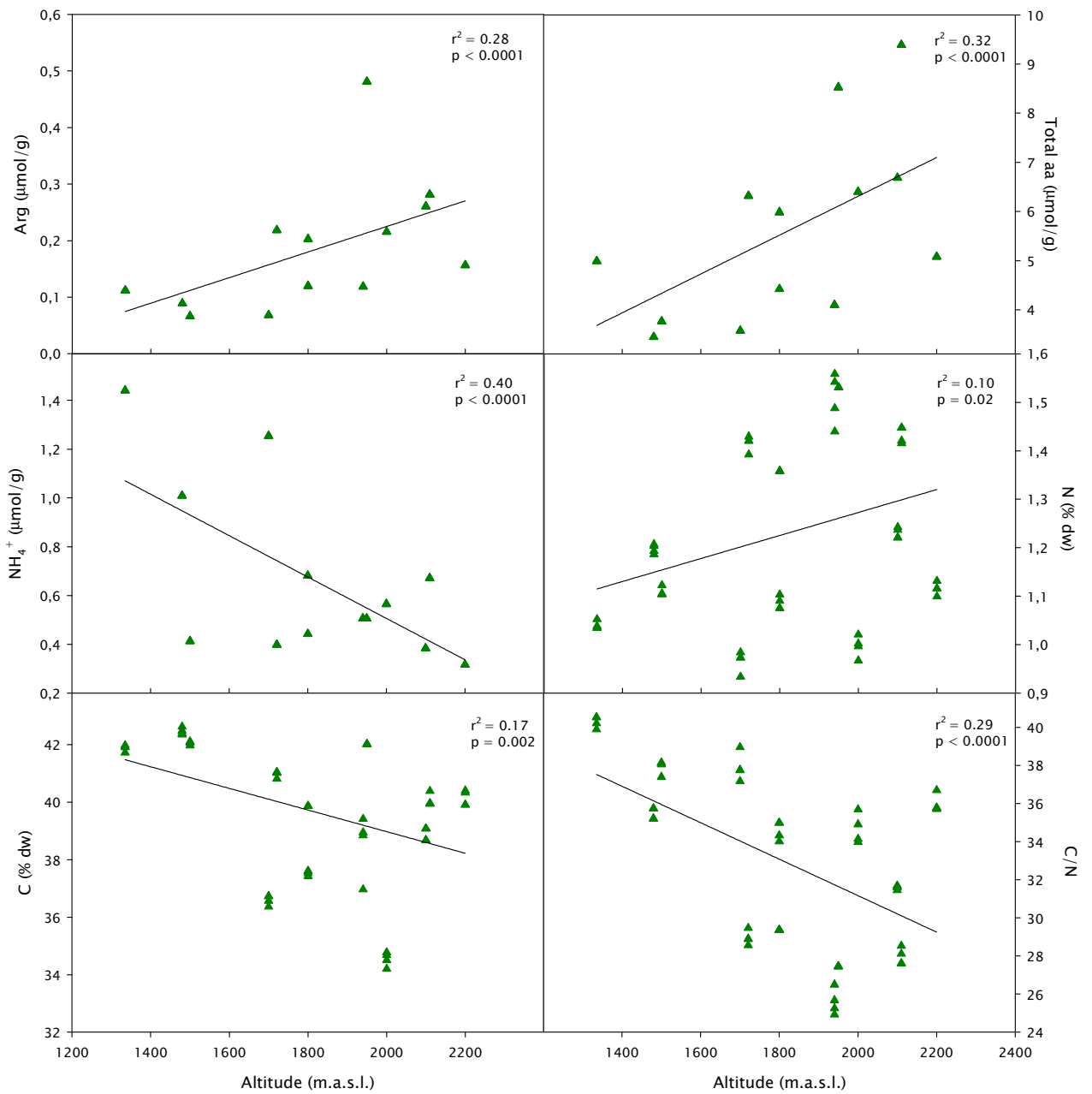


Fig. 3a.30: Regresión lineal entre altitud y Arg (arriba izqda.), Total aa (arriba dcha.),  $\text{NH}_4^+$  (centro izqda.), N (centro dcha.), C (abajo izqda.) y cociente C/N (abajo dcha.) de *Lasallia hispanica*.

Fig. 3a.30: Linear regression between altitude and Arg (top left), Total aa (top right),  $\text{NH}_4^+$  (middle left), N (middle right), C (bottom left) and C to N ratio (bottom right) of *Lasallia hispanica* samples.

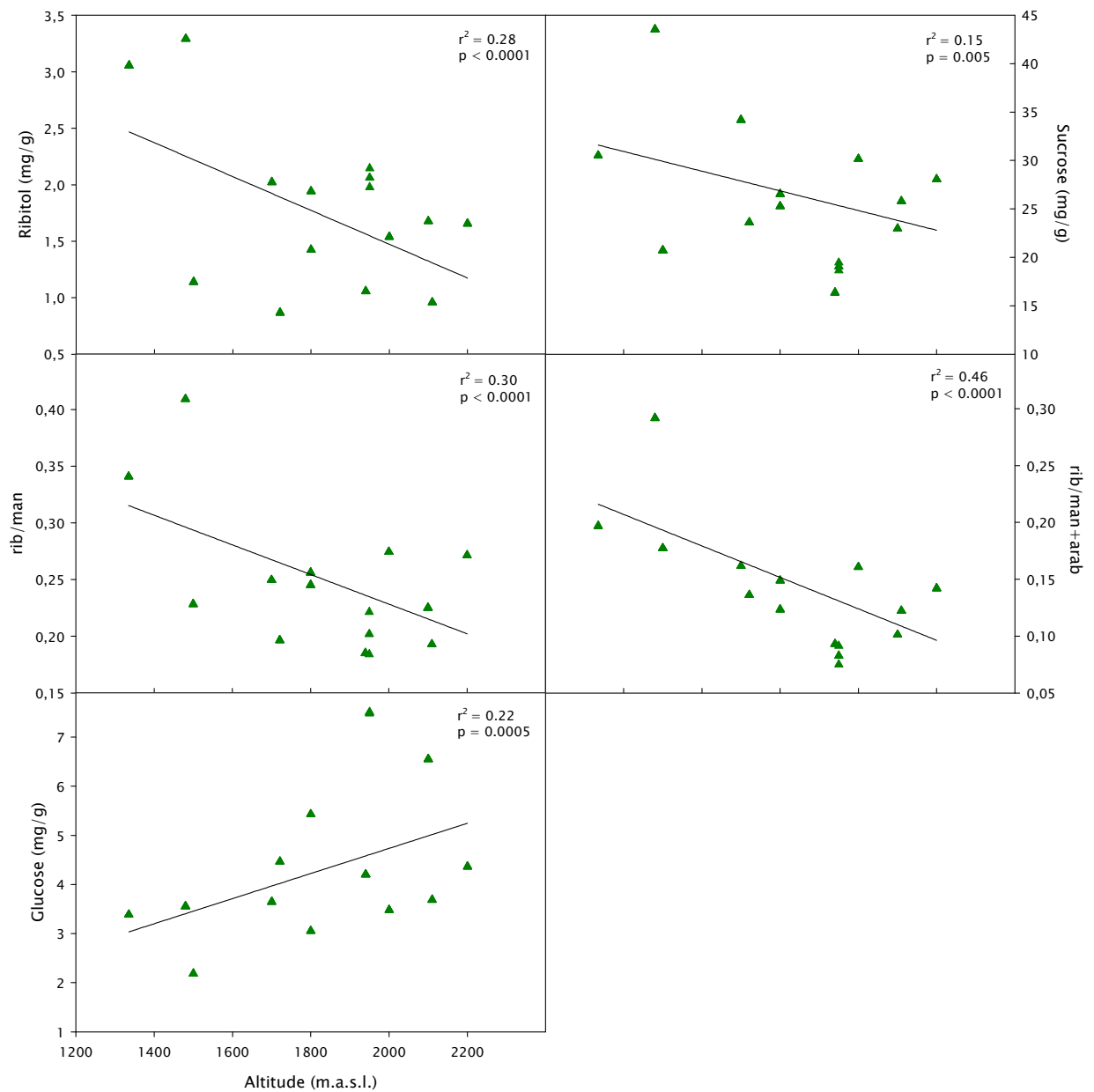


Fig. 3a.31: Regresión lineal entre altitud y ribitol (arriba izqda.), sacarosa (arriba dcha.), cociente ribitol/manitol (centro izqda.), cociente ribitol/manitol+arabitol (centro dcha.), y glucosa (abajo izqda.) de *Lasallia hispanica*.

Fig. 3a.31: Linear regression between altitude and ribitol (top left), sucrose (top right), ribitol to mannitol ratio (middle left), ribitol to mannitol+arabitol ratio (middle right), and glucose (bottom left) of *Lasallia hispanica* samples.

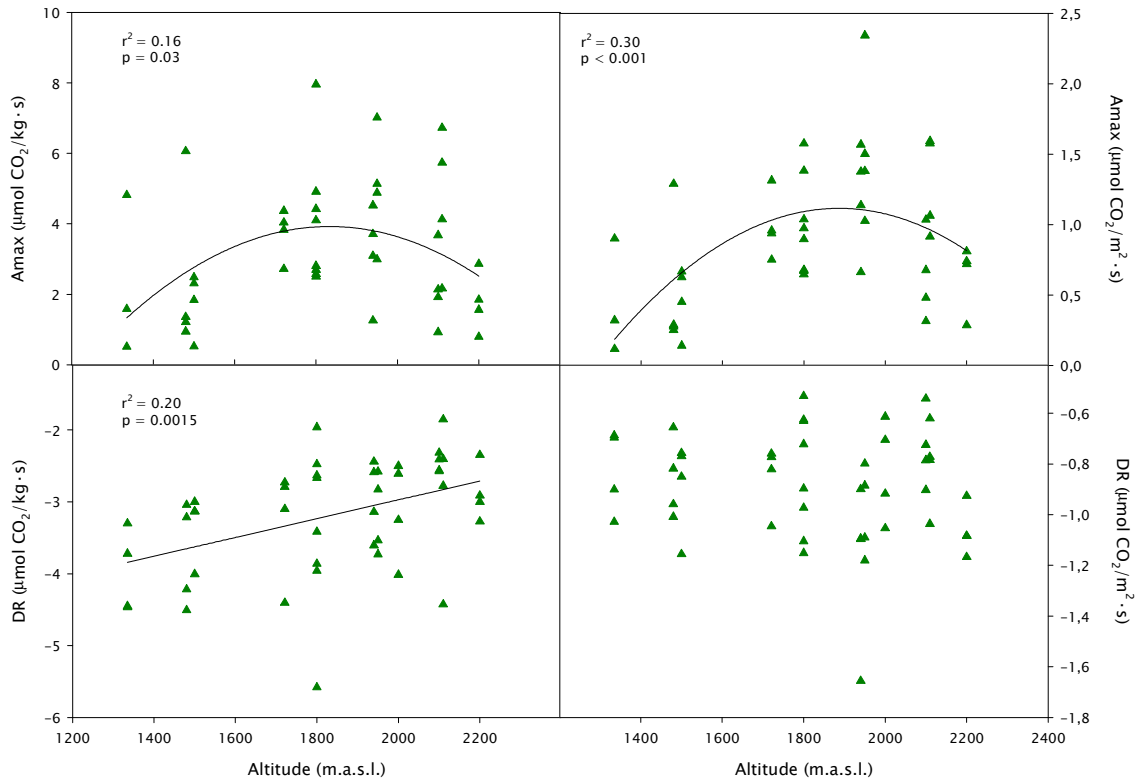


Fig. 3a.32: Altitud frente a Amáx por peso seco (arriba izqda.), por unidad de área (arriba dcha.) y RO por peso seco (abajo izqda.) y por unidad de área (abajo dcha.) de *Lasallia hispanica*. Los datos de Amáx se han ajustado a una función cuadrática. La RO por peso seco se ha ajustado por regresión lineal.

Fig. 3a.32: Plots between altitude and Amax on a dry weight basis (top left), on a surface area basis (top right) and dark respiration on a dry weight basis (bottom left) and a surface area basis (bottom right) of *Lasallia hispanica* samples. Data for Amax are fitted with a quadratic function. DR by dry weight is fitted by linear regression



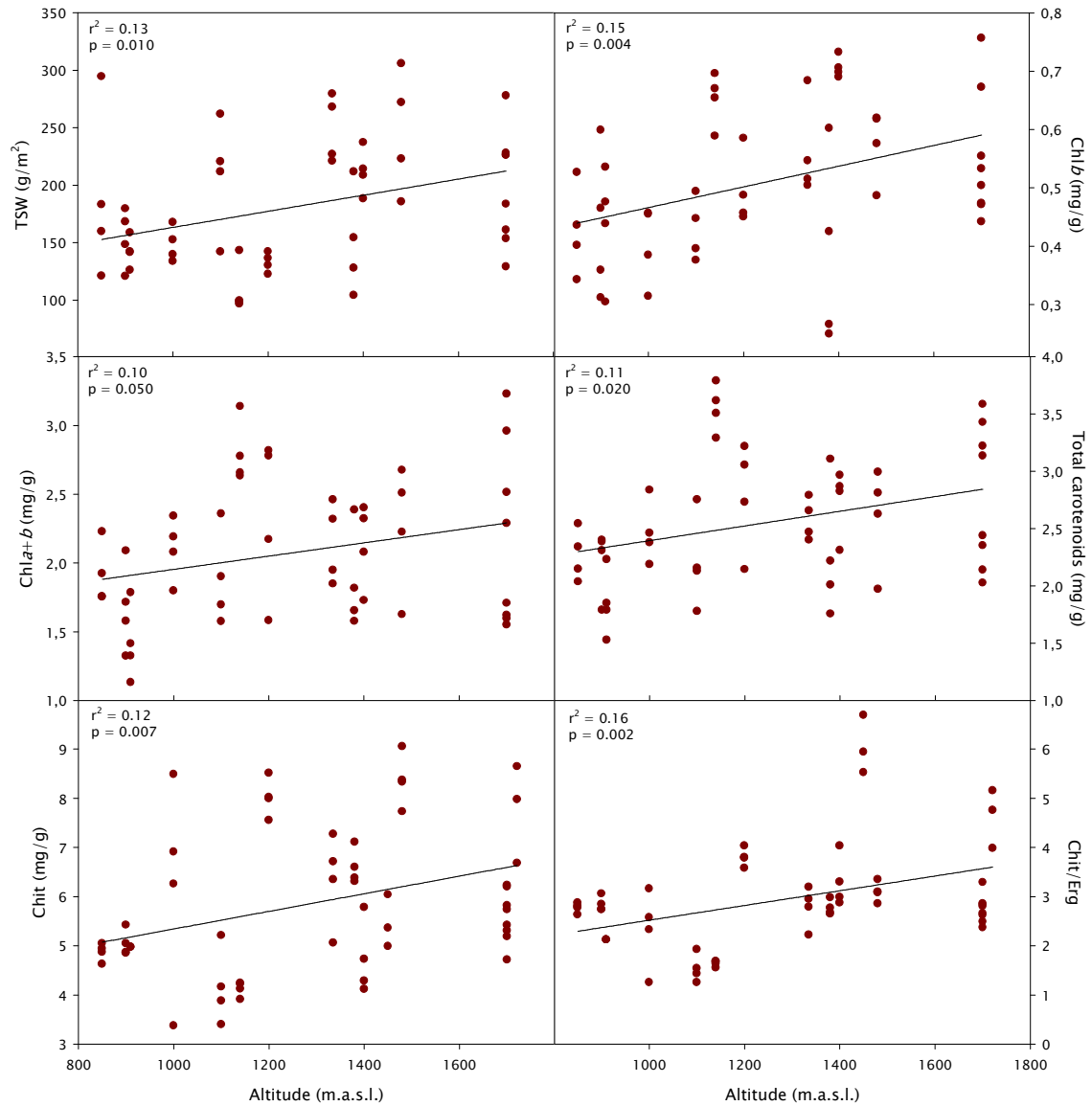


Fig. 3a.33: Regresión lineal entre altitud y TSW (IPE, arriba izqda.), Chlb (arriba dcha.), Chla+b (centro izqda.), carotenos totales (centro dcha.), quitina (abajo izqda.) y Quit/Erg (abajo dcha.) de *Lasallia pustulata*.

Fig. 3a.33: Linear regression between altitude and TSW (top left), Chlb (top right), Chla+b (middle left), total carotenoids (middle right), chitin (bottom left) and chitin to ergosterol ratio (bottom right) of *Lasallia pustulata* samples.

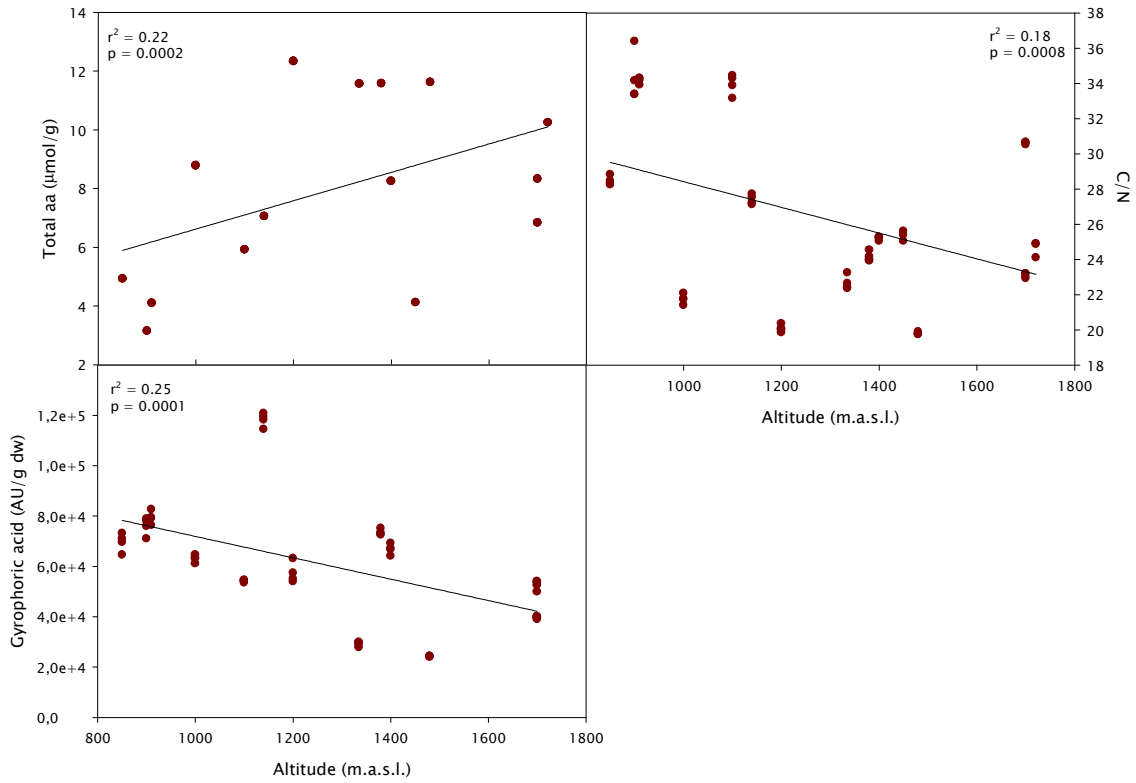


Fig. 3a.34: Regresión lineal entre altitud y total de aminoácidos (arriba izqda.), cociente C/N (arriba dcha.) y ácido girofórico (abajo izqda.) de *Lasallia pustulata*.

Fig. 3a.34: Linear regression between altitude and total aminoacid content (top left), C to N ratio (top right) and glyophoric acid content (bottom left) of *Lasallia pustulata* samples.

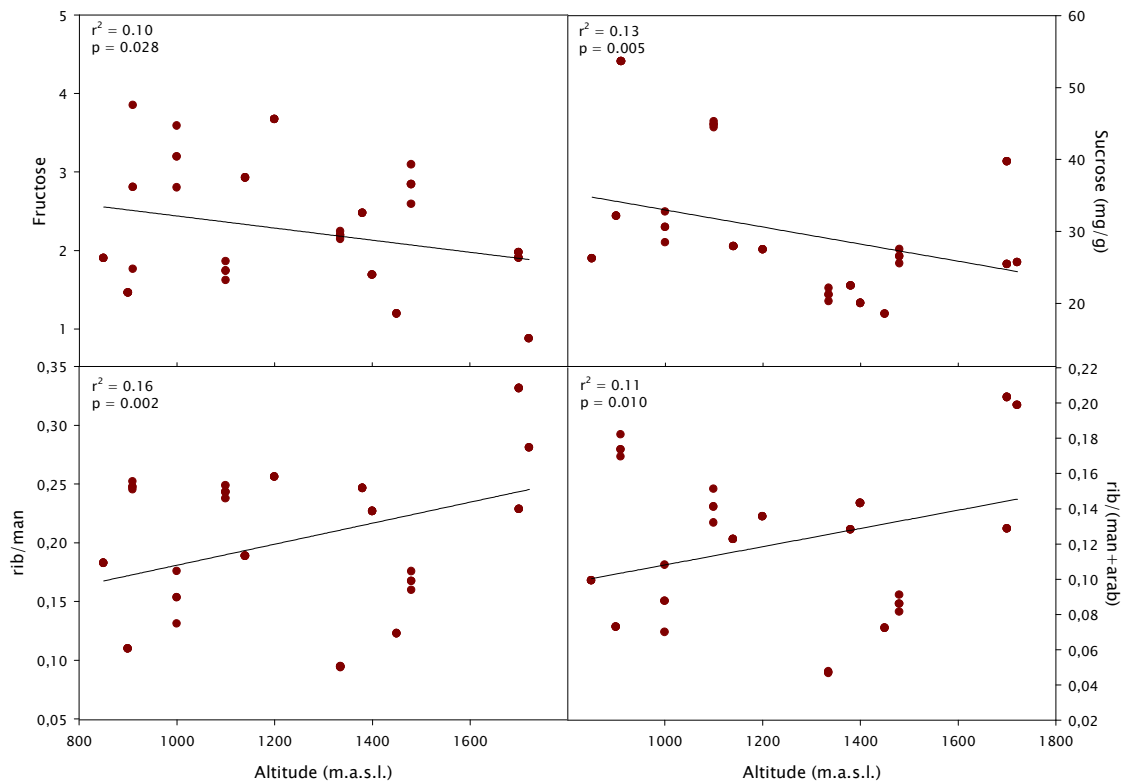


Fig. 3a.35: Regresión lineal entre altitud y fructosa (arriba izqda.), sacarosa (arriba dcha.), ribitol/manitol (abajo izqda.) y ribitol/manitol+arabitol (abajo dcha.) de *Lasallia pustulata*.

Fig. 3a.35: Linear regression between altitude and fructose (top left), sucrose (top right), ribitol to mannitol ratio (bottom left) and ribitol to mannitol+arabitol ratio (bottom right) of *Lasallia pustulata* samples.

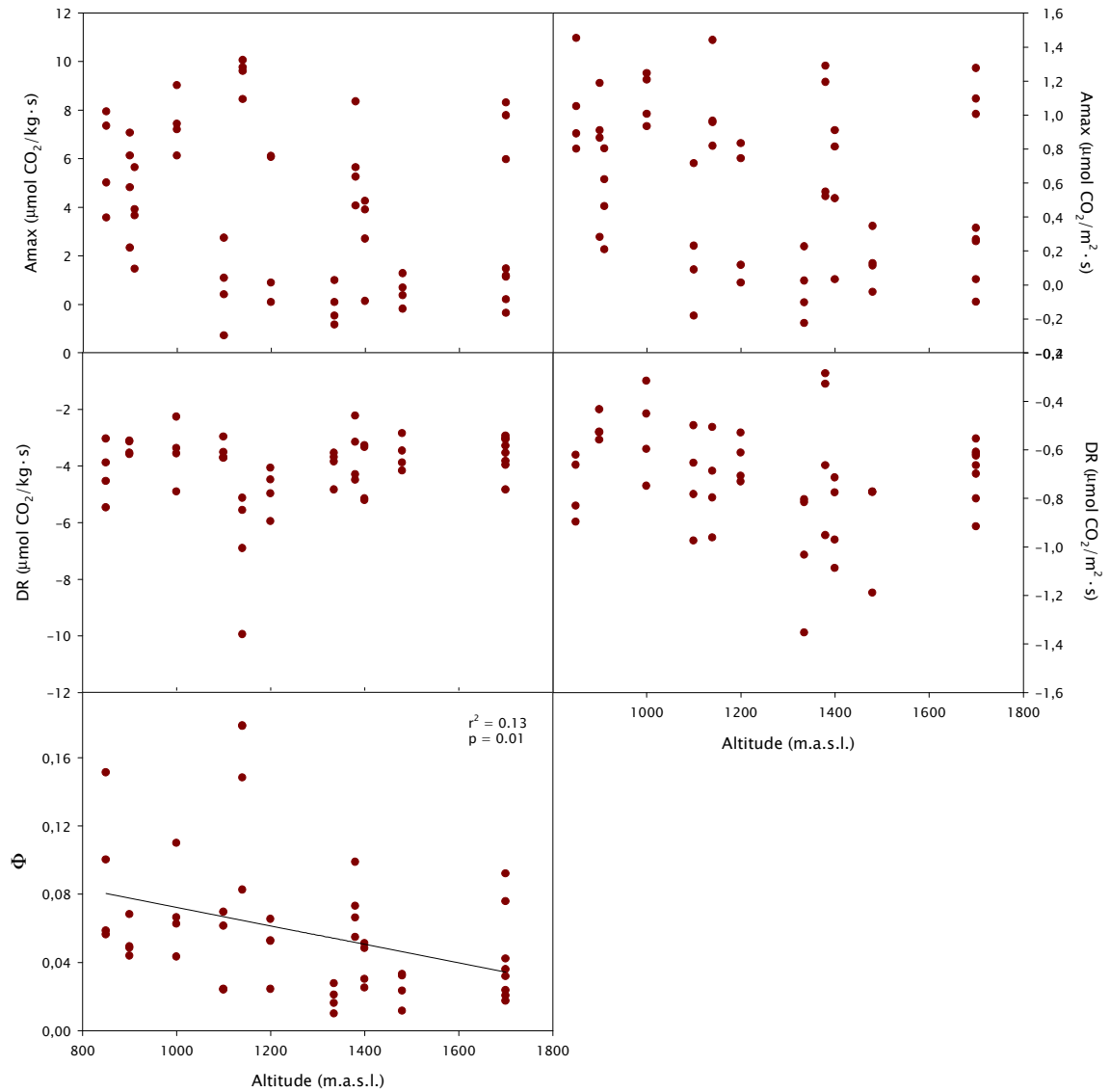


Fig. 3a.36: Altitud frente a Amáx por peso seco (arriba izqda.), por unidad de área (arriba dcha.) y RO por peso seco (centro izqda.) y unidad de área (centro dcha.); y regresión lineal entre altitud y eficiencia fotosintética ( $\Phi$ ) (abajo izqda.) de *Lasallia pustulata*.

Fig. 3a.36: Plots between altitude and Amax on a dry weight basis (top left), on a surface area basis (top right) and dark respiration on a dry weight basis (middle left) and a surface area basis (middle right); and linear regression between altitude and photosynthetic efficiency ( $\Phi$ ) (bottom left) of *Lasallia pustulata* samples.

	eigenvalue	% of variance	cumulative % of variance
Comp 1	4,5193	32,2808	32,2808
Comp 2	2,5646	18,3184	50,5992
Comp 3	1,7158	12,2556	62,8548
Comp 4	1,2683	9,0595	71,9144
Comp 5	1,0034	7,1670	79,0814

Tabla 3a.13: Valores propios, porcentaje de varianza y porcentaje de varianza acumulado del ACP consenso de *Lasallia hispanica* (Fig. 3.26).

Table 3a.13: Eigenvalues, percentage of variance and cumulative percentage of variance of the consensus PCA of *Lasallia hispanica* (Fig. 3.26).

	Dim 1	Dim 2	Dim 3	Dim 4	Dim 5
Altitude	-0,8648	-0,0232	0,0197	0,0347	0,2099
TSW	-0,6832	-0,1945	0,1925	-0,3761	-0,2533
Chla	0,1179	0,8172	-0,1469	-0,0844	-0,3074
car	0,1336	0,6568	-0,1809	-0,4556	0,0116
Erg	0,6508	0,4311	0,4296	-0,0750	0,1021
Taa	-0,5879	0,3302	0,1261	0,2934	0,5532
% Arg	-0,0633	0,1829	0,4037	0,6320	-0,5534
NH4	0,7373	0,1349	0,4010	0,1723	-0,0125
C/N	0,7728	-0,4662	-0,0235	0,0060	0,1341
Gyr	0,5104	-0,3350	-0,3007	0,4526	0,1363
r/(m+a)	0,8579	-0,0535	0,0148	-0,2860	-0,0264
Tsug	0,1951	0,4878	0,5861	0,0039	0,3618
Amax	-0,1736	0,6941	-0,5352	0,3124	-0,0151
DR15	-0,5425	-0,1679	0,6154	-0,0760	-0,0964

Tabla 3a.14: Correlación entre variables y componentes del ACP consenso de *Lasallia hispanica*.

Table 3a.14: Correlation between variables and components for the consensus PCA of *Lasallia hispanica*.

	Dim 1	Dim 2	Dim 3	Dim 4	Dim 5
Altitude	16,5473	0,0210	0,0227	0,0948	4,3914
TSW	10,3289	1,4751	2,1599	11,1550	6,3966
Chla	0,3077	26,0420	1,2582	0,5612	9,4176
car	0,3948	16,8224	1,9077	16,3641	0,0135
Erg	9,3717	7,2476	10,7560	0,4429	1,0393
Taa	7,6472	4,2508	0,9266	6,7880	30,5023
% Arg	0,0885	1,3044	9,4987	31,4965	30,5170
NH4	12,0271	0,7097	9,3719	2,3419	0,0155
C/N	13,2151	8,4735	0,0321	0,0029	1,7931
Gyr	5,7650	4,3758	5,2696	16,1485	1,8509
r/(m+a)	16,2864	0,1117	0,0128	6,4511	0,0693
Tsug	0,8421	9,2793	20,0225	0,0012	13,0449
Amax	0,6667	18,7882	16,6913	7,6968	0,0229
DR	6,5116	1,0987	22,0702	0,4552	0,9257

Tabla 3a.15: Contribuciones de cada variable a cada componente del ACP consenso de *Lasallia hispanica*.

Table 3a.15: Contributions of each variable to each component for the consensus PCA of *Lasallia hispanica*.

	eigenvalue	% of variance	cumulative % of variance
Comp 1	3,9812	26,5416	26,5416
Comp 2	3,5543	23,6952	50,2369
Comp 3	2,0751	13,8337	64,0705
Comp 4	1,6733	11,1553	75,2258
Comp 5	1,0464	6,9761	82,2020

Tabla 3a.16: Valores propios, % de varianza y % de varianza acumulada del ACP consenso de *Lasallia pustulata* (Fig. 3.27).

Table 3a.16: Eigenvalues, % of variance and cumulative % of variance of the consensus PCA of *Lasallia pustulata* (Fig. 3.27).

	Dim 1	Dim 2	Dim 3	Dim 4	Dim 5
Altitude	0,4215	0,0677	0,8108	0,0757	0,1518
TSW	0,5812	-0,6244	0,1536	-0,2208	0,1616
Chla	0,1462	0,7786	0,0769	-0,3188	0,3908
car	0,0331	0,7246	0,2481	-0,3432	0,4512
Erg	0,3618	0,3106	-0,6283	0,4398	0,3286
Quit	0,6538	0,2386	0,1845	0,2486	-0,4462
Taa	0,7669	0,4724	0,1857	0,1797	-0,1465
% Arg	0,4606	0,2167	-0,3281	-0,5383	-0,1783
NH4	-0,2106	0,7725	0,2293	0,2990	-0,1609
N	0,7189	0,6082	-0,1010	0,0183	-0,1754
Gyr	-0,8313	0,3534	-0,1074	0,0367	0,0525
r/(m+a)	-0,2322	-0,0955	0,4904	0,6814	0,2492
Tsug	0,5336	-0,0789	-0,6294	0,4291	0,2943
Amax	-0,5592	0,5908	-0,1437	-0,1153	-0,1331
DR15	-0,4256	0,3861	-0,1549	0,2632	-0,2341

Tabla 3a.17: Correlación entre variables y componentes del ACP consenso de *Lasallia pustulata*.

Table 3a.17: Correlation between variables and components for the consensus PCA of *Lasallia pustulata*.

	Dim 1	Dim 2	Dim 3	Dim 4	Dim 5
Altitude	4,4630	0,1289	31,6836	0,3421	2,2032
TSW	8,4854	10,9709	1,1370	2,9145	2,4942
Chla	0,5367	17,0556	0,2853	6,0731	14,5982
car	0,0276	14,7719	2,9658	7,0397	19,4549
Erg	3,2877	2,7150	19,0242	11,5613	10,3161
Quit	10,7375	1,6014	1,6409	3,6942	19,0284
Taa	14,7710	6,2787	1,6619	1,9291	2,0505
% Arg	5,3293	1,3211	5,1886	17,3150	3,0391
NH4	1,1142	16,7883	2,5342	5,3444	2,4735
N	12,9805	10,4085	0,4920	0,0200	2,9392
Gyr	17,3560	3,5139	0,5559	0,0804	0,2638
r/(m+a)	1,3543	0,2564	11,5906	27,7499	5,9326
Tsug	7,1524	0,1752	19,0895	11,0030	8,2766
Amax	7,8544	9,8190	0,9947	0,7946	1,6923
DR15	4,5500	4,1951	1,1556	4,1387	5,2374

Tabla 3a.18: Contribuciones de cada variable a cada componente del ACP consenso de *Lasallia pustulata*.

Table 3a.18: Contributions of each variable to each component for the consensus PCA of *Lasallia pustulata*.

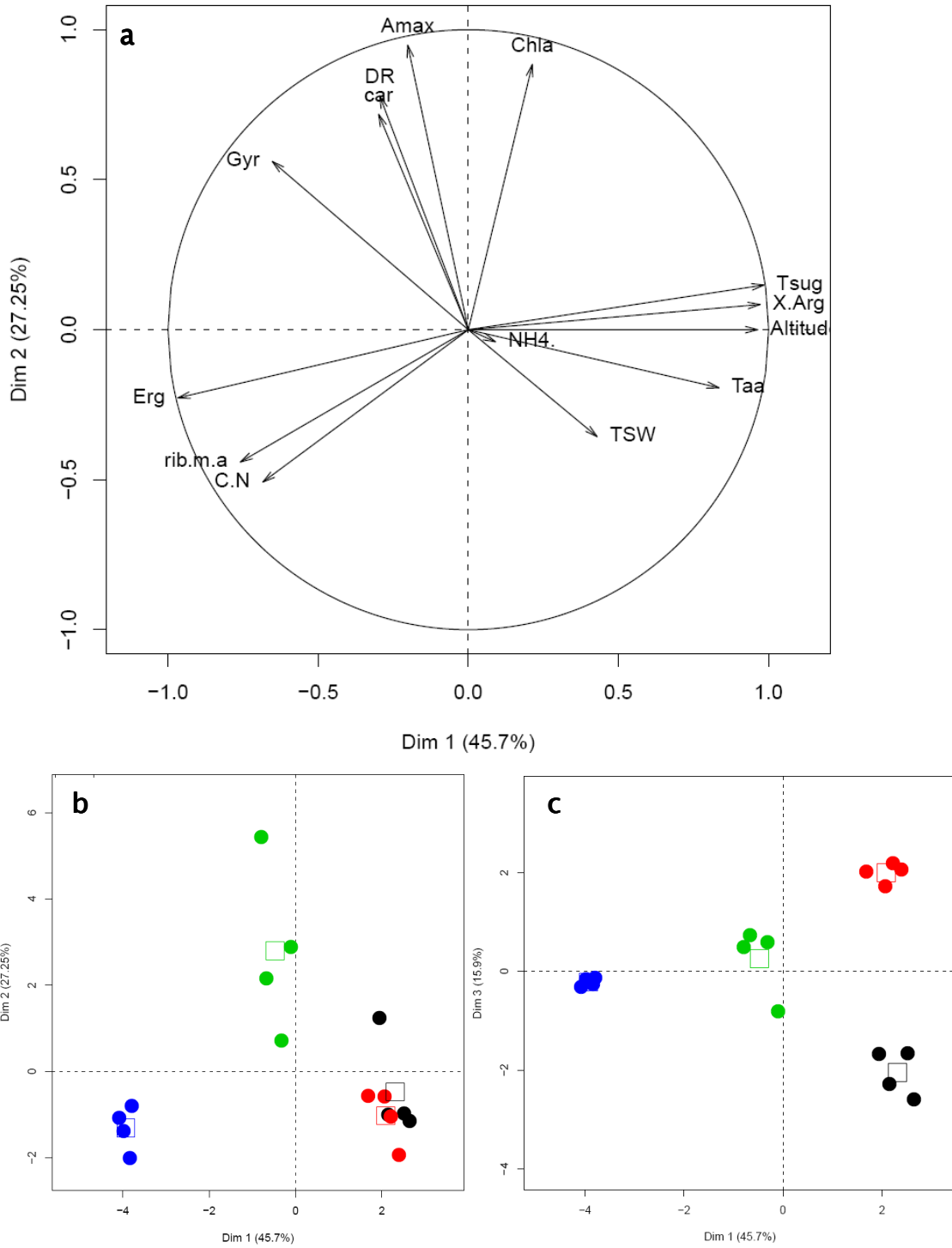


Fig. 3a.37: ACP del primer transecto de *Lasallia hispanica*. (a) Diagrama de variables. (b) Diagrama de individuos Dim. 1 vs. Dim. 2. (c) Diagrama de individuos Dim. 1 vs. Dim. 3. T1-22Lh en negro, T1-20Lh en rojo, T1-18Lh en verde, T1-15Lh en azul.

Fig. 3a.37: PCA of the first transect of *Lasallia hispanica*. (a) Variables factor map. (b) Individuals factor map Dim. 1 vs. Dim. 2. (c) Individuals factor map Dim. 1 vs. Dim. 3. T1-22Lh in black, T1-20Lh in red, T1-18Lh in green, T1-15Lh in blue.

	eigenvalue	% of variance	cumulative % of variance
Comp 1	6,3975	45,6961	45,6961
Comp 2	3,8154	27,2532	72,9493
Comp 3	2,2264	15,9026	88,8519
Comp 4	0,5911	4,2221	93,0740

Tabla 3a.19: Valores propios, porcentaje de varianza y porcentaje de varianza acumulado del primer transecto de *Lasallia hispanica*.

Table 3a.19: Eigenvalues, percentage of variance and cumulative percentage of variance of the first transect of *Lasallia hispanica*.

	Dim 1	Dim 2	Dim 3	Dim 4	Dim 5
Altitude	0,9633	0,0001	-0,2303	-0,0008	-0,1255
TSW	0,4289	-0,3564	-0,7033	0,0725	0,2121
Chla	0,2133	0,8841	-0,1772	0,1859	0,1023
car	-0,2985	0,7176	-0,2671	0,5331	0,0588
Erg	-0,9670	-0,2274	0,0187	0,0828	0,0055
Taa	0,8348	-0,1936	0,4743	0,1790	-0,0656
% Arg	0,9716	0,0841	0,2105	0,0157	-0,0199
NH4	0,0905	-0,0402	0,9631	0,1458	0,1413
C/N	-0,6840	-0,5077	-0,3968	0,0723	-0,2794
Gyr	-0,6527	0,5609	0,1073	-0,3398	0,3333
r/(m+a)	-0,7591	-0,4411	0,3975	0,2404	-0,0278
Tsug	0,9845	0,1489	-0,0313	-0,0462	-0,0383
Amax	-0,2017	0,9481	-0,0415	0,0031	-0,0941
DR	-0,2946	0,7785	0,2216	-0,1616	0,3946

Tabla 3a.20: Correlación entre variables y componentes del primer transecto de *Lasallia hispanica*.

Table 3a.20: Correlation between variables and components for the first transect of *Lasallia hispanica*.

	Dim 1	Dim 2	Dim 3	Dim 4	Dim 5
Altitude	14,5052	0,0000	2,3814	0,0001	3,4594
TSW	2,8757	3,3282	22,2175	0,8883	9,8835
Chla	0,7109	20,4859	1,4100	5,8481	2,2988
car	1,3926	13,4972	3,2047	48,0728	0,7592
Erg	14,6180	1,3553	0,0157	1,1595	0,0066
Taa	10,8931	0,9819	10,1054	5,4197	0,9445
% Arg	14,7556	0,1853	1,9898	0,0417	0,0870
NH4	0,1281	0,0423	41,6646	3,5968	4,3872
C/N	7,3134	6,7556	7,0704	0,8845	17,1412
Gyr	6,6588	8,2446	0,5169	19,5292	24,3928
r/(m+a)	9,0061	5,0992	7,0959	9,7787	0,1692
Tsug	15,1497	0,5812	0,0439	0,3604	0,3217
Amax	0,6359	23,5604	0,0775	0,0016	1,9449
DR	1,3568	15,8830	2,2064	4,4186	34,2038

Tabla 3a.21: Contribuciones de cada variable a cada componente para el primer transecto de *Lasallia hispanica*.

Table 3a.21: Contributions of each variable to each component for the first transect of *Lasallia hispanica*.

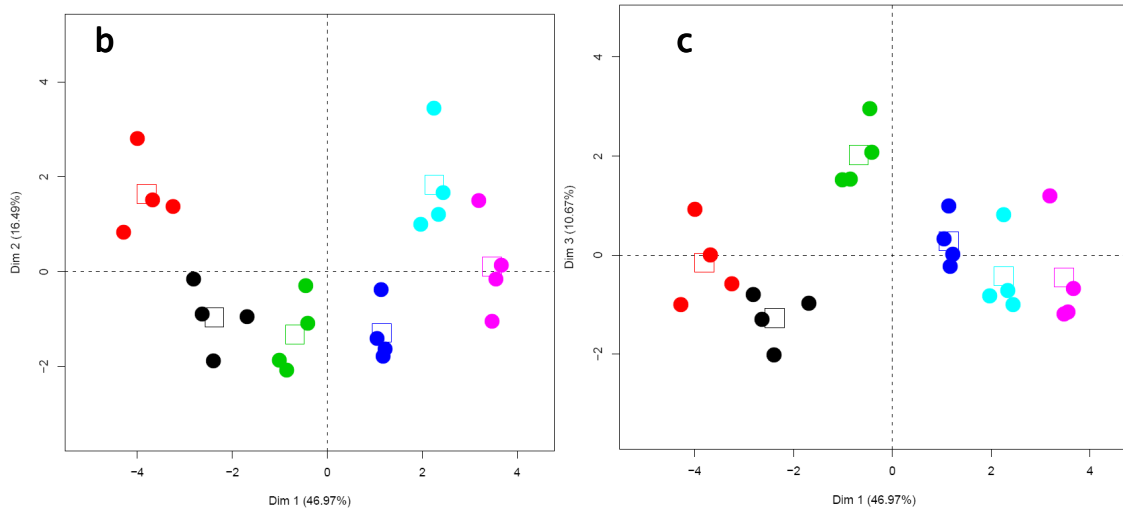
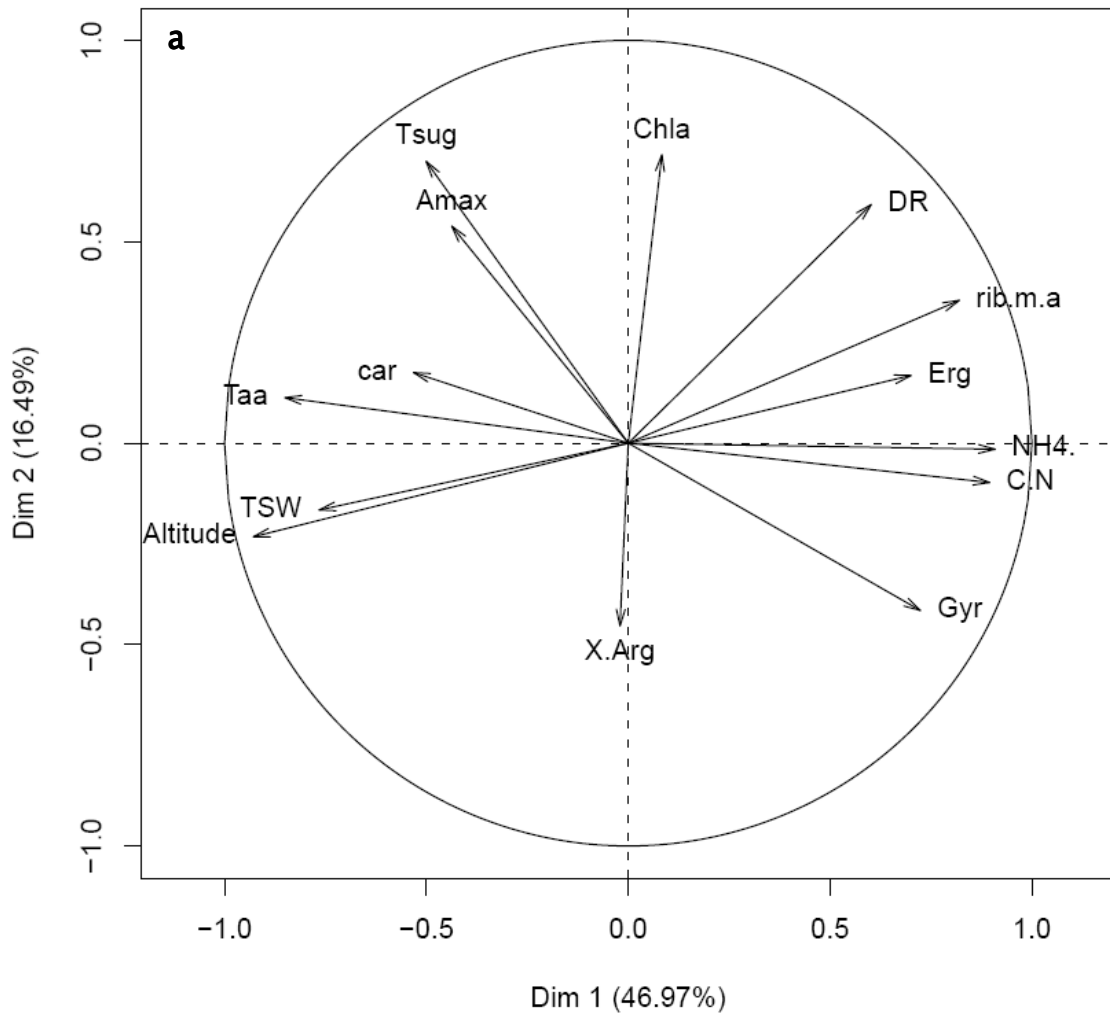


Fig. 3a.38: ACP del segundo transecto de *Lasallia hispanica*. (b) Diagrama de individuos Dim. 1 vs. Dim. 2. (c) Diagrama de individuos Dim. 1 vs. Dim. 3. T2-21Lh: Negro, T2-20Lh: rojo, T2-18Lh: verde, T2-17Lh: azul oscuro, T2-15Lh: azul claro, T2-13Lh: rosa.

Fig. 3a.38: PCA of the second transect of *Lasallia hispanica*. (b) Individuals factor map Dim. 1 vs. Dim. 2. (c) Individuals factor map Dim. 1 vs. Dim. 3. T2-21Lh: Black, T2-20Lh: red, T2-18Lh: green, T2-17Lh: deep blue, T2-15Lh: light blue, T2-13Lh: pink.



	eigenvalue	% of variance	cumulative % of variance
Comp 1	6,5753	46,9663	46,9663
Comp 2	2,3085	16,4890	63,4553
Comp 3	1,4933	10,6665	74,1218
Comp 4	1,2384	8,8455	82,9673
Comp 5	0,8316	5,9403	88,9076

Tabla 3a.22: Valores propios, porcentaje de varianza y porcentaje de varianza acumulado del segundo transecto de *Lasallia hispanica*.

Table 3a.22: Eigenvalues, percentage of variance and cumulative percentage of variance of the second transect of *Lasallia hispanica*.

	Dim 1	Dim 2	Dim 3	Dim 4	Dim 5
Altitude	-0,9283	-0,2323	-0,0454	0,0954	-0,1741
TSW	-0,7654	-0,1658	-0,1457	0,0058	0,2327
Chla	0,0832	0,7156	0,5657	0,2891	-0,0211
car	-0,5318	0,1753	-0,0498	0,6035	-0,4633
Erg	0,7002	0,1680	0,0418	0,5519	0,3770
Taa	-0,8500	0,1129	-0,0332	-0,0844	0,2336
% Arg	-0,0204	-0,4532	0,7993	-0,1890	0,1474
NH4	0,9082	-0,0150	0,0301	-0,3277	-0,1080
C/N	0,8948	-0,0976	-0,2302	-0,1407	-0,2948
Gyr	0,7233	-0,4152	0,3070	0,2101	0,1294
r/(m+a)	0,8198	0,3545	-0,1084	0,2216	0,0630
Tsug	-0,5007	0,6996	-0,1924	-0,1854	0,3439
Amax	-0,4370	0,5384	0,5378	-0,2734	-0,2737
DR	0,6018	0,5923	-0,1399	-0,3232	-0,0350

Tabla 3a.23: Correlación entre variables y componentes para el segundo transecto de *Lasallia hispanica*.

Table 3a.23: Correlation between variables and components for the second transect of *Lasallia hispanica*.

	Dim 1	Dim 2	Dim 3	Dim 4	Dim 5
Altitude	13,1057	2,3368	0,1382	0,7349	3,6427
TSW	8,9097	1,1910	1,4210	0,0027	6,5127
Chla	0,1053	22,1814	21,4309	6,7495	0,0536
car	4,3004	1,3308	0,1662	29,4074	25,8071
Erg	7,4568	1,2230	0,1170	24,5958	17,0896
Taa	10,9886	0,5524	0,0736	0,5746	6,5643
% Arg	0,0063	8,8954	42,7876	2,8849	2,6110
NH4	12,5453	0,0098	0,0606	8,6740	1,4033
C/N	12,1781	0,4127	3,5491	1,5982	10,4531
Gyr	7,9567	7,4663	6,3116	3,5658	2,0121
r/(m+a)	10,2218	5,4438	0,7869	3,9639	0,4775
Tsug	3,8130	21,2011	2,4799	2,7754	14,2191
Amax	2,9043	12,5571	19,3663	6,0354	9,0064
DR	5,508	15,1984	1,3112	8,4375	0,1476

Tabla 3a.24: Contribuciones de cada variable a cada componente del segundo transecto de *Lasallia hispanica*

Table 3a.24: Contributions of each variable to each component for the second transect of *Lasallia hispanica*.

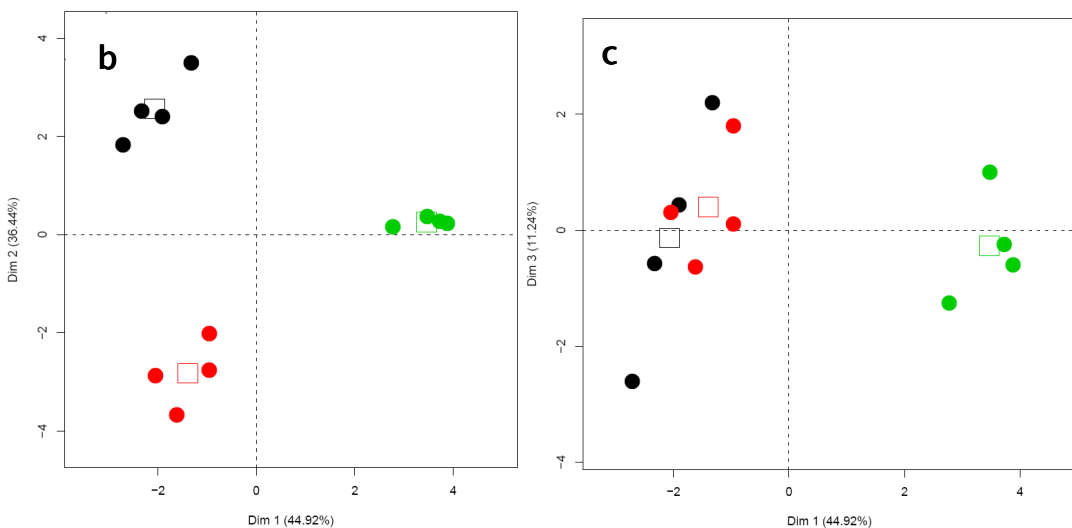
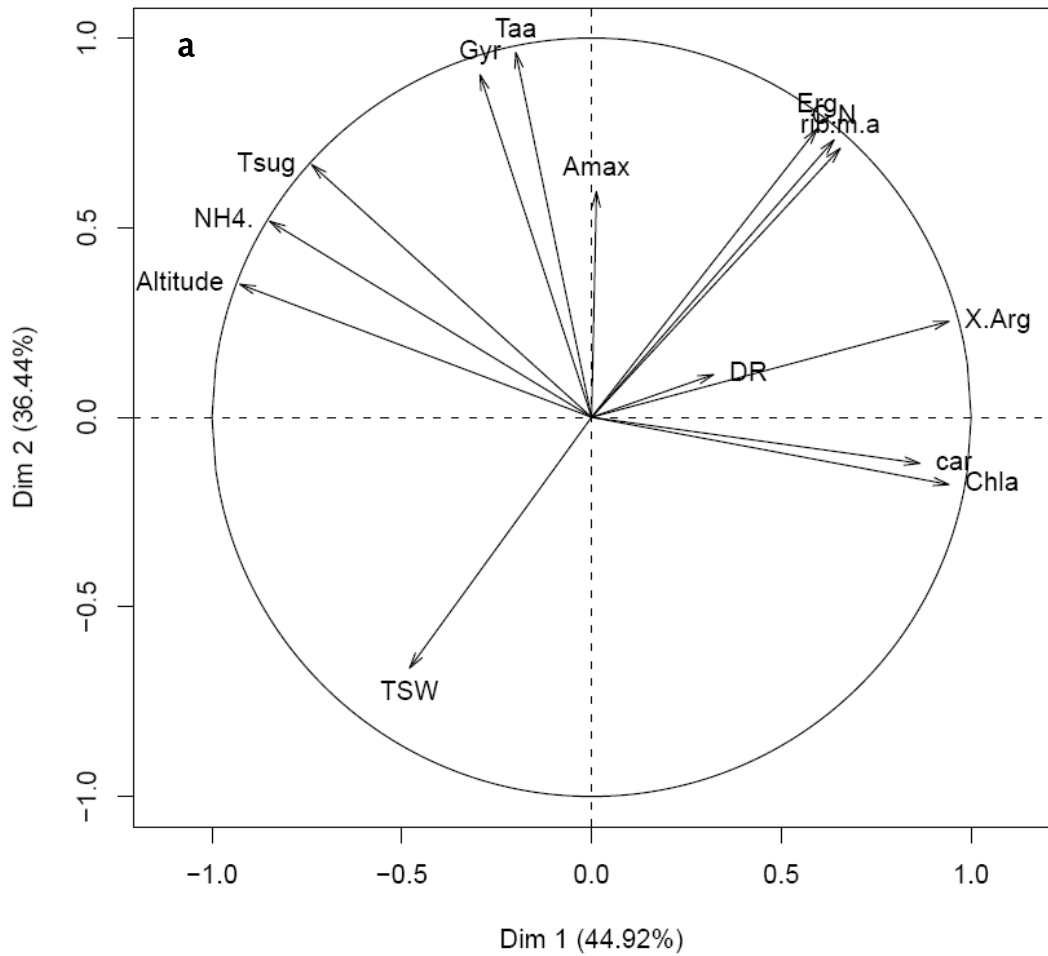


Fig. 3a.39: ACP del tercer transecto de *Lasallia hispanica*. (b) Diagrama de individuos Dim. 1 vs. Dim. 2. (c) Diagrama de individuos Dim. 1 vs. Dim. 3. T3-21Lh: Negro, T3-19Lh: rojo, T3-17Lh: verde.  
 Fig. 3a.39: PCA of the third transect of *Lasallia hispanica*. (b) Individuals factor map Dim. 1 vs. Dim. 2. (c) Individuals factor map Dim. 1 vs. Dim. 3. T3-21Lh: Black, T3-19Lh: red, T3-17Lh: green.

	eigenvalue	% of variance	cumulative % of variance
Comp 1	6,2887	44,9196	44,9196
Comp 2	5,1018	36,4417	81,3613
Comp 3	1,5739	11,2422	92,6035
Comp 4	0,4426	3,1614	95,7648
Comp 5	0,3233	2,3093	98,0741

Tabla 3a.25: Valores propios, porcentaje de varianza y porcentaje de varianza acumulado del tercer transecto de *Lasallia hispanica*.

Table 3a.25: Eigenvalues, percentage of variance and cumulative percentage of variance of the third transect of *Lasallia hispanica*.

	Dim 1	Dim 2	Dim 3	Dim 4	Dim 5
Altitude	-0,9264	0,3506	-0,0609	0,0408	0,1012
TSW	-0,4791	-0,6609	0,4200	-0,1981	0,2779
Chla	0,9410	-0,1773	0,0608	0,0982	0,1487
car	0,8645	-0,1214	-0,1072	0,1940	0,4044
Erg	0,5944	0,7607	0,2299	-0,0661	-0,0293
Taa	-0,1997	0,9613	0,1584	-0,0271	0,0539
% Arg	0,9414	0,2529	0,1798	-0,0661	-0,0808
NH4	-0,8477	0,5168	-0,0177	0,0294	0,0997
C/N	0,6387	0,7313	0,1317	-0,0277	0,0300
Gyr	-0,2937	0,9026	0,1960	-0,1037	0,0999
r/(m+a)	0,6552	0,7091	0,2284	-0,0676	-0,0369
Tsug	-0,7371	0,6658	0,0265	0,0167	0,0945
Amax	0,0129	0,5949	-0,7223	0,3010	0,0062
DR15	0,3210	0,1125	0,7985	0,4869	0,0937

Tabla 3a.26: Correlación entre variables y componentes para el tercer transecto de *Lasallia hispanica*.

Table 3a.26: Correlation between variables and components for the third transect of *Lasallia hispanica*.

	Dim 1	Dim 2	Dim 3	Dim 4	Dim 5
Altitude	13,6463	2,4088	0,2353	0,3755	3,1669
TSW	3,6503	8,5618	11,2103	8,8695	23,8851
Chla	14,0808	0,6162	0,2347	2,1794	6,8364
car	11,8844	0,2890	0,7296	8,5064	50,5779
Erg	5,6190	11,3420	3,3580	0,9878	0,2649
Taa	0,6339	18,1123	1,5938	0,1663	0,8972
% Arg	14,0931	1,2537	2,0539	0,9879	2,0188
NH4	11,4272	5,2344	0,0200	0,1947	3,0737
C/N	6,4861	10,4824	1,1013	0,1727	0,2775
Gyr	1,3720	15,9700	2,4417	2,4295	3,0866
r/(m+a)	6,8272	9,8569	3,3134	1,0337	0,4221
Tsug	8,6385	8,6878	0,0446	0,0634	2,7625
Amax	0,0026	6,9369	33,1477	20,4694	0,0121
DR	1,6387	0,2479	40,5154	53,5645	2,7183

Tabla 3a.27: Contribuciones de cada variable a cada componente del tercer transecto de *Lasallia hispanica*.

Table 3a.27: Contributions of each variable to each component for the third transect of *Lasallia hispanica*.

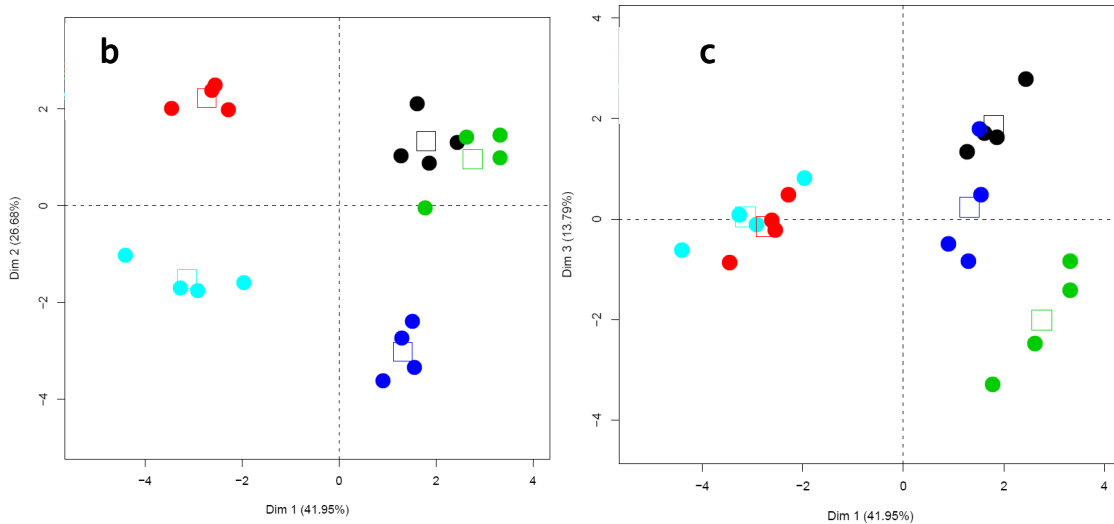
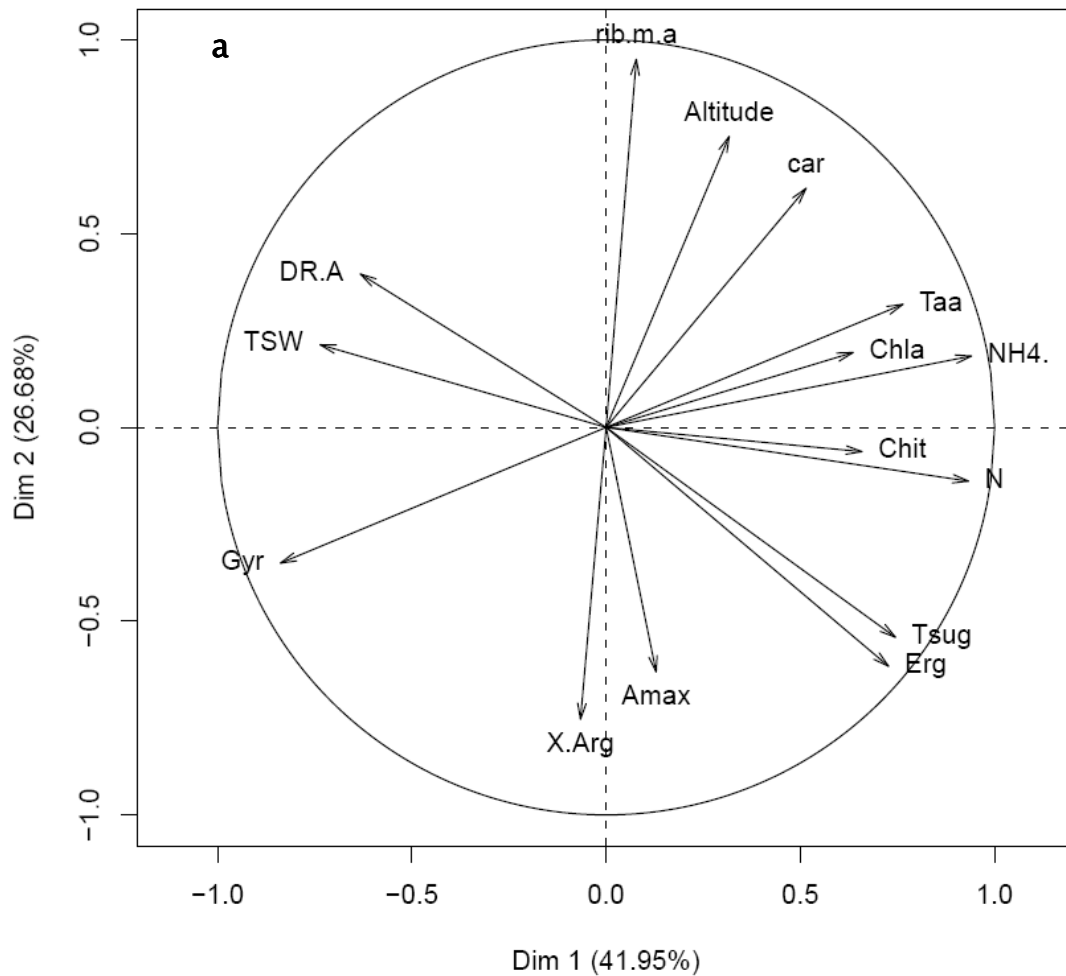


Fig. 3a.40: ACP del primer transecto de *Lasallia pustulata*. (b) Diagrama de individuos Dim. 1 vs. Dim. 2. (c) Diagrama de individuos Dim. 1 vs. Dim. 3. T1-17Lp: Negro, T1-14Lp: rojo, T1-12Lp: verde, T1-10Lp: azul oscuro, T1-9Lp: azul claro.

Fig. 3a.40: PCA of the first transect of *Lasallia pustulata*. (b) Individuals factor map Dim. 1 vs. Dim. 2. (c) Individuals factor map Dim. 1 vs. Dim. 3. T1-17Lp: Black, T1-14Lp: red, T1-12Lp: green, T1-10Lp: deep blue, T1-9Lp: light blue.

	eigenvalue	% of variance	cumulative % of variance
Comp 1	6,2924	41,9493	41,9493
Comp 2	4,0020	26,6802	68,6294
Comp 3	2,0683	13,7887	82,4181
Comp 4	0,7707	5,1381	87,5563
Comp 5	0,6486	4,3238	91,8800

Tabla 3a.28: Valores propios, porcentaje de varianza y porcentaje de varianza acumulado del primer transecto de *Lasallia pustulata*.

Table 3a.28: Eigenvalues, % of variance and cumulative % of variance of the first transect of *Lasallia pustulata*.

	Dim 1	Dim 2	Dim 3	Dim 4	Dim 5
Altitude	0,3167	0,7505	0,3907	0,1890	0,2672
TSW	-0,7360	0,2133	-0,0125	0,4266	0,2274
Chla	0,6355	0,1931	0,5047	-0,2756	0,0092
car	0,5145	0,6165	0,5407	-0,0687	-0,0293
Erg	0,7269	-0,6164	0,1203	0,2407	0,1047
Quit	0,6583	-0,0625	-0,5870	-0,1964	0,3406
Taa	0,7640	0,3176	-0,4778	0,0991	-0,0187
% Arg	-0,0659	-0,7526	0,4975	0,3044	0,1960
NH4	0,9403	0,1840	-0,0306	0,2147	0,1376
N	0,9325	-0,1387	-0,2950	0,1173	0,0115
Gyr	-0,8378	-0,3501	-0,2996	-0,0140	-0,0389
r/(m+a)	0,0778	0,9496	-0,0991	-0,0432	-0,1078
Tsug	0,7445	-0,5415	-0,3068	-0,0087	-0,0945
Amax	0,1287	-0,6307	0,3836	-0,4287	0,2759
DR.A	-0,6322	0,3956	-0,3236	-0,1664	0,4914

Tabla 3a.29: Correlación entre variables y componentes para el primer transecto de *Lasallia pustulata*.

Table 3a.29: Correlation between variables and components for the first transect of *Lasallia pustulata*.

	Dim 1	Dim 2	Dim 3	Dim 4	Dim 5
Altitude	1,5935	14,0726	7,3807	4,6371	11,0101
TSW	8,6077	1,1364	0,0076	23,6078	7,9718
Chla	6,4175	0,9319	12,3162	9,8529	0,0131
car	4,2064	9,4984	14,1348	0,6117	0,1325
Erg	8,3982	9,4940	0,6994	7,5153	1,6913
Quit	6,8864	0,0977	16,6577	5,0032	17,8842
Taa	9,2754	2,5198	11,0379	1,2741	0,0537
% Arg	0,0690	14,1526	11,9687	12,0190	5,9220
NH4	14,0513	0,8460	0,0452	5,9823	2,9194
N	13,8192	0,4804	4,2087	1,7850	0,0205
Gyr	11,1541	3,0630	4,3390	0,0255	0,2334
r/(m+a)	0,0962	22,5316	0,4751	0,2424	1,7926
Tsug	8,8099	7,3260	4,5519	0,0099	1,3778
Amax	0,2634	9,9387	7,1138	23,8423	11,7388
DR.A	6,3519	3,9107	5,0634	3,5915	37,2386

Tabla 3a.30: Contribuciones de cada variable a cada componente del primer transecto de *Lasallia pustulata*.

Table 3a.30: Contributions of each variable to each component for the first transect of *Lasallia pustulata*.

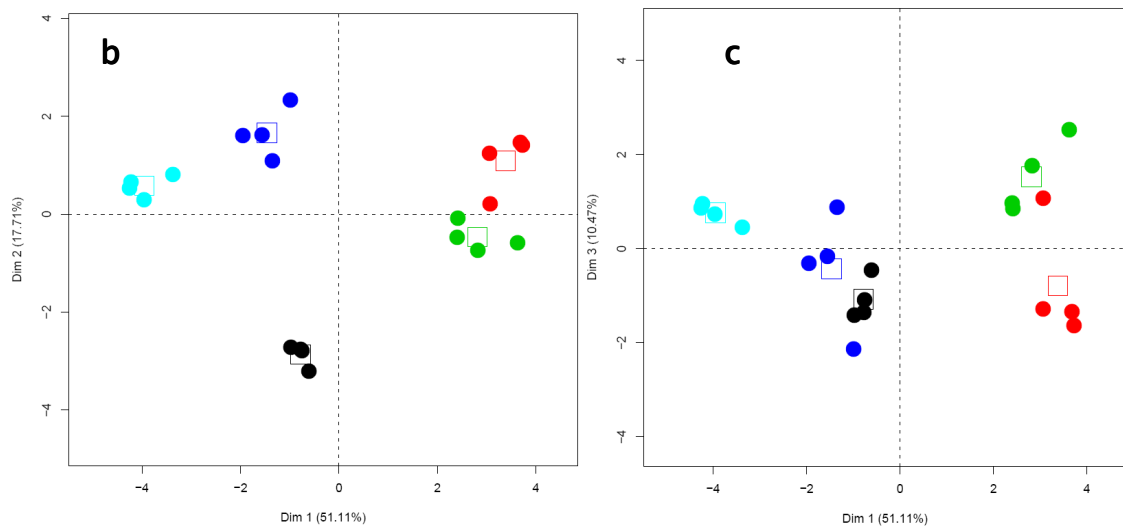
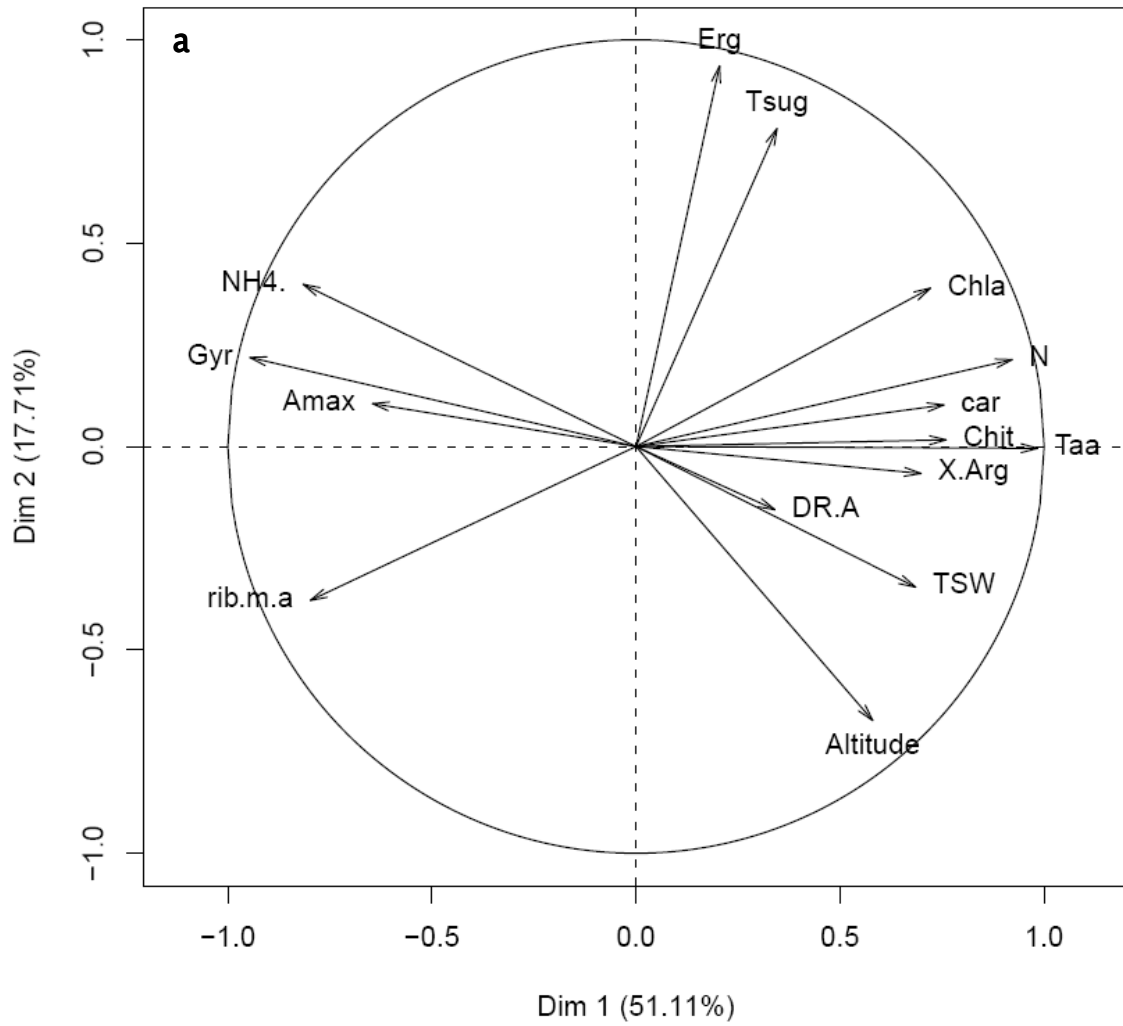


Fig. 3a.41: ACP del segundo transecto de *Lasallia pustulata*. (b) Diagrama de individuos Dim. 1 vs. Dim. 2. (c) Diagrama de individuos Dim. 1 vs. Dim. 3. T2-17Lp: Negro, T2-15Lp: rojo, T2-13Lp: verde, T2-11Lp: azul oscuro, T2-9Lp: azul claro.

Fig. 3a.41: PCA of the second transect of *Lasallia pustulata*. (b) Individuals factor map Dim. 1 vs. Dim. 2. (c) Individuals factor map Dim. 1 vs. Dim. 3. T2-17Lp: Black, T2-15Lp: red, T2-13Lp: green, T2-11Lp: deep blue, T2-9Lp: light blue.

	eigenvalue	% of variance	cumulative % of variance
Comp 1	7,6658	51,1054	51,1054
Comp 2	2,6563	17,7087	68,8141
Comp 3	1,5704	10,4694	79,2835
Comp 4	1,2633	8,4221	87,7056
Comp 5	0,8742	5,8281	93,5337

Tabla 3a.31: Valores propios, porcentaje de varianza y porcentaje de varianza acumulado del segundo transecto de *Lasallia pustulata*.

Table 3a.31: Eigenvalues, % of variance and cumulative % of variance of the second transect of *Lasallia pustulata*.

	Dim 1	Dim 2	Dim 3	Dim 4	Dim 5
Altitude	0,5799	-0,6735	-0,4178	0,1210	-0,1003
TSW	0,6848	-0,3456	0,1648	0,1812	-0,4883
Chla	0,7218	0,3895	-0,2236	-0,3278	0,0899
car	0,7542	0,1022	-0,2966	-0,3486	0,3044
Erg	0,2048	0,9355	-0,0323	0,1813	-0,2030
Quit	0,7597	0,0164	-0,0416	0,4786	0,3482
Taa	0,9840	-0,0044	0,0930	0,0162	0,0651
% Arg	0,6981	-0,0662	0,4838	-0,4847	0,0323
NH4	-0,8152	0,3986	0,2099	-0,2958	-0,1633
N	0,9216	0,2136	0,1152	0,1650	0,1571
Gyr	-0,9459	0,2189	0,1556	-0,0059	0,1347
r/(m+a)	-0,7974	-0,3781	-0,3852	0,1864	-0,0651
Tsug	0,3453	0,7814	-0,2965	0,3326	-0,2561
Amax	-0,6454	0,1053	0,2132	0,3727	0,4588
DR15	0,3402	-0,1552	0,7887	0,3014	-0,0867

Tabla 3a.32: Correlación entre variables y componentes para el segundo transecto de *Lasallia pustulata*.

Table 3a.32: Correlation between variables and components for the second transect of *Lasallia pustulata*.

	Dim 1	Dim 2	Dim 3	Dim 4	Dim 5
Altitude	4,3864	17,0751	11,1134	1,1591	1,1502
TSW	6,1171	4,4970	1,7304	2,5984	27,2701
Chla	6,7964	5,7126	3,1836	8,5033	0,9248
car	7,4199	0,3929	5,6026	9,6196	10,6011
Erg	0,5473	32,9468	0,0663	2,6006	4,7140
Quit	7,5296	0,0101	0,1101	18,1283	13,8664
Taa	12,6297	0,0007	0,5510	0,0209	0,4852
% Arg	6,3580	0,1650	14,9035	18,5979	0,1192
NH4	8,6690	5,9817	2,8051	6,9243	3,0499
N	11,0804	1,7180	0,8444	2,1555	2,8229
Gyr	11,6709	1,8041	1,5412	0,0027	2,0741
r/(m+a)	8,2953	5,3832	9,4480	2,7500	0,4854
Tsug	1,5556	22,9884	5,5975	8,7569	7,5024
Amax	5,4344	0,4176	2,8944	10,9940	24,0751
DR15	1,5101	0,9069	39,6085	7,1887	0,8591

Tabla 3a.33: Contribuciones de cada variable a cada componente del segundo transecto de *Lasallia pustulata*.

Table 3a.33: Contributions of each variable to each component for the second transect of *Lasallia pustulata*

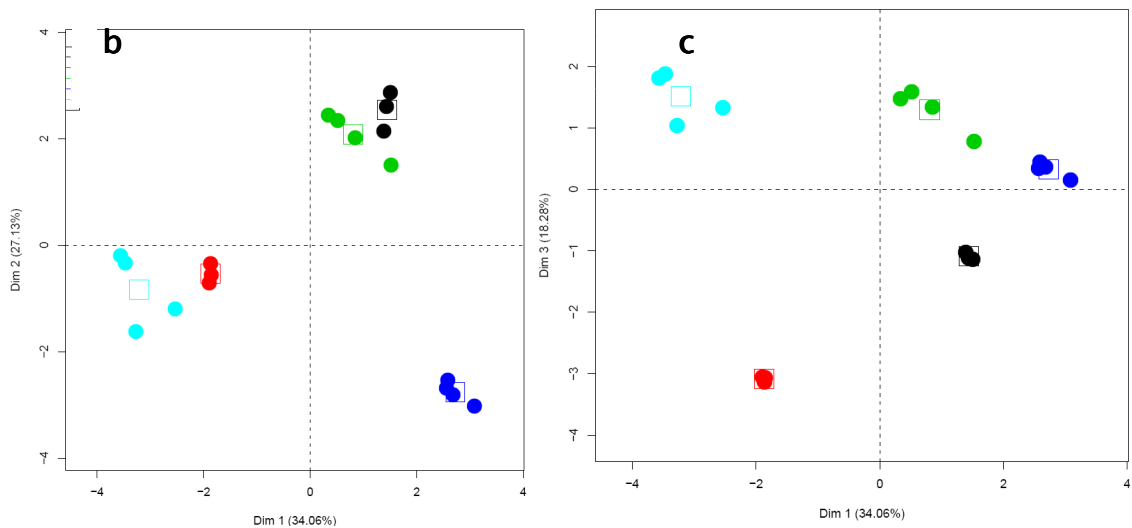
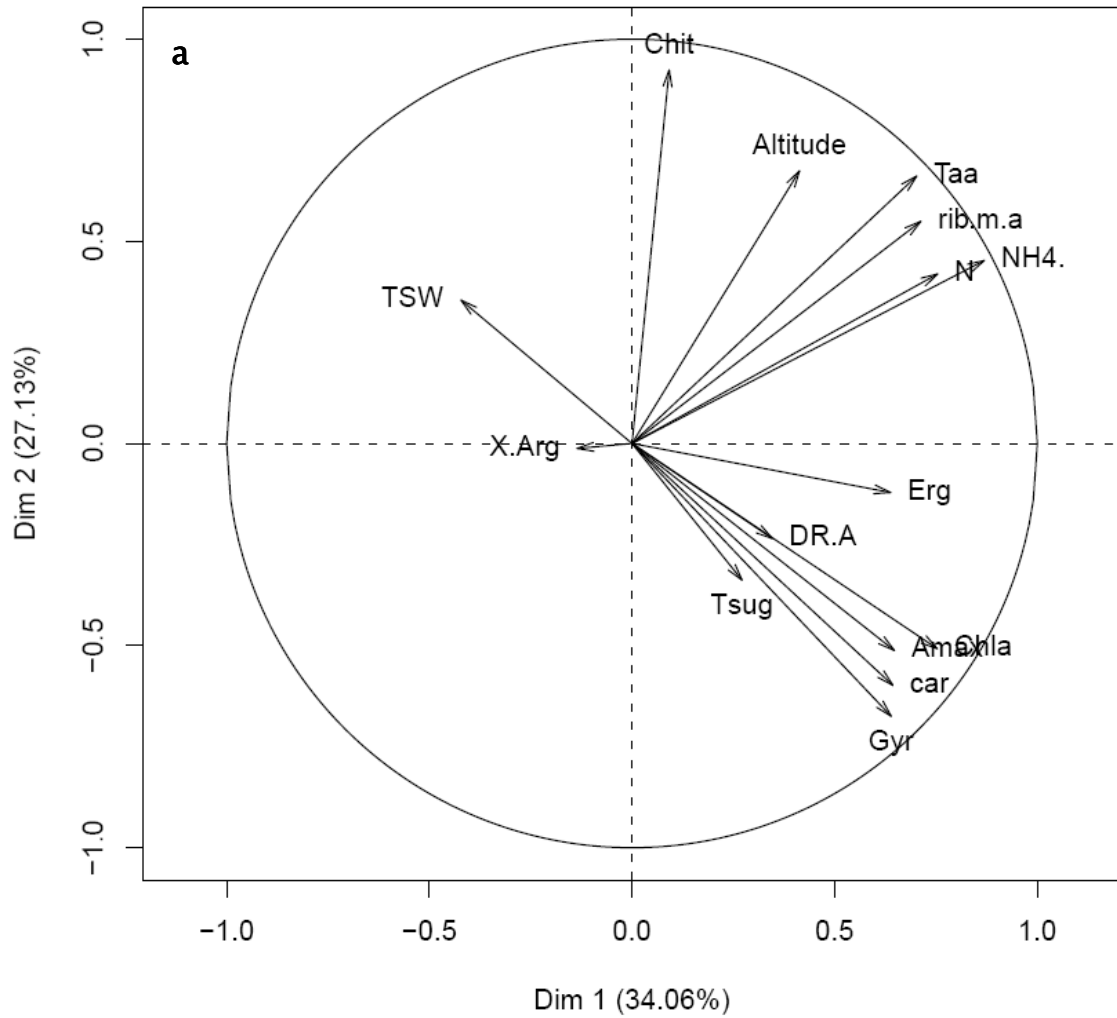


Fig. 3a.40: ACP del tercer transecto de *Lasallia pustulata*. (b) Diagrama de individuos Dim. 1 vs. Dim. 2. (c) Diagrama de individuos Dim. 1 vs. Dim. 3. T3-17Lp: Negro, T3-15Lp: rojo, T3-14p: verde, T3-11Lp: azul oscuro, T3-9Lp: azul claro.

Fig. 3a.42: PCA of the third transect of *Lasallia pustulata*. (b) Individuals factor map Dim. 1 vs. Dim. 2. (c) Individuals factor map Dim. 1 vs. Dim. 3. T3-17Lp: Black, T3-15Lp: red, T3-14Lp: green, T3-11Lp: deep blue, T3-9Lp: light blue.



	eigenvalue	% of variance	cumulative % of variance
Comp 1	5,1085	34,0564	34,0564
Comp 2	4,0694	27,1293	61,1857
Comp 3	2,7424	18,2824	79,4681
Comp 4	1,4197	9,4644	88,9325
Comp 5	0,8133	5,4218	94,3542

Tabla 3a.34: Valores propios, porcentaje de varianza y porcentaje de varianza acumulado del tercer transecto de *Lasallia pustulata*.

Table 3a.34: Eigenvalues, % of variance and cumulative % of variance of the third transect of *Lasallia pustulata*.

	Dim 1	Dim 2	Dim 3	Dim 4	Dim 5
Altitude	0,4131	0,6741	-0,6068	0,0181	0,0301
TSW	-0,4216	0,3543	0,1800	0,7392	0,0686
Chla	0,7530	-0,5076	-0,2704	0,0322	0,0170
car	0,6435	-0,5982	-0,2698	-0,2771	0,0926
Erg	0,6379	-0,1213	0,7491	-0,0082	-0,1068
Quit	0,0917	0,9233	-0,1616	-0,1341	0,1785
Taa	0,7024	0,6614	0,1670	0,0146	-0,1553
% Arg	-0,1351	-0,0123	0,7460	-0,1216	0,6364
NH4	0,8689	0,4525	0,1695	0,0050	-0,0555
N	0,7537	0,4190	0,2818	0,0583	-0,2904
Gyr	0,6394	-0,6747	-0,2554	-0,0381	0,1490
r/(m+a)	0,7126	0,5494	-0,0424	-0,0549	0,4176
Tsug	0,2715	-0,3380	0,8863	-0,0108	-0,1406
Amax	0,6471	-0,5120	-0,2379	0,2825	0,0992
DR15	0,3464	-0,2351	-0,0827	0,8211	0,1132

Tabla 3a.35: Correlación entre variables y componentes para el tercer transecto de *Lasallia pustulata*.

Table 3a.35: Correlation between variables and components for the third transect of *Lasallia pustulata*.

	Dim 1	Dim 2	Dim 3	Dim 4	Dim 5
Altitude	3,3407	11,1676	13,4267	0,0231	0,1111
TSW	3,4792	3,0856	1,1814	38,4873	0,5779
Chla	11,1008	6,3314	2,6656	0,0730	0,0354
car	8,1070	8,7935	2,6541	5,4074	1,0547
Erg	7,9661	0,3616	20,4641	0,0047	1,4018
Quit	0,1646	20,9483	0,9520	1,2672	3,9163
Taa	9,6579	10,7500	1,0173	0,0151	2,9640
% Arg	0,3574	0,0037	20,2947	1,0418	49,8042
NH4	14,7782	5,0305	1,0473	0,0017	0,3794
N	11,1191	4,3148	2,8965	0,2395	10,3688
Gyr	8,0019	11,1864	2,3780	0,1021	2,7302
r/(m+a)	9,9401	7,4183	0,0656	0,2127	21,4423
Tsug	1,4426	2,8081	28,6436	0,0083	2,4303
Amax	8,1961	6,4413	2,0638	5,6210	1,2090
DR15	2,3483	1,3588	0,2492	47,4951	1,5747

Tabla 3a.24: Contribuciones de cada variable a cada componente del tercer transecto de *Lasallia pustulata*.

Table 3a.36: Contributions of each variable to each component for the third transect of *Lasallia pustulata*.

For the first transect of *Lasallia hispanica* (Fig. 3a.37 and tables 3a.19 to 3a.21) we could observe a principal axis, which accounted for the 46% of the total variance, with high positive correlation values with altitude, Taa, % Arg and Tsug, and high negative correlation values with Erg, C/N, Gyr and ribitol to mannitol+arabitol. The second axis accounted for a 27% more of the variance, and it was mainly defined by Chla, carotenes, Gyr, DR and Amax, with positive coefficients, and C/N, with negative coefficients. We could also take into account the third axis, in which NH<sub>4</sub><sup>+</sup> is the main positive influence, while TSW is the main negative effect. Altogether, these three components explain the 89% of the variance of our data (Table 3a.19). In the individuals factor map (Fig. 3a.37b) we can see that the two populations from the highest points (2200 and 2000 m.a.s.l.) group together in the fourth quadrant, fairly close to the X axis, indicating that they tend to have high values of Taa, % Arg, Tsug, and low values of Erg, rib/(m+a), Gyr and C/N. The lowest population (1500 m) shows an opposite tendency for the first axis, with low values of Taa, % Arg, Tsug, and high values of Erg, rib/(m+a), Gyr and C/N. But the position of most of the samples from these altitudes is similar with respect to the second axis, indicating that they tend to have low rates of both DR and NP rates, as well as low concentration of pigments. The individuals factor map depicted in Fig. 3a.37c plots the first axis vs. the third one. This is highly informative in order to separate the two highest populations. Therefore, they differ in their relative amount of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> and their TSW, which are high and low respectively for T1-22Lh (2000 m) and the opposite for the highest point.

In the second transect (Fig. 3a.38 and tables 3a.22 to 3a.24), the first axis of the PCA was mainly defined again by altitude, Tsug and Taa on the negative side and Erg, C/N, rib/(m+a) and Gyr with positive coefficients. Now, also carotenes and TSW had a high negative correlation with this component and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> and DR a high positive one. This axis accounted for the 47% of the total variance. The second axis had a high positive correlation with Chla, Tsug and Amax and a high negative correlation with DR. It accounted for a 16% of the variance. The third component was mainly defined by the positive effect of %Arg, Amax and Chla, and explained a further 11% of the variance. A fourth axis, defined positively by carotenes and Erg is necessary to explain an 83% of the total variance. Replicates from each altitude appear more dispersed than in the first transect. Samples belonging to T2-21Lh, T2-18Lh and T2-17Lh (i.e., 2100, 1800 and 1700 m) appear fairly close to the middle of the individuals factor plot, below the first axis, i.e., tending to have negative values of the second component, and, hence, high values of Chla, Tsug and Amax. The three highest locations, T2-21Lh, T2-20Lh and T2-18Lh are at the left of the second axis, with higher values of Tsug, Taa, carotenes, DR and TSW and lower values of Erg, C/N, rib/(m+a), Gyr and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> compared to the lowest locations, T2-17Lh, T2-15Lh and T2-13Lh, which are placed on the right side of the first axis. T2-20Lh and T2-15Lh (1950 and 1480 m respectively), at the top of the plot, have high values of Chla, Tsug and Amax. The individuals factor plot of the first and third components separates T2-21Lh of T2-18Lh by their difference of values taken on the third axis, having T2-18Lh higher Chla, %Arg and Amax than T2-21Lh. The plot between components 1 and 4 (not shown) did not contribute to a better separation of the populations.

The PCA of the third transect (Fig. 3a.39 and tables 3a.25 to 3a.27) separated very clearly the three sampled localities. The three first axes accounted for the 93% of the total variance. The first component (45% of the variance) was defined by altitude, together with NH<sub>4</sub><sup>+</sup> and Tsug in the negative side, and Chla, carotenes, Erg, %Arg, C/N and rib(m+a) in the positive side. The second axis (36%) was mainly influenced by the strong positive effect of Taa, Gyr, r/(m+a), Tsug, Erg, C/N, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> and Amax, and the negative effect of TSW. The third component, which accounted for an 11% of total variance, was mainly defined by DR and Amax in opposite directions. T3-21Lh (2110 m) appeared on the top left quadrant, indicating high values for Tsug,

NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, Gyr, Taa, r/(m+a). The plot between components 1 and 3 grouped T3-21Lh and T3-19Lh, thus indicating that the three points showed similar rates of DR and Amax.

For the first transect of *Lasallia pustulata* (Fig. 3a.40 and tables 3a.28 to 3a.29) we could observe a principal axis, which accounted for the 42% of the total variance, with high positive correlation values with NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, N, Taa, Tsug, Erg, Chit, Chla and car and high negative correlation values with Gyr, TSW and DR. The second axis accounted for an additional 27% of the variance, and was mainly defined by rib/(m+a) ratio, altitude and car, on the positive side, and %Arg, Amax, Erg and Tsug with negative coefficients. The third axis, in which carotenes and Chla contents are the main positive influence, while Chit is the main negative effect, accounted for a 14% of the variance. In the individuals factor map (Fig. 3a.40b) we can see that T1-17Lp and T1-12Lp populations (1700 and 1200 m respectively) group together on the top right quadrant, completely opposed to T1-9Lp (850 m) population, i.e., the former high populations have higher values of NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, N, Taa, Tsug, Erg, Chit, Chla, car and rib/(m+a) and lower values of Gyr, TSW, DR and %Arg than T1-9Lp. There is also an opposite behaviour between T1-14Lp (1400 m) and T1-10Lp (1000 m), as they occupy the fourth and the second quadrants respectively. The third axis separates T1-17Lp and T1-12Lp populations, as T1-17Lp tends to show larger values of car and Chla, whereas its Chit content is lower than in T1-12Lp.

The second transect (Fig. 3a.41 and tables 3a.31 to 3a.33) showed a highly informative first axis, which accounted for the 51% of the total variance. This axis was defined by the positive effect of Taa, N, car, Chla, Chit, TSW, altitude and %Arg, and the negative effect of Gyr, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, r/(m+a) and Amax. The second component, with an additional 18%, was positive for Erg and Tsug, and negative for altitude. The third axis was mainly defined by DR, and accounted for a 10% of the variance. For the fourth axis, with an 8%, the main contributors were Chit and %Arg in an opposite way. With respect to the first component, populations were grouped as follows: T2-15Lp (1480 m) and T2-13Lp (1335 m) on the right side, then, with a higher content of Taa, N, car, Chla, Chit, TSW and %Arg and lower content of Gyr, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, r/(m+a) ratio and lower Amax rates than T2-17Lp (1700 m), T2-11Lp (1100 m) and T2-9Lp (910 m), which appear on the left side. The second component highlights the lower content on Erg and Tsug that T2-17Lp has in comparison with the others. And the third component shows a tendency of T2-15Lp to have lower values of DR than T2-13Lp.

The result of the PCA for the third transect is depicted in Fig. 3a.42 and tables 3a.34 to 3a.36. We can find a first component, explaining the 34% of the variance, positively influenced by Chla, car, Erg, Taa, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, N, Gyr, r/(m+a) and Amax. The second component, in turn, is influenced by altitude, Chit, Taa and r/(m+a) on the positive side and Chla, car, Gyr and Amax on the negative. It explains an additional 27%. The third component is defined by the positive effect of Erg, %Arg and Tsug, and the negative influence of altitude. It explains an 18% of the total variance. With respect to the first component, T3-15Lp and T3-9Lp (1450 and 900 m respectively) have a similar position, on the negative side, thus showing low values of Chla, car, Erg, Taa, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, N, Gyr, r/(m+a) and Amax. T3-17Lp and T3-14Lp (1720 and 1380 m, respectively) have a neutral position, close to the middle, and T3-11Lp (1140 m) shows the highest values of the variables cited above. But this is also the population with the lowest position with regard to the second component, as expected, taking into account that many variables which positively defined the first axis were also negatively correlated with the second one. The third component clearly divided the two groups that we observed above: T3-17Lp and T3-15Lp appeared on the bottom part of the plot (Fig. 3a.42c), while T3-14Lp and T3-9Lp can be seen on the top, meaning that they possess more Erg, %Arg and Tsug than T3-17Lp and T3-15Lp.

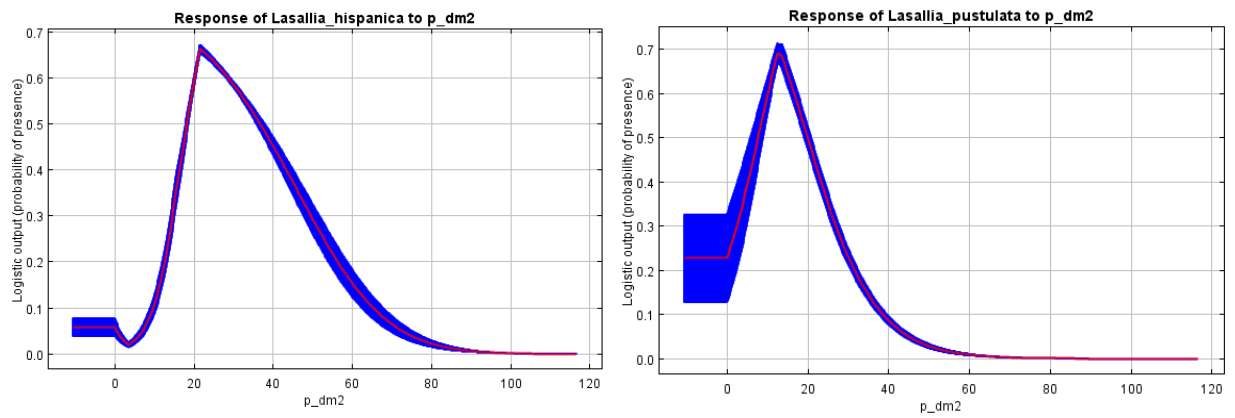


Fig. 3a.37: Influencia individual de Pdm (precipitación del mes más seco) en la probabilidad de aparición de *L. hispanica* (izqda.) y *L. pustulata* (dcha.).

Fig. 3a.37: Plot of the individual influence of Pdm (precipitation of the dryest month) on the probability of appearance of *L. hispanica* (left) and *L. pustulata* (right).



**4. EFECTOS DE LA ESTACIONALIDAD EN EL  
COMPORTAMIENTO ECOFISIOLÓGICO DE DOS ESPECIES  
SIMPÁTRICAS DE *LASALLIA***



## INTRODUCCIÓN

La principal ventaja que distingue a los líquenes de las plantas vasculares es su impresionante capacidad de tolerar los ambientes más extremos gracias a su habilidad para permanecer en estado latente bajo condiciones desfavorables, reanudando completamente su actividad cuando las condiciones se hacen adecuadas para su crecimiento y desarrollo (v.gr., Lange *et al.*, 2007; Kranner *et al.*, 2008; Raggio *et al.*, 2011). Esta habilidad se basa en su estilo de vida poquilohidro, los líquenes están activos solamente cuando están hidratados. Persisten durante todo el año y en la mayoría de los hábitats están activos de manera intermitente dependiendo de los ciclos estacionales de cambio ambiental. Sus procesos metabólicos se ven influidos por la disponibilidad de agua, además de los cambios en intensidad lumínica y fotoperiodo y en temperatura. La aclimatación de su aparato fotosintético sería una gran ayuda para mantener la ganancia de carbono bajo estas variaciones estacionales, pues este término se refiere a una adaptación resultante en la constancia o el control homeostático de los procesos vitales bajo condiciones cambiantes (Prosser, 1955). La adaptación y la aclimatación a estas condiciones difíciles son el resultado de cambios que ocurren a todos los niveles de organización, desde el anatómico y morfológico hasta el celular, bioquímico y molecular (Beckett *et al.*, 2008).

Desde Stålfelt (1939), se ha estudiado la influencia estacional en el metabolismo en varias especies de líquenes. Los estudios más tempranos en este ámbito (Stålfelt, 1939; Kallio & Heinonen, 1971; Lechowicz & Adams, 1974; Kershaw, 1975; Larson, 1980; referencias recogidas por Kershaw, 1985; etc.) tratan principalmente de los cambios provocados en las tasas de respiración y fotosíntesis, así como en los óptimos de temperatura, especialmente en regiones subantárticas y templadas. Se han descrito distintas respuestas a los cambios ambientales, no se ha encontrado un patrón común. Parece probable que la respuesta a la estacionalidad es específica de cada especie o incluso de cada población (Larson, 1980), y es posible que tampoco dependa completamente del ambiente. De acuerdo con Levins (1968), los ambientes heterogéneos pueden seleccionar más de un equilibrio estable o modo de adaptación. Esto quiere decir que en el mismo ambiente una aclimatación estacional completa puede ser tan importante para una especie como la ausencia de aclimatación para otra distinta (Larson, 1980). Como ejemplo de esto, Larson (1980) llevó a cabo un amplio estudio con cinco especies de Umbilicariáceas que convivían en el mismo lugar, aunque en diferentes nichos (*Umbilicaria vellea*, *U. mammulata*, *Lasallia papulosa* (bajo *U. papulosa*), *U. deusta* y *U. muhlenbergii*). Este autor tomó muestras una vez en invierno y otra en verano para evaluar el intercambio neto de CO<sub>2</sub>, y encontró una amplia variedad de respuestas: incremento en la tasa de respiración (RO) combinado con descenso de la fotosíntesis neta (FN) en invierno (*U. mammulata*), descenso de la RO en invierno (*U. vellea*) o tasas de RO constantes a lo largo del año, pero con cambios marcados en la FN (*L. papulosa*).

En algunas especies se ha observado una aclimatación completa, v.gr., en *Collema furfuraceum* (Kershaw & MacFarlane, 1982), que no muestra cambios en las



tasas de intercambio de CO<sub>2</sub> entre invierno y verano. Los líquenes también se han utilizado como demostración de la capacidad de aclimatación a la temperatura de los hongos (Lange & Green, 2005). Por otro lado, se ha visto que las condiciones bajo las que un líquen está activo pueden ser distintas de las existentes en el medio global (v.gr., Green *et al.*, 2008; Pintado *et al.*, 2010; Green *et al.*, 2011b; Raggio *et al.*, en preparación), lo cual tendería a oponerse a los procesos de aclimatación o adaptación.

Se han observado también otros patrones de cambios fotosintéticos desencadenados por la estacionalidad. En relación con los cambios en el régimen lumínico, Kershaw y MacFarlane (1980) encontraron aclimatación a los bajos niveles de luz en *Peltigera praetextata* (especie epífita en un bosque caducifolio) y *P. scabrosa* (epífita en un abetal perennifolio), con un incremento de la tasa máxima de FN (Amáx) tras 20 días de almacenamiento bajo luz tenue, y una recuperación de los valores iniciales cuando las muestras se transfirieron a condiciones de alta irradiación. También observaron aclimatación al fotoperiodo en sólo 4 días de cambio de régimen de 12h/12h a 18h/6h luz/oscuridad.

Más recientemente, MacKenzie *et al.* (2001, 2003, 2004) han estudiado exhaustivamente la respuesta de la especie epífita *Lobaria pulmonaria* al cambio de las condiciones ambientales provocado por la estacionalidad. Observaron una estrecha relación entre la actividad fotosintética potencial y el cambio en el régimen lumínico, mientras que la actividad real, es decir, en condiciones similares a las del ambiente natural, se veía influenciada principalmente por la temperatura. El aparato fotosintético respondía a la interacción entre ambos factores. También encontraron una menor amplitud estacional en una población de un bosque perennifolio, comparada con poblaciones de bosques caducifolios. Asimismo, vieron una tasa de fijación de CO<sub>2</sub> relativamente constante de Abril a Noviembre, a pesar de los cambios en luz y temperatura, que explicaron como resultado de los cambios en la cantidad de Rubisco y la actividad del fotosistema II, ambos ajustados para seguir los cambios en la luz ambiental. Llegaron a la conclusión de que la productividad de esta especie está limitada por la temperatura en invierno y por la luz en verano, cuando el dosel arbóreo está completamente desarrollado.

Otra aproximación al estudio de la influencia estacional en el metabolismo de los líquenes fue llevada a cabo por Lange en un elegante y completo experimento de campo donde se realizó un seguimiento del comportamiento de *Lecanora muralis* de manera continua durante 15 meses en su hábitat natural, tomando medidas de intercambio gaseoso y fluorescencia de Chl<sub>a</sub>, así como de las condiciones meteorológicas (Lange, 2002, 2003a, 2003b). Las muestras estuvieron activas el 35'6% del año, con un balance positivo de carbono en todas las estaciones. Lange enfatizó el papel del estado hídrico como el factor más importante que conduce a la activación y, por tanto, a la productividad. De esta manera, los periodos de actividad dependen de características específicas de cada especie, tales como la absorción de agua y la capacidad de retenerla, que, a su vez, residen en particularidades morfológicas y anatómicas. *Lecanora murales* se activaba con lluvia, nieve, niebla, rocío, escarcha y

alta humedad ambiental. Lange también midió la productividad de esta especie bajo condiciones controladas en el laboratorio (2002), sin encontrar ningún patrón claro de adaptación, con la excepción de un aumento de la sensibilidad de la respiración a la temperatura en invierno, que conllevaba un punto de compensación de luz más bajo. Este autor también encontró fuertes patrones temporales en la ganancia y pérdida de carbono, pero llegó a la conclusión de que las condiciones climáticas momentáneas son el factor que determina casi exclusivamente la actividad fotosintética a lo largo del año.

Larsson *et al.* (2012) también analizaron la respuesta de *Lobaria pulmonaria* y *L. scrobiculata* desde el punto de vista del crecimiento real. Sus resultados muestran un desacoplamiento en el aumento de biomasa y de superficie del talo. El peso específico del talo (masa por superficie) incrementaba en el periodo seco y soleado entre Abril y Junio, mientras que disminuía (en *L. scrobiculata*) o permanecía constante (en *L. pulmonaria*) en el periodo húmedo y oscuro de Octubre a Diciembre, lo cual conllevaba un aumento de área, pero no de masa. De este modo, el crecimiento en biomasa era dependiente de la disponibilidad de luz, mientras que una mayor disponibilidad de agua implicaba crecimiento en superficie.

Como se ha visto, se ha estudiado a menudo el efecto de la estacionalidad en los hábitats de subárticos a templados, con especial énfasis en especies epífitas o terrícolas que viven en bosques caducifolios, pues estos hábitats muestran un cambio estacional muy contrastado en el ambiente lumínico, debido al desarrollo del dosel arbóreo en verano y la posterior defoliación en otoño (ver las referencias ya citadas). Pero no existen tantos estudios sobre estacionalidad en otros ambientes.

El clima mediterráneo es uno de los que muestran una estacionalidad más marcada. El régimen de lluvias es muy contrastado, con precipitación prácticamente ausente durante el verano y con diferencias pronunciadas en temperatura, especialmente en zonas continentales. Por tanto, nos proporciona un campo muy interesante para el estudio de los efectos de las condiciones cambiantes en las especies que viven en él, y de sus estrategias para hacer frente a esos cambios. Apenas se ha estudiado la influencia de la estacionalidad en líquenes de la región mediterránea, y sólo se han considerado separadamente algunos aspectos, tales como la variación de la cantidad de pigmentos, la fluorescencia de la Chl<sub>a</sub>, el intercambio gaseoso o el contenido de polisacáridos (Pintado, 1996; Pereyra *et al.*, 2003; Baruffo & Tretiach, 2007; Pirintsos *et al.*, 2011). Hasta donde sabemos, el estudio que aquí se presenta es el más amplio realizado en líquenes en un ecosistema mediterráneo. En él, hemos analizado los efectos de la estacionalidad en varios aspectos ecofisiológicos y subcelulares del metabolismo líquénico. Las especies escogidas han sido *Lasallia pustulata* (L.) Mérat y *Lasallia hispanica* (Frey) L.G. Sancho & A. Crespo (véase el capítulo 3 para una descripción más completa).

Hemos estudiado su fijación de CO<sub>2</sub> durante todo un año, por medio de medidas de intercambio gaseoso bajo condiciones controladas de luz y temperatura. El hábitat

de *L. hispanica*, que se encontraba en una roca más expuesta (Fig. 4.2), nos llevó a plantear la hipótesis de si su rendimiento fotosintético no sería mejor a temperaturas más bajas e irradiaciones más altas, con puntos de compensación de luz (Pc) más altos. De la misma manera, esperábamos un índice de peso específico del talo (IPE) mayor en esta especie (Kappen, 1988), pues esto le permitiría retener agua durante más tiempo, una característica no tan importante para *L. pustulata*, teniendo en cuenta que es una especie con una estrategia de hidratación sustrato-higrófila (Sancho & Kappen, 1989). Ya vimos en el capítulo anterior la relación entre IPE y contenido de quitina, como aproximación a la masa fúngica total (Palmqvist *et al.*, 2002), Esperaríamos una mayor cantidad de quitina en *L. hispanica* y en los meses más secos del año. Pensamos que el hábitat más expuesto en el que vive esta especie podría inducir un engrosamiento del córtex superior, con el resultado de aumentar la protección de la capa algal frente al exceso de luz y la desecación, en un intento por extender su tiempo de actividad.

Por la misma razón, esperaríamos valores mayores de ácido girofórico en *L. hispanica*, suponiendo que este metabolito secundario tuviera una actividad fotoprotectora frente al exceso de irradiación (Solhaug & Gauslaa, 1996). También se esperaba un descenso de la cantidad de Chl en los meses de verano, especialmente de Chl**b**, que promueve la captación de luz, y por tanto un incremento del cociente Chl**a**/**b**.

La comentada estrategia de hidratación sustrato-higrófila de *L. pustulata* le proporcionaría periodos de actividad más largos que los de la aero-higrófila *L. hispanica* (Sancho & Kappen, 1989; Valladares *et al.*, 1998), durante los que se esperaba que su fijación de carbono fuera mayor y acumulara más azúcares de reserva.

El análisis de aminoácidos se realizó como indicación de productividad y con el objetivo adicional de comprobar el posible papel de la arginina como molécula inmovilizadora del exceso de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, muy tóxico (Dahlman *et al.*, 2002; Dahlman & Palmqvist, 2003). Se han descrito variaciones estacionales en la disponibilidad de nitrógeno (Crittenden, 1998; Galloway *et al.*, 2008), así como una acumulación diferencial de la cantidad total de este elemento en los talos liquénicos, dependiendo de los periodos de actividad, en dos especies que crecían en la Antártida continental (Hovenden, 2000).

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Material liquénico**

Para este estudio elegimos una localidad cerca de Madrid, en la Silla de Felipe II, El Escorial (N 40° 34' 5'', W 9° 8' 45'', 1070 m.s.n.m.), donde fuimos una vez al mes desde el primero de Octubre de 2008 hasta el 31 de Agosto de 2009 para recolectar muestras y llevar a cabo medidas de fluorescencia en el campo. En esta localidad la vegetación dominante es un bosque aclarado de roble melojo (*Quercus pyrenaica*

Willd.), rico en especies epífitas de briófitos y líquenes (Belinchón *et al.*, 2007). Esta especie tiene un follaje marcescente, especialmente en las ramas jóvenes. Las hojas nuevas aparecen a finales de Abril en esta localidad, y la floración tiene lugar poco después. En este bosque hay algunos bloques de granito dispersos, que proporcionan un nicho para la aparición de especies de musgos y líquenes saxícolas. Entre estos últimos se encuentran *Lasallia hispanica* (Frey) L.G. Sancho & A. Crespo (Fig. 4.2) y *L. pustulata* (L.) Mérat (Fig. 4.3). *Lasallia hispanica* es una especie endémica del Mediterráneo, que aparece desde los 1000 m.s.n.m. hasta las cumbres más altas del Sistema Central (Pico Almanzor, 2592 m), siempre en superficies verticales muy expuestas y venteadas. *Lasallia pustulata* por el contrario, es una especie de amplia distribución en Europa, que aparece desde el nivel del mar hasta unos 1700 m de altitud, normalmente en zonas más protegidas (Sancho, 1986; Sancho & Crespo, 1989; Codogno & Sancho, 1991). Elegimos una sola roca, distinta para cada especie con el objeto de minimizar los efectos de cambiar el lugar de muestreo y tomamos muestras de ellas a lo largo de todo el año. La roca de *L. hispanica* no tenía suficientes talos para poder tomar muestras todos los meses, por lo que los datos de laboratorio son bimensuales (recogida de muestras al principio de Febrero, Abril, Junio, Agosto, Septiembre, Octubre y Diciembre). Sin embargo, la roca de *L. pustulata* tenía tal cantidad de talos de esta especie que permitió un muestreo mensual. Los talos de *L. hispanica* son pequeños y para esta especie cada réplica estaba constituida por entre 3 y 5 talos individuales. Por el contrario, los talos de *L. pustulata* son más grandes y casi siempre un solo talo constituía una réplica. Se utilizaron tres réplicas de cada especie para casi todas las medidas, con la excepción de las medidas de fluorescencia.

### **Datos meteorológicos**

Los datos climáticos fueron proporcionados amablemente por la Agencia Estatal de Meteorología (AEMET) y corresponden al periodo de muestreo, con valores horarios de precipitación, temperatura e irradiación. Los datos de cada mes concreto son en realidad los correspondientes al mes anterior (v.gr., los datos marcados como Enero en la Fig. 4.4 son en realidad los recogidos durante el mes de Diciembre). El propósito de esta nomenclatura es mantener los mismos nombres de meses para todos los datos, ya que las muestras de Enero son las recogidas a primeros de Enero, y que han estado por tanto expuestas a las condiciones climáticas de Diciembre.

### **Medidas de intercambio gaseoso**

Los talos se dejaron secar al aire a temperatura ambiente el día de su recolección y antes de medirlos se reactivaron durante dos días en una cámara a 10 °C, y un fotoperiodo de 12h a una intensidad de luz fotosintéticamente activa (PPFD) de 100  $\mu\text{moles de fotones} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , siendo hidratados una vez al día con agua mineral. Se hicieron medidas de intercambio de CO<sub>2</sub> con un sistema compacto de minicubeta CMS 400 (Walz, Effeltrich, Alemania) y un analizador de gases infrarrojo IRGA (Binos 100, Leybold-Heraeus, Alemania) bajo condiciones controladas de temperatura, humedad e irradiación, y a concentración de CO<sub>2</sub> ambiental (350 ppm, aprox.). Se puede encontrar una descripción completa de este método en Schroeter *et al.* (1994). Antes de las medidas, los líquenes se hidrataron completamente pulverizándolos con agua mineral

hasta la saturación y se retiró el exceso de agua suavemente con un papel absorbente. Se hicieron curvas de respuesta a la luz a 5, 10, 15, 20 y 25 °C. Primero se obtuvo el valor de respiración en oscuridad (RO), manteniendo la muestra sin luz hasta que se alcanzaba un valor estable y en ese momento, se iba incrementando la PPFD consecutivamente desde 25 hasta 1200  $\mu\text{moles} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  (25, 50, 100, 200, 400, 800 y 1200) a 15 °C, mientras que se hicieron curvas de luz cortas al resto de temperaturas, tomando valores a 0, 200, 400, 800 y 1200  $\mu\text{moles} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ . Antes y después de cada serie de medidas, los talos se pesaron para determinar el contenido de agua del talo en función del peso seco. A veces fue necesario rehidratar los talos durante las medidas para asegurar el nivel de hidratación óptima de los mismos. Las tasas se calcularon por unidad de peso seco, de superficie y de clorofila, mediante las ecuaciones de von Caemmerer & Farquhar (1981). Las curvas de respuesta a la luz se analizaron mediante un ajuste estadístico a una función de Smith, según se detalla en Green *et al.* (1997) y en la sección de Material y Métodos de los capítulos previos de esta memoria.

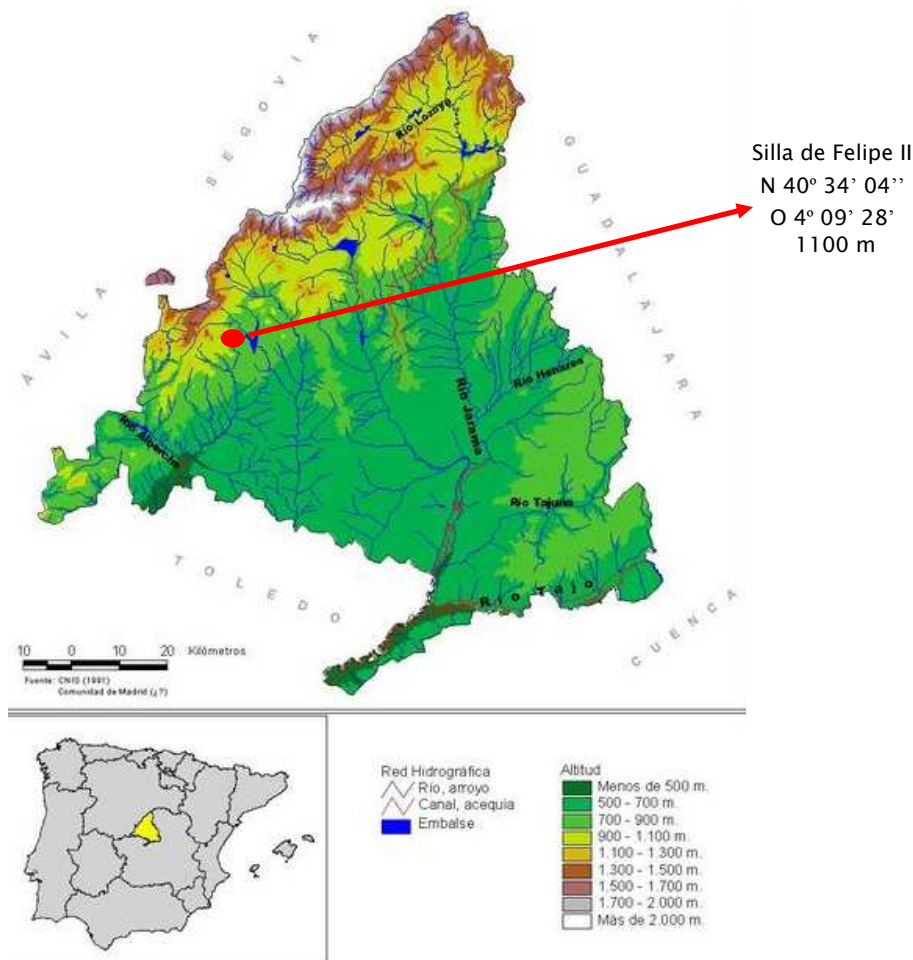


Fig. 4.1: Localización del lugar de experimentación (Fuente: CNIG).





Fig. 4.2: Talos húmedos de *L. hispanica* (izqda.) y roca de donde se tomaron las muestras (derecha).



Fig. 4.3: Talo húmedo de *L. pustulata* (izqda.) y roca de donde se tomaron las muestras (derecha).

Tras las medidas de intercambio gaseoso, se determinó la superficie de las muestras del modo ya explicado en la sección de Material y Métodos de los capítulos anteriores.

### **Análisis subcelulares**

Los talos utilizados para las medidas de intercambio gaseoso se usaron también para el análisis de clorofilas *a* y *b*, quitina, ergosterol, aminoácidos, azúcares, ácido girofórico y cociente C/N. Los detalles sobre estos análisis pueden encontrarse en la sección de Material y Métodos de los capítulos anteriores.

### **Medidas de fluorescencia**

Las medidas de fluorescencia de campo y laboratorio se llevaron a cabo con un fluorímetro MINI-PAM (Walz, Effeltrich, Alemania). Se eligieron cuidadosamente ocho talos de cada especie con aspecto saludable para su seguimiento en el campo a lo largo de todo el año. Estos talos crecían también sobre la misma roca de la que se tomaron las muestras para las medidas de laboratorio. Se tomaron medidas en 10 puntos en cada talo. Las medidas de campo se llevaron a cabo el mismo día que se recogieron las muestras para las medidas ecofisiológicas, al comienzo de cada mes y a la misma hora del día. Los resultados de estas medidas de campo se muestran en el

capítulo 5. Las medidas de laboratorio se llevaron a cabo con los talos recolectados para las medidas de intercambio gaseoso y antes de hacer éstas. Tras la hidratación completa de los talos con agua mineral y adaptación a oscuridad (20 min), llevamos a cabo curvas de inducción oscuridad/luz de la misma manera que la explicada en la sección de Material y Métodos del capítulo 2.

### **Análisis estadísticos**

Los análisis estadísticos se hicieron en R 2.10.0 (R Development Core Team, 2009) con la ayuda de los paquetes multcomp (Hothorn *et al.*, 2008), Hmisc (Harrell, 2006) y FactoMineR (Husson *et al.*, 2012). Se hicieron ANOVAs seguidos del test post-hoc Tukey HSD para comparar las diferencias dentro de cada especie. Las diferencias entre las dos especies se analizaron mediante t-tests. El nivel de significación fue  $p < 0.05$ . Se hicieron Análisis de Componentes Principales para agrupar las variables. Los gráficos se hicieron en SigmaPlot 10.0 (Chicago, Illinois, EEUU). Los gráficos para los ACPs se obtuvieron en R.

## **RESULTADOS**

### **Datos meteorológicos**

La Fig. 4.4 representa las variables climáticas durante el periodo en el que se llevó a cabo este estudio. Fue un año bastante seco (473 mm, comparados con los 910 mm de media entre 1960 y 1990, según datos de la AEMET). El mes más frío fue Febrero (en realidad, Enero de 2009) con una temperatura media de  $3.4^{\circ}\text{C}$ , y el más cálido fue Septiembre (es decir, Agosto), con  $25.2^{\circ}\text{C}$  de media. Las diferencias entre la temperatura máxima, media y mínima son consistentes a lo largo del año. La temperatura covaría con la irradiación, reflejando el fotoperiodo.

### **Intercambio gaseoso**

Las curvas de respuesta a la temperatura de *L. hispanica* se muestran en la Fig. 4.5, que muestra algunas diferencias en la tasa máxima de fotosíntesis ( $A_{\text{máx}}$ , a  $1200 \mu\text{moles de fotones} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) a lo largo de los meses de medida. Los bajos valores obtenidos en Septiembre son especialmente notables. Los valores de respiración en oscuridad (RO) son más parecidos a lo largo del año, con valores más bajos para las muestras recogidas a principios de Diciembre a todas las temperaturas de medida.

Los óptimos de temperatura para la fotosíntesis se muestran en la Tabla 4.1. Los valores más bajos fueron los de las muestras recogidas en Febrero y Abril, coincidentes con las temperaturas más bajas registradas en el periodo de estudio. Los puntos de compensación inferior y superior estimados siguen el mismo patrón, siendo más bajos en Febrero y Abril. El rango más estrecho se encuentra en las muestras de Septiembre, que también tiene la menor área bajo la curva, indicando un rendimiento fotosintético menos eficiente que en muestras recolectadas en otros meses.

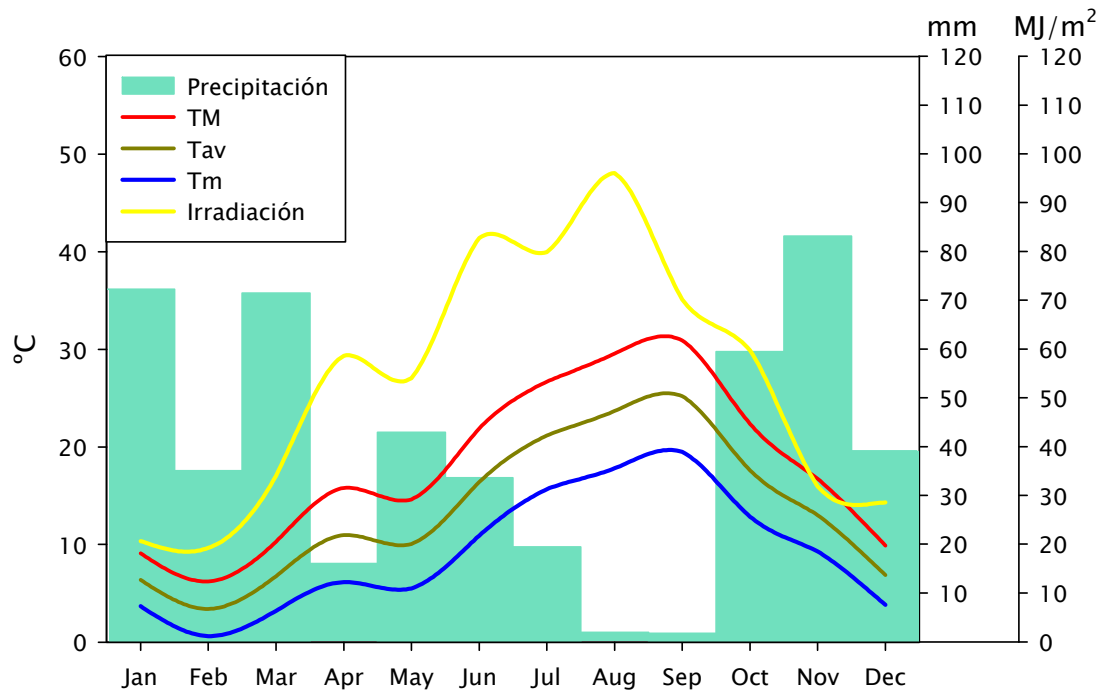


Fig 4.4: Datos meteorológicos para el periodo experimental en la localidad de muestreo. TM es la media de las temperaturas máximas diarias, Tav la media de las medias y Tm la media de las mínimas (en °C). LA precipitación mensual se midió en mm y la irradiación total en Mega Julios por m<sup>2</sup> (Fuente: AEMET). Los valores para cada mes pertenecen realmente a los medidos hasta el primer día de ese mes, es decir, son las medias (para las temperaturas) o los sumatorios (para la precipitación y la irradiación) de los 30 días previos.

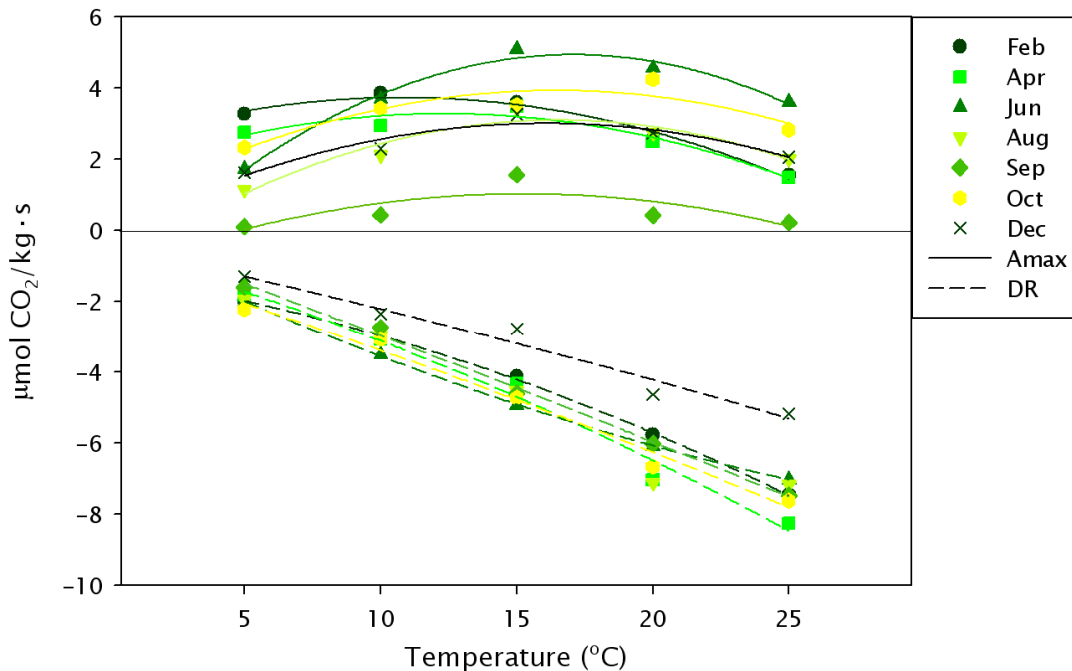


Fig. 4.5: Curvas de respuesta del intercambio de CO<sub>2</sub> a la temperatura de muestras de *Lasallia hispanica* con las tasas en función de peso seco. Amáx (líneas continuas, fotosíntesis neta a 1500 µmoles de fotones m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) y RO (líneas discontinuas, respiración en oscuridad, a 0 µmoles de fotones m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) a todas las temperaturas de medida. Los datos se ajustaron mediante regresiones polinómicas (2º grado, r<sup>2</sup> siempre >0.95).



Las muestras de *L. pustulata* muestran un comportamiento diferente. En esta especie, no se observan diferencias tan grandes (Fig. 4.6 y Tabla 4.2). El mes menos productivo (según el área bajo la curva de temperatura) sería Diciembre, pero con un área mucho mayor que la de *L. hispanica* en su mes menos productivo, Septiembre (54'29 vs. 10'60  $\mu\text{moles CO}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ). Los meses más productivos son Octubre, Noviembre, Mayo y Agosto. El área bajo la curva para ambas especies fue parecida en Abril, Junio y Diciembre, mayor para *L. hispanica* en Febrero y mayor para *L. pustulata* en Agosto, Septiembre y Octubre. Los resultados para aquella especie parecen ser más variables a lo largo del año.

Mes	Tci	Topt	Tcs	Área	Tav
Febrero	-7.4	10.8	28.9	72.7	3.4
Abril	-4.8	12.3	29.4	62.9	11.0
Junio	2.2	17.1	32.0	75.8	16.4
Agosto	2.4	16.5	30.6	46.3	23.7
Septiembre	4.9	14.5	25.4	10.6	25.2
Octubre	-1.3	16.4	34.1	71.8	17.6
Diciembre	0.2	16.1	32.0	51.8	6.9

Table 4.1: Óptimo de temperatura para la fotosíntesis, puntos de compensación de temperatura inferior y superior (Topt, Tci y Tcs, respectivamente, en °C) y área bajo la curva (calculada por integración de la función entre 5 y 25 °C, en  $\mu\text{moles CO}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) para *L. hispanica*. Tav es la temperatura media de cada mes (in °C).

El coeficiente de eficiencia fotosintética KF (Figs. 4a.3, 4a.4, Apéndice 4) muestra valores muy similares a lo largo del año para *L. pustulata* a la misma temperatura de medida. En el caso de *L. hispanica*, los valores mensuales son más distintos: las muestras de Septiembre tienen valores más bajos a todas las temperaturas, y son a menudo significativamente más bajos. Cuando comparamos las dos especies (Fig. 4.7), encontramos valores significativamente menores para *L. hispanica* en a todas las temperaturas de medid y a 15 °C en Agosto. Aunque la diferencia no era significativa ( $p= 0.1$ ), encontramos un valor más alto de KF en *L. hispanica* a 5°C en Febrero, con una tendencia similar en Abril, Junio y Diciembre.

No sólo es más bajo el KF de *L. hispanica* en Septiembre, sino que también la Amáx absoluta es significativamente menor que la medida para *L. pustulata* (Fig. 4.8). La Amáx de esta última especie fue significativamente mayor que la de *L. hispanica* a 15 °C en Agosto y a 20 °C en Octubre, mientras que *L. hispanica* mostraba valores más altos a 5 °C en Febrero. Los resultados son parecidos para las dos especies cuando las tasas se calculan en función de superficie o de contenido en Chl (Figs. 4a.5, 4a.6, Apéndice 4).

La respiración en oscuridad no variaba mucho entre las dos especies (Fig. 4.9), aunque *L. pustulata* mostraba tendencia a tener valores algo más altos.

Estos tres parámetros, RO, FN y KF obtenidos a la temperatura predominante en el campo en el mes de recolección y a una temperatura fija (15 °C) se comparan en las Figs. 4.10 y 4.11. Se puede ver que en el último caso los valores son más regulares.

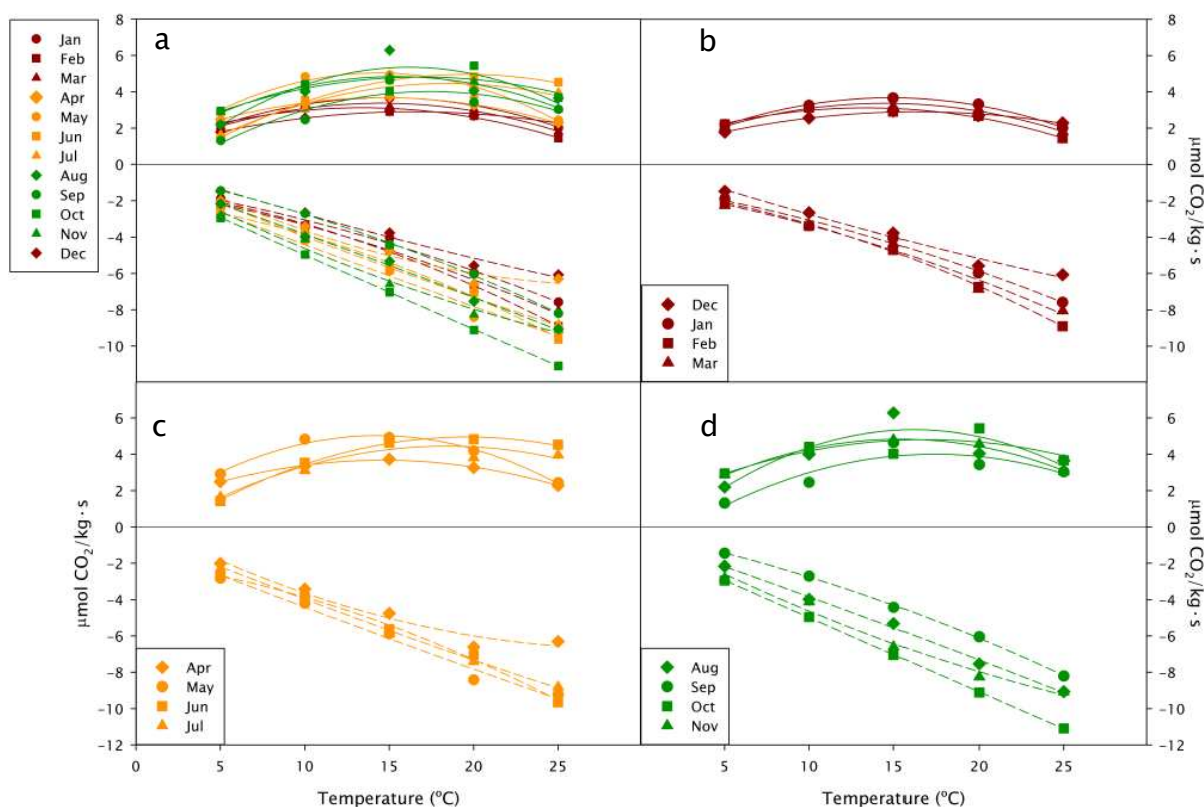


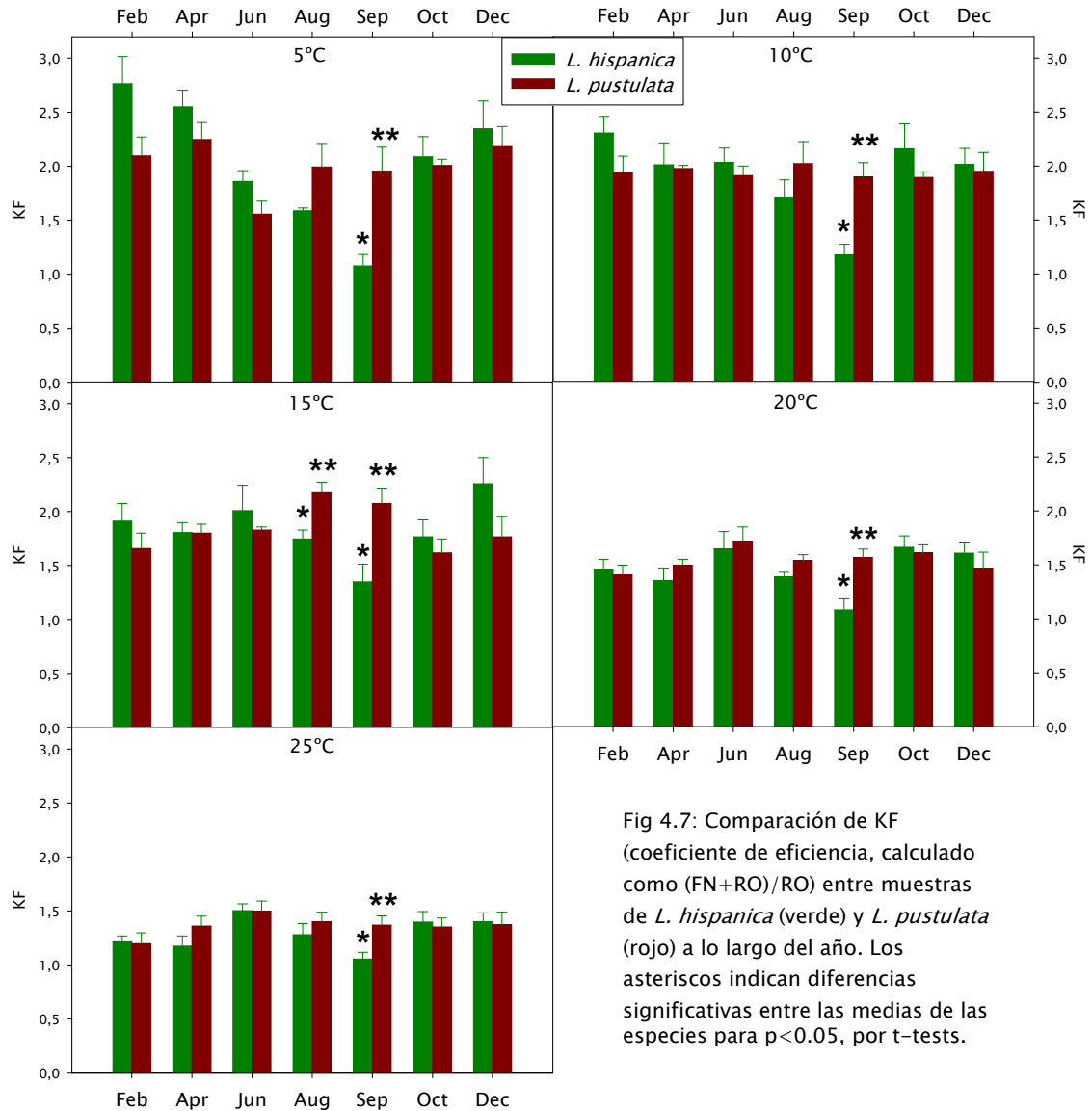
Fig. 4.6: Curvas de respuesta del intercambio de CO<sub>2</sub> a la temperatura de muestras de *Lasallia pustulata* con las tasas en función de peso seco. Amáx (líneas continuas, fotosíntesis neta a 1500 µmoles de fotones m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) y RO (líneas discontinuas, respiración en oscuridad, a 0 µmoles de fotones m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) a todas las temperaturas de medida. Los datos se ajustaron mediante regresiones polinómicas (2º grado, r<sup>2</sup> siempre >0.95). (a) Todos los meses juntos. (b), (c) y (d) sólo cuatro meses para facilitar la comparación.

Mes	Tci	Topt	Tcs	Área	Tav
Ene	-0.5	14.8	30.2	64.1	6.4
Feb	-2.6	13.3	29.3	57.2	3.4
Mar	-1.0	14.5	30.1	60.0	6.7
Abr	-2.3	14.6	31.5	68.7	11
May	-0.4	14.3	29.0	86.0	10.1
Jun	2.2	19.7	37.1	76.4	16,4
Jul	1.6	18.2	34.9	70.1	21.2
Ago	1.7	16.2	30.7	84.3	23.7
Sep	2.7	17.4	32.1	59.3	25.2
Oct	-2.3	16.8	35.7	90.3	17.6
Nov	-0.8	15.3	31.5	86.1	13
Dic	-2.1	16.3	34.6	54.3	6.9

Table 4.2: Óptimo de temperatura para la fotosíntesis, puntos de compensación de temperatura inferior y superior (Topt, Tci y Tcs, respectivamente, en °C) y área bajo la curva (calculada por integración de la función entre 5 y 25 °C, en µmoles CO<sub>2</sub>·kg<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>) para *L. pustulata*. Tav es la temperatura media de cada mes (in °C).

### Índice de peso específico del talo

No se encontraron diferencias entre las dos especies (Fig. 4.12), o en los valores de *L. hispanica* a lo largo del año. Por el contrario, los talos de *L. pustulata* de Ago y Oct mostraban valores de IPE significativamente más bajos que en Ene. El IPE de ambas especies mostró tendencia a aumentar en invierno.



### Componentes celulares

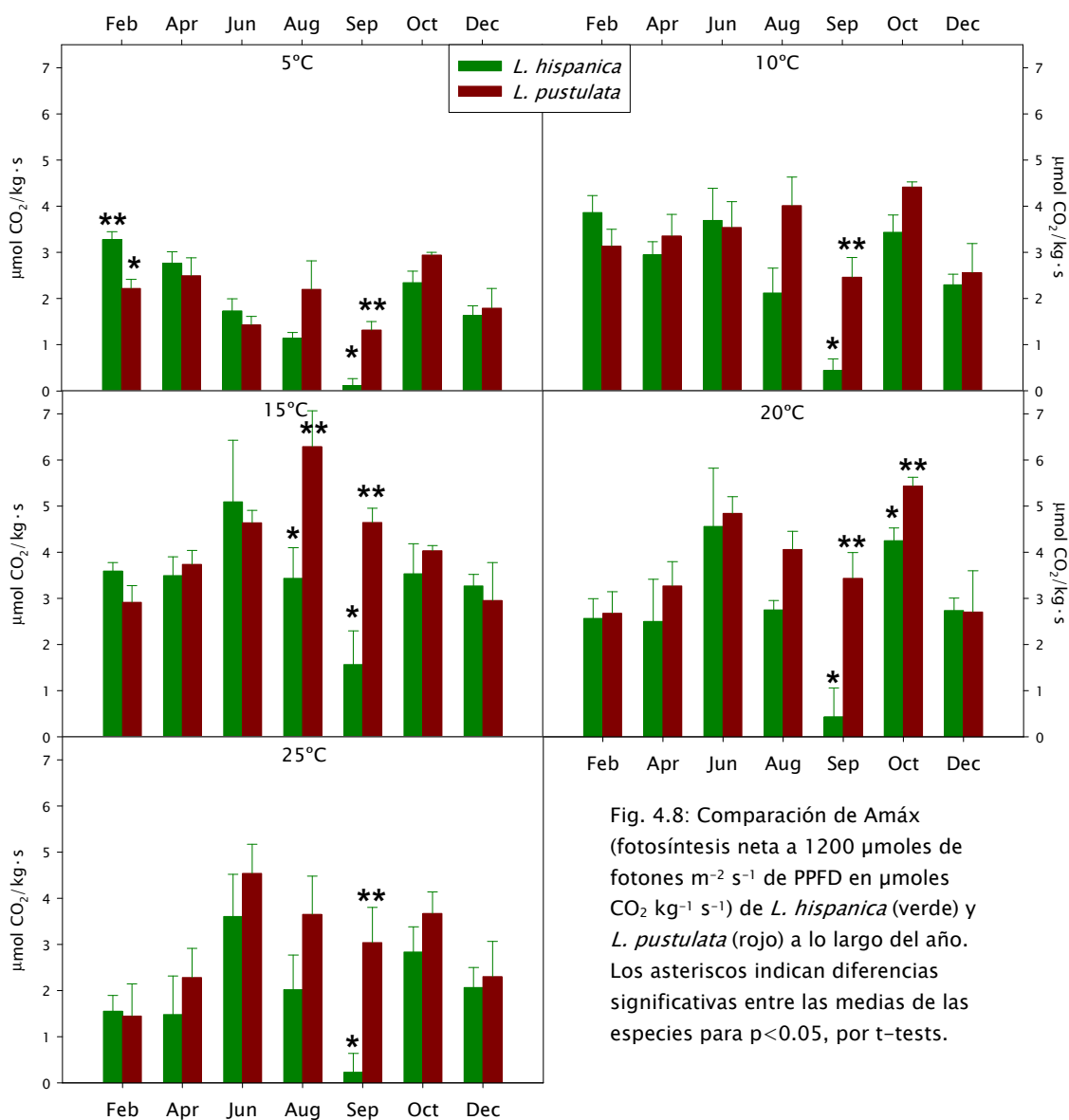
Todos los datos presentados se han calculado en función de peso seco. También se hicieron cálculos en función de superficie, y los resultados y tendencias eran bastante parecidos en todos los casos. Por esta razón no se representan gráficamente.

### Clorofila

La Fig. 4.13 muestra los cambios en la cantidad de Chl a lo largo del año en *L. hispanica*. No se encontró ningún patrón ni variación significativa para la Chl $a$ , pero, por el contrario, se encontraron valores más altos de Chl $b$  en otoño-invierno, con tendencia a disminuir de nuevo en primavera. Se observó la misma respuesta en la cantidad total de Chl y la mayor cantidad de Chl $b$  en otoño produjo valores más bajos del cociente Chl $a$ /Chl $b$ .

*L. pustulata* (Fig. 4.14) muestra también un descenso en el contenido de Chl $b$  desde primavera hasta alcanzar un valor mínimo en verano, con recuperación al

principio de otoño. Los valores de Chl*a* fueron más constantes, excepto para Feb, cuyo valor era significativamente más bajo que la mayoría de los otros. De nuevo en este caso, los cambios en Chl*b* tenían mayor influencia en el patrón tanto de Chl total como del cociente Chl*a*/*b*.

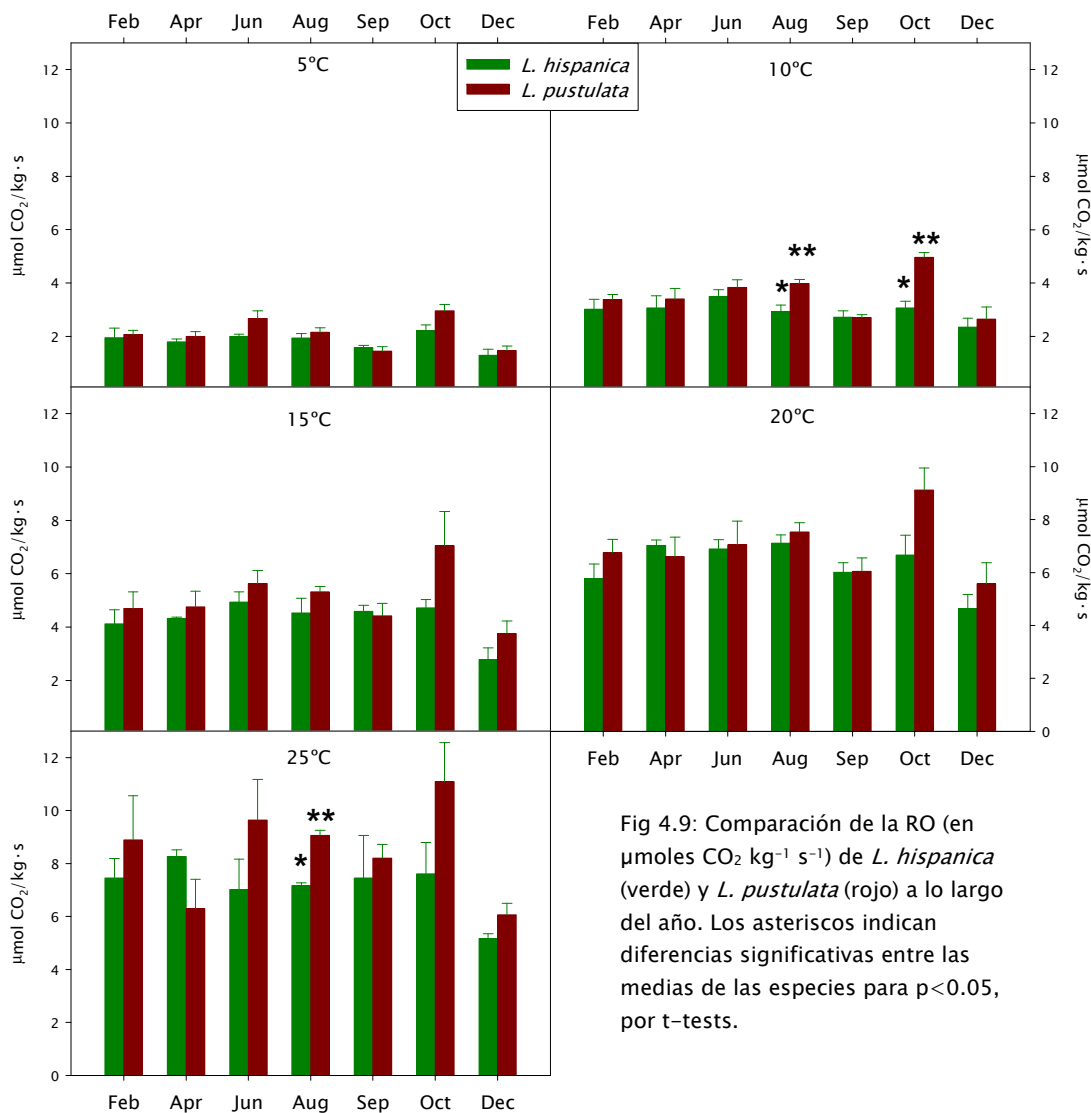


Los contenidos de Chl de ambas especies eran parecidos (Fig. 4a.7, Apéndice 4), aunque con diferencias significativas en Jun y Sep, cuando *L. pustulata* tenía valores significativamente mayores de Chl*b*. Su contenido total de Chl era mayor en Sep, mientras que en Feb *L. hispanica* tenía más Chl. La única diferencia significativa para el cociente entre clorofilas se encontró en Ago, con un valor mayor para *L. pustulata*.

### Componentes fúngicos

La Fig. 4.15 muestra las diferencias en ergosterol a lo largo del año para las dos especies. *Lasallia hispanica* mostró tendencia a tener valores mayores hacia primavera, momento en el que comienzan a descender hasta los niveles más bajos encontrados en Sep ( $1.55 \text{ mg g}^{-1}$ ). *Lasallia pustulata* también mostró valores bajos en Sep ( $1.57 \text{ mg g}^{-1}$ ), peor el menor valor fue el encontrado en Ene ( $1.25 \text{ mg g}^{-1}$ ). A partir de entonces,

los niveles aumentaron hasta el máximo registrado en Jun. Los valores fueron bastante constantes en verano, hasta el súbito descenso de Sep. Un nuevo aumento sucede en Oct. Cuando se hacen comparaciones entre las dos especies, encontramos diferencias significativas en Ago y Oct, con valores más altos en *L. pustulata*, y en Feb, con mayores valores en *L. hispanica*.



Los resultados para el contenido en quitina se pueden ver también en la Fig. 4.15. No se encontraron diferencias significativas, ni entre especies ni dentro de cada una de ellas, pero *L. hispanica* muestra un patrón similar al del ergosterol, con valores en aumento en invierno y en disminución en verano. Por esta razón, su cociente Quit/Erg es muy constante a lo largo del año, mostrando una buena aclimatación en este aspecto. Por el contrario, este cociente en *L. pustulata* mostraba una tendencia opuesta a aquélla observada para el ergosterol solo, es decir, un descenso en primavera y un aumento en invierno.

### Ácido girofórico

En general, los valores de ácido girofórico eran más altos en *L. hispanica* que en *L. pustulata* en muchos meses (Fig. 4.15), pero la diferencia era estadísticamente

significativa sólo en Dic. No hubo diferencias significativas en *L. hispanica*. Para *L. pustulata* se encontró un valor significativamente más bajo para las muestras de Nov en comparación con las de los cuatro primeros meses del año.

### Análisis de azúcares

Los resultados de los análisis de azúcares se muestran en la Fig. 4.16. El contenido del azúcar algal ribitol no varió significativamente a lo largo del año en *L. pustulata*, pero sí se pudieron observar algunas diferencias en *L. hispanica*, que mostraba valores más altos en primavera y más bajos en verano. La cantidad de manitol, el azúcar fúngico, era mucho mayor que la de ribitol. Ambas especies tendían a mostrar valores más bajos en verano y más altos en primavera. Aunque no hubo diferencias entre especies en el contenido absoluto de ribitol y manitol, se encontraron algunas diferencias en el cociente de estos azúcares alcohólicos. *L. hispanica* mostró valores significativamente mayores en Feb, Jun, Ago y Dec, con el mayor valor en Jun, y valores similares el resto del año. También *L. pustulata* alcanza su mayor valor en Jun. La cantidad total de azúcares mostró un patrón similar a los de ribitol y manitol, con un máximo en primavera y aun descenso a partir del verano. *Lasallia pustulata* tiene más azúcares que *L. hispanica*, siendo la diferencia entre ellas estadísticamente significativa en Abr y Ago.

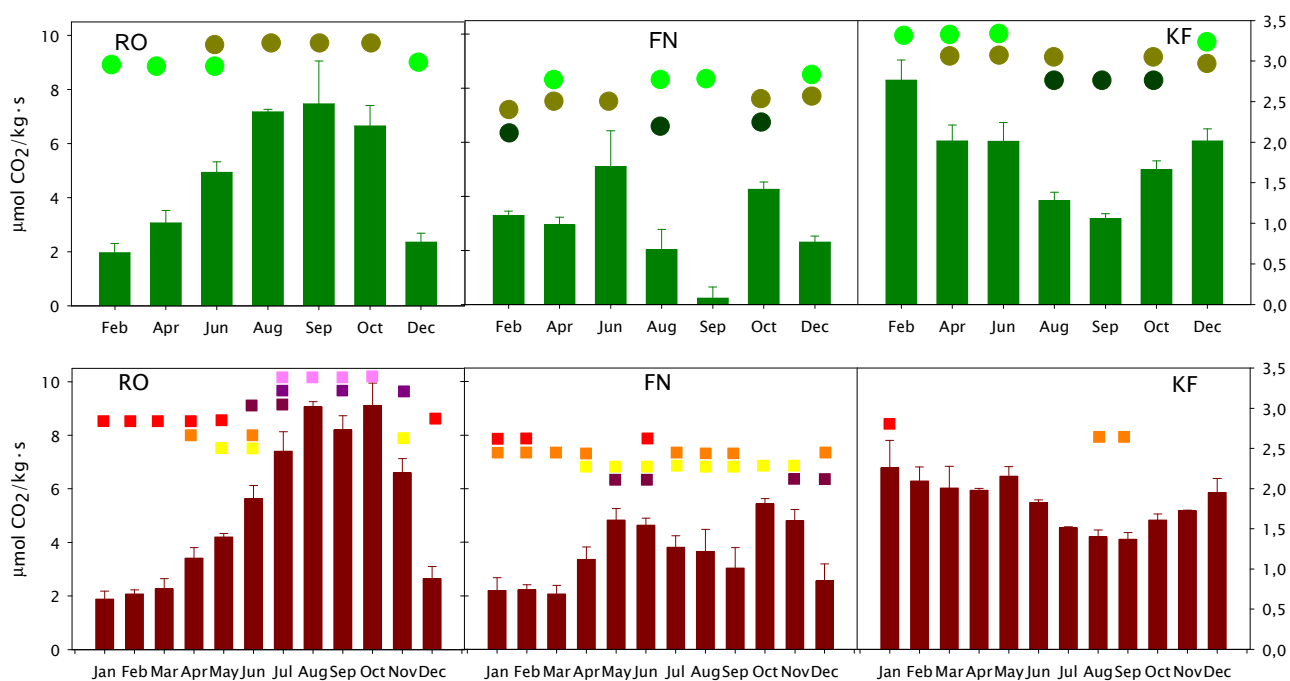


Fig. 4.10: RO, FN y KF de *L. hispanica* (verde) y *L. pustulata* (rojo) a lo largo del año a la temperatura de medida más cercana a la media de cada mes. Las unidades y escalas de RO y FN son las mismas. Las barras que comparten puntos o cuadrados del mismo color no son significativamente distintas, mientras que las que muestran puntos o cuadrados de distinto color, sí lo son, según un ANOVA seguido del test Tukey HSD, para  $p < 0.05$ .

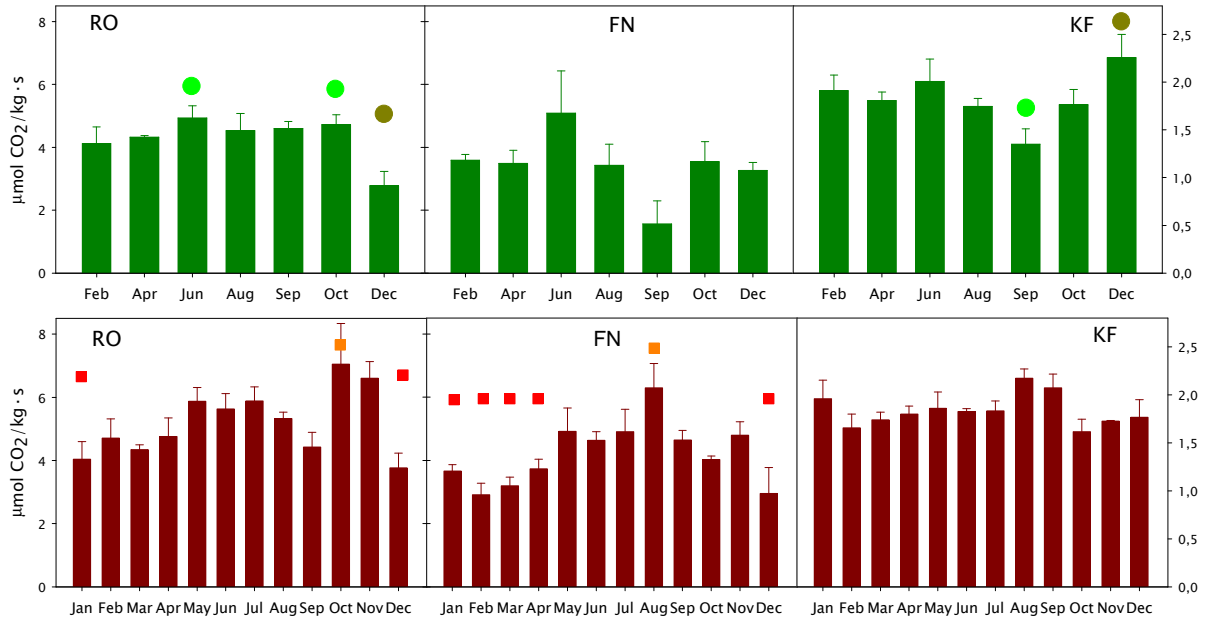


Fig. 4.11: RO, FN y KF de *L. hispanica* (verde) y *L. pustulata* (rojo) a lo largo del año, a la temperatura de medida más cercana a la media anual, 15 °C. Las unidades y escalas de RO y FN son las mismas. Las barras que comparten puntos o cuadrados del mismo color no son significativamente distintas, mientras que las que muestran puntos o cuadrados de distinto color, sí lo son, según un ANOVA seguido del test Tukey HSD, para  $p < 0.05$ .

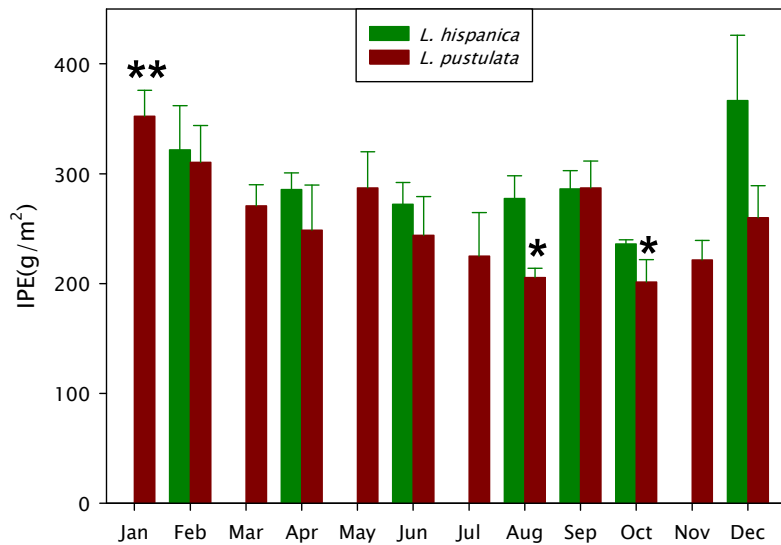


Fig. 4.12: Índice de peso específico (en  $\text{g m}^{-2}$ ) de *L. hispanica* (verde) y *L. pustulata* (rojo) a lo largo del año. No se encontraron diferencias significativas entre las especies por t-test. Se hicieron ANOVAs seguidos del test Tukey HSD para ver diferencias dentro de cada especie: en *L. hispanica* no hubo diferencias y en *L. pustulata* se encontraron valores significativamente mayores en los talos de Ene respecto a los de Ago y Oct (marcados con asteriscos)

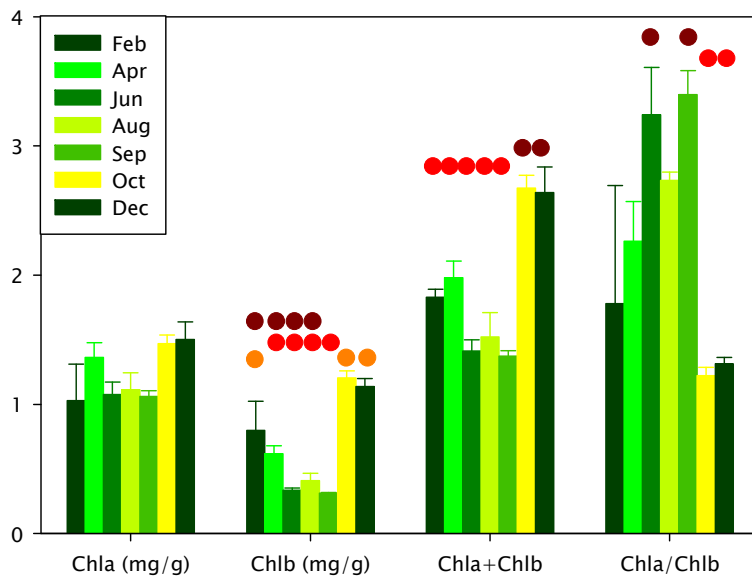


Fig. 4.13: Contenido de Chl de *L. hispanica* a lo largo del año. Las barras con puntos de colores diferentes son significativamente distintas por ANOVA seguido del test Tukey HSD,  $p < 0.05$ .

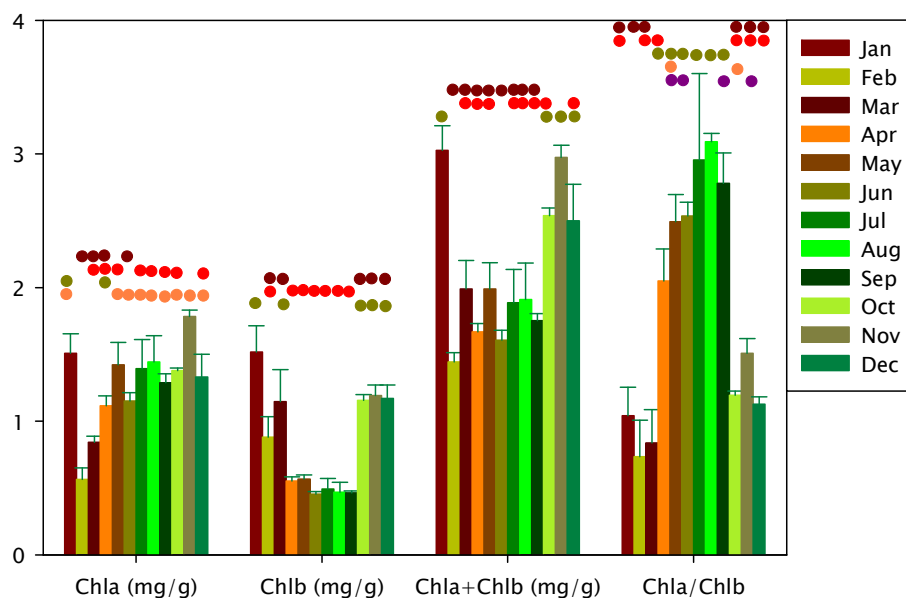


Fig. 4.14: Contenido de Chl de *L. pustulata* a lo largo del año. Las barras con puntos de colores diferentes son significativamente distintas por ANOVA seguido del test Tukey HSD,  $p < 0.05$ .

### Aminoácidos y $\text{NH}_4^+$

No se observó un patrón estacional claro en el contenido de  $\text{NH}_4^+$  en ninguna de las dos especies (Fig. 4.17). Se midieron valores muy bajos en *L. pustulata* en Mar y Jul.

La cantidad relativa de Arg, con respecto a la cantidad total de aminoácidos parecía tener una clara tendencia estacional en *L. hispanica*, con un valor mínimo al final de la primavera y un incremento hasta el máximo alcanzado en invierno. Esta tendencia no se vio en *L. pustulata*.

El contenido total de aminoácidos era bastante constante a lo largo del año en *L. hispanica*, pero *L. pustulata* tenía valores más bajos en invierno y primavera, que comienzan a aumentar en verano hasta el máximo encontrado en Oct.



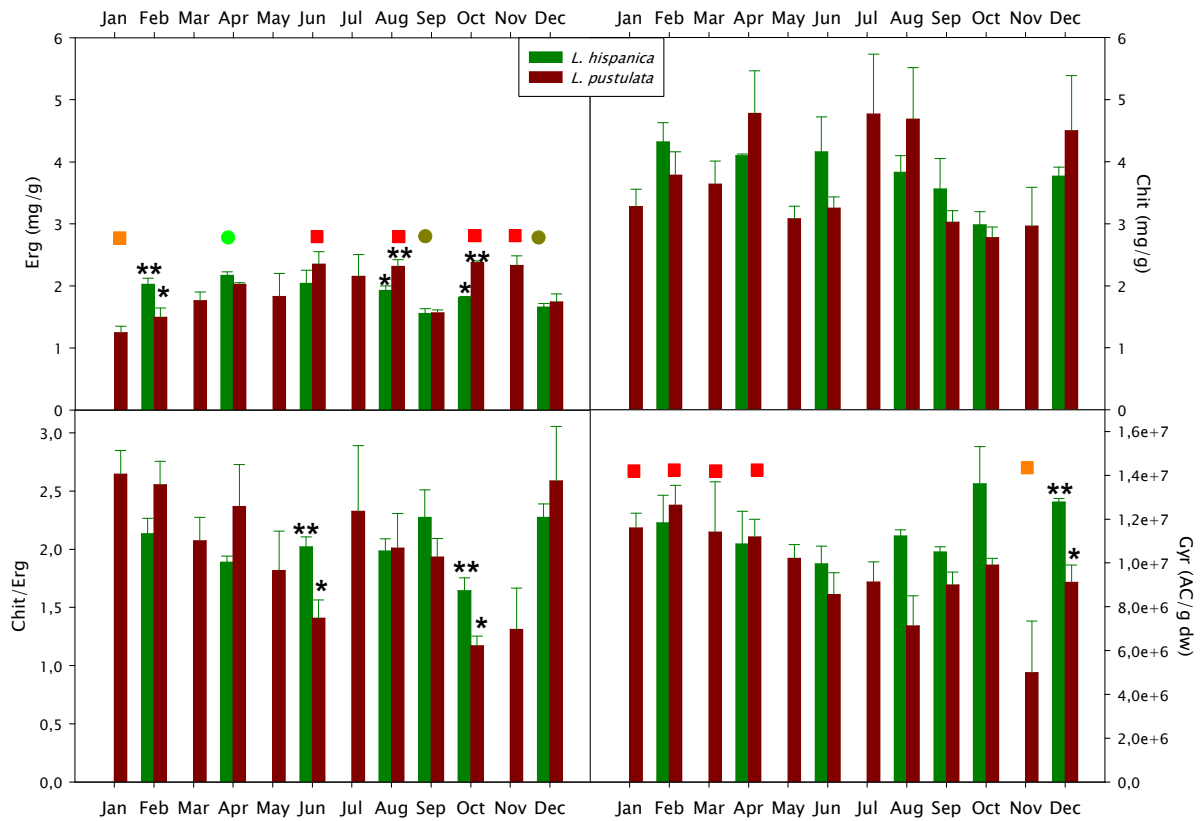


Fig. 4.15: Ergosterol (Erg, en  $\text{mg g}^{-1}$ , arriba izqda.), quitina (Quit, en  $\text{mg g}^{-1}$ , arriba derecha), cociente Quit/Erg (abajo izqda.) y girofórico (en Cuentas de Área  $\text{g}^{-1}$ , abajo derecha) de *L. hispanica* (verde) y *L. pustulata* (rojo) a lo largo de los meses de muestreo. Las diferencias significativas entre especies, analizadas por t-tests, están marcadas con asteriscos. Las barras con puntos (*L. hispanica*) o cuadrados (*L. pustulata*) de distintos colores son significativamente distintas por ANOVA seguido de Tukey HSD, para  $p < 0.05$ .

### Medidas de C y N

Las cantidades de C de los talos fueron muy parecidas a lo largo del año para ambas especies, sin diferencias entre ellas ni dentro de cada una de ellas (Fig. 4.18). Por el contrario, en lo que respecta al contenido total de N, encontramos valores mayores de N en *L. pustulata*, con la excepción de Feb y Abr, meses en los que la cantidad encontrada en *L. hispanica* era mayor. Aquélla especie mostró tendencia a tener mayor cantidad de N hacia Ago, con un valor mínimo en Ene.

El cociente C/N era constante para *L. hispanica*, mientras que en *L. pustulata* mostraba la tendencia opuesta a la encontrada para el contenido de N, con un máximo el principio del año y una tendencia a disminuir hacia el verano y el otoño (Fig. 4.18).

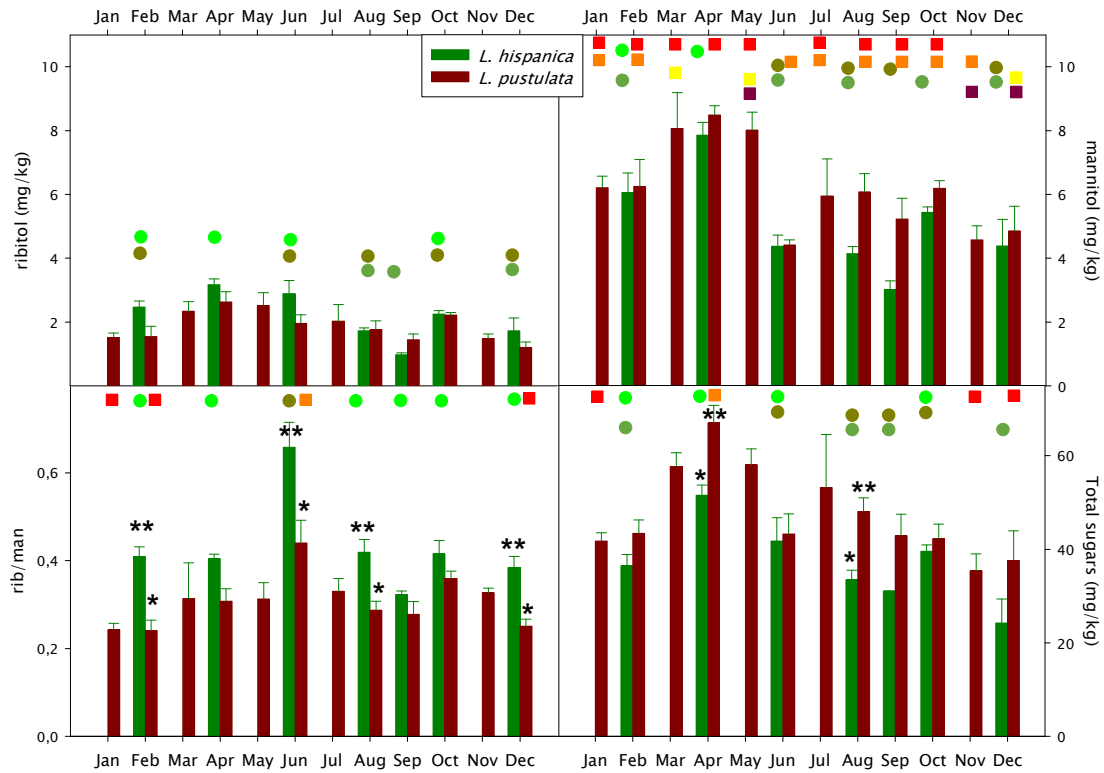


Fig. 4.16: Ribitol (en mg kg<sup>-1</sup>, arriba izqda.), manitol (en mg kg<sup>-1</sup>, arriba dcha.), cociente ribitol/manitol abajo izqda.) y azúcares totales (en mg kg<sup>-1</sup>, abajo dcha.) de *L. hispanica* (verde) y *L. pustulata* (rojo) a lo largo del año. Las diferencias significativas entre especies, analizadas por t-tests, están marcadas con asteriscos. Las barras con puntos (*L. hispanica*) o cuadrados (*L. pustulata*) de distintos colores son significativamente distintas por ANOVA seguido de Tukey HSD, para p<0.05.

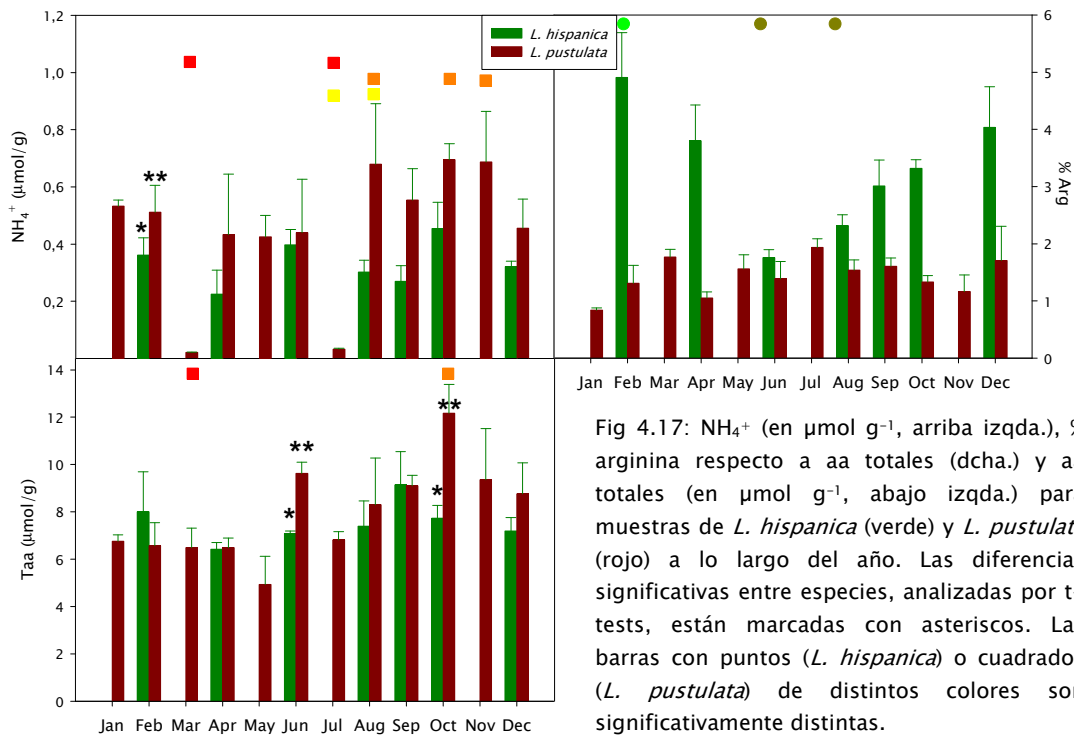


Fig 4.17: NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (en μmol g<sup>-1</sup>, arriba izqda.), % arginina respecto a aa totales (dcha.) y aa totales (en μmol g<sup>-1</sup>, abajo izqda.) para muestras de *L. hispanica* (verde) y *L. pustulata* (rojo) a lo largo del año. Las diferencias significativas entre especies, analizadas por t-tests, están marcadas con asteriscos. Las barras con puntos (*L. hispanica*) o cuadrados (*L. pustulata*) de distintos colores son significativamente distintas.

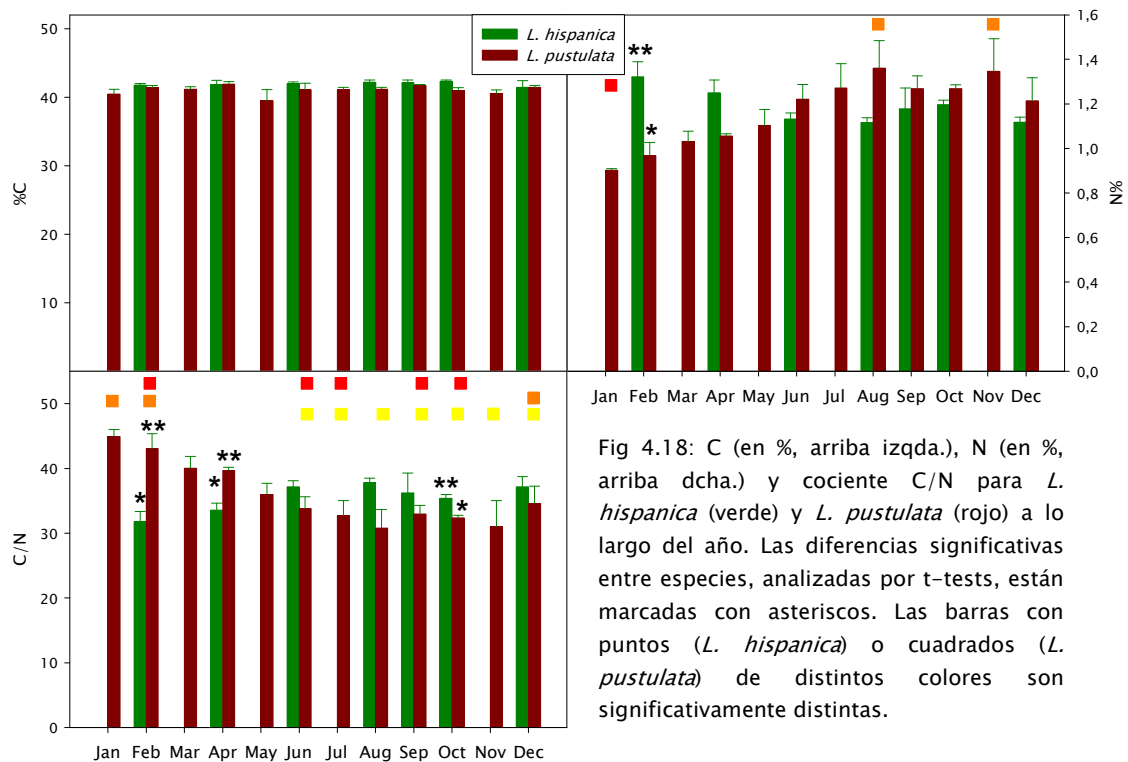


Fig 4.18: C (en %, arriba izqda.), N (en %, arriba dcha.) y cociente C/N para *L. hispanica* (verde) y *L. pustulata* (rojo) a lo largo del año. Las diferencias significativas entre especies, analizadas por t-tests, están marcadas con asteriscos. Las barras con puntos (*L. hispanica*) o cuadrados (*L. pustulata*) de distintos colores son significativamente distintas.

### Medidas de fluorescencia

Los resultados del estudio de laboratorio de la fluorescencia se muestran en las Figs. 4a.8 a 4a.11 y las Tablas 4a.2 y 4a.3, en el Apéndice 4. *Lasallia hispanica* mostró un comportamiento parecido a lo largo del año, con la excepción de Ago y Sep, cuando los valores absolutos de Fv/Fm fueron mucho menores (Tabla 4a.2). Sin embargo, si miramos los valores relativos, calculados como el porcentaje del valor máximo (Fig. 4a.9), podemos ver que la recuperación del rendimiento fotosintético no era diferente a lo largo del año y que todas las muestras tenían valores parecidos al final. Lo mismo sucedía en el caso de *L. pustulata*. Los valores más bajos se encontraron en Sep (Fig. 4a.10, Tabla 4a.3), pero, de nuevo, no se vieron diferencias significativas en la recuperación (Fig. 4a.11). Al comparar ambas especies los valores eran siempre mayores para *L. pustulata*, y la diferencia más grande se encontraba en Sep (Fv/Fm= 0'622 en *L. pustulata* y 0'494 en *L. hispanica*).

### Análisis multivariante

Se hizo una matriz de correlación para cada especie con 29 variables (Figs 4a.12 y 4a.13, Apéndice 4). Las variables que mostraron mayores coeficientes de correlación se seleccionaron para hacer ACPs. Trece fueron las variables elegidas para *L. hispanica*, a saber, IPE, Chl<sub>a</sub>, Chl<sub>b</sub>, Erg, %Arg, N, Gir, Amáx, RO15 (en valor absoluto), man, r, m, glu y Taz. En el caso de *L. pustulata* las variables elegidas fueron IPE, Chl<sub>a</sub>, Erg, Arg, Taa, N, Gir, Amáx, RO15 (en valor absoluto) man, r/m+a, glu y Taz. (Los APCs con esas variables están en el Apéndice 4, Figs. 4a.14 y 4a.15, Tablas 4a.4 to 4a.9).

Se hicieron nuevas matrices de correlación con estas variables, a las que se añadieron las variables climáticas siguientes: precipitación, TM, Tm, Tav y radiación (Figs. 4a.16 y 4a.17), que mostraban correlaciones significativas con muchos parámetros, como IPE, Chl**b**, % Arg, RO y man (Fig. 4a.16), en *L. hispanica*, e IPE, Erg y Gir (Fig. 4a.17) en *L. pustulata*. Se hicieron nuevos ACPs añadiendo precipitación, Tav y radiación. Estos ACPs están representados en las Figs. 4.19 y 4.20 (las correspondientes Tablas 4a.10 a 4a.15 están en el Apéndice 4). Para *L. hispanica* (Fig. 4.19), se puede ver que el primer eje está definido por N y man, que ya estaban positivamente correlacionados en el análisis previo, y también por las variables Chl**b**, Gir, %Arg y precipitación (coeficiente positivo) y Tav y Rad (negativo). La estacionalidad también estaba representada en el primer eje, con muestras de Jun, Ago y Sep (final de primavera-verano) a la izquierda (lado negativo), y Feb, Abr, Oct y Dic a la derecha (lado positivo), con un 28% de la varianza total explicada. El segundo eje explicaba un 24% adicional, con coeficientes positivos para Erg, Amáx, RO, man, glu y Taz y negativo para IPE. Las muestras de Abr, Jun, Ago y Oct se sitúan a la izquierda, mientras que las de Sep y Dic están a la derecha. Feb aparece en el centro.

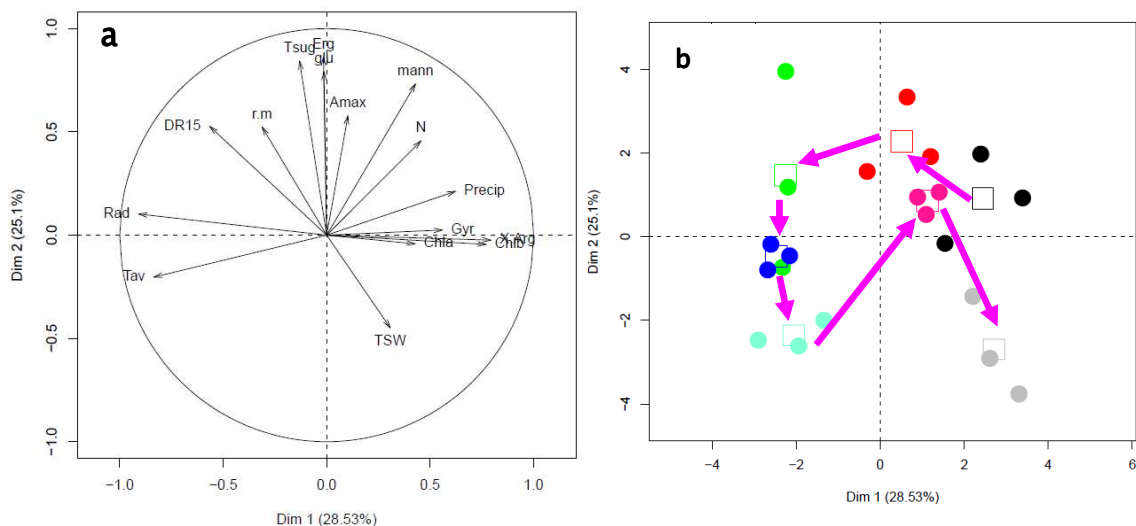


Fig. 4.19: ACP para *Lasallia hispanica*, incluyendo variables climáticas. (a) Diagrama de variables. (b) Diagrama de individuos. Feb en negro; Abr en rojo; Jun en verde; Ago en azul; Sep en azul claro; Oct en rosa; Dic en gris. Los cuadrados indican la media de cada mes, las flechas rosas entre ellos muestran el orden cronológico de Feb a Dic. Las tablas con los valores propios, las correlaciones y las contribuciones están en el Apéndice 4.

Los resultados de este ACP para *L. pustulata* (Fig. 4.20) fueron parecidos a los del análisis hecho sin las variables climáticas (Fig. 4a.15). Las mismas variables definieron la primera y segunda componentes, que en este caso explicaban un 35% y un 20% de la varianza, respectivamente. En el primer eje, Tav y Rad tenían un coeficiente positivo, pero la precipitación era importante sólo en la tercera componente, que explicaba un 12% adicional de la varianza, y estaba también definida por los coeficientes negativos de Tav y Rad. El primer eje separaba las muestras de la siguiente forma: las muestras recogidas de Dic a May (invierno-primavera) aparecían a la izquierda, mientras que las muestras de Jun a Nov (verano-otoño) estaban en el lado derecho. El segundo eje

separaba las muestras de primavera-comienzo de verano, con valores más altos de Amáx y menor cantidad de azúcares, de aquéllas del final del verano-otoño-invierno.

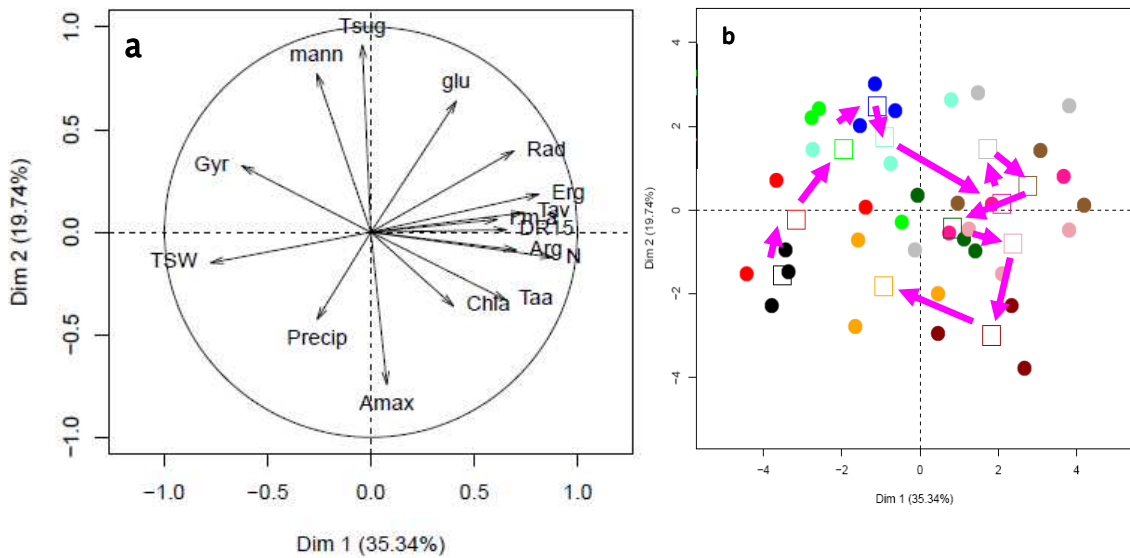


Fig. 4.20: ACP para *Lasallia pustulata*, incluyendo las variables climáticas. (a) Diagrama de variables (b) Diagrama de individuos. Ene en negro; Feb en rojo; Mar en verde; Abr en azul; May en azul claro; Jun en rosa; Jul en gris; Ago en pardo; Sep en verde oscuro; Oct en rosa claro; Nov en granate; Dic en naranja. Los cuadrados indican la media de cada mes, las flechas rosas entre ellos muestran el orden cronológico de Ene a Dic. Las tablas con los valores propios, las correlaciones y las contribuciones están en el Apéndice 4.

## DISCUSIÓN

La marcada estacionalidad del clima mediterráneo parece provocar cambios en varios parámetros fotosintéticos y metabólicos de las dos especies de *Lasallia* estudiadas. Aunque se observaron patrones similares para algunas variables, se registraron tendencias opuestas para otras. Estas distintas respuestas a la estacionalidad en algunos parámetros se deben probablemente a la diferencia en las condiciones microclimáticas en las que vive cada una de estas dos especies. Parece ser precisamente esta diferenciación de nicho la que hace posible la coexistencia de estas especies. Se ha observado un fenómeno de segregación de nicho similar dentro de un mismo hábitat en los estudios de Larson (1984), Scott & Larson (1986) y Hestmark (1997), llevados a cabo en varias especies de Umbilicariáceas, y más recientemente, de Sonesson *et al.* (2011), en *Parmeliopsis ambigua* y *Parmelia olivacea*.

### Intercambio gaseoso

*Lasallia pustulata* parece ser capaz de utilizar de manera más eficiente los periodos breves de actividad. El área bajo la curva de temperatura Fig. 4.5 (Tabla 4.1), que proporciona una idea de la productividad potencial, es mínima para *L. hispanica* en Sep ( $10'6 \mu\text{moles CO}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ), y máxima en Jun, siete veces más alta ( $75'83 \mu\text{moles CO}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ). Por el contrario, *L. pustulata* mostraba su valor más bajo en Dic ( $54'29 \mu\text{moles CO}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ) (Tabla 4.2), y el más alto en Oct ( $90'26 \mu\text{moles CO}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ), pero este valor era sólo un 66% mayor que en Dic. En todos los casos, el área integrada era mucho mayor en *L. pustulata*.

Al comparar los resultados de KF y Amáx de ambas especies (Figs. 4.7, 4.8) vemos que *L. hispanica* muestra a menudo valores más altos a temperaturas más bajas, especialmente en invierno y primavera, en el caso de Amáx, mientras que los valores son similares (o incluso bastante menores para Amáx a 25°C) a temperaturas más altas (con la excepción de Sep, véase más abajo). Larson (1980) encontró diferencias parecidas en las preferencias de temperatura de especies de *Umbilicaria* con distintos nichos. Este autor observó una mayor productividad de *U. vellea* y *U. muhlenbergii* a temperaturas cercanas al punto de congelación del agua, comparadas con el resto de especies utilizadas en ese estudio, y explicó que, de ese modo, esas especies vivirían probablemente en lugares protegidos por rocas frescas en verano. La diferencia en nuestro estudio es que *L. hispanica* crece en una roca mucho más expuesta, sufriendo temperaturas más bajas en invierno y más altas en verano, pero en esos meses extremadamente cálidos los talos están inactivos la mayor parte del tiempo.

En la Fig. 4.8 puede verse que las muestras de *L. hispanica* de Jun, que, como se ha dicho ya, muestran el área más amplia, no fueron las más productivas a 5 °C, las de Feb, Abr y Oct tuvieron tasas más altas. La temperatura media en el lugar de recolección (Tav) en Feb y Abr fue menor que en Jun (Fig. 4.4, Tabla 4.2), por lo que esta observación indicaría una aclimatación muy útil a la temperatura predominante en Feb y Abr, y sería ventajosa a la hora de obtener productividades mayores. Se observó una tendencia similar en *L. pustulata*, aunque las diferencias no eran tan claras. Feb fue el mes más eficiente a 5 y 10 °C, siendo superado por Dic y Jun a 15 °C en *L. hispanica* (Fig. 4.7). Junio tiene los mayores valores de KF y Amáx a 20 y 25 °C (Figs. 4.7, 4.8) en *L. hispanica* y a 25 °C en *L. pustulata*. En esta última, Sep era el mes con menor eficiencia a todas las temperaturas (tanto para KF, in Fig. 4.7, como para  $\Phi$ , en la Tabla 4a.1). Las diferencias no eran estadísticamente significativas, pero la tendencia era clara. Septiembre también muestra la menor productividad. Por el contrario, los valores de Sep de *L. pustulata* no son más bajos que el resto del año. Esto confirma la influencia del microhábitat, que protege a *L. pustulata* frente a las condiciones adversas estivales. La respuesta respiratoria encontrada en Dic es la menor para ambas especies (Fig. 4.9). Esta respuesta se describió también en *Umbilicaria vellea* (Larson, 1980).

En el caso de *L. pustulata*, se ve un comportamiento muy regular en las muestras de los meses más fríos del año (Fig. 4.6b). Se observa claramente un cambio en el óptimo de temperatura para la fotosíntesis entre Abr–May y Jun–Jul, similar al encontrado en *L. hispanica* entre Abr y Jun. En la Fig. 4a.1 (Apéndice 4) vemos que la relación entre el óptimo de temperatura y la temperatura ambiente de cada mes es positiva y significativa para *L. pustulata*, indicando la aclimatación a las condiciones predominantes en cada momento, una tendencia que no fue significativa en *L. hispanica*.

Los resultados de Sep son notablemente distintos. En todos los casos, en Sep *L. hispanica* tenía valores más bajos de KF y Amáx (con diferencias significativas en todos los casos, excepto en Amáx a 5 °C), pero no se observaron cambios en RO (Fig. 4.9). El bajo rendimiento de las muestras de Sep de *L. hispanica* debe estar relacionado con la sequía e insolación extremas que sufrieron los talos en Agosto. La precipitación fue prácticamente nula y la estación meteorológica no registró rocío ese mes (datos no mostrados). Además, la humedad relativa media del mes completo estuvo por debajo del 35%, con valores máximos por debajo del 70% (y éstos fueron extremadamente raros). Aunque los clorolíquenes son capaces de reactivarse y fotosintetizar con hidratación procedente de la humedad del aire (Lange & Kilian, 1985; Scheidegger *et al.*, 1995; Pintado & Sancho, 2002), la HR registrada no es ni suficientemente alta ni se mantiene el tiempo suficiente para permitir la reactivación del metabolismo (Lange & Kilian, 1985; Lange *et al.*, 1986). Además, se ha demostrado que las altas irradiaciones pueden dañar incluso talos inactivos (Gauslaa & Solhaug, 1999; Heber & Lüttge, 2011). Es fácil entender que, bajo condiciones tan adversas, los talos hayan perdido parte de la productividad potencial que muestran en otros meses con condiciones más suaves.

Otra consecuencia de estas condiciones difíciles se refleja en los valores de Pc y Ps, que fueron bastante mayores en Sep, mes en el que  $\Phi$  fue mínima (Tabla 4a.1, Fig. 4a.2, Apéndice 4). Los resultados de la fluorescencia de la Chl<sub>a</sub> indica también el daño sufrido durante este periodo, con el valor más bajo de Fv/Fm en Sep (Figs. 4a.8, Tabla 4a.2). Todo esto refleja el hecho de que el micobionte no parece sufrir tanto la sequía, insolación y calor como el fotobionte, teniendo en cuenta la ausencia de respuesta de los valores de RO (Fig. 4.9). Se puede asumir que el hongo es responsable de la mayor parte de la RO (Quispel, 1960) teniendo en cuenta que en la mayoría de los líquenes heterómeros, el micobionte conforma la mayor parte del talo (Ahmadjian, 1993). Por tanto, al tener una tasa de RO parecida, las algas dañadas no son capaces de compensar hasta que se alcanzan irradiaciones muy altas en el laboratorio, o en muchos casos, no son capaces en absoluto.

¿Por qué no encontramos una respuesta similar en *L. pustulata*? Hay una cierta depresión de los valores alcanzados por esta especie en Sep, con respecto a otros meses, pero ni el coeficiente de eficiencia KF (Fig. 4.7), ni la productividad (Fig. 4.8), ni Fv/Fm (Fig. 4a.10, Tabla 4a.3) eran tan marcadamente menores como en el caso de *L. hispanica*, manteniéndose dentro de los valores medios del año. En este caso RO no era tan uniforme, sino que mostraba tendencia a tener valores algo más bajos en Sep con respecto a los del resto del año, a excepción de Dic. Esto, por supuesto, afecta también a la respuesta de KF y Amáx, pues las algas compensan antes un valor menor de respiración, alcanzando productividades más altas y mostrando mejores KF. Se puede asumir que el régimen hídrico era el mismo para ambas especies (es decir, nada de agua en Sep), aunque los talos de *L. pustulata* estaban más cerca del suelo. La diferencia principal reside entonces en el régimen lumínico, que es más intenso para *L. hispanica*, que se encuentra completamente desprotegida frente a la irradiación, debido a la ausencia del dosel arbóreo que *L. pustulata* sí disfruta. De esta manera, podemos concluir que la depresión encontrada en Sep en *L. hispanica* se debe

principalmente a daño por exceso de luz. Esto se ve respaldado por el valor mínimo de Fv/Fm encontrado ese mes (0'494, Tabla 4a.2). También el valor de Fv/Fm de *L. pustulata* en Sep era mínimo, pero era mucho más alto (0'622, Tabla 4a.3).

Curiosamente, el micobionte de *L. pustulata* parecía más afectado por las condiciones estivales, mostrando, como se ha dicho anteriormente, un descenso de RO en función de peso seco en Sep, que aumentó de nuevo hasta alcanzar los valores máximos en Oct, tras las primeras lluvias otoñales (Fig. 4.9). Este incremento de RO y por tanto de actividad del micobionte, coincide con un descenso de IPE (Fig. 4.12), que Larsson *et al.* (2012) también observaron y explicaron como una consecuencia del crecimiento fúngico, que provoca principalmente una expansión del área del talo. La misma respuesta a esas primeras lluvias otoñales se pudo observar en *L. hispanica*. En el citado estudio de Larsson *et al.* (2012) se observó mayor crecimiento en área durante las estaciones húmedas. De acuerdo con esto, el valor más bajo de IPE en ambas especies de *Lasallia* se alcanzó en Oct. Pero, sorprendentemente, los más altos fueron los de Feb y Dic para *L. hispanica* y de Ene para *L. pustulata*. Feb y Dic fueron meses bastante secos dentro de la estación húmeda, pero Ene fue uno de los meses con mayores precipitaciones (Fig. 4.4). Sin embargo, esta precipitación fue principalmente en forma de nieve, y, por tanto, menos disponible para los talos. Cuando fuimos al campo a principios de Diciembre para la recolección mensual, la roca de *L. pustulata* estaba completamente cubierta de nieve y la temperatura era tan baja, que los talos de *L. hispanica* estaban congelados. Se ha visto que algunas especies de líquenes son capaces de fotosintetizar bajo la nieve (las especies antárticas *Umbilicaria aprina* en Schroeter *et al.*, 1994 y *Xanthoria mawsonii*, Pannewitz *et al.*, 2003) y/o a temperaturas muy bajas, mucho más allá del punto de congelación (Lange, 1965; Schroeter *et al.*, 1994). Larson (1982) demostró la resistencia de cinco especies de Umbilicariáceas a la exposición a -25 °C durante nueve meses y los líquenes antárticos pasan la mayor parte del tiempo a temperaturas más bajas. Nuestros talos no se vieron dañados por el frío, sino que experimentaron la sequía relativa provocada por la nieve y la deshidratación consecuente a la formación de hielo extracelular y, por tanto, el incremento de IPE en los meses más fríos estaría de acuerdo con el que encontraron Larsson *et al.* (2012) en los meses más secos, y sería también una respuesta útil para soportar el frío. Asimismo, es una respuesta lógica ante el descenso de disponibilidad de agua, pues los valores altos de IPE se han relacionado con un incremento de la capacidad de almacenamiento de agua (Lange *et al.*, 1993; Gauslaa & Coxson, 2011) y del tiempo de retención (Valladares *et al.*, 1998).

Al comparar los valores de RO, NP y KF obtenidos a la temperatura media de cada mes y a una temperatura fija (Figs. 4.10 y 4.11), observamos que para ambas especies, de acuerdo con MacKenzie *et al.* (2002), el parámetro más influyente en la productividad a lo largo del año es la temperatura predominante en condiciones naturales. De hecho, hay muchas más diferencias significativas cuando se analizan las tasas a la temperatura media de cada mes (Fig. 4.10) que cuando se miden a una temperatura fija (Fig. 4.11). La RO en el primer caso es una consecuencia directa de las altas temperaturas veraniegas y bajas invernales, y tanto FN como KF se ven afectadas



por esas tasas de RO, aunque obviamente KF de manera más marcada. Los valores de KF a una temperatura fija son mucho más uniformes en ambas especies. Sin embargo, para *L. hispanica* el valor de Sep era aún marcadamente menor, como consecuencia de la FN tan baja, ya que la RO era similar, mostrando la influencia más marcada de las condiciones estivales en el fotobionte que en el micobionte (Lange & Green, 2005). Es interesante ver los valores bastante regulares de KF de *L. pustulata* también a la temperatura de campo (Fig. 4.10). En *L. hispanica*, el valor máximo (Feb, 2'77) era más de dos veces mayor que el mínimo (Sep, 1'05). En el caso de *L. pustulata*, el rango era más estrecho (de 1'37 en Sep a 2'26 en Ene). Esto se debe también a las condiciones ambientales más suaves que proporciona el dosel arbóreo en verano.

### **Análisis subcelulares**

El contenido de clorofila mostró un patrón similar de variación en ambas especies, con valores más bajos de Chl total en primavera-verano, un incremento repentino en Oct, y el mantenimiento de altos niveles en otoño e invierno (Figs. 4.13 y 4.14). Estos cambios se debieron principalmente a cambios en la cantidad de Chl**b**, mientras que la Chl**a** mostraba valores más uniformes a lo largo del año para ambas especies. Tal incremento de Chl**b** al comienzo del otoño parece muy útil para mejorar la captura de luz en un mes en el que el metabolismo se reactiva mucho, según la lluvia reaparece tras la sequía estival, mientras que los días se van haciendo más cortos y la declinación solar desciende. Por el contrario, MacKenzie *et al.* (2001) midieron valores mayores de Chl y menores de Chl *a/b* en verano, como consecuencia del completo desarrollo del dosel en un bosque caducifolio de arce. Debido a la ausencia del efecto sombra, el comportamiento de *L. hispanica* parece perfectamente lógico, pero, ¿por qué el contenido de Chl de *L. pustulata* no se ve afectado por el dosel? ¿No sería esperable encontrar un incremento de la molécula captadora de luz Chl**b** en los meses de verano, como en el caso de *Lobaria pulmonaria* (MacKenzie *et al.* 2001)? Se puede encontrar una tendencia parecida a la nuestra en el estudio de Pirintsos *et al.* (2011), que observaron en muestras de *Evernia prunastri* y *Pseudevernia furfuracea* de Creta un aumento de Chl *a/b* en verano, un fenómeno que también nosotros hemos podido ver en nuestro estudio. Tretiach *et al.* (2003) describieron un valor máximo de Chl en muestras de *Parmelia sulcata* que crecían en un bosque de castaños en Toscana, y ya Wilhelmsen (1959) observó valores más bajos en verano comparados con los de invierno en *Peltigera canina*, *Hypogymnia physodes* y *Xanthoria parietina* de Dinamarca y Austria. El factor más influyente en el clima Mediterráneo durante el verano es la disponibilidad de agua (v.gr.: Rundel, 1995; Pintado *et al.*, 1997; Joffre *et al.*, 2007), y determina la respuesta a todo el resto de cambios ambientales. Aunque no existen estudios de seguimiento a largo plazo de líquenes de bosques mediterráneos, podemos asumir que su tiempo de actividad en los secos meses de verano es muy corto. De esta manera, ni tendrían tiempo para sintetizar más Chl ni esa síntesis les serviría de nada, teniendo en cuenta la brevedad del periodo de actividad. En esta situación, el hecho de que la luz se vea filtrada por el dosel en verano es puramente anecdótico, aunque, como hemos visto más arriba, protege a *L. pustulata* del daño provocado por el exceso de irradiación ante el que *L. hispanica* se ve completamente expuesta. Sin embargo, podemos observar algunas diferencias entre

estas dos especies, que se entienden fácilmente teniendo en cuenta su exposición a la irradiación (Fig. 4a.7). Encontramos un contenido de Chl**b** significativamente mayor en *L. pustulata* en Jun y Oct, justo antes y justo después de la inactividad estival.

Los marcadores fúngicos ergosterol (Erg) y quitina (Quit) se relacionan habitualmente con el IPE, como hemos visto en los capítulos anteriores. Como se ha dicho más arriba, observamos un aumento de RO ligado a un descenso de IPE en ambas *Lasalliae* de Sep a Oct. Nuestra explicación de la reactivación del metabolismo fúngico tras las primeras lluvias de otoño se ve respaldado por el aumento en Erg y la disminución en Quit/Erg (Fig. 4.15), más marcados en *L. pustulata*. Esta especie mostró una reducción en los valores de Erg a partir de Dic, hasta alcanzar un mínimo en Ene. Esto refleja de nuevo la tendencia opuesta del IPE. *Lasallia hispanica* muestra un valor de Erg significativamente mayor en Feb que *L. pustulata*. Esto puede indicar tanto una recuperación más rápida de las condiciones tan frías del invierno, como un daño menos acusado por causa de las bajas temperaturas. De hecho, pudimos observar tasas de Amáx mas altas en las muestras de Feb de *L. hispanica* (Fig. 4.8). Por el contrario, los valores de Erg de *L. pustulata* fueron mayores durante el verano y el otoño, mostrando la misma tendencia que la encontrada en Amáx. Claramente, tanto el hongo como el alga de esta especie se benefician de la protección que reciben del dosel arbóreo durante el verano.

Los valores de ácido girofórico (Gir) respaldan la conclusión de los capítulos previos respecto a la ausencia de actividad fotoprotectora de este metabolito secundario. En tal caso, hubiéramos esperado mayores cantidades de este compuesto en *L. hispanica* en los meses de verano, pero lo que se observó fue una tendencia a mostrar valores más bajos en la época estival en ambas especies. Esto se ve apoyado también por los ACPs, en los que Gir se correlaciona negativamente con la irradiación en ambas especies (Figs. 4.19 y 4.20).

Los cambios observados en los azúcares se deben interpretar con cautela. La bibliografía sobre azúcares en líquenes es escasísima. Parece que la cantidad de azúcares puede cambiar completamente en unas pocas horas, siempre y cuando las condiciones sean propicias para ello (T.G.A. Green, comunicación personal) y por tanto, es probable que la síntesis de azúcares sencillos esté profundamente influida por las condiciones precias a la recolección de los talos. Sin embargo, todas nuestras muestras tuvieron un idéntico tratamiento previo a los análisis y esto puede haber hecho desaparecer o al menos mmitigado los efectos de las condiciones previas a la recolección.

En conjunto, los azúcares fueron más abundantes en talos de primavera, con un descenso en verano hasta alcanzar el valor mínimo en Sep. En ese momento, los valores comenzaron a aumentar, como se ha visto en otros parámetros (Fig. 4.16). Esto es una consecuencia lógica de la productividad, que es una combinación del tiempo de actividad y de la capacidad fotosintética potencial, especialmente en el caso del ribitol, el azúcar del alga, la molécula que transfieren los fotobiontes trebuxioideos a los

micobiontes (Gorin *et al.*, 1988; Fahselt, 1994; Palmqvist *et al.*, 2008). De acuerdo con esta hipótesis, el contenido total de azúcares fue siempre mayor en la más productiva *L. pustulata*.

Los valores de manitol (man) fueron también ligeramente más altos en *L. pustulata*, y esto se ve reflejado en el cociente rib/man, que era mayor en *L. hispanica*. Las diferencias son especialmente amplias en los meses de condiciones más extremas, en invierno y en verano. Esto puede interpretarse como un intento de *L. hispanica* de proteger a su fotobionte frente a la desecación (Smith *et al.*, 1969; Farrar, 1976; Ahmadjian, 1993; Green *et al.*, 2011a). Pero al mismo tiempo, podría indicar una menor transferencia relativa de ribitol al micobionte, porque los recursos disponibles deben emplearse en otras moléculas protectoras, y no es posible llevar a cabo una inversión tan grande en las reservas de hidratos de carbono.

Se observaron muchas diferencias entre las dos especies en cuanto al metabolismo y distribución del N (Figs. 4.17, 4.18). La explicación de estas diferencias es complicada y está más allá de los datos disponibles en este estudio, por lo que sería necesario llevar a cabo nuevos estudios enfocados en cambio estacional de la disponibilidad de N en este ecosistema, así como en la tolerancia a este elemento y su metabolismo en estas dos especies. Como se dijo en la introducción general, la acumulación de arginina (Arg) puede interpretarse como un mecanismo de reserva de N (Legaz *et al.*, 1986) y como un medio para evitar la toxicidad del exceso de  $\text{NH}_4^+$ , mediante la inmovilización de esta molécula (Dahlman *et al.*, 2002; Dahlman & Palmqvist, 2003). Los niveles de  $\text{NH}_4^+$  de *L. pustulata* fueron siempre mayores que los encontrados en *L. hispanica*. La ausencia de un patrón anual significativo en el contenido de  $\text{NH}_4^+$  de *L. hispanica* podría indicar una inmovilización de esta molécula muy eficiente mediante la síntesis de Arg. No se pudo observar ningún patrón estacional en la proporción de Arg en *L. pustulata* (Fig. 4.22), mientras que en *L. hispanica* había una clara tendencia a mostrar valores más bajos hacia el final de la primavera, con un mínimo en Jun, y un incremento a partir de entonces hasta el máximo encontrado en Feb. El contenido total de aminoácidos fue generalmente superior en *L. pustulata*, especialmente en meses supuestamente muy productivos, como Jun y Oct.

Como se ha dicho antes, también pudimos observar niveles más altos de azúcares totales en *L. pustulata*. Esto podría indicar que la estrategia funcional de esta especie se centra en la inversión del C disponible en crecimiento, mientras *L. hispanica* lo invertiría en moléculas de protección para poder soportar de manera efectiva las condiciones más duras a las que está expuesta. Como puede verse en la Fig. 4.23, no se encontraron diferencias en contenido de C entre las especies. De este modo, *L. hispanica* evita la competencia con especies menos tolerantes, pero de crecimiento más rápido, estableciéndose en nichos donde las condiciones microclimáticas son más duras. Sonesson *et al.* (2011) describieron una estrategia similar en *Parmeliopsis ambigua*.

### Análisis multivariante

El ACP de *L. hispanica* (Fig. 4.19) muestra la influencia que los factores climáticos parecen tener en esta especie. La precipitación aparece en la primera componente con un coeficiente alto y positivo, y se opone a Tav y Rad, cuyo coeficiente es también alto, pero negativo. Curiosamente, en el caso de *L. pustulata* (Fig. 4.20) la influencia de la precipitación es mucho menor, con un coeficiente con el primer eje de sólo -0'26. Los coeficientes de Tav y Rad son mayores, pero más bajos que en *L. hispanica* (Tablas 4a.11, 4a.14). Esto confirma de nuevo la mayor influencia que tienen las condiciones meteorológicas en *L. hispanica* en comparación con *L. pustulata*. La especie anterior tienen una estrategia de adaptación aero-higrófila, como ya se ha dicho (Sancho & Kappen, 1989), mientras que la de *L. pustulata* es sustrato-higrófila, lo que le permite aprovechar también la hidratación de su sustrato. Amáx está en ambas especies estrachamente ligada al segundo eje. Es notable que esta variable aparece mucho más cerca de la precipitación en *L. pustulata* que en *L. hispanica*, lo cual indica que en la especie anterior Amáx es más dependiente de la lluvia, mientras que en *L. hispanica* no muestra relación con ninguna variable ambiental. En otras palabras, *L. pustulata* es una especie mesófila y *L. hispanica* es una especie xerófila o al menos, tolerante a la sequía.

En ambos casos, el eje 1 parece estar indicando productividad, pues se relaciona con variables como Chla, Arg, Gir y N, y en el caso de *L. pustulata*, también Erg y Taa. Curiosamente, Amáx no aparece en línea con este eje, sino con el segundo. Esto sugiere que la productividad no se relaciona con las tasas máximas fotosintéticas en ninguna de las dos especies. Por tanto, hay otro factor que gobierna la productividad, que es, con toda probabilidad, el periodo de actividad. su longitud influenciaría notablemente el efecto de los demás factores, siendo por tanto mucho más importante que la tasa fotosintética puntual y potencial.

En ambas especies la primera componente agrupó Erg con RO, resultado concordante con el de Sundberg *et al.* (1999). El coeficiente entre azúcares algales y fúngicos también se agrupaba con ellos, y en el caso de *L. pustulata*, estas variables estaban también relacionadas con el N (Fig. 4a.15). Parece que la síntesis de Erg y la de manitol compiten por los recursos proporcionados por el fotobionte. En ambos casos, estas variables aparecían opuestas al IPE. De hecho, a mayor cantidad de Erg, mayor número de células fúngicas activas, menor de células estructurales y por tanto, más ligero es el talo por unidad de superficie. La Amáx aparece también en el lado positivo de la primera componente en *L. hispanica*, así como los azúcares totales, manitol y glucosa, mientras que en *L. pustulata* los aminoácidos totales y la arginina definen positivamente el primer eje.

Es digno de mención el hecho de que para *L. pustulata* la posición de los meses apenas cambia entre el ACP calculado sin variables ambientales (Fig. 4a.15. Apéndice 4) y el que sí las contenía (Fig. 4.35). El primer eje separa los meses de Ene a May de los meses de Jun a Nov, con la excepción de Sep, que aparece, al igual que Dic, en el centro del eje.

En el ACP de *L. hispanica*, los factores climáticos sitúan los meses de verano (Jun, Ago, Sep) a la izquierda del primer eje, relacionados con las altas temperaturas, irradiaciones y bajas precipitaciones y también con bajos contenidos de Chl, Gir, % Arg, y man. Cuando se calcula el ACP sin las variables climáticas para *L. hispanica* (Fig. 4a.14), la topografía de los meses respecto al primer eje sitúa en la parte positiva los meses de Abr y Oct, en los que las condiciones son más suaves y por tanto, se alcanzan valores más altos de azúcares, Amáx, Erg y RO. También son más bajos los valores de IPE, de acuerdo con Larsson *et al.* (2012) y el observado incremento en superficie en las estaciones húmedas. Con un comportamiento opuesto, encontramos los meses de Ago, Sep y Dic en la parte negativa de este primer eje. Y Feb y Jun ocupan una posición intermedia. La segunda componente separa los meses de verano (Jun, Aug, Sep) del resto del año. Estos meses aparecen en la parte negativa y muestran por tanto valores bajos de Chl, %Arg, Gir y N. Todo esto indica su menor rendimiento, una consecuencia directa del menor tiempo de actividad que muestran en esa estación.

### Conclusiones

La combinación de las condiciones climáticas reales y las características morfológicas y ecofisiológicas de cada especie determina la longitud y productividad de los periodos de actividad (Lange, 2003a). Esto parece tener una gran influencia en el rendimiento de las dos especies de *Lasallia* aquí estudiadas. Es muy probable que *L. pustulata* tenga un periodo activo anual más largo, gracias a vivir en un microhábitat más protegido. Esto le permite tener una tasa de crecimiento más rápida, especialmente teniendo en cuenta su mayor productividad potencial (Fig. 4.8) y eficiencia (Fig. 4.7), en comparación con *L. hispanica*, que debe invertir más recursos en protegerse frente a las condiciones más duras a las que tiene que enfrentarse. No es que esas condiciones no dañen su metabolismo, incluso bajo periodos de inactividad, porque hemos observado de hecho valores más bajos en casi todos los parámetros medidos, así como una fuerte fotoinhibición, especialmente tras las duras condiciones estivales. Pero el éxito de *L. hispanica* radica en el hecho de que es capaz de medrar en ecosistemas muy cambiantes, gracias a su tolerancia frente a la sequía, frío y calor extremos y a los altos niveles de luz. Hemos demostrado que esta especie es capaz de recuperarse en todos los aspectos cuando las condiciones mejoran. Los costes son altos, ya que debe invertir gran parte de sus recursos en la reparación de los tejidos dañados y esto conlleva una reducción de su tasa de crecimiento. Pero le permite colonizar nichos en los que con toda probabilidad *L. pustulata* y otras especies más competitivas son incapaces de vivir.

Sería muy útil realizar medidas microclimáticas combinadas con un seguimiento de actividad líquénica en el campo y experimentos de trasplantes recíprocos, que ayudarían a profundizar en la comprensión de las respuestas encontradas en este estudio, ya que proporcionarían mucha información sobre las condiciones a las que los líquenes se encuentran activos y permitirían realizar estimaciones de la longitud de sus periodos de actividad.

#### **4. EFFECTS OF SEASONALITY IN THE ECOPHYSIOLOGICAL PERFORMANCE OF TWO SYMPATRIC SPECIES OF *LASALLIA***



## INTRODUCTION

The main advantage that distinguishes lichens from vascular plants is their impressive capacity to tolerate the harshest environments thanks to their ability to remain dormant under unfavourable conditions, resuming their full activity when conditions become suitable for their metabolic activity (e.g., Lange *et al.*, 2007; Kranner *et al.*, 2008; Raggio *et al.*, 2011). Because of their poikilohydric lifestyle, which means that their water content tends to equilibrium with the environment, their metabolic processes are influenced by water availability in addition to changes in light intensity and photoperiod and temperature (Green *et al.*, 2008). Acclimation of their photosynthetic apparatus would help to maintain carbon gain under the seasonal variations in the environment, as the term 'acclimation' refers to a change resulting in the constancy or homeostatic control of vital processes under changing conditions (Prosser, 1955). Adaptation and acclimation to these environmental stresses result from changes that occur at all levels of organization, from the anatomical and morphological to the cellular, biochemical and molecular level (Beckett *et al.*, 2008).

Since Stålfelt (1939), the seasonal influence on metabolism has been studied in many lichen species. The early literature on this subject (Stålfelt, 1939; Kallio & Heinonen, 1971; Lechowicz & Adams, 1974; Kershaw, 1975; Larson, 1980; references reviewed in Kershaw, 1985; etc.) mainly deals with the changes produced in respiration and photosynthetic rates, as well as in temperature optima, especially in subarctic and temperate environments. Different reactions to seasonal changes have been described and, indeed, there is no commonly found response pattern. It seems likely that response to seasonality is species specific, or even population specific (Larson, 1980), and it may not depend entirely on the environment either. As stated by Levins (1968), coarse-grained environments can select for more than one stable equilibrium or mode of adaptation. This means that, in the same environment, complete seasonal acclimation may be as important to one species as lack of acclimation is to a different species (Larson, 1980). As an example of this, in his broad study Larson (1980) focused on five species of *Umbilicariaceae* growing at the same site, although in different niches (*Umbilicaria vellea*, *U. mammulata*, *Lasallia papulosa* (under *U. papulosa*), *U. deusta* and *U. muhlenbergii*). He took samples once in winter and once in summer to assess their net CO<sub>2</sub> exchange, and found a wide range of different responses: increasing rates of respiration combined with decreasing net photosynthesis in winter (*U. mammulata*), decreasing respiration rates in winter (*U. vellea*), or constant respiration rates through the year, but marked changes in photosynthesis (*L. papulosa*).

Full acclimation has also been observed, e.g. in *Collema furfuraceum* (Kershaw & MacFarlane, 1982), which shows no changes in CO<sub>2</sub> exchange rates between winter and summer. Lichens have been used in fact as a demonstration of the acclimation ability of fungi to temperature (Lange & Green, 2005). In other studies, it has been found that the operating environment of a lichen may not be similar to the global



environment (e.g., Green *et al.*, 2008; Pintado *et al.*, 2010; Green *et al.*, 2011b), which would tend to act against acclimation or adaptation.

Other patterns of photosynthetic changes triggered by seasonality have also been reported. Considering changes in light regime, Kershaw and MacFarlane (1980) found acclimation to low light in *Peltigera praetextata* (epiphyte on a deciduous woodland) and *P. scabrosa* (epiphyte on a spruce evergreen forest), with an increase of maximum net photosynthesis rates ( $A_{max}$ ) after 20 days of storage under low light, and a return to the initial values when the samples were transferred to high-light conditions. They also observed acclimation to photoperiod within 4 days of changing from a 12h/12h light/darkness regime to an 18h/6h regime.

More recently, MacKenzie *et al.* (2001, 2002, 2004) have thoroughly examined the response of the epiphyte species *Lobaria pulmonaria* to changing environmental conditions. They observed a tight relationship between the photosynthetic potential and the changing light regime, whereas the actual activity, i.e., under field conditions, was mainly influenced by temperature. The photosynthetic apparatus would respond to the interaction of both factors. They reported a lower seasonal amplitude in one population from an evergreen forest, in comparison with populations from deciduous woodlands. They also found a relatively constant rate of CO<sub>2</sub> uptake from April to November, despite changes in light and temperature, which they explained as a result of changes in Rubisco amount and activity of photosystem II, both adjusted to track ambient light. They concluded that the productivity of this species is temperature limited in winter and light limited in summer, when canopy has fully developed.

Another approach to seasonal influence on lichen metabolism was carried out by Lange in a wonderful field experiment where the behaviour of *Lecanora muralis* was monitored continuously for 15 months in its natural habitat, taking measurements of gas exchange and Chl<sub>a</sub> fluorescence, as well as meteorological data (Lange, 2002, 2003a, 2003b). Samples were active 35.6% of the year, with a positive carbon balance in every season. He emphasised the role of water status as the most important factor which drives activation and, hence, productivity. Therefore, activity periods depend on species-specific features, such as water uptake and water holding capacity, which, in turn, rely on morphological and anatomical particularities. *Lecanora muralis* was activated by rain, snow, fog, dew, frost and high air humidity. He also measured the productivity of this species under controlled conditions (2002), not finding any clear adaptation, with the exception of an increased temperature sensitivity of respiration in winter, which gave a lower light compensation point. He reports strong temporal patterns on carbon gain and loss, but he concludes that the momentary weather conditions are the factor that almost exclusively determined the photosynthetic activity throughout the year.

Larsson *et al.* (2012) analysed the seasonal response in growth of *L. pulmonaria* and *L. scrobiculata*. They reported an uncoupled increase of biomass and thallus area. Thallus specific weight (mass per area) increased in the dry and sunny period between

April and June, whereas it declined (in *L. scrobiculata*) or remained constant (in *L. pulmonaria*) in the humid and dark October–December season, entailing an increase of area, but not of mass. They suggested that biomass growth was dependent on light availability, while higher water availability caused area growth.

As seen, much attention has been put on the study of seasonal trends on subarctic to temperate habitats, with stress on epiphyte or terricolous species living on deciduous forests, for these habitats show a strong seasonal change in the light environment, due to the canopy development in spring and subsequent defoliation in autumn (see references above). However, literature is not so abundant on seasonal studies in other environments.

The Mediterranean climate is one that shows an even more marked seasonality. It has a strong contrast in rain regime, with precipitation almost completely absent in summer, and with pronounced differences in temperature, especially in continental areas. Therefore, it provides us with a very interesting field to study the effects of changing conditions on the species which live in it, and their strategies to cope with those changes. In the Mediterranean habitat the influence of seasonality in lichen performance has been scarcely investigated and only some aspects of it have been considered, such as pigment variation, Chl*a* fluorescence, gas exchange or polysaccharides content (e.g., Pintado, 1996; Pereyra *et al.*, 2003; Baruffo & Tretiach, 2007; Pirintsos *et al.*, 2011). As far as we know, the study here presented is the most extensive performed on lichens from a Mediterranean ecosystem. In it, we have analysed the effect of seasonality on several ecophysiological and subcellular aspects of the lichen metabolism. The chosen species have been *Lasallia pustulata* (L.) Mérat and *Lasallia hispanica* (Frey) L.G. Sancho & A. Crespo (see chapter 3 for a description).

We studied their CO<sub>2</sub> fixation rates throughout a whole year, by means of gas exchange measurements under controlled conditions of PPFD and temperature. The habitat of *L. hispanica*, which usually appears on more exposed rocks (Fig. 4.2), led us to hypothesise that its photosynthetic performance would be better at lower temperatures and higher PPFD, with higher light compensation points (P<sub>c</sub>). Likewise, we expected a higher thallus specific weight (TSW) for this species (Kappen, 1988), as it would allow it to retain water longer (Valladares *et al.*, 1998), a feature that would not be so important for *L. pustulata*, taking into account its substrate–hygrophytic strategy (Sancho & Kappen, 1989). We have already seen in the previous chapters the relationship between TSW and chitin content, as a quantifier of total fungal mass (Palmqvist *et al.*, 2002). We would expect a higher coefficient chitin to ergosterol in *L. hispanica* especially in the drier months of the year. We thought that the more exposed habitat where this species grew might also induce a thickening of the upper cortex, in order to protect the algal layer against excessive light.

For the same reason, we would expect higher values of gyrophoric acid in *L. hispanica*, under the assumption that this secondary metabolite would protect the lichen against high light intensities (Solhaug & Gauslaa, 1996). The amount of

chlorophyll was therefore expected to decrease in the summer months, especially the light harvesting Chl**b**, thus having an increase of Chl**a/b** ratio.

The commented substrate-hygrophytic strategy of *L. pustulata* would provide it with longer active periods than the aero-hygrophytic *L. hispanica* (Sancho & Kappen, 1989; Valladares *et al.*, 1998), during which it would be expected to fix more carbon and accumulate more sugars.

Amino acid analysis was performed as an indication of productivity and to check the possible role of arginine as an immobilising molecule of excess of the toxic NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (Dahlman *et al.*, 2002; Dahlman & Palmqvist, 2003). Seasonal variations of nitrogen availability have been described (Crittenden, 1998; Galloway *et al.*, 2008), and differential accumulation of total N on lichen thalli, depending on activity periods was found by Hovenden (2000) in two species growing in continental Antarctica.

## MATERIAL AND METHODS

### Lichen material

For this study, we chose a location near Madrid, in Silla de Felipe II, El Escorial (N 40° 34' 5", W 9° 8' 45", 1100 m. a. s. l., Fig. 4.1), where we went once a month from 1<sup>st</sup> October 2008 until 31<sup>st</sup> August 2009 to collect samples and perform chlorophyll fluorescence field measurements. At this locality, the dominant vegetation is an oak forest (*Quercus pyrenaica* Willd.), rich in epiphytic bryophyte and lichen species (Belinchón *et al.*, 2007). This species of oak has marcescent foliage, especially in young branches. The new leaves appear at the end of April in this locality and the flowering takes place shortly after that. There are in this forest some scattered granite boulders, where many saxicolous lichen species appear. Among them, we can find *Lasallia hispanica* (Frey) L.G. Sancho & A. Crespo (Fig. 4.2) and *L. pustulata* (L.) Mérat (Fig. 4.3). The former is an endemic mediterranean species, appearing from 1000 m.a.s.l. up to the highest summits of Iberian Sistema Central (Almanzor, 2592 m), in vertical, very exposed and windy surfaces. *Lasallia pustulata* is a widely distributed species, which grows from sea level until 1700 m. a. s. l., usually in more protected habitats (Sancho, 1986; Sancho & Crespo, 1989; Codogno & Sancho, 1991). A complete description of these species, as well as of their distribution area, can be found in the previous chapter. We selected one rock where *L. hispanica* was abundant and a different rock with plentiful *L. pustulata* so that we could take samples through the whole year, in order to avoid variability due to different places of collection. Samples of *L. hispanica* could be taken only every two months (at the beginning of February, April, June, August, September, October and December), due to the fact that the selected rock had not enough thalli to allow us to collect samples every month. This rock was completely exposed. In contrast, the rock of *L. pustulata*, which was inside the forest, had enough samples to allow a monthly collection. Thalli of *L. hispanica* are small and for this species each "replicate" contained from 3 to 5 individual thalli. In contrast, individual thalli of *L. pustulata* are larger, so a single thallus almost always constituted a

replicate. For most measurements of both species, three replicates were used, with the exception of fluorescence measurements.

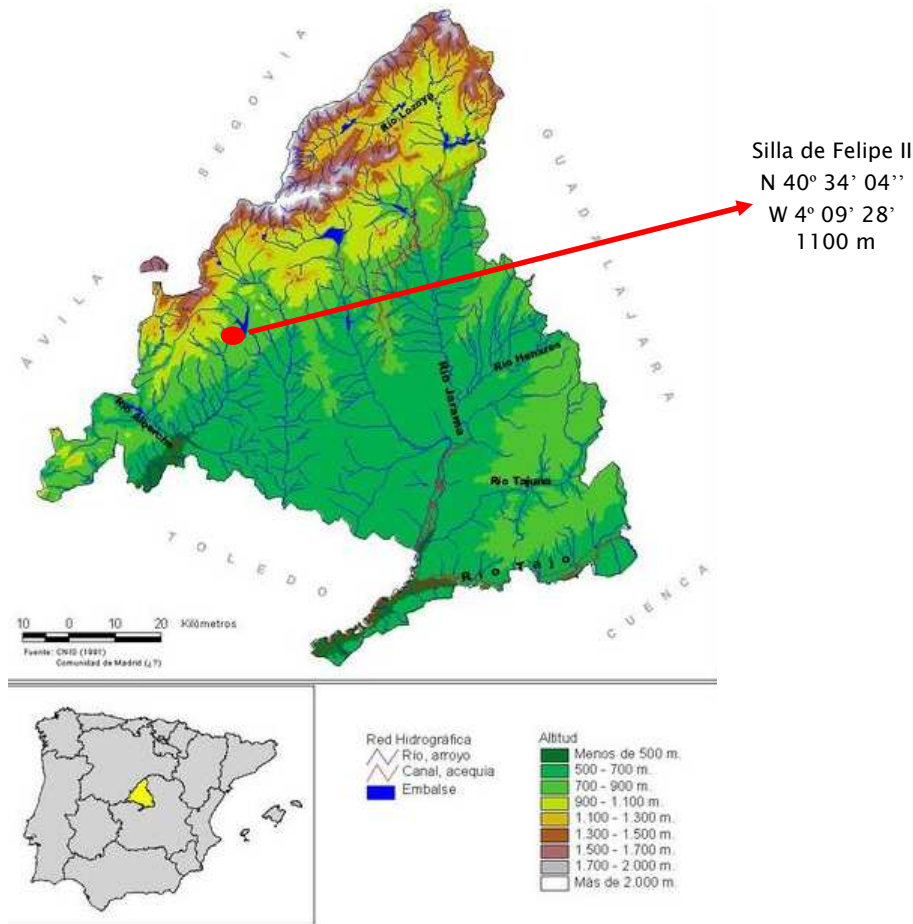


Fig. 4.1: Location of the experiment site (Source: CNIG).

### Meteorological data

The climatic data were kindly provided by the Agencia Estatal de Meteorología (AEMET) and cover the period of sampling, with hourly values for precipitation, temperature and irradiation. The data given for any particular month is actually the data for the month before (e.g., data labelled as January in Fig. 4.4 is actually the data gathered in December). The purpose of this labelling is to keep the same month labels for all the data, as samples from January were those collected at the beginning of January, and hence, exposed to the climatic conditions of the previous month, December.

### Gas-exchange measurements

Thalli were allowed to dry out at room temperature on the day of collection and when required for experimentation were reactivated for two days in a chamber at 10 °C, under a 12h photoperiod at a photosynthetically active photon flux density (PPFD) of 100  $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , being sprayed once a day with mineral water. CO<sub>2</sub> exchange measurements were performed using a Compact Minicuvette System (CMS 400, Walz, Effeltrich, Germany) and a differential IRGA (Binos 100, Leybold-Heraeus,



Germany) at fully controlled conditions of temperature, humidity and PPFD and at ambient CO<sub>2</sub> (approx. 350 ppm). A full description of the method is given in Schroeter *et al.* (1994). Prior to measurements, lichens were fully hydrated by spraying with mineral water until saturated and then gently blotted with tissue paper to remove excess water. Photosynthetic response to PPFD curves was measured at 5, 10, 15, 20 and 25 °C, obtaining an initial dark respiration (**DR**) value in darkness until steady-state was reached, and then values at 25, 50, 100, 200, 400, 800 and 1200  $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  were taken at 15 °C, whereas short light curves were performed at the rest of temperatures, taking values at 0, 200, 400, 800 and 1200  $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Before and after each series of measurements, thalli were weighed so that thallus water content (as %DW) could be later determined. It was necessary in some cases to rehydrate the thalli during the measurements to retain optimal hydration. Photosynthetic rates were then calculated on a dry weight, surface area and chlorophyll basis, according to von Caemmerer & Farquhar (1981). The PPFD response curves were analysed by statistical fitting to a Smith function, as detailed in Green *et al.* (1997) and in the Material and Methods section of the previous chapters of this thesis.

After the gas-exchange measurements, thalli surface area of the samples was determined in the same way as in the Material and Methods section of the previous chapters.



Fig. 4.2: Wet thalli of *L. hispanica* (left) and rock where the species was collected (right).



Fig. 4.3: Wet thallus of *L. pustulata* (left) and rock where the species was collected (right).

### **Subcellular analyses**

After photosynthetic analysis samples were frozen until further analyses of chlorophylls *a* and *b* content (**Chl*a*** and **Chl*b***) and chitin, ergosterol, aminoacid, sugars, gyrophoric acid and C/N. The details about these analyses have already been described in the Material and Methods section of the previous chapters.

### **Fluorescence measurements**

Field and laboratory fluorescence measurements were carried out using a fluorometer MINI-PAM (Walz, Effeltrich, Germany). Thalli of *Lasallia hispanica* and *L. pustulata* were carefully selected for a monitoring of their physiological status during the whole year in the field. We chose 8 healthy looking thalli from each species living attached to the same rock from which we took the samples for laboratory measurements. For each thallus we measured 10 saturation pulses at 10 different points, after full hydration by spraying with mineral water and dark adaptation (20 minutes with a black velvet cloth). These field measurements were carried out the same day of collection of samples for ecophysiological measurements, at the beginning of each month. In December we found the rock of *L. pustulata* completely covered by snow, and had to remove it to reach the thalli. Being more exposed, the rock of *L. hispanica* had no snow cover, but the thalli were completely frozen, making the fluorescence measurements impossible. The results of these field measurements are shown in chapter 5. For lab measurements, we used the collected thalli from the two species prior to gas exchange. After full hydration by spraying with mineral water and dark adaptation (20 min), we recorded the dark/light induction curves followed by the light/dark recovery in the same way as explained in the Material and Methods section of chapter 2.

### **Statistical analysis**

Statistical analyses were conducted in R 2.10.0 (R Development Core Team, 2009) with the help of the packages *multcomp* (Hothorn *et al.*, 2008), *Hmisc* (Harrell, 2012) and *FactoMineR* (Lê *et al.*, 2008). ANOVA followed by Tukey's HSD post-hoc test were performed to test the differences within the species. For differences between the species, t-tests were calculated. Significant differences were considered for  $p < 0.05$ . Principal Component Analysis was performed to group the variables. Graphs for gas exchange and subcellular components results were made using SigmaPlot 10.0 (Chicago, Illinois, USA). Graphs for Principal Component Analysis were obtained in R.

## **RESULTS**

### **Meteorological data**

Fig. 4.4 depicts the climatic variables during the period where this study took place. It was a fairly dry year (473 mm, compared to the 910 mm on average from 1960 to 1990, according to AEMET). The coldest month was February (actually, January 2009) with a mean temperature of 3.4 °C, and the warmest was September (i.e., August), with a mean of 25.2 °C. The differences between the maximal, mean and

minimal temperature are consistent through the year. The temperature covaries with the irradiation, reflecting the photoperiod.

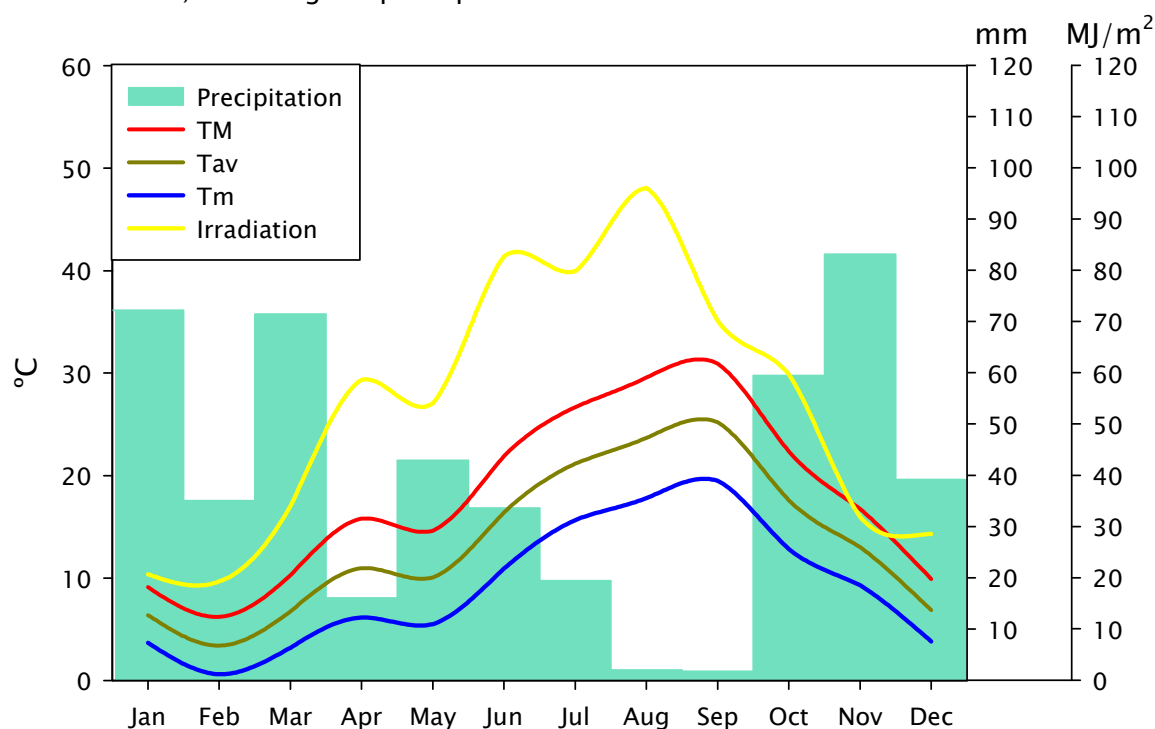


Fig 4.4: Meteorological data for the experimental period at the sampling locality. TM is the average of the daily maximal temperature, Tav is the average of the daily average temperature and Tm is the average of the daily minimal temperature (in °C). Monthly precipitation is measured in mm and total irradiation is measured in Mega Joules per square meter (Source: AEMET). Values of each month actually belong to the first day of that month, i.e., they are the means (for temperatures) or the summation (for precipitation and irradiation) of the **previous** 30 days.

### CO<sub>2</sub> exchange

Photosynthetic response curves to temperature of *L. hispanica* are shown in Fig. 4.5 which shows some differences in the photosynthetic performance ( $A_{max}$ , at  $1200 \mu\text{mol photons} \cdot \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) over the months of measurement. The low values obtained in September are especially noteworthy. The values of dark respiration (DR) are more similar over the year, with lower values for the samples collected at the beginning of December at every temperature measured.

Optimal temperature for photosynthesis is shown in Table 4.1. The lowest values are from samples collected at the beginning of February and April, coinciding with the lowest temperatures recorded for the period of the study. The estimated lower and upper compensation points follow the same pattern, being lowest in February and April. The lowest range is found for the September samples, which also have the lowest area under the curve, suggesting a poorer photosynthetic performance in comparison with samples collected at other times.

The samples of *L. pustulata* show a different behaviour. No similarly large differences are observed in this species (Fig. 4.6 and Table 4.2). The least productive month (based on the area under the photosynthetic response to temperature curve)

would be December, but with a much higher area than *L. hispanica* in its lowest month, September (54.29 vs. 10.60 total  $\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ). The most productive months are October, November, May and August. The area under the curve for both species was similar in April, June and December, higher for *L. hispanica* in February and higher for *L. pustulata* in August, September and October. The results for the former species seem to be more variable through the year.

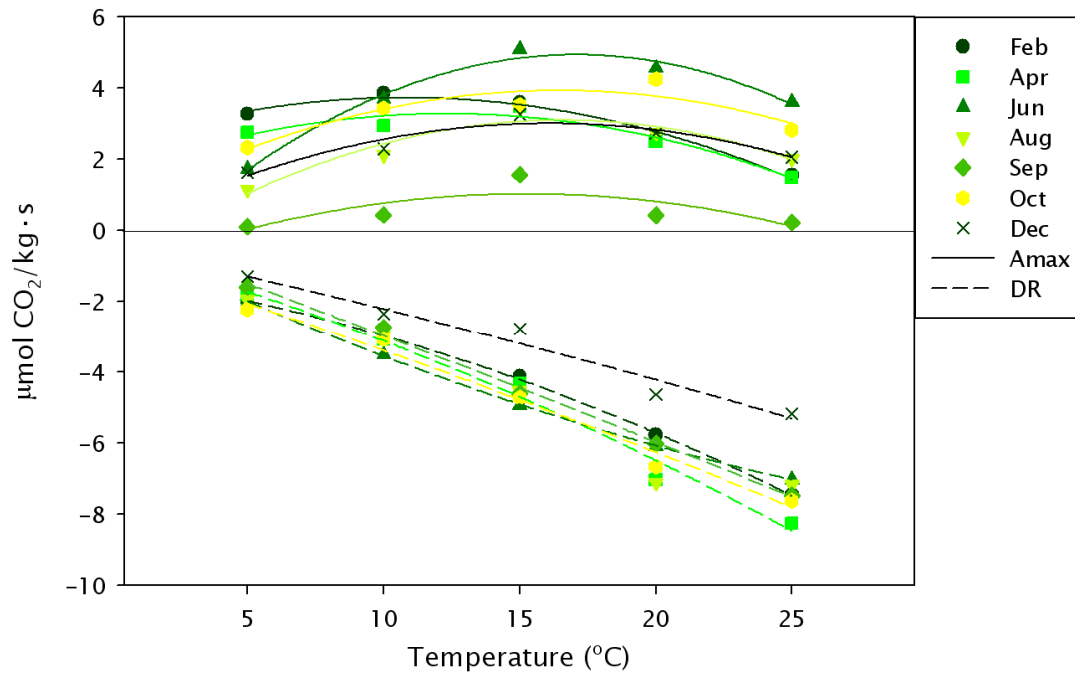


Fig. 4.5: Temperature response curves of gas exchange for *Lasallia hispanica* samples with rates on a dry weight basis. Amax (solid line, net photosynthesis at  $1500 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) and DR (dashed line, dark respiration, at  $0 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) at every measuring temperature. Data are fitted using polynomial regressions (2<sup>nd</sup> degree,  $R^2$  always  $>0.95$ ).

Month	Tcl	Topt	Tcu	Area	Tav
February	-7.4	10.8	28.9	72.7	3.4
April	-4.8	12.3	29.4	62.9	11.0
June	2.2	17.1	32.0	75.8	16.4
August	2.4	16.5	30.6	46.3	23.7
September	4.9	14.5	25.4	10.6	25.2
October	-1.3	16.4	34.1	71.8	17.6
December	0.2	16.1	32.0	51.8	6.9

Table 4.1: Temperature optimum of photosynthesis, lower and upper temperature compensation points ( $T_{\text{opt}}$ ,  $T_{\text{cl}}$  and  $T_{\text{cu}}$  respectively, in  $^{\circ}\text{C}$ ) and area under the curve (calculated by integration of the function between 5 and  $25^{\circ}\text{C}$ , in  $\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) for *L. hispanica*. Tav is the mean temperature of each month (in  $^{\circ}\text{C}$ ).

For the efficiency quotient KF (Figs. 4a.3, 4a.4, appendix 4) we see very similar values through year for *L. pustulata* at the same measurement temperature. In the case of *L. hispanica*, monthly values are more different with the samples from September having lower values at every temperature, and often statistically significant different. When we compare the two species (Fig. 4.7) we find significantly lower values for *L. hispanica* in September at all the measurement temperatures and at  $15^{\circ}\text{C}$  in August. Although the difference was not significant ( $p=0.1$ ), we found a higher value for KF of *L. hispanica* at  $5^{\circ}\text{C}$  in February samples, with a similar tendency in April, June and December.



Not only is the KF of *L. hispanica* lower in September, but also the absolute Amax is significantly lower than the measured for *L. pustulata* (Fig. 4.8). The Amax of the latter species was significantly higher than *L. hispanica* at 15 °C in August and at 20 °C in October, whereas *L. hispanica* had higher values at 5 °C in February. Results are similar for the two species when rates are calculated on a surface area or chlorophyll content basis (Figs. 4a.5, 4a.6, appendix 4).

Dark respiration was little different between the two species (Fig. 4.9), although there was a tendency for *L. pustulata* to have slightly higher values.

These three parameters, DR, NP and KF obtained at the field temperature and at a fixed temperature (15 °C) are compared in Figs. 4.10 and 4.11. We can see that values for the latter are much more even.

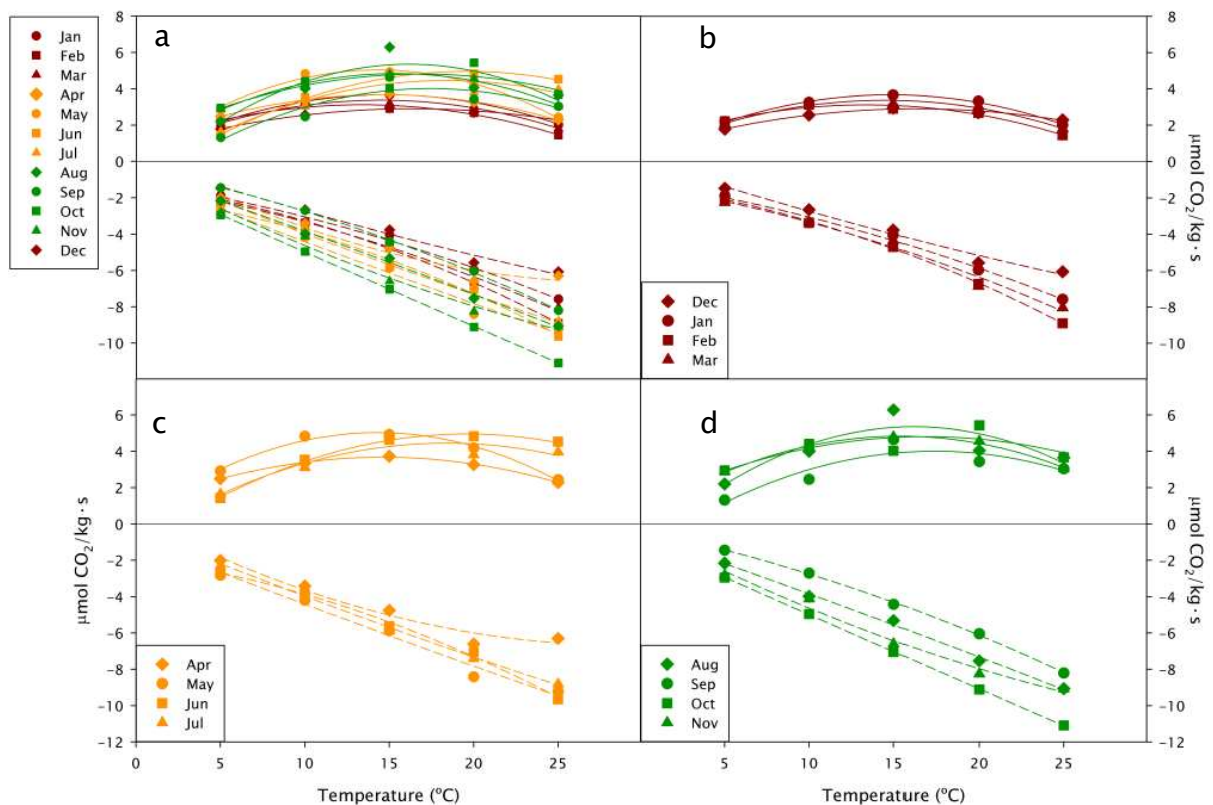


Fig. 4.6: Temperature response curves of gas exchange for *Lasallia pustulata* samples with rates on a dry weight basis. Amax (solid line, net photosynthesis at 1500  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) and DR (dashed line, dark respiration, at 0  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) at every measuring temperature. Data are fitted using polynomial regressions (2<sup>nd</sup> degree,  $R^2$  always >0.95). (a) All months plotted together. (b), (c) and (d) show only 4 months to ease comparisons.

### Thallus specific weight

No differences were found between the two species (Fig. 4.12), or within *L. hispanica* through the year. In contrast, thalli of *L. pustulata* from August and October had significantly lower TSW than in January. Both species showed a slight tendency to increase their TSW in winter.

Month	Tcl	Topt	Tcu	Area	Tav
Jan	-0.5	14.8	30.2	64.1	6.4
Feb	-2.6	13.3	29.3	57.2	3.4
Mar	-1.0	14.5	30.1	60.0	6.7
Apr	-2.3	14.6	31.5	68.7	11
May	-0.4	14.3	29.0	86.0	10.1
Jun	2.2	19.7	37.1	76.4	16,4
Jul	1.6	18.2	34.9	70.1	21.2
Aug	1.7	16.2	30.7	84.3	23.7
Sep	2.7	17.4	32.1	59.3	25.2
Oct	-2.3	16.8	35.7	90.3	17.6
Nov	-0.8	15.3	31.5	86.1	13
Dec	-2.1	16.3	34.6	54.3	6.9

Table 4.2: Temperature optimum of photosynthesis, lower and upper temperature compensation points (Topt, Tcl and Tcu respectively, in °C) and area under the curve (calculated by integration of the function between 5 and 25 °C, in  $\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \text{s}^{-1}$ ) for *L. pustulata*. Tav is the mean temperature of each month (in °C).

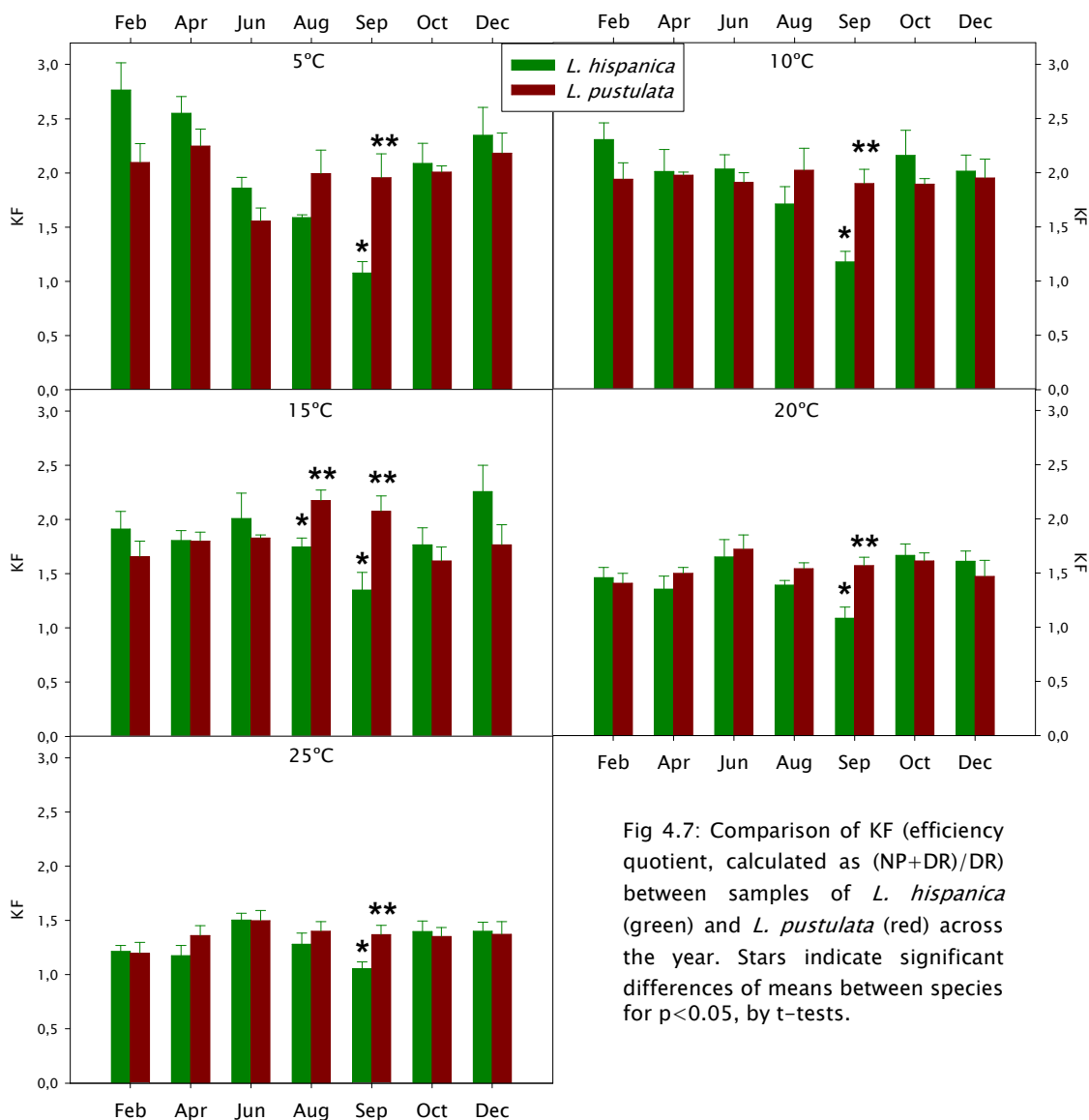


Fig 4.7: Comparison of KF (efficiency quotient, calculated as  $(\text{NP} + \text{DR}) / \text{DR}$ ) between samples of *L. hispanica* (green) and *L. pustulata* (red) across the year. Stars indicate significant differences of means between species for  $p < 0.05$ , by t-tests.

### Cellular components

All data presented are calculated on a dry weight basis. Calculations on a surface area basis were also performed, and the results and trends were fairly similar in all the cases. For this reason, these data are not plotted.

### Chlorophyll

Fig. 4.13 shows the changes in the amount of Chl over the year for *L. hispanica*. No pattern or significant variations were found for Chl*a* but, in contrast, higher values of Chl*b* were observed in autumn–winter, with a tendency to decrease again in spring. The same trend was observed for the total amount of Chl and the higher amount of Chl*b* in autumn produced a lower Chl*a* to Chl*b* ratio.

*Lasallia pustulata* (Fig. 4.14) also shows a decrease in Chl*b* over the period spring to a minimum in summer with a recovery at the beginning of autumn. Values of Chl*a* were more constant, except for February which was significantly lower than most of the others. Again in this case, the changes in Chl*b* had most influence on the pattern of both total Chl and *a* to *b* ratio.

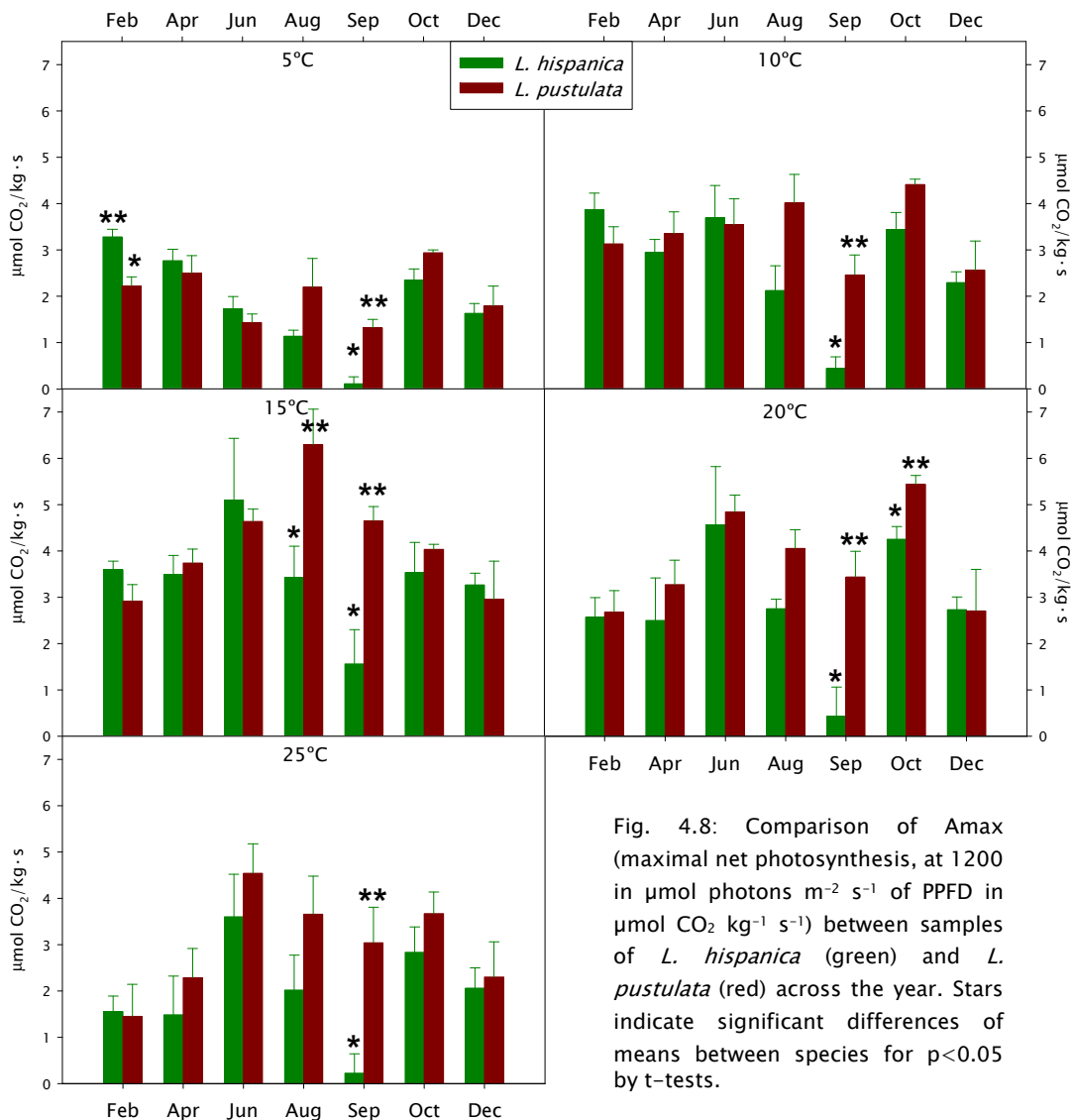


Fig. 4.8: Comparison of A<sub>max</sub> (maximal net photosynthesis, at 1200 in  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  of PPFD in  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) between samples of *L. hispanica* (green) and *L. pustulata* (red) across the year. Stars indicate significant differences of means between species for  $p < 0.05$  by t-tests.

Chlorophyll contents in the two species were fairly similar (Fig. 4a.7, appendix 4), although with significant differences in June and September when *L. pustulata* had significantly higher values of Chl*b*. Its total Chl was also higher in September, whereas in February *L. hispanica* had more Chl. The only significant difference for the ratio between the chlorophylls was found in August, with a higher value for *L. pustulata*.

### Fungal proxies

Fig. 4.15 shows the differences in ergosterol content through the year for the two species. *Lasallia hispanica* showed a tendency to have increasing values towards the spring, which then begin to decrease to give lowest levels in September (1.55 mg g<sup>-1</sup>). *Lasallia pustulata* also had a low value in September (1.57 mg g<sup>-1</sup>), but the lowest was found (1.25 mg g<sup>-1</sup>) in January and then an increase occurred to the maximum, found in June. Values were fairly constant in summer, until a sudden decrease in September. A new increase occurs in October. When comparisons are made between the two species, we find significant differences in August and October, with higher values in *L. pustulata*, and in February, with higher values in *L. hispanica*.

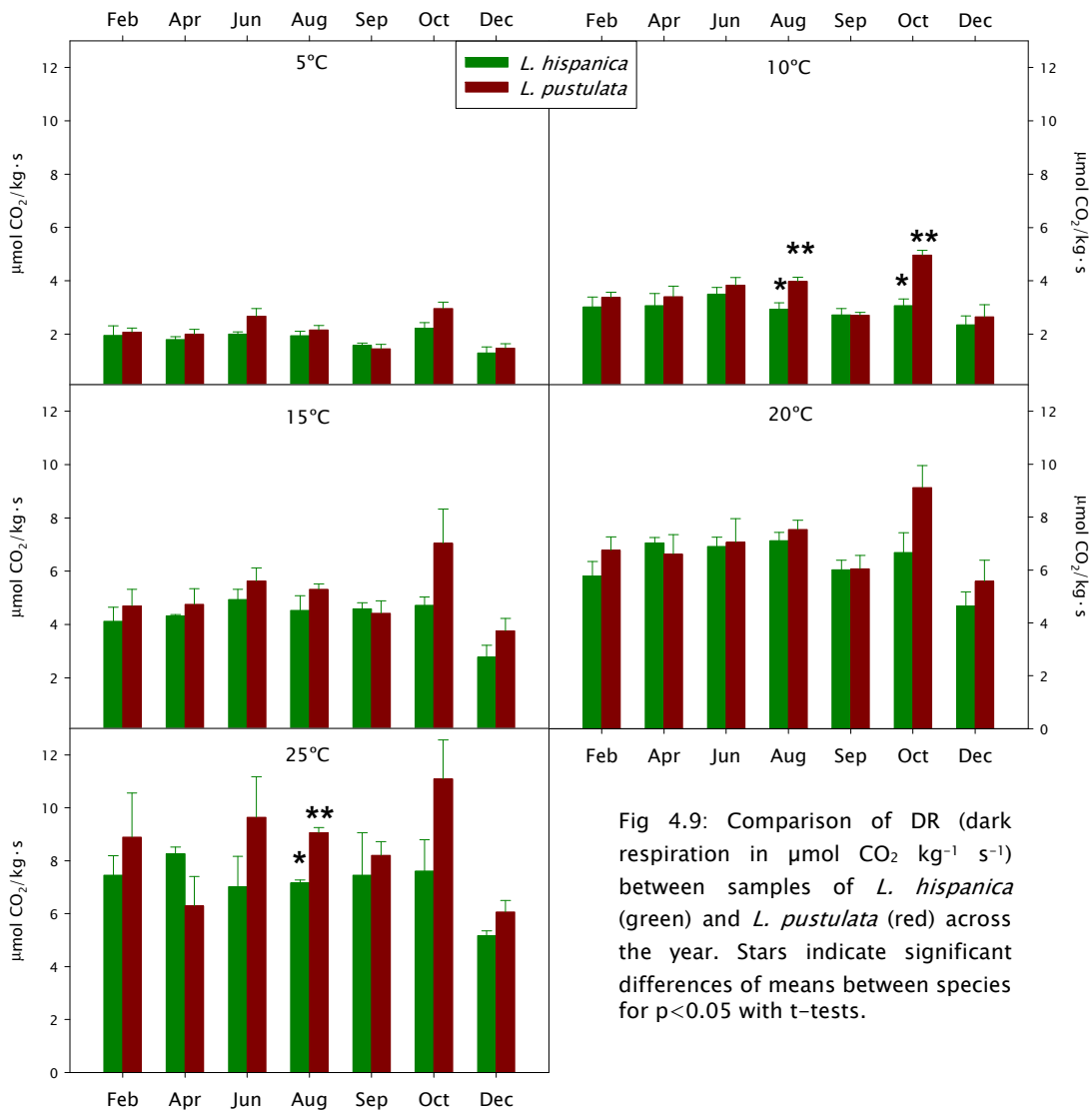


Fig 4.9: Comparison of DR (dark respiration in  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) between samples of *L. hispanica* (green) and *L. pustulata* (red) across the year. Stars indicate significant differences of means between species for  $p < 0.05$  with t-tests.

Results for chitin content can also be seen in Fig. 4.15. No significant differences were found, either between species, or within species, but *L. hispanica* shows a similar pattern to that of ergosterol, with increasing values in winter and decreasing in summer. For this reason, its chitin to ergosterol ratio is very constant through the year, showing a good acclimation for this character. In contrast, this ratio in *L. pustulata* showed a tendency opposite to that observed for ergosterol alone, i.e., a decrease in spring and an increase in winter.

### **Gyrophoric acid**

In general, the gyrophoric acid content was higher in *L. hispanica* than in *L. pustulata* in many months (Fig. 4.15), but the difference was statistically significant only in December. There were no significant differences within *L. hispanica*. For *L. pustulata* there was a significantly lower value for the samples from November compared with the samples from the first four months of the year.

### **Sugar analyses**

The results of the sugar analyses are shown on Fig. 4.16. The content of algal sugar, ribitol, did not vary significantly through the year in *L. pustulata*, but some differences were observed in *L. hispanica*, with higher values in spring and decreasing values in summer. The content of mannitol, the fungal sugar, was much higher than that of ribitol. Both species tend to have lower values in summer and higher in spring. Although there were no differences between species in absolute contents of ribitol and mannitol, some differences were found in the ratio of these sugar alcohols. *L. hispanica* showed significantly higher values in February, June, August and December, having its highest value in June, and similar values the rest of the year. Also *L. pustulata* reaches its highest value in June. The total amount of sugars had a similar pattern to ribitol and mannitol, with a maximum in spring and a decrease from summer. *Lasallia pustulata* has more sugars than *L. hispanica*, with the difference between them statistically significant in April and August.

### **Amino acids and NH<sub>4</sub><sup>+</sup>**

No clear seasonal pattern was found in NH<sub>4</sub><sup>+</sup> content in either species (Fig. 4.17). Very low values were measured for *L. pustulata* in March and July.

The relative amount of Arg, with respect to the total amount of amino acids seemed to have a clear seasonal tendency in *L. hispanica*, with a minimum at the end of the spring and then increasing till a maximum in winter. This trend was not seen in *L. pustulata*.

Total amino acids content were fairly constant over the year in *L. hispanica*, but *L. pustulata* had lower values in winter and spring, which began to rise in summer to the maximum found in October.

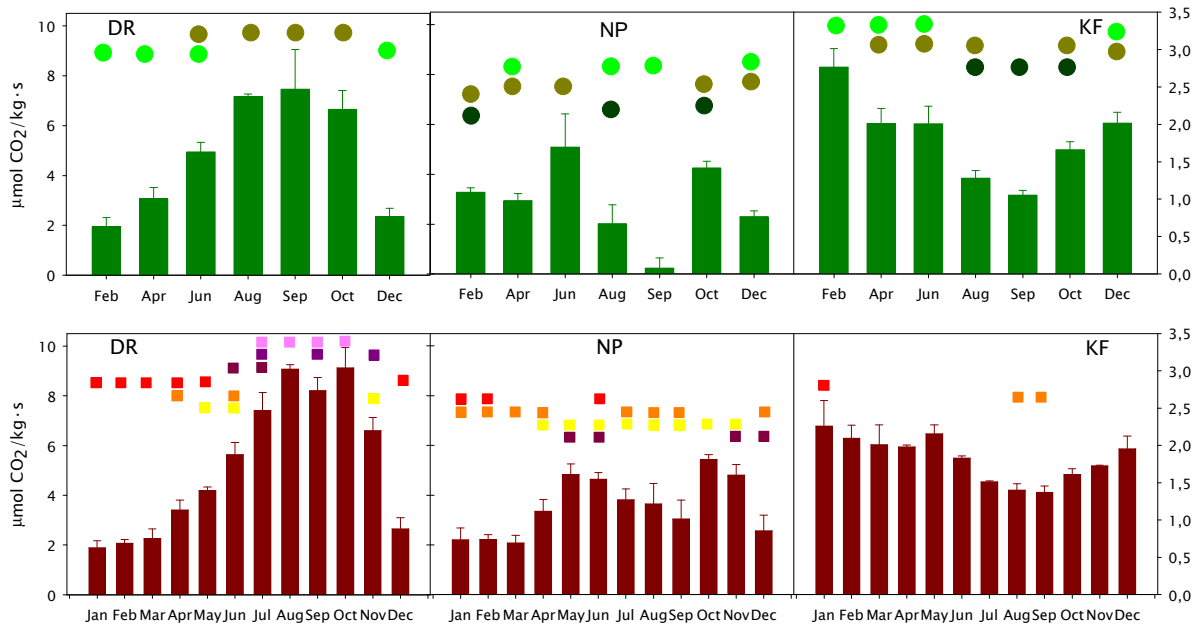


Fig. 4.10: DR, NP and KF of *L. hispanica* (green) and *L. pustulata* (red) along the year at the measuring temperature closest to the mean temperature of each month. Units and scale for DR and NP are the same. Bars sharing a common dot or square colour are not significantly different, whilst those with different coloured dots or squares are significantly different by ANOVA followed by Tukey HSD test, for  $p < 0.05$ .

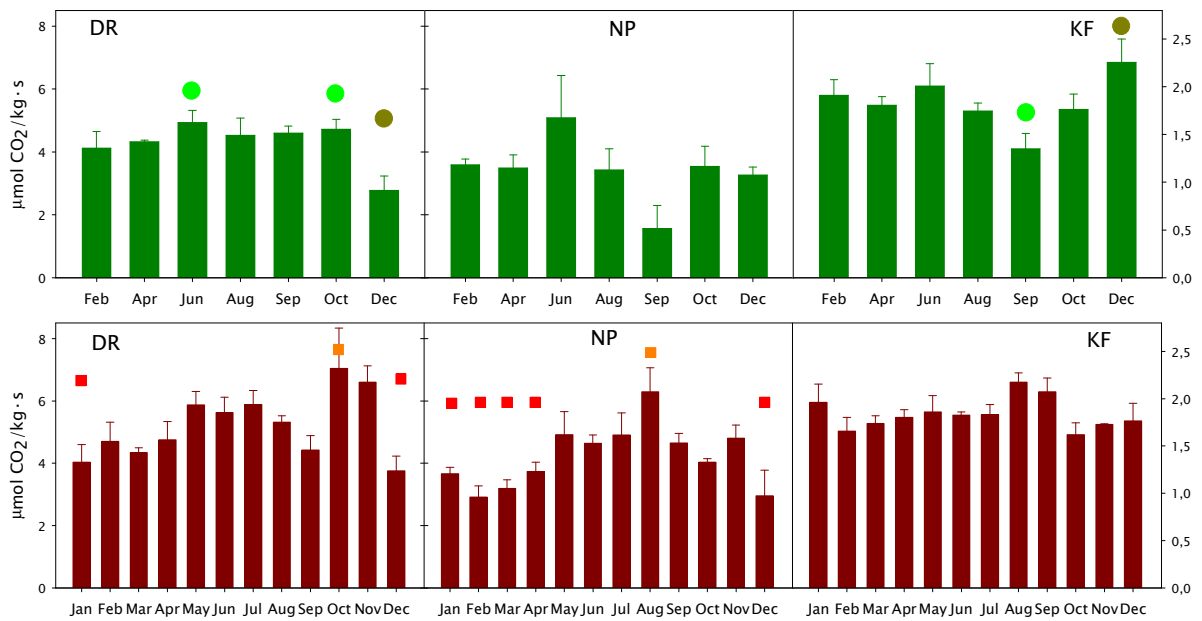


Fig. 4.11: DR, NP and KF of *L. hispanica* (green) and *L. pustulata* (red) along the year at the measuring temperature closest to the mean temperature of the entire year, 15 °C. Units and scale for DR and NP are the same. Bars sharing a common dot or square colour are not significantly different, whilst those with different coloured dots or squares are significantly different by ANOVA followed by Tukey HSD test, for  $p < 0.05$ .

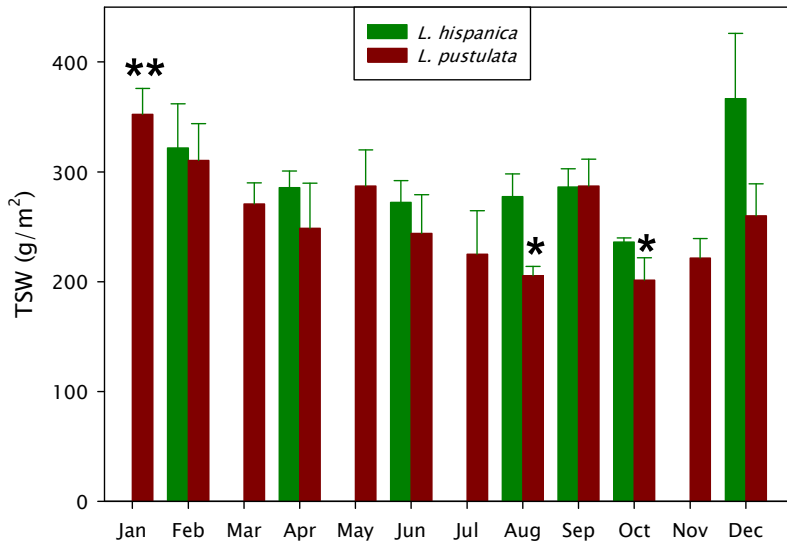


Fig. 4.12: Thallus specific weight (in  $\text{g m}^{-2}$ ) of *L. hispanica* (green) and *L. pustulata* (red) along the months of sampling. No significant differences were found between species by t-test. For differences within each species ANOVA followed by Tukey HSD test was performed, resulting in no differences for *L. hispanica* and statistically significant higher values of thalli of *L. pustulata* from January, respective to thalli from August and October, for  $p < 0.05$  (marked with stars).

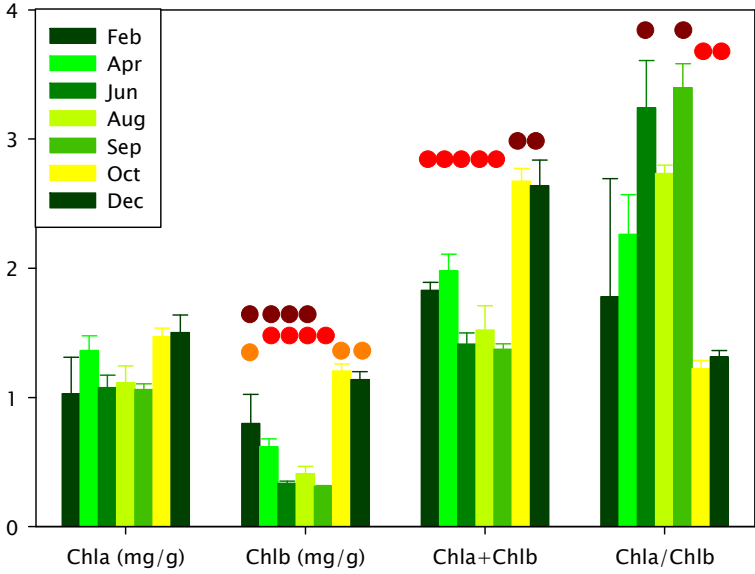


Fig. 4.13: Chl content of *L. hispanica* along the months of sampling. Bars sharing a common dot colour are not significantly different, whilst those with different coloured dots are significantly different by ANOVA followed by Tukey HSD test, for  $p < 0.05$ .

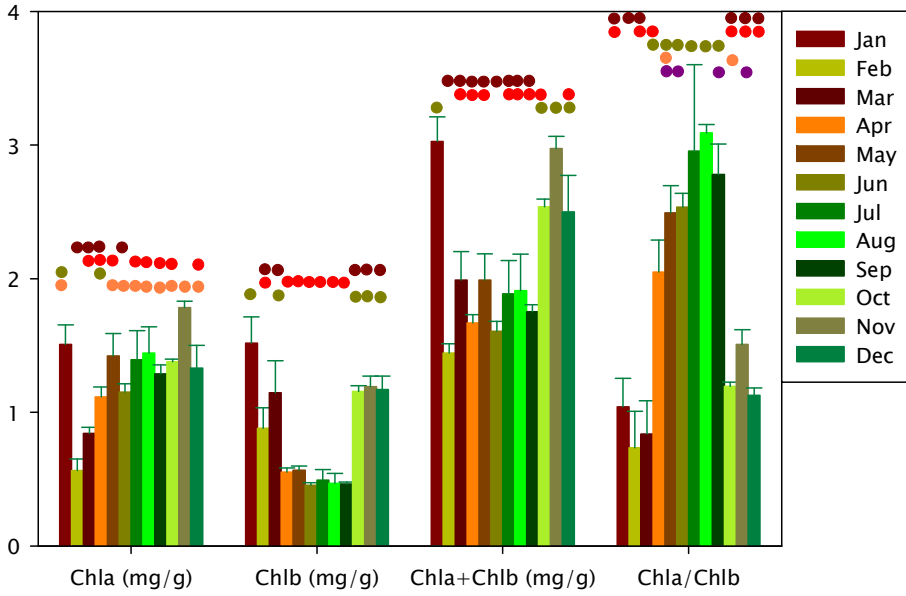


Fig. 4.14: Chl content of *L. pustulata* along the months of sampling. Bars sharing a common dot colour are not significantly different, whilst those with different coloured dots are significantly different by ANOVA followed by Tukey HSD test, for  $p < 0.05$ .

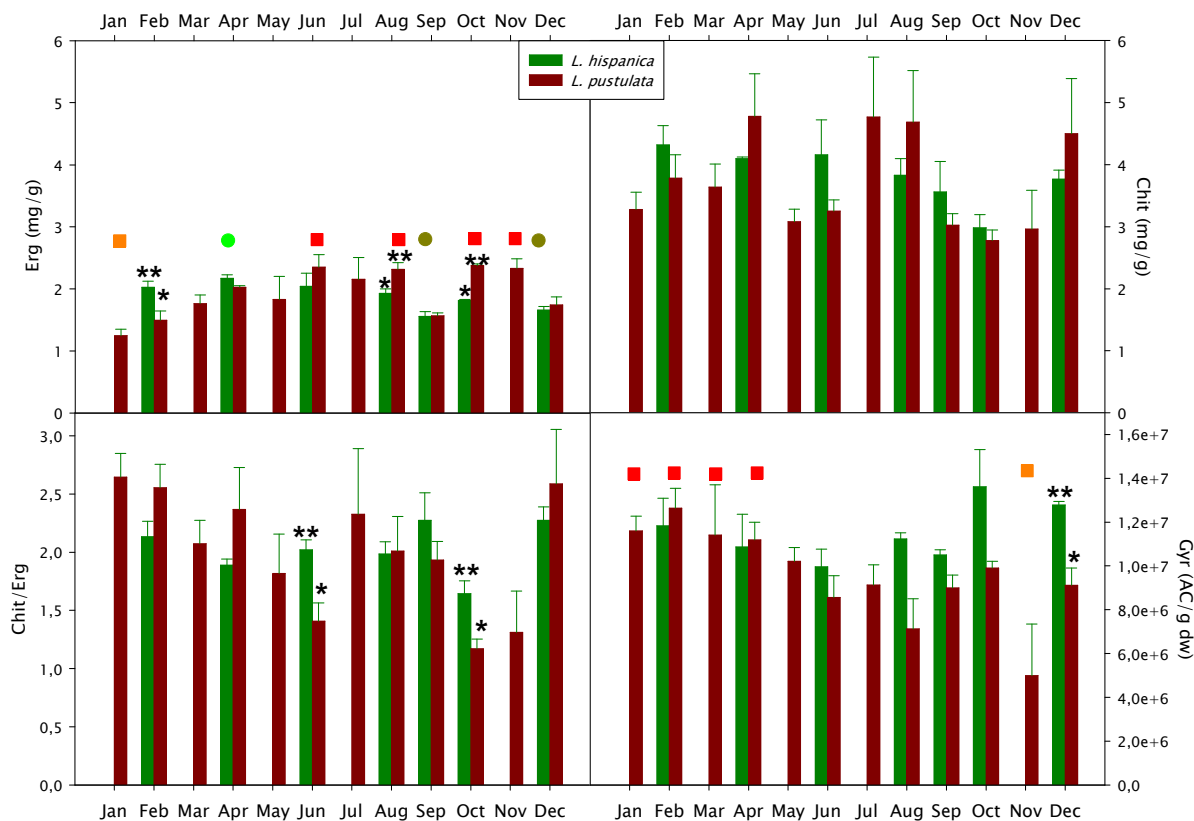


Fig. 4.15: Ergosterol (Erg, in  $\text{mg g}^{-1}$ , top left), chitin (Chit, in  $\text{mg g}^{-1}$ , top right), chitin to ergosterol ratio (bottom left) and gyrophoric acid measurements (in Area Counts  $\text{g}^{-1}$ , bottom right) of *L. hispanica* (green) and *L. pustulata* (red) along the months of sampling. Significant differences between species by t-test are shown with stars. Bars sharing a common dot (*L. hispanica*) or square (*L. pustulata*) colour are not significantly different, whilst those with different coloured dots or squares are significantly different by ANOVA followed by Tukey HSD test, for  $p < 0.05$ .

### C and N measurements

The amounts of C were very similar through the year for both species, with no differences both within and between them (Fig. 4.18). In contrast, for total N we found higher values of N in *L. pustulata*, with the exception of February and April, when the amount in *L. hispanica* was higher. For the former species, there was a tendency for N content to increase towards August, followed by a minimum value in January.

The ratio C to N was constant for *L. hispanica*, whereas in *L. pustulata* it showed the inverse trend to that found see for N content, a maximum at the beginning of the year and a tendency to decrease towards summer and autumn (Fig. 4.18).



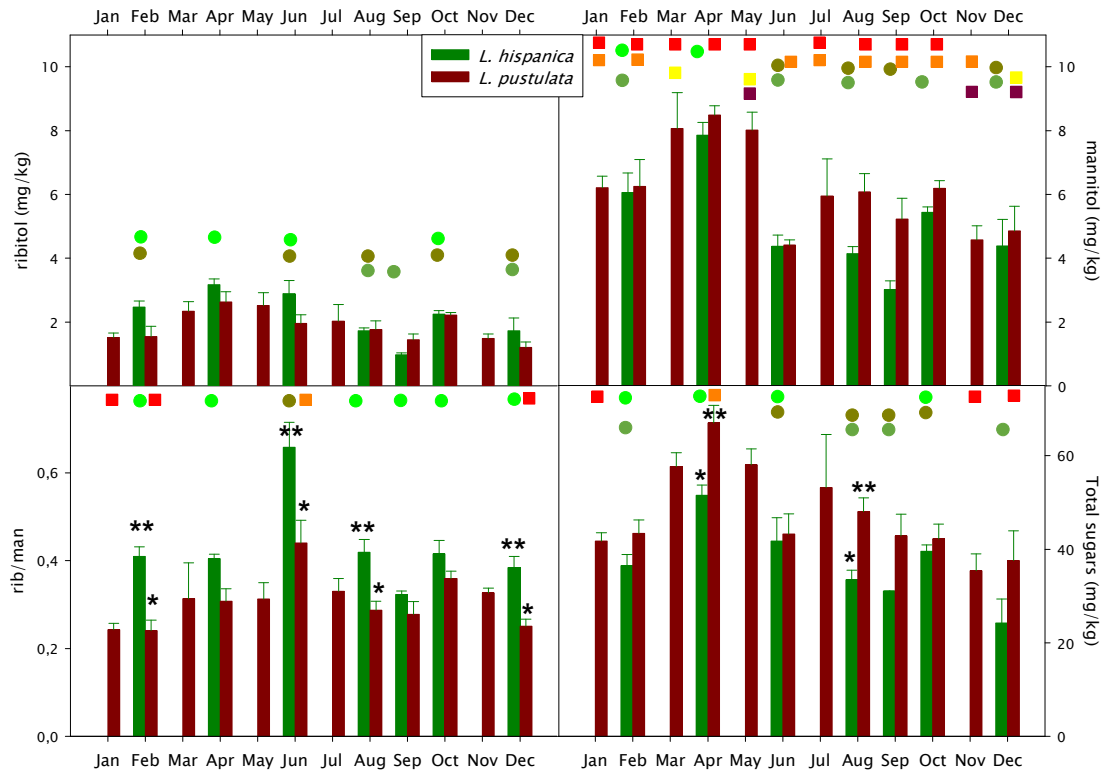


Fig. 4.16: Ribitol (in mg kg<sup>-1</sup>, top left), mannitol (in mg kg<sup>-1</sup>, top right), ribitol to mannitol ratio (bottom left) and total sugars (in mg kg<sup>-1</sup>, bottom right) of *L. hispanica* (green) and *L. pustulata* (red) along the months of sampling. Significant differences between species by t-test are shown with stars. Bars sharing a common dot (*L. hispanica*) or square (*L. pustulata*) colour are not significantly different, whilst those with different coloured dots or squares are significantly different by ANOVA followed by Tukey HSD test, for p < 0.05.

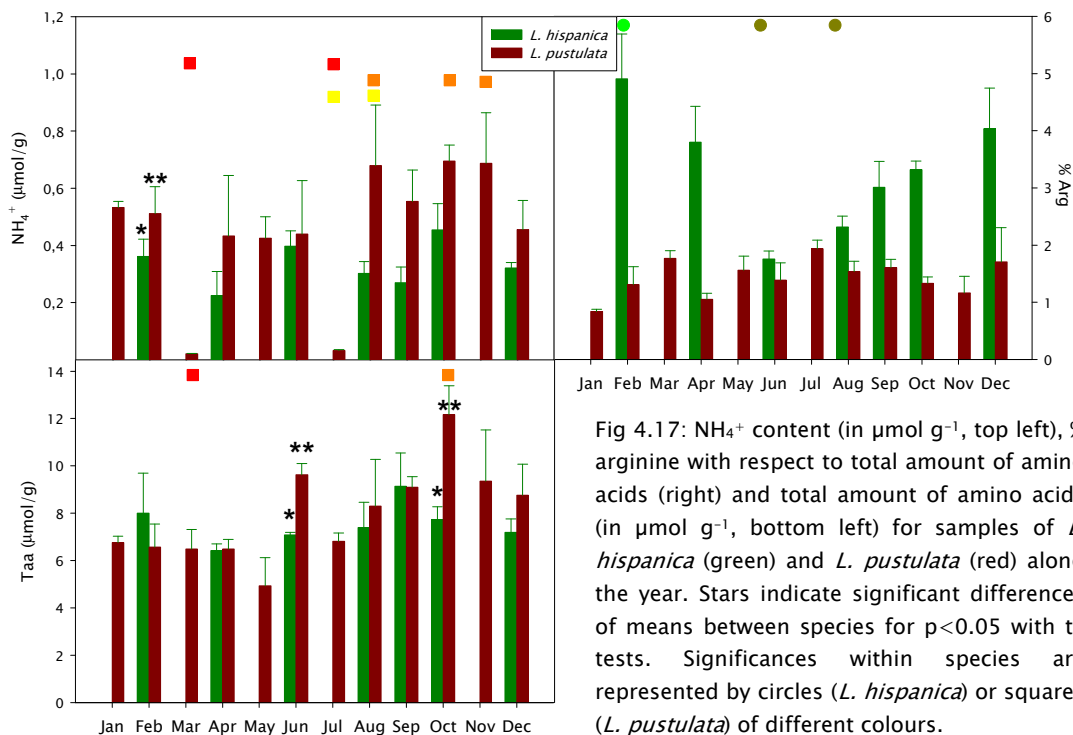


Fig 4.17: NH<sub>4</sub><sup>+</sup> content (in μmol g<sup>-1</sup>, top left), % arginine with respect to total amount of amino acids (right) and total amount of amino acids (in μmol g<sup>-1</sup>, bottom left) for samples of *L. hispanica* (green) and *L. pustulata* (red) along the year. Stars indicate significant differences of means between species for p < 0.05 with t-tests. Significances within species are represented by circles (*L. hispanica*) or squares (*L. pustulata*) of different colours.

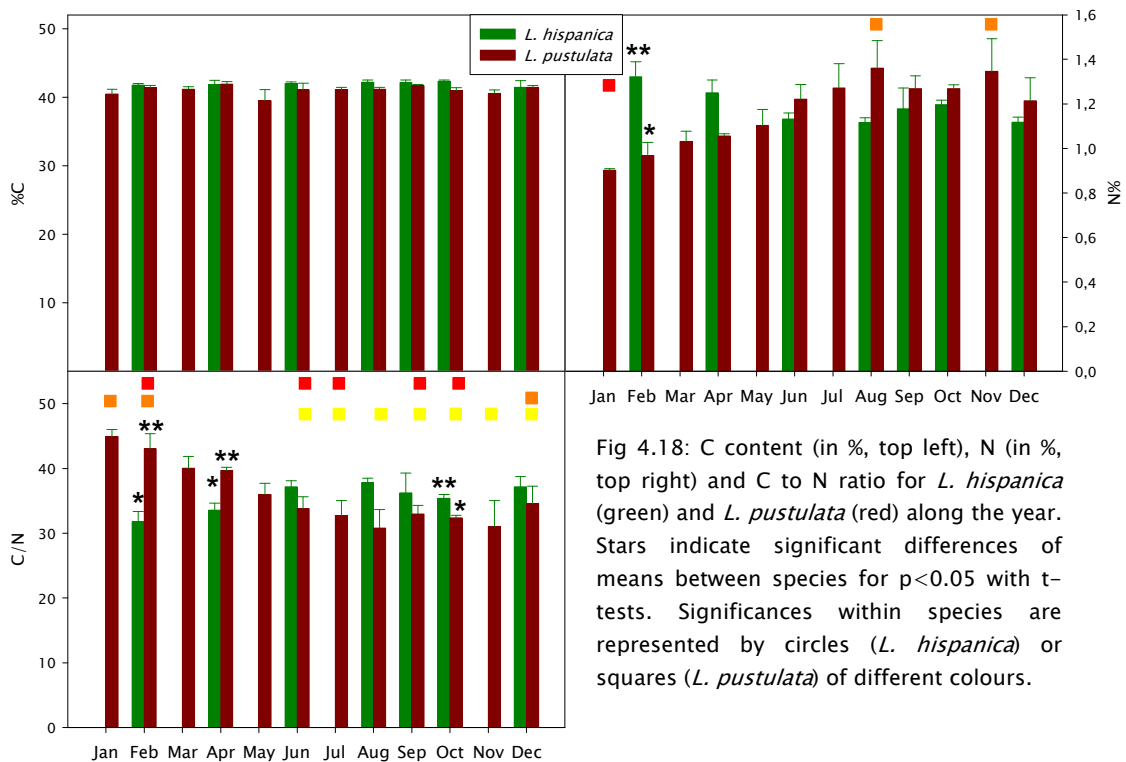


Fig 4.18: C content (in %, top left), N (in %, top right) and C to N ratio for *L. hispanica* (green) and *L. pustulata* (red) along the year. Stars indicate significant differences of means between species for  $p < 0.05$  with t-tests. Significances within species are represented by circles (*L. hispanica*) or squares (*L. pustulata*) of different colours.

### Fluorescence measurements

The results of the lab study of fluorescence are given in Figs. 4a.8 to 4a.11 and Tables 4a.2 and 4a.3, in the appendix 4. *Lasallia hispanica* showed a similar behaviour through the year, with the exception of August and September, when there were much lower absolute values of  $F_v/F_m$  (Table 4a.2). However, if we look at the relative values, calculated as percentages of the maximal value (Fig. 4a.9), we can see that the recovery of photosynthetic yield was not different through the year and all the samples had similar values at the end. The same was true for *L. pustulata*. Lowest values were found in September (Fig. 4a.10, Table 4a.3), but, again, no significant differences were seen in the recovery (Fig. 4a.11). Comparing both species, values were always higher for *L. pustulata*, and the biggest difference was found in September ( $F_v/F_m = 0.622 \pm 0.004$  in *L. pustulata* and  $0.494 \pm 0.01$  in *L. hispanica*).

### Multivariate analysis

One correlation matrix for each species was calculated, using 29 variables (Figs 4a.12 and 4a.13, appendix 4). The variables which showed higher correlation coefficients were selected to make PCAs. Thirteen variables were chosen in *L. hispanica* data, namely, TSW,  $Chl_a$ ,  $Chl_b$ , Erg, %Arg, N, Gyr, Amax, DR15 (in absolute value), mann, rib to mann ratio (r.m), glu and Tsug. In the case of *L. pustulata* the chosen variables were TSW,  $Chl_a$ , Erg, Arg, Taa, N, Gyr, Amax, DR15 (in absolute value), mann, ribitol to mannitol+arabitol ratio (r/m+a), glu and Tsug. (PCAs with those variables are in Appendix 4, Figs. 4a.14 and 4a.15, Tables 4a.4 to 4a.9).

New correlation matrices were then constructed with these variables plus the climatic variables: precipitation, TM, Tm, Tav and radiation (Figs. 4a.16 and 4a.17) which had significant correlations with many parameters, such as TSW, Chlb, % Arg, DR and mann (Fig. 4a.16), in *L. hispanica*, and TSW, N, Erg and Gyr (Fig. 4a.17) in *L. pustulata*. New PCAs were performed adding precipitation, Tav and radiation. PCAs are depicted in Figs. 4.19 and 4.20 (corresponding tables 4a.10 to 4a.15 are in Appendix 4). For *L. hispanica* (Fig. 4.19), we can see that the first axis is defined by N and mann, which were also positively correlated in the previous analysis, and also by the variables Chlb, Gyr, %Arg and precipitation (positive coefficient) and Tav and Rad (negative coefficient). Season was also on the first axis, with samples from Jun, Aug and Sep (late spring–summer) to the left (negative), and Feb, Apr, Oct and Dec to the right (positive), with a 28% of the variance explained. The second axis accounts for a further 24% of the total variation, with Erg, Amax, DR, mann, glu and Tsug having positive and TSW negative coefficients. The samples from Apr, Jun, Aug and Oct are to the left side, while the samples from Sep and Dec are to the right side. Feb appears in the middle.

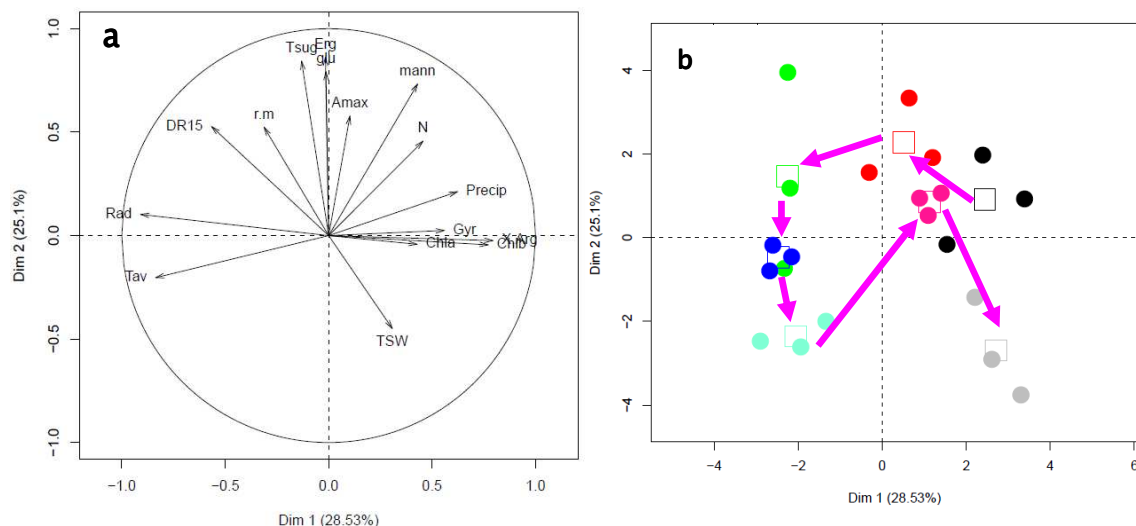


Fig. 4.19: PCA for *Lasallia hispanica*, including climatic variables. (a) Variables factor map. (b) Individuals factor map. Feb in black; Apr in red; Jun in green; Aug in blue; Sep in light blue; Oct in pink; Dec in grey. The squares indicate the average of each month, the pink arrows between them show the chronological order of the months from Feb to Dec. Tables with eigenvalues, correlations and contributions are provided in Appendix 4.

The results of this PCA for *L. pustulata* (Fig. 4.20) were similar to the analysis without climatic variables (Fig. 4a.15). The same variables defined the first and second components, which now accounted for the 35% and 20% of the variance, respectively. In the first axis, Tav and Rad had positive coefficients, but precipitation was only important on the third component, which accounted for an additional 12% of the variance, and was also defined by the negative coefficients of Tav and Rad. The first axis separated the samples as follows: samples from Dec to May (winter–spring) were to the left, while samples from Jun to Nov (summer–autumn) were to the right side. The second axis separated the samples of spring–beginning of summer, with higher Amax and lower sugar content, from those at the end of summer–autumn–winter.

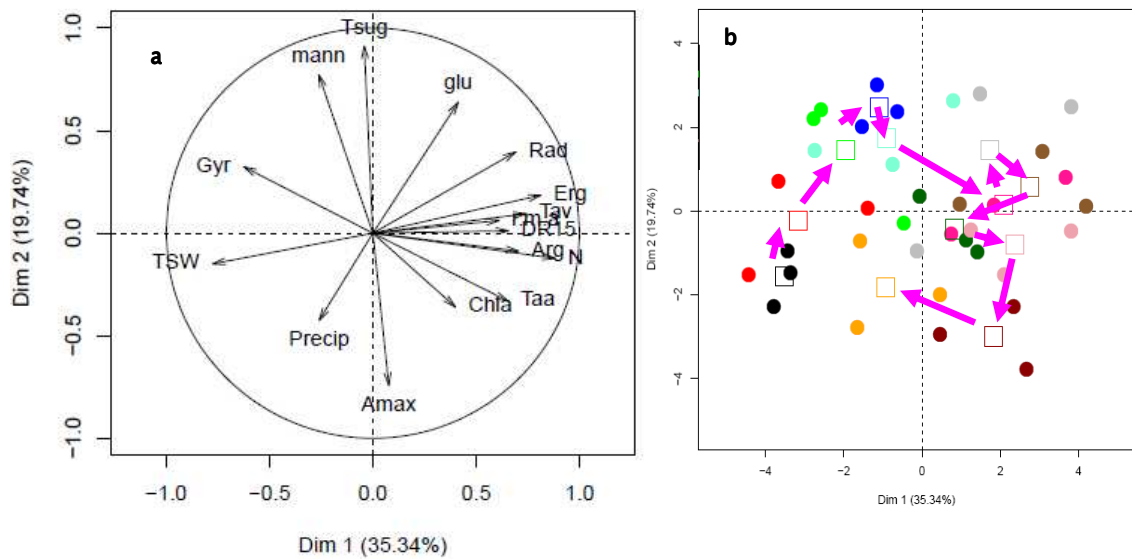


Fig. 4.20: PCA for *Lasallia pustulata*, including climatic variables. (a) Variables factor map. (b) Individuals factor map. Jan in black; Feb in red; Mar in green; Apr in blue; May in light blue; Jun in pink; Jul in grey; Aug in brown; Sep in deep green; Oct in pale pink; Nov in deep red; Dec in orange. The squares indicate the average of each month, the pink arrows between them show the chronological order of the months from Jan to Dec. Tables with eigenvalues, correlations and contributions are provided in Appendix 4.

## DISCUSSION

The contrasting seasonality of Mediterranean climate appears to cause changes in several photosynthetic and metabolic features of the two *Lasallia* species studied. Although similar patterns were observed for some of the studied variables, opposite trends were recorded for others. The different responses to season of those non coincident parameters are likely to be due to the contrasting microclimatic conditions under which each species lives. It seems to be precisely this niche differentiation, what allows these species to coexist. A similar phenomenon of niche segregation within the same habitat was already described by Larson (1984), Scott & Larson (1986) and Hestmark (1997) in several species of *Umbilicariaceae* and more recently by Sonesson *et al.* (2011) between *Parmeliopsis ambigua* and *Parmelia olivacea*.

### Gas exchange

*Lasallia pustulata* appears to be better able to make use of brief periods of activity. If we look at the area under the temperature curves of Fig. 4.5 (Table 4.1) as an indication of the total potential productivity, then *L. hispanica* had its lowest value ( $10.6 \mu\text{mols CO}_2 \cdot \text{kg}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) in Sep, and its highest in Jun, which was seven times higher ( $75.83 \mu\text{mols CO}_2 \cdot \text{kg}^{-1}\text{s}^{-1}$ ). In contrast, *L. pustulata* had its lowest value, ( $54.29 \mu\text{mols CO}_2 \cdot \text{kg}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) in Dec (Table 4.2), and highest in Oct but only about 66% higher than in Dec ( $90.26 \mu\text{mols CO}_2 \cdot \text{kg}^{-1}\text{s}^{-1}$ ). Overall, the integrated area was always higher for *L. pustulata*.

When comparing the KF and Amax for both species (Figs. 4.7, 4.8) we realise that *L. hispanica* often shows higher values at lower temperatures, especially in winter and spring in the case of Amax, whereas the values are similar (or fairly lower for Amax at

25 °C) at higher temperatures (with the exception of September, see below). Larson (1980) related similar differences in temperature preference with contrasting niches of species of *Umbilicaria*. He reported a higher productivity of *U. vellea* and *U. muhlenbergii* near freezing temperatures compared to the rest of species of the study, and explained that, therefore, they would likely live in sheltered sites protected by cool rocks in the summer. The difference in our study is that *L. hispanica* grows in much more an exposed rock, thus suffering lower temperatures in winter and higher temperatures in summer, but in those extremely hot months, thalli are inactive most of the time.

In Fig. 4.8 we could also see that the *L. hispanica* samples from Jun, which, as said, had the highest area, were not the most productive at 5 °C, samples from Feb, Apr and Oct had higher rates. Mean temperature at the site (Tav) in Feb and Apr was lower than in Jun (Fig. 4.4, table 4.2), so this would indicate a useful acclimation to prevailing temperatures in Feb and Apr, and would be advantageous for higher productivities. A similar trend was observed in *L. pustulata*, although the differences were not so clear. Feb is the most efficient month at 5 and 10 °C, being exceeded by Dec and Jun at 15 °C for *L. hispanica* (Fig. 4.7). June shows the highest KF and Amax at 20 and 25 °C (Figs. 4.7, 4.8) for *L. hispanica* and at 25 °C for *L. pustulata*. In the case of the former, Sep has the lowest efficiency at all the temperatures (both KF, in Fig. 4.7, and  $\Phi$  in table 4a.1). The differences are not statistically significant, but the trend is clear. September also shows the lowest productivity. In contrast, Sep values for *L. pustulata* are not lower than in the rest of the year. This confirms the influence of the microhabitat, which protects *L. pustulata* against the stressful summer conditions. The respiratory response found in Dec is the lowest for both species (Fig. 4.9). This response was also described for *Umbilicaria vellea* (Larson, 1980).

In the case of *L. pustulata*, we found a very even behaviour in the samples from the coldest months of the year (Fig. 4.6b). A shift in temperature optimum for photosynthesis is clearly observed between Apr–May and Jun–Jul, similar to that found in *L. hispanica* between Apr and Jun. In Fig. 4a.1 (appendix 4) we see that the relationship between temperature optimum and ambient temperature is positive and significant, indicating an acclimation to prevailing conditions, a trend which was not significant for *L. hispanica*.

The results from Sep are remarkably different. In all the cases, in Sep *L. hispanica* had lower KF and Amax (significant differences for all the cases except Amax at 5 °C), but no changes in DR were observed (Fig. 4.9). The low performance of Sep samples of *L. hispanica* must be related to the extreme drought and insolation suffered by the thalli during August. The precipitation was almost absent and no dewfall was recorded by the meteorological station that month (data not shown). Also, the mean relative humidity of the whole month was below 35%, with maximal values below 70% (and they were extremely rare). Although green algal lichens have been demonstrated to be able to reactivate and photosynthesise by taking advantage of the humidity of the air (Lange & Kilian, 1985; Scheidegger *et al.*, 1995; Pintado & Sancho, 2002), this amount neither

was high nor long enough to reactivate their metabolism (Lange & Kilian, 1985; Lange *et al.*, 1986). Moreover, it has been demonstrated that high irradiances can damage even inactive thalli (Gauslaa & Solhaug, 1999; Heber & Lüttge, 2011). Under such stressful conditions it is easy to understand that the thalli have lost part of the potential productivity that they show in other milder months.

Another consequence of these difficult conditions is reflected in the values of both  $P_c$  and  $P_s$ , which were fairly higher in Sep, being its  $\Phi$  the lowest (Table 4a.1, Fig. 4a.2). The results of Chl $a$  fluorescence further indicate the damage suffered during this period, with the lowest value of  $F_v/F_m$  in Sep (Figs. 4a.8, Table 4a.2). All this is reflecting the fact that the fungal partner does not seem to have suffered from the drought, insolation and heat as far as the algal partner has, taking into account the absence of response in DR values (Fig. 4.9). We assume that the fungus is responsible of most of the value of DR (Quispel, 1960) and knowing that in most heteromorous lichens, the fungus constitutes the vast majority of the thallus (Ahmadjian, 1993). Therefore, having a similar DR rate, the damaged algae are not able to compensate until high light irradiances are provided in the lab, or, in many cases, are not able at all.

Why do not we find a similar response in *L. pustulata*? There is a certain depression of the values reached by this species in Sep, with respect to other months, but neither the efficiency quotient KF (Fig. 4.7), nor the productivity (Fig. 4.8) and nor the  $F_v/F_m$  (Fig. 4a.10, table 4a.3) were as markedly smaller as in *L. hispanica*, being instead, within the average values of the year. In this case, DR was not that even, but had a tendency to show slightly lower values in Sep with respect to the rest of the months except Dec. This is of course modulating also the responses of both KF and  $A_{max}$ , as algae compensate earlier a lower value of respiration, thus reaching higher productivity and having a better KF value. We could assume that the water regime was the same for both species (i.e., no water at all in Sep), although the thalli of *L. pustulata* were closer to the ground. The main difference relies then on the light regime, which is much more intense for *L. hispanica*, completely unprotected against irradiation because of the absence of a tree canopy, which *L. pustulata* does have. Therefore, we could conclude that the depression found in *L. hispanica* in Sep is mainly due to photodamage. This is supported by the lowest  $F_v/F_m$  value found this month (0.494, Table 4a.2). Also the value for  $F_v/F_m$  of *L. pustulata* in Sep was the lowest, but it was much higher (0.622, Table 4a.3).

Curiously, the mycobiont of *L. pustulata* seemed more affected by the summer conditions, showing a decrease of DR on a DW basis in Sep, which increased again until maximal values in Oct samples, after the first rains of autumn (Fig. 4.9). This increase of DR, and hence, of mycobiont activity, coincides with a decrease of TSW (Fig. 4.12), reported by Larsson *et al.* (2012) as a consequence of fungal growth, which mainly causes area expansion. The same response to those first autumn rains could be observed in *L. hispanica*. In that study Larsson *et al.* (2012) indeed observed the strongest area growth during humid seasons. Accordingly, the lowest value of TSW for

both *Lasallia* species is reached in October. But, surprisingly, the highest were those of Feb and Dec for *L. hispanica* and of Jan for *L. pustulata*. Feb and Dec were fairly dry months, within a humid season, but Jan was in fact one of the months with highest precipitation records (Fig. 4.4). But that precipitation was mainly in the form of snow, and therefore, less available for the thalli. When we went to our monthly collection in December, the rock of *L. pustulata* was completely covered by the snow, and the temperature was so low, that the thalli of *L. hispanica* were actually frozen. Lichens have been described as capable of photosynthesising under snow, e.g., the antarctic species *Umbilicaria aprina* (Schroeter *et al.*, 1994) and *Xanthoria mawsonii* (Pannewitz *et al.*, 2003) and/or at very low temperatures, far below the freezing point (Lange, 1965; Schroeter *et al.*, 1994). Larson (1982) showed five species of *Umbilicariaceae* to be resistant to the exposure at  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$  for nine months and Antarctic lichens spend most of the time at colder temperatures. Our thalli were not damaged by the cold, but they experienced the relative drought caused by snow and the dehydration that follows extracellular ice formation, and thus, the increase on TSW in the coldest months would be in accordance with the increase found by Larsson *et al.* (2012) in the driest months, and a useful response as well, to endure the cold. It is also a very logical response to the decrease of water availability, because a higher TSW has been related with an increase of the water holding capacity (Lange *et al.*, 1993; Gauslaa & Coxson, 2011) and of the water retention time (Valladares *et al.*, 1998).

By comparing DR, NP and KF obtained at the field temperature and at a fixed temperature (Figs. 4.10 and 4.11) we observe that for both species, in accordance with MacKenzie *et al.* (2002), the most influent parameter on productivity variations along the year is the prevailing temperature at field conditions. Indeed, there are much more significant differences when rates at the mean temperature of each month are analysed (Fig. 4.10) than when they are measured at a fixed temperature (Fig. 4.11). DR in the former case is a direct consequence of the high temperatures of summer and low of winter, and both NP and KF are affected by DR rates, although KF, of course, in a more marked way. The values of KF when at the same temperature are much more even in both species. However, for *L. hispanica* there was still a markedly lower value in Sep, as a consequence of the low NP value, for DR was similar, showing the more marked influence of the summer conditions on the photobiont than on the mycobiont (Lange & Green, 2005). It is interesting to see the fairly even KF values of *L. pustulata* also at field temperatures (Fig. 4.10). For *L. hispanica*, the highest value (Feb, 2.77) was more than twice the lowest value (Sep, 1.05). In the case of *L. pustulata*, the range was smaller (from 1.37 in Sep to 2.26 in Jan). This is also due to the milder environment provided by the protection of the canopy in summer.

### **Subcellular analyses**

Chlorophyll content showed a similar pattern of variation in both species, with lower values of total Chl in spring–summer months, a sudden increase in Oct, and a maintenance of high levels in autumn and winter (Figs. 4.13 and 4.14). These changes were mainly due to the changes in Chl**b** concentration, as Chl**a** had more even values among the year for both species. Such an increase of Chl**b** at the beginning of autumn



seems to be very useful to improve the light harvesting in a month in which metabolism is highly reactivated, as rain returns after the summer drought, while days become shorter and shorter and solar declination decreases. In contrast, MacKenzie *et al.* (2001) measured higher values of Chl and lower of Chl *a/b* ratio in summer, in accordance with the fully developed canopy of a maple deciduous forest. Because of the lack of shadow effect, the behaviour of *L. hispanica* seems perfectly logical, but, why does not affect the canopy the Chl content of *L. pustulata*? Would it not be expectable to find an increase of the light harvesting Chl*b* in the summer months, as in the case of *Lobaria pulmonaria* (MacKenzie *et al.* 2001)? A similar trend to ours was observed in *Evernia prunastri* and *Pseudevernia furfuracea* from Crete by Pirintsos *et al.* (2011), who also reported an increase of Chl *a/b* ratio in summer months, a phenomenon that we have observed in our data as well. Tretiach *et al.* (2003) described a maximal value of Chl in Dec in *Parmelia sulcata* from a chestnut forest in Tuscany, and already Wilhelmsen (1959) observed lower values in summer compared to those of winter for *Peltigera canina*, *Hypogymnia physodes* and *Xanthoria parietina* from Denmark and Austria. The most influent factor of Mediterranean climate during the summer is water availability (e.g.: Rundel, 1995; Pintado *et al.*, 1997; Joffre *et al.*, 2007), and it determines the response to all other environmental changes. Although no long term monitoring studies are available for lichens living in a mediterranean forest, we can assume that their activity time in the dry summer months is very short. This way, neither have they enough time to synthesise more Chl, nor would that make any sense, taking into account the shortness of their active periods. In this situation, the fact that the light is dimmed by the canopy in summer is purely incidental, although, as we have seen above, the canopy protects *L. pustulata* from the photodamage to which *L. hispanica* is completely exposed. Nevertheless, we can observe some differences between these two species, which are easily understood on the light of their exposure to irradiation (Fig. 4a.7). We have found a significantly higher Chl*b* content in *L. pustulata* in Jun and Oct, just before and just after the inactivity of the dry summer months.

Fungal markers ergosterol (Erg) and chitin (Chit) are usually related to TSW, as we have seen in the previous chapters. As seen above, we observed an increase of DR linked to a decrease of TSW for both *Lasalliae* from Sep to Oct. Our explanation of a reactivation of fungal metabolism after the first rains of autumn is further supported by the observed increase in Erg and decrease in Chit/Erg ratio (Fig. 4.15), more marked for *L. pustulata*. This species showed a decline in Erg values from Dec, until a minimum was reached in Jan. This reflects again the opposite tendency of TSW. *Lasallia hispanica* shows a significantly higher value of Erg in Feb than *L. pustulata*. This may be indicating either a faster recovery from the very cold conditions of the winter, or a smaller damage due to the low temperatures. Indeed, we could also observe higher Amax rates in the Feb samples of *L. hispanica* (Fig. 4.8). In contrast, the Erg values for *L. pustulata* were higher during summer and autumn, showing the same pattern that we found on Amax. Clearly, both the fungal and the algal partner of this species benefit from the protection that they receive from the tree canopy during the summer.



The values for gyrophoric acid (Gyr) support the conclusion from the previous chapter regarding the lack of relationship between this secondary metabolite and protection against excess UV radiation. In such a case, we would expect higher amounts for *L. hispanica* in the summer months, but in fact, a tendency to decreasing values towards summer is observed in both species. This is further supported by the PCAs, where Gyr is negatively correlated with irradiance in both species (Figs. 4.19 and 4.20).

The changes observed on sugars must be interpreted with caution. Lichen literature largely lacks studies on this issue. It seems that the amount of sugars can change substantially in a few hours, provided the conditions are suitable for that (T.G.A. Green, pers. comm.) and therefore, it is likely that the synthesis of small sugars be deeply influenced by the conditions previous to collecting the thalli. However, all our samples had the same pretreatment prior to the analyses and this will probably have removed or at least mitigated the possible effect of the conditions in the days prior to collection.

Altogether, sugars were more abundant on thalli from spring, with a decrease in summer until minimal values were reached in Sep. Then, an increase from Sep to Oct occurred, as we have seen for other substances (Fig. 4.16). This is a logical consequence of the productivity, which is a combination of the activity time and the potential photosynthetic capacity, especially in the case of ribitol, the algal sugar, the molecule transferred from trebouxoid photobionts to mycobionts (Gorin *et al.*, 1988; Fahselt, 1994; Palmqvist *et al.*, 2008). In agreement with this hypothesis, total sugars were always higher in the more productive *L. pustulata*.

Mannitol (man) values were also slightly higher in *L. pustulata*, and this was reflected in the ratio rib/man being higher in *L. hispanica*. Differences are especially larger in the most stressful months, in winter and summer. This might be interpreted as an attempt of *L. hispanica* to further protect its algal partner against desiccation (Smith *et al.*, 1969; Farrar, 1976; Ahmadjian, 1993; Green *et al.*, 2011a). But it could at the same time indicate a lower relative amount of ribitol being transferred to the mycobiont, because available resources must be allocated in other protective molecules, and such an investment on carbohydrate reserves is not possible.

Many differences can be observed between both species regarding N metabolism and allocation (Figs. 4.17, 4.18). The explanation of these differences is challenging and beyond the data available. More studies, focused on seasonal changes of N availability in this ecosystem, as well as on N tolerance and metabolism in these species would be required. As seen in the general introduction, arginine (Arg) accumulation can be regarded both as a mechanism for N reserve (Legaz *et al.*, 1986) and as a means to avoid  $\text{NH}_4^+$ -excess toxic effects, by the immobilisation of this molecule (Dahlman *et al.*, 2002; Dahlman & Palmqvist, 2003).  $\text{NH}_4^+$  levels of *L. pustulata* were always higher than those found in *L. hispanica*. The lack of any significant annual pattern in  $\text{NH}_4^+$  content for *L. hispanica*, could indicate a very

efficient immobilisation of this molecule by the synthesis of Arg. We did not observe any seasonal pattern in Arg as a proportion of total amino acids in *L. pustulata* (Fig. 4.22) whilst, in the case of *L. hispanica*, there was a very clear tendency to decreasing values towards the end of spring, with a minimum in Jun, and thereafter, increasing values towards the maximum in Feb. Total amino acids content was usually higher in *L. pustulata*, especially in supposedly very productive months, like Jun and Oct.

We also observed higher levels of total sugars in *L. pustulata*. This might indicate that the functional strategy of this species is focused on the allocation of available C to growth, whereas *L. hispanica* would allocate it on protective molecules in order to endure effectively the harder conditions to which it is exposed. As it can be seen on Fig. 4.23, there were no differences in C content between the species. This way, *L. hispanica* avoids competition with less tolerant, but faster growing species, establishing in niches where microclimatic conditions are harsher. A similar strategy was found by Sonesson *et al.* (2011) in *Parmeliopsis ambigua*.

### **Multivariate analyses**

The PCA for *L. hispanica* (Fig. 4.19) shows the influence that climatic factors seem to have in this species. Precipitation appears in the first component with a high positive score and so do Tav and Rad, which appear in opposition to Precip, with a negative correlation. Interestingly, in the case of *L. pustulata* (Fig. 4.20) the influence of precipitation is much lower, with a correlation with the first axis of only  $-0.26$ . The coefficients of both Tav and Rad are higher, but lower than those of *L. hispanica* (Tables 4a.11, 4a.14). This further confirms the higher influence that the meteorological conditions have in *L. hispanica* in comparison to *L. pustulata*. The former species was described as an aero-hygrophytic species by Sancho & Kappen (1989), taking water mainly from rain, snow, dew or fog, while *L. pustulata* has a substrate-hygrophytic strategy, hence, it also relies on the moisture of its substrate, being usually found associated with mosses. Amax is in both species strongly linked to the second axis. It is noteworthy that this variable appears much closer to precipitation in the case of *L. pustulata* than in *L. hispanica*, thus indicating that in the former species Amax is driven by precipitation and in *L. hispanica* it really does not rely on any environmental variable, or, in other words, *L. pustulata* is a mesophytic species, while *L. hispanica* is a xerophytic species.

In both cases, axis 1 seems to be indicating productivity, as it is linked to variables such as Chla, Arg, Gyr and N, and in the case of *L. pustulata*, also Erg and Taa. Interestingly, Amax does not align with this axis, but with the second. This is suggesting that productivity is not related to the maximal photosynthetic rates for either species. Hence, something else is governing the productivity and this is, most likely, the activity period. Its length would influence the effectiveness of all other factors that influence productivity, being then more important than the potential momentary photosynthetic rate.

In both species, the first component grouped together Erg with DR, in accordance with Sundberg *et al.* (1999). The ratio between algal and fungal sugars also grouped with them, and in the case of *L. pustulata*, these variables were also related to N (Fig. 4a.15). It seems that the synthesis of Erg and the synthesis of mannitol compete for the resources provided by the photobiont. In both species, these variables were opposed to TSW. Indeed, the higher the amount of Erg, the higher the number of active fungal cells is. Hence, the thallus per unit surface area is lighter. Amax appears also in the positive side of the first component for *L. hispanica*, as well as total sugars, mannitol and glucose, whereas for *L. pustulata* total amino acids and Arg define positively the first axis.

It is noteworthy that for *L. pustulata* the position of the months barely changes between the PCAs without meteorological variables (Fig. 4a.15. Appendix 4) and the PCAs which feature them (Fig. 4.35). The first axis separates the months from Jan to May in opposition to the months from Jun to Nov, with the exception of Sep, which appears, as Dec does, in the middle of the axis.

In the PCA for *L. hispanica*, climatic factors place the summer months (Jun, Aug, Sep) at the left side of this first axis, with high temperature and radiation and low precipitation. Also, low Chl, Gyr, % Arg, and mann. When the PCA is performed without the climatic variables for *L. hispanica* (Fig. 4a.14), the topography of the months with regard to the first axis places on the positive side the months of Apr and Oct, when conditions are milder and, therefore, higher values of altogether, sugars, Amax, Erg and DR are reached. Also, values of TSW are low, in accordance with Larsson *et al.* (2012) and their reported increase in surface at humid seasons. With an opposite behaviour, we find the months of Aug, Sep and Dec at the negative part of this first axis. And Feb and Jun occupy an intermediate position. The second component separates the summer months (Jun, Aug, Sep) from the rest of the year. They appear in the negative part, thus showing low values of Chl, %Arg, Gyr and N. All this indicates their lower performance, a direct consequence of the lower active time they show in that season.

### Conclusions

The combination of actual weather conditions and species-specific morphological and physiological features determine the length and productivity of activity periods (Lange, 2003a). This seems to have a high influence on the performance of the two species of *Lasallia* here studied. It is very likely that *L. pustulata* has a longer activity period along the year, thanks to its more protected microhabitat. This enables it to have a higher growth rate, especially taking into account its higher potential productivity (Fig. 4.8) and efficiency (Fig. 4.7), with respect to *L. hispanica*, which has to invest more resources in protection against the harder conditions that it must endure. It is not that those conditions do not damage its metabolism, even under inactivity periods. In fact, we have observed depressed values of almost all the parameters measured, as well as strong photoinhibition, especially after the harsh summer. But the success of *L. hispanica* relies on the fact that it is able to thrive in

very changing ecosystems, thanks to its tolerance to extreme drought, cold and heat, and very high irradiation. We have shown that this species is able to recover in all aspects when conditions improve. The costs are high, it must allocate a great part of its resources on repairing damaged tissues and this reduces its growth rate. But it enables it to colonise niches where, most likely, *L. pustulata* and other more competitive species are not able to live.

Microclimatic measurements combined with activity monitoring in the field and transplantation experiments would highly improve our understanding of this issue, as they would provide much information about the conditions under which lichens are active and estimations of their activity period length.



**4A. APÉNDICE**  
**APPENDIX**



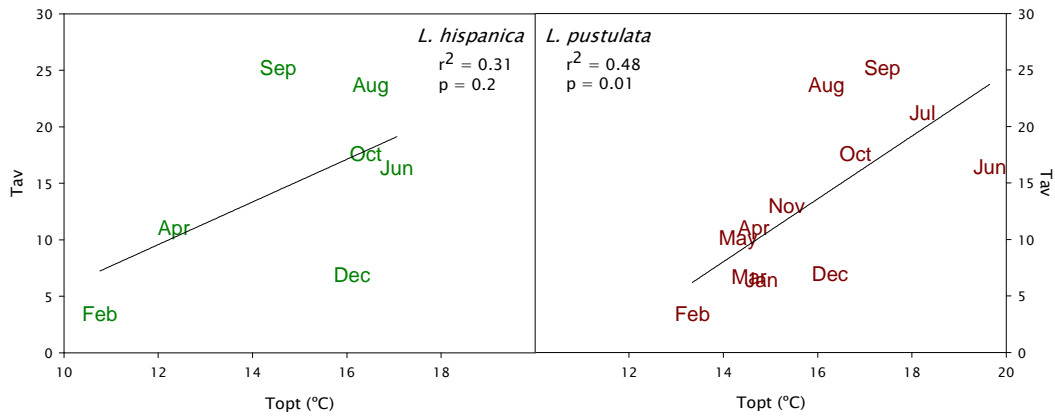


Fig.

4a.1: Temperatura óptima para la fotosíntesis (Topt) frente a temperatura media del mes de recolección (Tav) en *Lasallia hispanica* (izquierda) y *L. pustulata* (derecha). Optimal temperature for photosynthesis (Topt) vs. mean temperature of the month of collection (Tav) for *Lasallia hispanica* (left) and *L. pustulata*.

Month	<i>L. hispanica</i>			<i>L. pustulata</i>		
	Pc	Ps	$\Phi$	Pc	Ps	$\Phi$
Jan				50±2	241±15	0.094±0.002
Feb	51±7	242±18	0.091±0.002	44±5	193±19	0.116±0.001
Mar				42±4	192±20	0.122±0.004
Apr	68±4	295±11	0.087±0.001	62±6	296±23	0.078±0.002
May				50±7	246±23	0.118±0.005
Jun	51±6	254±12	0.113±0.002	49±2	232±14	0.127±0.003
Jul				53±3	246±15	0.130±0.006
Aug	57±9	254±21	0.091±0.003	59±4	106±19	0.104±0.004
Sep	103±7	364±17	0.071±0.005	61±3	303±17	0.085±0.003
Oct	50±5	224±10	0.115±0.001	39±4	167±17	0.211±0.002
Nov				52±2	229±14	0.153±0.005
Dec	44±3	235±10	0.075±0.002	47±3	222±15	0.094±0.006

Tabla 4a.1: Valores de punto de compensación lumínica (Pc), punto de saturación lumínica (Ps, ambos en  $\mu\text{moles de fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  de PPFd) y rendimiento cuántico aparente de la luz incidente ( $\Phi$ ) a 15 °C en *L. hispanica* y *L. pustulata* a lo largo de un año completo. Media  $\pm$  error estándar. Values for light compensation point (Pc), light saturation point (Ps, both on  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  de PPFd) and apparent quantum yield for incident light ( $\Phi$ ) at 15 °C for *L. hispanica* and *L. pustulata* along a whole year. Mean  $\pm$  SE.

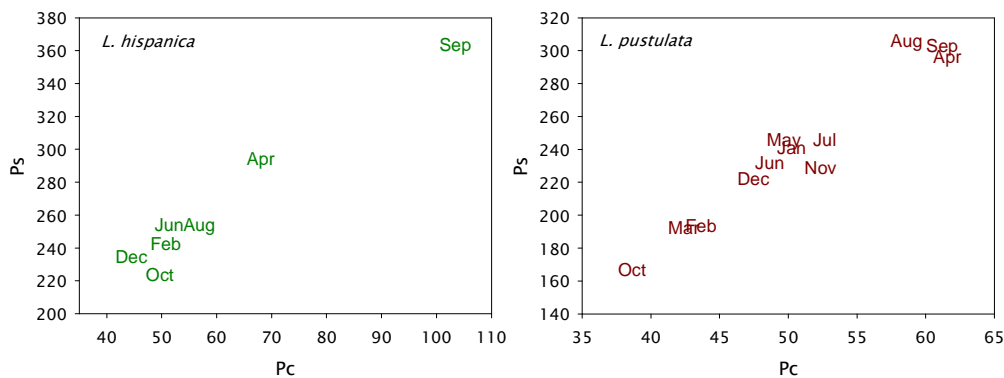


Fig. 4a.2: Punto de compensación lumínica (Pc) frente a punto de saturación (Ps, ambos en  $\mu\text{moles de fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  de PPFd) en *Lasallia hispanica* (izqda.) y *L. pustulata* (dcha.). Nótese la utilización de diferentes escalas. Light compensation point (Pc) vs. light saturation point (Ps, both on  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  de PPFd) for *Lasallia hispanica* (left) and *L. pustulata* (right). Note the different scales.



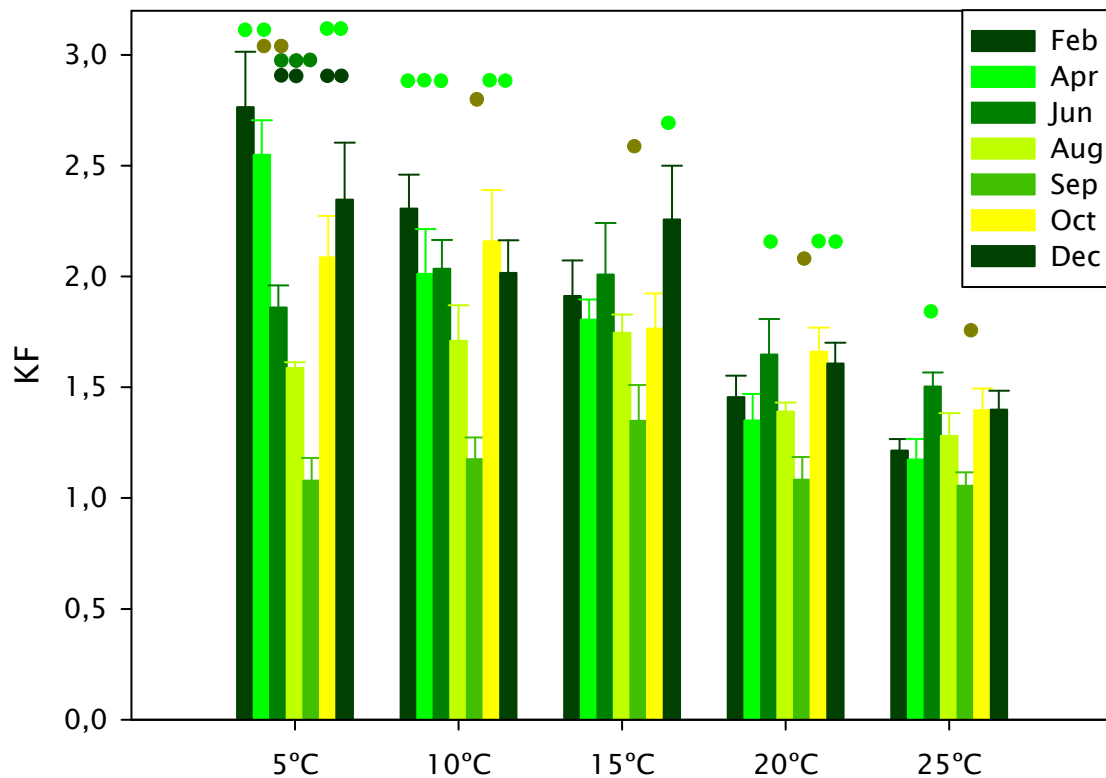


Fig. 4a.3: Índice de eficiencia KF de *L. hispanica* a lo largo del año. De aquí en adelante, las líneas de las barras indican el error estándar. Las barras que comparten puntos del mismo color no son significativamente distintas, mientras que aquéllas con puntos de distinto color sí lo son, según un ANOVA seguido de la prueba TukeyHSD, para  $p < 0.05$ . Efficiency quotient KF of *L. hispanica* along the year. Henceforth, bars in all figures indicate SE. Bars sharing a common dot colour are not significantly different, whilst those with different coloured dots are significantly different by ANOVA followed by Tukey HSD test, for  $p < 0.05$ .

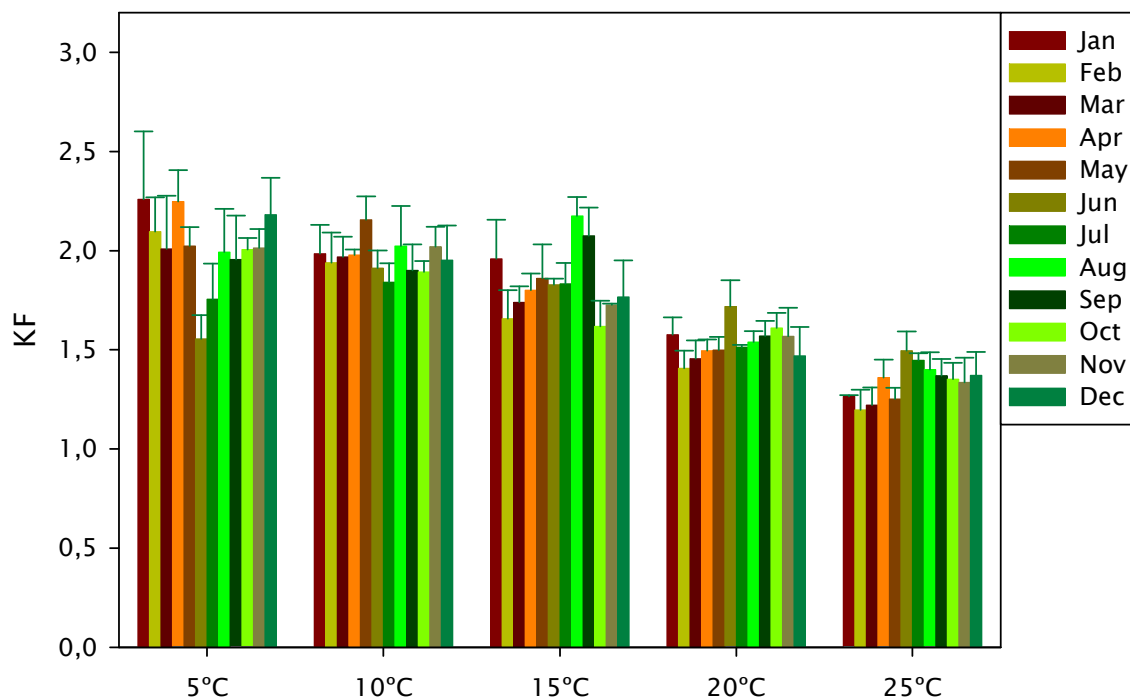


Fig. 4a.4: KF de *Lasallia pustulata* a lo largo del año. KF of *L. pustulata* along the seasons.

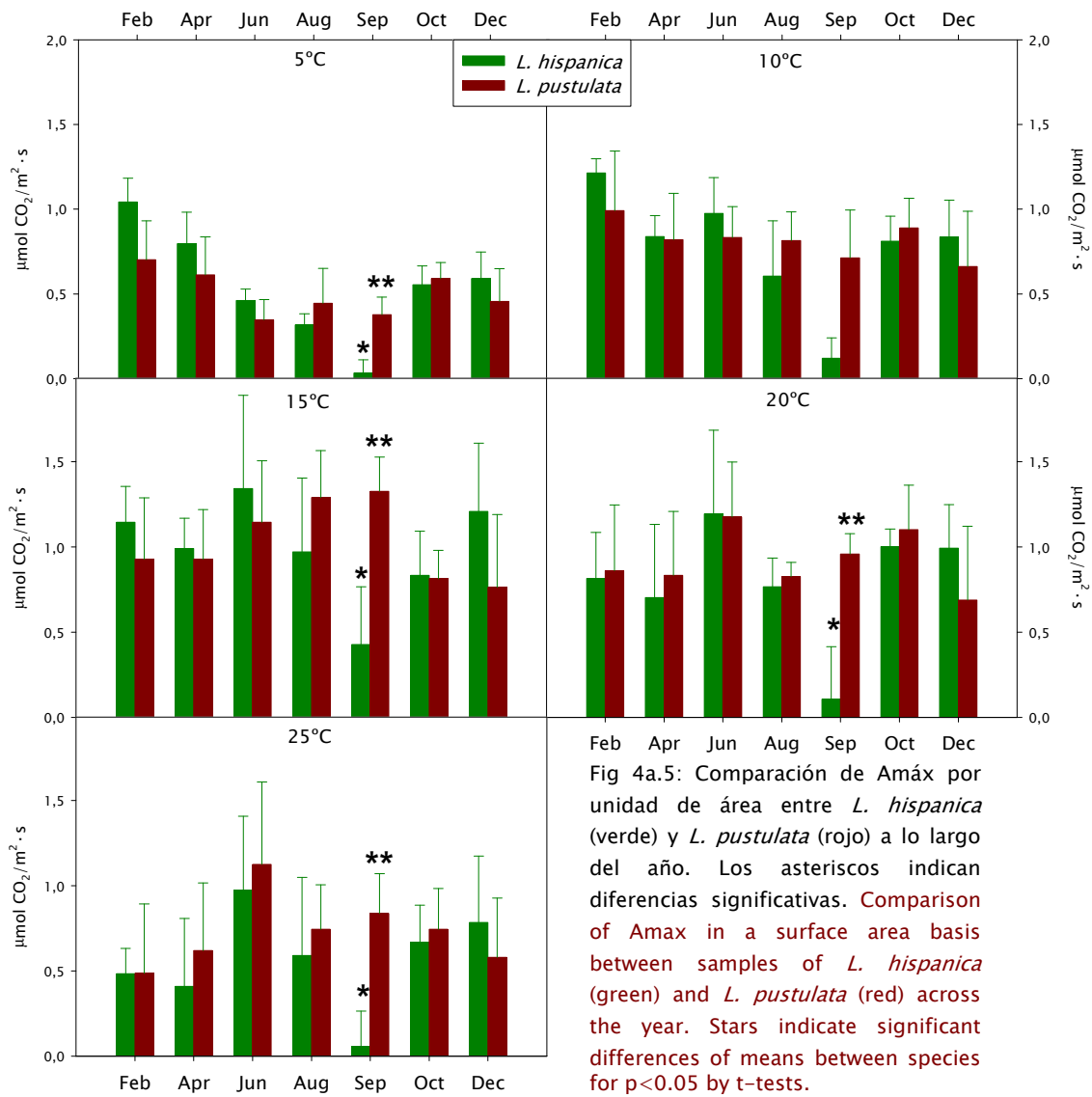


Fig 4a.5: Comparación de Am<sub>max</sub> por unidad de área entre *L. hispanica* (verde) y *L. pustulata* (rojo) a lo largo del año. Los asteriscos indican diferencias significativas. Comparison of Am<sub>max</sub> in a surface area basis between samples of *L. hispanica* (green) and *L. pustulata* (red) across the year. Stars indicate significant differences of means between species for  $p < 0.05$  by t-tests.

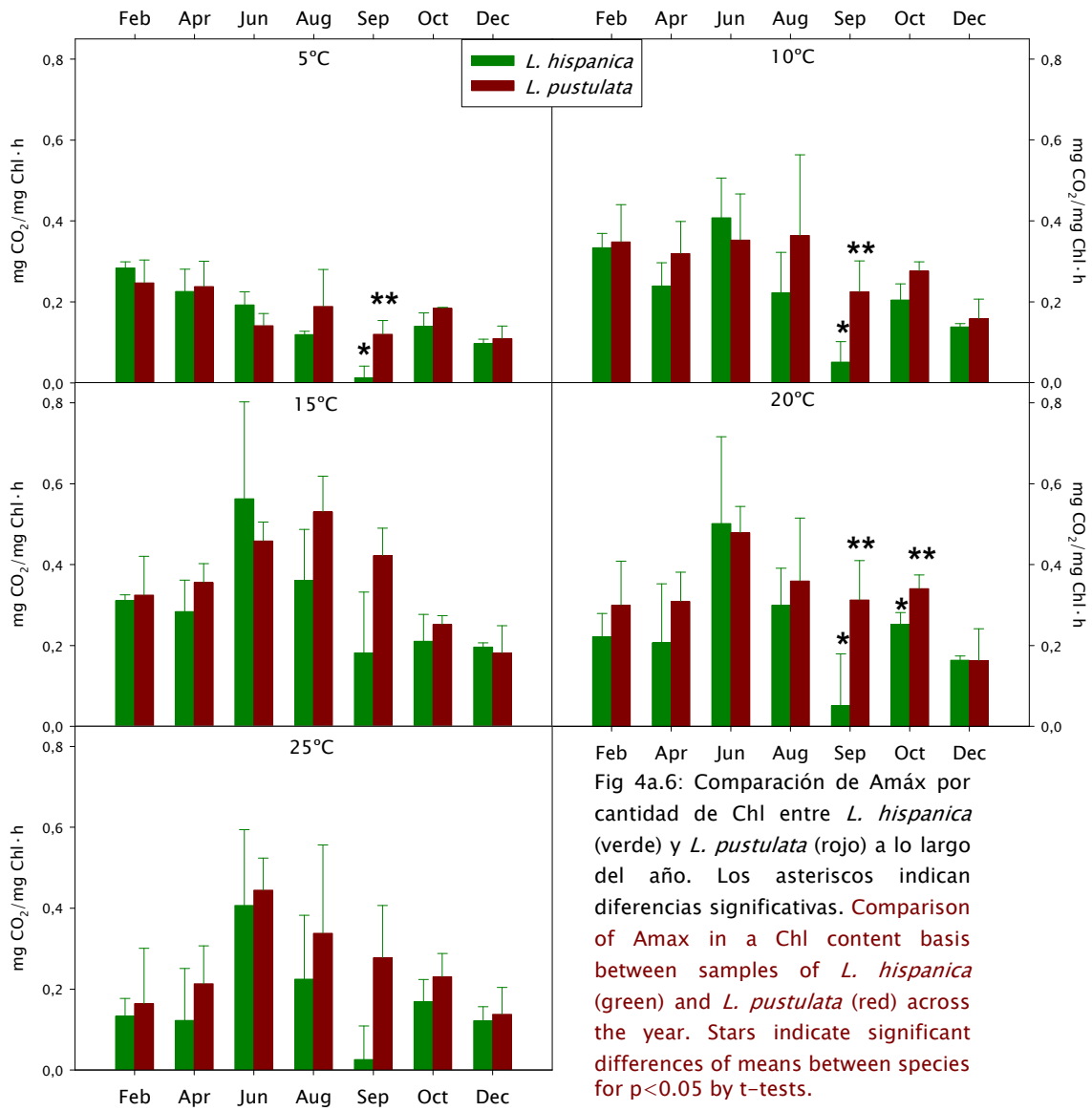


Fig 4a.6: Comparación de Amax por cantidad de Chl entre *L. hispanica* (verde) y *L. pustulata* (rojo) a lo largo del año. Los asteriscos indican diferencias significativas. Comparison of Amax in a Chl content basis between samples of *L. hispanica* (green) and *L. pustulata* (red) across the year. Stars indicate significant differences of means between species for  $p < 0.05$  by t-tests.

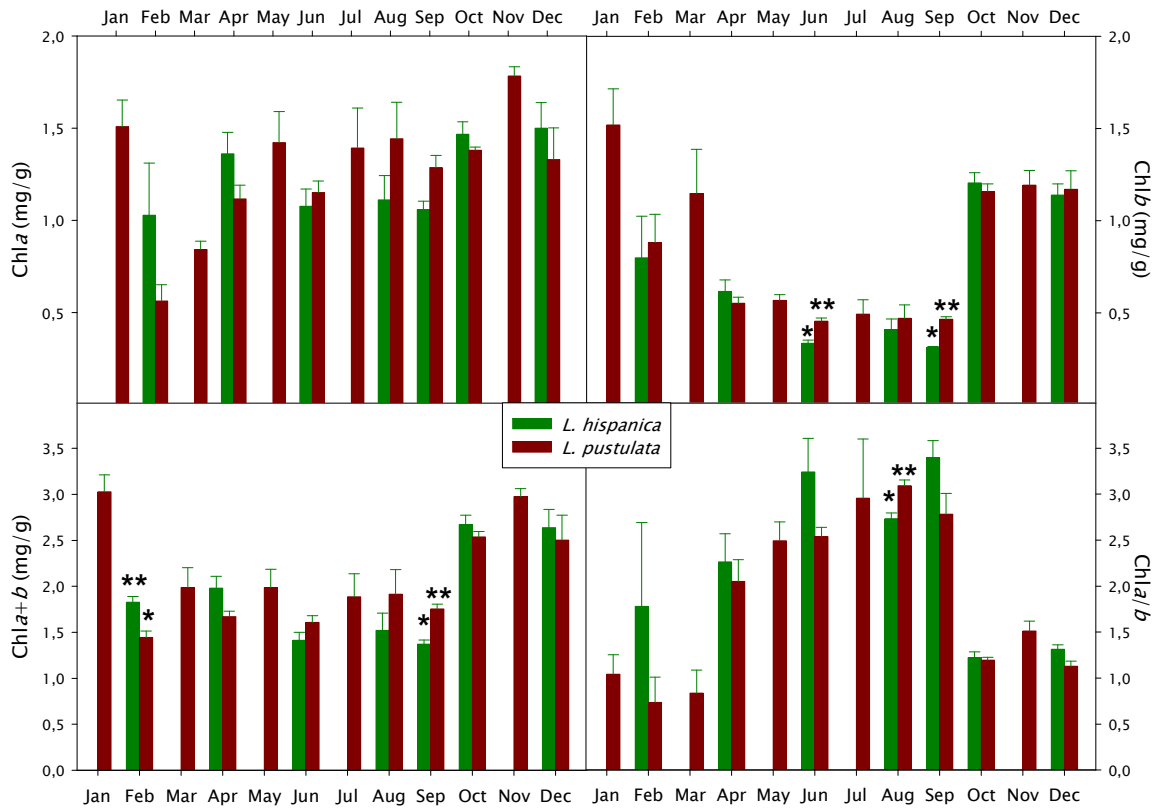


Fig. 4a.7: Contenido de clorofila en  $\text{mg g}^{-1}$  en *L. hispanica* (verde) y *L. pustulata* (rojo) a lo largo del año. Los asteriscos indican diferencias significativas. Las diferencias dentro de cada especie están reflejadas en las Fig. 4.17 y 4.18 del texto principal. Chl content of *L. hispanica* (green) and *L. pustulata* (red) along the months of sampling. Significant differences between species by t-test are shown with stars. Significance within species is shown on Figs. 4.17 and 4.18.

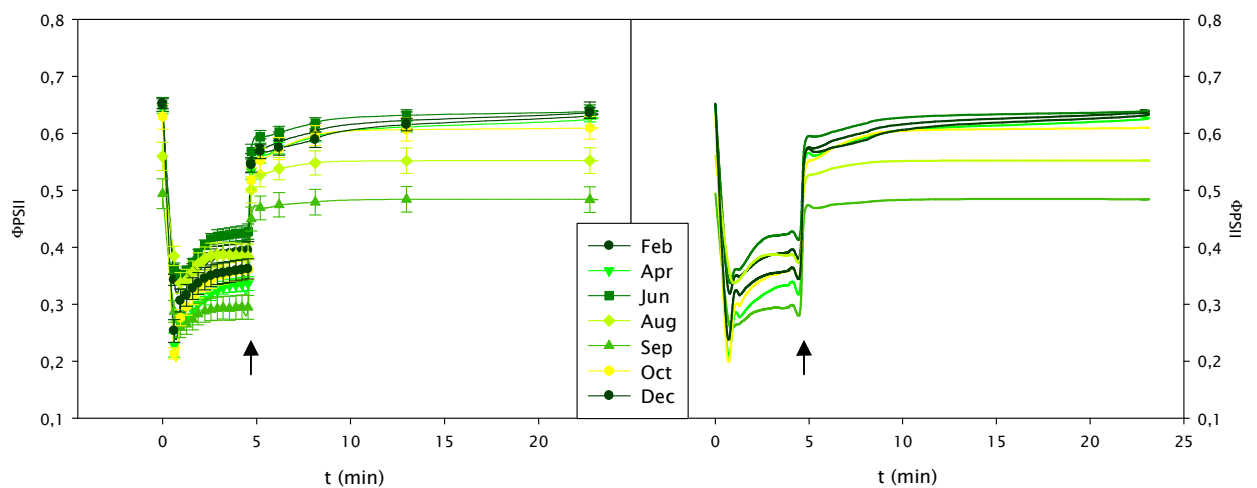


Fig 4a.8: Curvas de inducción y recuperación de *L. hispanica*, representando el rendimiento cuántico del FS II ( $\Phi_{PSII}$ ) frente al tiempo en minutos. A la izquierda se muestran las barras de error estándar. A la derecha se han eliminado para facilitar comparaciones. Las flechas indican el comienzo de la curva de recuperación. Ver detalles en Material y Métodos. Induction and recovery curves for *L. hispanica*, plotting PSII quantum yield ( $\Phi_{PSII}$ ) vs. time in minutes. At left, with SE bars (n= 8 to 12), at right only the lines to ease comparisons. Arrows indicate the beginning of the recovery curve. For details, see Material and Methods section.

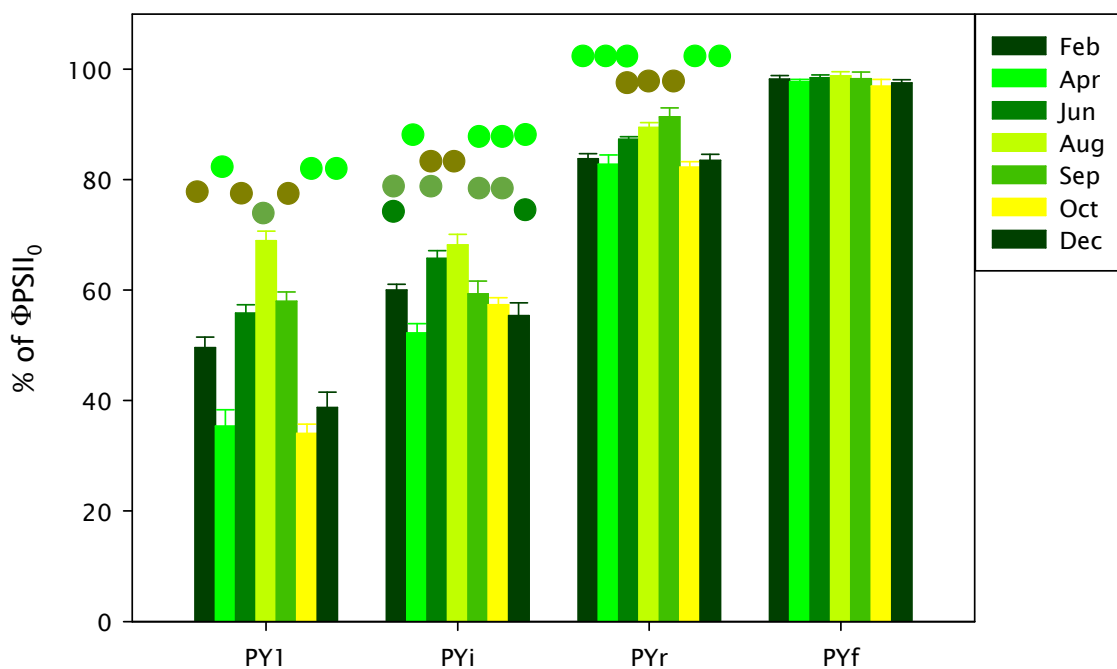


Fig. 4a.9: Comparación del porcentaje de caída inicial de rendimiento cuando se aplicó el primer pulso de saturación (PY1), el % de caída en el último punto de la curva de inducción (PYi), el % de recuperación en el primer punto de la curva de recuperación (PYr) y al final de ésta (PYf), en muestras de *L. hispanica* a lo largo del año. Todos los porcentajes se han calculado respecto al valor inicial de rendimiento cuántico del FS II ( $F_v/F_m$ ). Comparison of percentage of initial yield decay, when the first saturation pulse was applied (PY1), percentage of decay at the last point of the induction curve (PYi), percentage of recovery at the first point of recovery curve (PYr) and at the end of the curve (PYf), for samples of *L. hispanica* along the year. All percentages are calculated respective to initial value of PSII quantum yield ( $F_v/F_m$ ).

Month	Fv/Fm
Feb	0.652±0.003 <sup>a</sup>
Apr	0.644±0.003 <sup>a</sup>
Jun	0.650±0.005 <sup>a</sup>
Aug	0.560±0.01 <sup>bc</sup>
Sep	0.494±0.01 <sup>b</sup>
Oct	0.630±0.006 <sup>ac</sup>
Dec	0.652±0.003 <sup>a</sup>

Tabla 4a.2: Valor inicial de rendimiento cuántico del FS II (Fv/Fm) de las muestras de *L. hispanica* a lo largo del año. PSII quantum yield initial value (Fv/Fm) for samples of *L. hispanica* along the year.

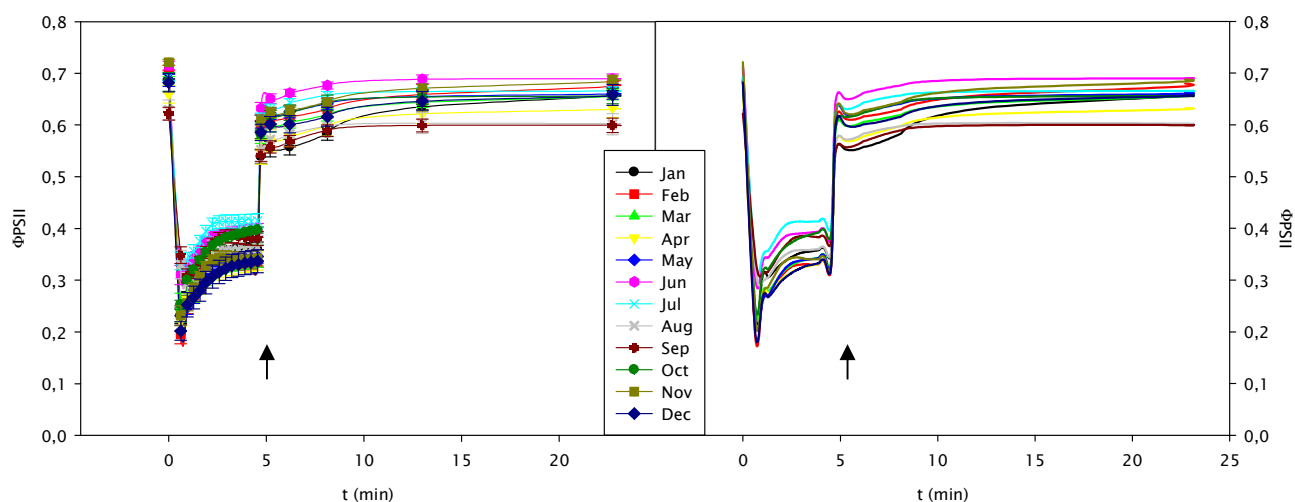


Fig 4a.10: Curvas de inducción y recuperación de *L. pustulata*, representando el rendimiento cuántico del FS II ( $\Phi$ PSII) frente al tiempo en minutos. A la izquierda se muestran las barras de error estándar. A la derecha se han eliminado para facilitar comparaciones. Las flechas indican el comienzo de la curva de recuperación. Ver detalles en Material y Métodos. Induction and recovery curves for *L. pustulata*, plotting PSII quantum yield ( $\Phi$ PSII) vs. time in minutes. At left, with SE bars (n= 8 to 12), at right only the lines to ease comparisons. Arrows indicate the beginning of the recovery curve. For details, see Material and Methods section.

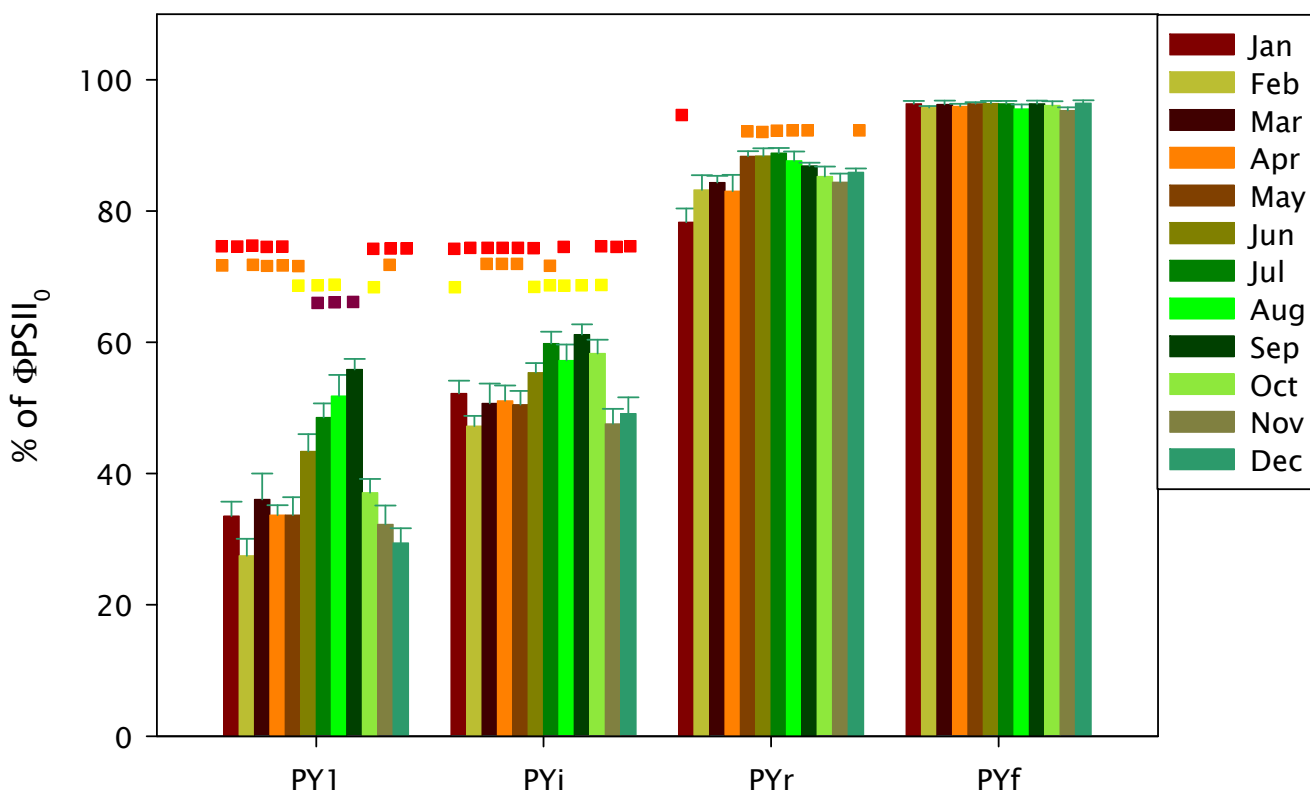


Fig. 4a.11: Comparación del porcentaje de caída inicial de rendimiento cuando se aplicó el primer pulso de saturación (PY1), el % de caída en el último punto de la curva de inducción (PYi), el % de recuperación en el primer punto de la curva de recuperación (PYr) y al final de ésta (PYf), en muestras de *L. pustulata* a lo largo del año. Todos los porcentajes se han calculado respecto al valor inicial de rendimiento cuántico del FS II (Fv/Fm). Comparison of percentage of initial yield decay, when the first saturation pulse was applied (PY1), percentage of decay at the last point of the induction curve (PYi), percentage of recovery at the first point of recovery curve (PYr) and at the end of the curve (PYf), for samples of *L. pustulata* along the year. All percentages are calculated respective to initial value of PSII quantum yield (Fv/Fm).

Month	Fv/Fm
Jan	0.688±0.000 <sup>ab</sup>
Feb	0.710±0.001 <sup>ab</sup>
Mar	0.685±0.003 <sup>abc</sup>
Apr	0.659±0.005 <sup>ad</sup>
May	0.686±0.004 <sup>ab</sup>
Jun	0.715±0.002 <sup>b</sup>
Jul	0.694±0.002 <sup>ab</sup>
Aug	0.629±0.006 <sup>cd</sup>
Sep	0.622±0.004 <sup>d</sup>
Oct	0.683±0.004 <sup>bd</sup>
Nov	0.722±0.002 <sup>b</sup>
Dec	0.682±0.005 <sup>abc</sup>

Tabla 4a.3: Valor inicial de rendimiento cuántico del FS II (Fv/Fm) de las muestras de *L. pustulata* a lo largo del año. PSII quantum yield initial value (Fv/Fm) for samples of *L. pustulata* along the year.

	TSW	Chla	Chlb	a+b	a/b	Erg	Chit	Ch/E	Arg	Taa	%Arg	NH4	N	C	C/N	Gyr	Amax	DR15	inos	arab	rib	man	r/m	r/m+a	glu	gal	fru	suc	Tsug	
TSW																														
Chla	-0,13																													
Chlb	0,20	0,37																												
a+b	0,07	<i>0,77</i>	<i>0,88</i>																											
a/b	-0,30	-0,09	<b>-0,92</b>	<b>-0,67</b>																										
Erg	-0,23	-0,12	-0,09	-0,12	0,05																									
Chit	0,22	-0,30	-0,21	-0,30	0,16	<i>0,66</i>																								
Ch/E	<i>0,53</i>	-0,22	-0,17	-0,23	0,17	-0,19	<i>0,61</i>																							
Arg	0,14	0,01	0,40	0,28	-0,39	-0,16	0,15	0,36																						
Taa	0,10	-0,40	0,05	-0,17	-0,11	-0,22	0,22	<i>0,50</i>	<i>0,62</i>																					
%Arg	0,01	0,30	0,38	0,42	-0,31	-0,06	0,01	0,07	<i>0,78</i>	0,01																				
NH4	-0,03	0,09	0,22	0,20	-0,12	0,13	0,07	-0,05	-0,04	0,23	-0,24																			
N	-0,09	-0,06	0,19	0,10	-0,14	0,32	0,28	0,04	<i>0,60</i>	0,26	<i>0,58</i>	-0,01																		
C	-0,30	-0,18	-0,15	-0,20	0,09	-0,13	-0,31	-0,28	-0,32	-0,22	-0,17	-0,10	-0,04																	
C/N	0,03	-0,03	-0,22	-0,17	0,15	-0,34	-0,32	-0,08	<b>-0,65</b>	-0,29	<b>-0,61</b>	-0,04	<b>-0,97</b>	0,27																
Gyr	-0,17	0,29	<i>0,57</i>	<i>0,54</i>	<i>-0,43</i>	-0,08	-0,15	-0,11	0,28	-0,16	<i>0,49</i>	0,00	0,27	0,25	-0,22															
Amax	-0,24	0,21	0,11	0,19	0,00	<i>0,63</i>	0,38	-0,16	-0,23	-0,31	-0,06	0,27	0,06	-0,05	-0,09	0,18														
DR15	<b>-0,57</b>	-0,36	-0,27	-0,37	0,23	0,38	0,01	-0,41	-0,28	0,06	-0,41	-0,03	0,07	0,22	-0,01	-0,17	0,22													
inos	-0,22	0,21	0,23	0,27	-0,14	0,19	-0,12	-0,34	0,08	-0,24	0,32	<i>0,49</i>	0,37	0,23	-0,33	<i>0,47</i>	0,25	-0,08												
arab	-0,05	0,24	0,30	0,33	-0,31	0,39	-0,01	-0,37	-0,02	-0,28	0,16	-0,01	<i>0,52</i>	0,26	<b>-0,45</b>	0,17	0,06	0,01	0,41											
rib	-0,19	0,02	0,08	0,06	-0,13	<i>0,80</i>	0,34	-0,40	-0,23	-0,41	-0,01	0,11	0,31	0,16	-0,28	0,04	<i>0,55</i>	0,32	0,37	<i>0,61</i>										
man	-0,06	0,12	0,26	0,24	-0,34	<i>0,62</i>	0,12	<b>-0,46</b>	0,04	-0,39	0,32	-0,09	<i>0,49</i>	0,12	<b>-0,46</b>	0,11	0,21	0,06	0,43	<i>0,83</i>	<i>0,80</i>									
r/m	-0,22	-0,13	-0,22	-0,22	0,23	<i>0,50</i>	0,37	-0,09	<b>-0,47</b>	-0,21	<b>-0,45</b>	0,31	-0,17	0,13	0,18	-0,12	<i>0,67</i>	0,42	0,04	-0,09	<i>0,60</i>	0,01								
r/m+a	-0,19	-0,19	-0,32	-0,31	0,30	0,42	0,39	0,01	<b>-0,42</b>	-0,16	-0,42	0,23	-0,32	0,01	0,30	-0,22	<i>0,62</i>	0,39	-0,13	-0,37	0,42	-0,17	<i>0,94</i>							
glu	-0,36	-0,01	-0,12	-0,08	0,07	<i>0,55</i>	0,15	-0,39	-0,03	-0,05	0,04	0,16	<i>0,51</i>	0,41	<b>-0,44</b>	-0,02	0,18	0,35	0,34	<i>0,63</i>	<i>0,63</i>	<i>0,65</i>	0,17	0,00						
gal	-0,33	0,24	0,24	0,29	-0,18	0,23	-0,30	<b>-0,59</b>	-0,18	-0,17	-0,09	0,31	0,33	0,34	-0,28	0,21	0,04	0,21	<i>0,56</i>	<i>0,79</i>	0,41	<i>0,56</i>	-0,07	-0,36	<i>0,62</i>					
fru	-0,08	-0,14	-0,24	-0,24	0,27	0,22	0,25	0,07	-0,24	-0,05	-0,24	0,08	-0,15	0,15	0,18	-0,16	<i>0,49</i>	0,17	-0,08	-0,13	0,16	-0,15	<i>0,56</i>	<i>0,53</i>	-0,07	-0,11				
suc	-0,19	-0,21	-0,29	-0,31	0,18	0,28	0,04	-0,22	-0,20	-0,08	-0,19	-0,06	0,09	-0,01	-0,09	-0,24	-0,20	0,30	0,13	0,19	0,34	0,36	0,00	-0,03	0,40	0,22	<b>-0,61</b>			
Tsug	-0,32	-0,10	-0,18	-0,18	0,10	<i>0,66</i>	0,15	<b>-0,47</b>	-0,31	-0,28	-0,17	0,07	0,32	0,25	-0,27	-0,15	0,20	0,41	0,40	<i>0,67</i>	<i>0,80</i>	<i>0,76</i>	0,30	0,09	<i>0,75</i>	<i>0,65</i>	-0,06	<i>0,67</i>		

Fig. 4a.12: Matriz de correlación de *L. hispanica*. Bajo la diagonal principal, los coeficientes de correlación de Pearson. Los valores en cursiva y color añil indican correlaciones positivas significativas. Los valores en rojo indican las correlaciones negativas significativas. Sobre la diagonal, valores de significación de las correlaciones. Los valores inferiores a 0'05 aparecen en cursiva y color púrpura. Correlation matrix for *Lasallia hispanica*. Below the main diagonal, Pearson's product-moment correlation coefficients. Values marked by italics and indigo indicate positive significant correlations. Values in red indicate negative significant correlations. Above the main diagonal, significance of the correlation. Significances under 0.05 are marked by italics and purple colour. Meaning of abbreviations is clarified on page 325.



	TSW	Chla	Chlb	a+b	a/b	Erg	Chit	Ch/E	Arg	Taa	%Arg	NH4	N	C	C/N	Gyr	Amax	DR15	inos	arab	rib	man	r/m	r/m+a	glu	gal	fru	suc	Tsug	
TSW		0,56	0,42	0,84	0,48	<i>0,00</i>	0,11	<i>0,03</i>	<i>0,00</i>	<i>0,02</i>	0,06	0,96	<i>0,00</i>	<i>0,03</i>	<i>0,00</i>	<i>0,01</i>	0,80	<i>0,00</i>	0,28	0,12	<i>0,03</i>	0,77	<i>0,00</i>	<i>0,00</i>	0,18	0,15	0,18	<i>0,03</i>	0,31	TSW
Chla	-0,1		0,52	<i>0,00</i>	<i>0,02</i>	0,16	0,92	0,44	0,82	0,18	0,28	0,14	<i>0,00</i>	0,05	<i>0,00</i>	<i>0,00</i>	<i>0,01</i>	0,08	0,44	0,79	0,38	0,18	0,94	0,71	0,40	0,20	0,24	<i>0,04</i>	0,23	Chla
Chlb	0,14	0,11		<i>0,00</i>	<i>0,00</i>	0,25	0,56	0,52	0,66	0,42	0,16	0,64	0,30	0,34	0,23	0,82	<i>0,01</i>	0,84	0,34	0,88	0,35	0,78	0,18	0,26	0,05	0,15	<i>0,01</i>	0,16	0,13	Chlb
a+b	0,03	<i>0,71</i>	<i>0,78</i>		0,05	0,95	0,73	0,98	0,87	0,16	0,09	0,21	0,33	0,05	0,35	0,08	<i>0,00</i>	0,34	0,85	0,95	0,22	0,53	0,38	0,30	0,41	0,83	0,26	<i>0,02</i>	0,06	a+b
a/b	-0,12	<i>0,38</i>	<b>-0,81</b>	-0,33		0,24	0,37	0,81	0,55	0,82	0,35	0,92	<i>0,03</i>	0,66	<i>0,01</i>	0,05	0,29	0,44	0,27	0,88	0,98	0,31	0,32	0,61	<i>0,02</i>	<i>0,02</i>	<i>0,00</i>	0,84	0,62	a/b
Erg	<b>-0,8</b>	0,24	-0,20	0,01	0,20		0,49	<i>0,00</i>	<i>0,02</i>	<i>0,01</i>	0,34	0,81	<i>0,00</i>	0,10	<i>0,00</i>	<i>0,00</i>	0,80	<i>0,00</i>	<i>0,02</i>	0,15	<i>0,01</i>	0,96	<i>0,00</i>	<i>0,00</i>	<i>0,02</i>	0,50	<i>0,04</i>	<i>0,04</i>	0,20	Erg
Chit	-0,27	0,02	-0,10	-0,06	0,15	0,12		<i>0,00</i>	0,37	0,86	0,16	0,72	0,07	0,12	0,24	0,78	0,73	0,41	<i>0,02</i>	0,06	0,51	0,16	0,48	0,20	0,15	0,54	0,15	0,20	0,06	Chit
Ch/E	<i>0,37</i>	-0,13	0,11	0,00	-0,04	<b>-0,64</b>	<i>0,67</i>		0,25	<i>0,05</i>	0,86	0,63	0,12	0,87	0,05	0,06	0,96	<i>0,00</i>	0,99	<i>0,01</i>	0,17	0,35	<i>0,00</i>	<i>0,00</i>	0,54	0,40	0,52	0,53	0,78	Ch/E
Arg	<b>-0,51</b>	0,04	-0,08	-0,03	0,10	<i>0,40</i>	0,15	-0,20		<i>0,00</i>	<i>0,00</i>	0,20	<i>0,00</i>	0,16	<i>0,00</i>	0,06	0,96	<i>0,02</i>	0,56	0,10	0,28	0,19	<i>0,00</i>	<i>0,01</i>	0,07	0,75	0,10	0,36	0,33	Arg
Taa	<b>-0,4</b>	0,23	0,14	0,24	-0,04	<i>0,43</i>	-0,03	<b>-0,33</b>	<i>0,74</i>		0,63	<i>0,00</i>	<i>0,00</i>	0,41	<i>0,00</i>	0,15	0,25	<i>0,00</i>	0,86	<i>0,03</i>	0,78	0,08	<i>0,02</i>	<i>0,01</i>	0,93	0,35	0,59	0,12	0,05	Taa
%Arg	-0,32	-0,19	-0,24	-0,29	0,16	0,16	0,24	0,03	<i>0,72</i>	0,08		0,26	<i>0,03</i>	0,21	<i>0,03</i>	0,40	0,17	0,80	0,56	0,81	0,20	0,90	0,06	0,18	<i>0,01</i>	0,66	<i>0,05</i>	0,95	0,70	%Arg
NH4	0,01	0,25	0,08	0,21	-0,02	0,04	-0,06	-0,08	0,22	<i>0,50</i>	-0,19		0,13	0,69	0,21	0,51	<i>0,01</i>	0,32	0,62	<i>0,04</i>	0,57	0,33	0,89	0,54	0,20	0,10	0,48	0,16	<i>0,04</i>	NH4
N	<b>-0,65</b>	<i>0,47</i>	-0,18	0,17	<i>0,36</i>	<i>0,66</i>	0,30	-0,26	<i>0,70</i>	<i>0,65</i>	<i>0,37</i>	0,26		0,60	<i>0,00</i>	<i>0,00</i>	0,17	<i>0,01</i>	<i>0,04</i>	0,07	0,63	0,16	<i>0,03</i>	<i>0,03</i>	<i>0,03</i>	0,91	<i>0,01</i>	0,50	0,50	N
C	<b>-0,36</b>	-0,33	-0,16	-0,32	-0,08	0,28	0,26	-0,03	0,24	0,14	0,22	-0,07	0,09		0,68	0,74	0,54	0,85	0,82	0,89	0,66	0,58	0,31	0,44	0,57	0,32	0,87	0,17	0,59	C
C/N	<i>0,63</i>	<b>-0,49</b>	0,21	-0,16	<b>-0,42</b>	<b>-0,64</b>	-0,20	0,32	<b>-0,67</b>	<b>-0,61</b>	<b>-0,36</b>	-0,21	<b>-0,97</b>	0,07		0,00	0,33	<i>0,00</i>	0,07	0,07	0,53	0,20	<i>0,02</i>	<i>0,02</i>	<i>0,03</i>	0,78	<i>0,00</i>	0,52	0,55	C/N
Gyr	<i>0,45</i>	<b>-0,54</b>	0,04	-0,30	-0,33	<b>-0,49</b>	-0,05	0,32	-0,32	-0,25	-0,15	-0,11	<b>-0,58</b>	0,06	<i>0,60</i>		0,06	0,08	0,27	<i>0,04</i>	0,41	<i>0,01</i>	0,07	0,10	0,51	0,68	0,27	0,45	0,19	Gyr
Amax	0,04	<i>0,40</i>	<i>0,41</i>	<i>0,54</i>	-0,18	-0,04	-0,06	0,01	0,01	0,19	-0,23	<i>0,43</i>	0,24	-0,10	-0,17	-0,32		0,87	0,69	<i>0,03</i>	<i>0,00</i>	<i>0,01</i>	0,23	0,43	0,06	0,10	0,16	<i>0,00</i>	<i>0,00</i>	Amax
DR15	<b>-0,55</b>	0,30	-0,03	0,16	0,13	<i>0,62</i>	-0,14	<b>-0,53</b>	<i>0,38</i>	<i>0,49</i>	0,04	0,17	<i>0,46</i>	-0,03	<b>-0,48</b>	-0,30	-0,03		0,97	0,20	0,08	0,81	<i>0,01</i>	<i>0,00</i>	0,06	0,87	0,38	0,83	0,87	DR15
inos	-0,19	0,13	-0,17	-0,03	0,19	<i>0,37</i>	<i>0,40</i>	0,00	0,10	0,03	0,10	0,09	<i>0,35</i>	0,04	-0,31	-0,19	-0,07	-0,01		<i>0,05</i>	<i>0,04</i>	<i>0,00</i>	0,88	0,83	<i>0,00</i>	<i>0,02</i>	<i>0,00</i>	<i>0,02</i>	<i>0,00</i>	inos
arab	0,27	-0,05	0,03	-0,01	-0,03	-0,24	0,32	<i>0,42</i>	-0,28	<b>-0,36</b>	-0,04	<b>-0,35</b>	-0,30	-0,02	0,31	<i>0,35</i>	<b>-0,37</b>	-0,22	<i>0,33</i>		<i>0,02</i>	<i>0,00</i>	0,10	<i>0,00</i>	<i>0,02</i>	<i>0,00</i>	0,47	0,46	<i>0,00</i>	arab
rib	<b>-0,35</b>	-0,15	-0,16	-0,21	0,00	<i>0,42</i>	0,11	-0,24	0,19	0,05	0,22	-0,10	0,08	0,08	-0,11	0,14	<b>-0,49</b>	0,30	<i>0,35</i>	<i>0,40</i>		<i>0,00</i>	<i>0,00</i>	<i>0,00</i>	<i>0,00</i>	0,19	0,14	<i>0,00</i>	<i>0,00</i>	rib
man	0,05	-0,23	0,05	-0,11	-0,17	-0,01	0,24	0,16	-0,22	-0,30	-0,02	-0,17	-0,24	-0,10	0,22	<i>0,43</i>	<b>-0,44</b>	-0,04	<i>0,51</i>	<i>0,74</i>	<i>0,69</i>		0,39	0,26	<i>0,01</i>	<i>0,00</i>	0,23	<i>0,00</i>	<i>0,00</i>	man
r/m	<b>-0,53</b>	0,01	-0,23	-0,15	0,17	<i>0,61</i>	-0,12	<b>-0,53</b>	<i>0,50</i>	0,39	0,31	-0,02	<i>0,37</i>	0,17	<b>-0,39</b>	-0,31	-0,21	<i>0,45</i>	-0,03	-0,28	<i>0,59</i>	-0,15		<i>0,00</i>	0,17	0,17	0,51	0,06	0,46	r/m
r/m+a	<b>-0,54</b>	-0,06	-0,19	-0,18	0,09	<i>0,63</i>	-0,22	<b>-0,63</b>	<i>0,46</i>	<i>0,42</i>	0,23	0,10	<i>0,36</i>	0,13	<b>-0,39</b>	-0,28	-0,14	<i>0,48</i>	-0,04	<b>-0,53</b>	<i>0,48</i>	-0,19	<i>0,92</i>		0,48	<i>0,01</i>	0,75	<i>0,03</i>	0,84	r/m+a
glu	-0,23	0,14	-0,33	-0,14	<i>0,39</i>	<i>0,38</i>	0,25	-0,10	0,31	0,01	<i>0,41</i>	-0,22	<i>0,36</i>	-0,10	<b>-0,37</b>	-0,11	-0,31	0,32	<i>0,65</i>	<i>0,39</i>	<i>0,51</i>	<i>0,45</i>	0,23	0,12		<i>0,00</i>	<i>0,00</i>	0,23	<i>0,00</i>	glu
gal	0,24	0,22	-0,25	-0,04	<i>0,38</i>	-0,12	0,1	0,15	-0,05	-0,16	0,08	-0,28	0,02	-0,17	-0,05	0,07	-0,28	0,03	<i>0,39</i>	<i>0,73</i>	0,22	<i>0,48</i>	-0,23	<b>-0,44</b>	<i>0,64</i>		<i>0,00</i>	0,33	<i>0,01</i>	gal
fru	-0,23	0,2	<b>-0,45</b>	-0,19	<i>0,55</i>	<i>0,34</i>	0,24	-0,11	0,28	0,09	<i>0,33</i>	-0,12	<i>0,44</i>	-0,03	<b>-0,47</b>	-0,19	-0,24	0,15	<i>0,6</i>	0,12	0,25	0,21	0,11	0,06	<i>0,75</i>	<i>0,51</i>		0,25	<i>0,01</i>	fru
suc	<b>-0,37</b>	<b>-0,34</b>	-0,24	<b>-0,39</b>	-0,04	<i>0,34</i>	0,22	-0,11	-0,16	-0,26	0,01	-0,24	-0,12	0,23	0,11	0,13	<b>-0,46</b>	-0,04	<i>0,39</i>	0,13	<i>0,64</i>	<i>0,52</i>	0,32	<i>0,36</i>	0,21	-0,17	0,2		<i>0,00</i>	suc
Tsug	-0,18	-0,21	-0,26	-0,31	0,09	0,22	0,32	0,05	-0,17	-0,32	0,07	<b>-0,34</b>	-0,12	0,09	0,1	0,22	<b>-0,57</b>	-0,03	<i>0,61</i>	<i>0,63</i>	<i>0,77</i>	<i>0,85</i>	0,13	0,04	<i>0,57</i>	<i>0,43</i>	<i>0,42</i>	<i>0,8</i>		Tsug

Fig. 4a.13: Matriz de correlación de *L. pustulata*. Bajo la diagonal principal, los coeficientes de correlación de Pearson. Los valores en cursiva y color añil indican correlaciones positivas significativas. Los valores en rojo indican las correlaciones negativas significativas. Sobre la diagonal, valores de significación de las correlaciones. Los valores inferiores a 0'05 aparecen en cursiva y color púrpura. Correlation matrix for *Lasallia pustulata*. Below the main diagonal, Pearson's product-moment correlation coefficients. Values marked by italics and indigo indicate positive significant correlations. Values in red indicate negative significant correlations. Above the main diagonal, significance of the correlation. Significances under 0.05 are marked by italics and purple colour. Meaning of abbreviations is clarified on page 325.

Abreviaturas utilizadas en las Figs. 4a12 y 4a13: TSW: Peso específico del talo weight ( $\text{g m}^{-2}$ ); Chla: Clorofila *a* ( $\text{mg g}^{-1}$  de peso seco); Chlb: Clorofila *b* ( $\text{mg g}^{-1}$ ); a+b: Clorofila *a+b* ( $\text{mg g}^{-1}$ ); a/b: Clorofila *a/b*; Erg: ergosterol ( $\text{mg g}^{-1}$ ); Chit: quitina ( $\text{mg g}^{-1}$ ); Ch/E: proporción quiina/ergosterol; Arg: arginina ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ ); Taa: aminoácidos totales ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ ); %Arg: porcentaje de arginina en el total de aa;  $\text{NH}_4$ :  $\text{NH}_4^+$  ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ ); N: nitrógeno ( $\text{mg g}^{-1}$ ); C: carbono ( $\text{mg g}^{-1}$ ); C/N: proporción carbono/nitrógeno; Gyr: ácido girofórico (Cuentas de área  $\text{g}^{-1}$ ); Amax: fotosíntesis neta máxima ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ); DR15: Respiración en oscuridad a 15 °C ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ); inos: inositol ( $\text{mg g}^{-1}$ ); arab: arabitól ( $\text{mg g}^{-1}$ ); rib: ribitol ( $\text{mg g}^{-1}$ ); man: manitol ( $\text{mg g}^{-1}$ ); r/m: proporción ribitol/manitol; r/m+a: proporción entre ribitol y manitol+arabitól; glu: glucosa ( $\text{mg g}^{-1}$ ); gal: galactosa ( $\text{mg g}^{-1}$ ); fru: fructosa ( $\text{mg g}^{-1}$ ); suc: sacarosa ( $\text{mg g}^{-1}$ ); Tsug: azúcares totales ( $\text{mg g}^{-1}$ ).

Abbreviations used in Figs. 4a.12 and 4a.13: TSW: Thallus specific weight ( $\text{g m}^{-2}$ ); Chla: Chlorophyll *a* ( $\text{mg g}^{-1}$  dry weight); Chlb: Chlorophyll *b* ( $\text{mg g}^{-1}$  dry weight); a+b: Chlorophyll *a+b* ( $\text{mg g}^{-1}$  dry weight); a/b: Chlorophyll *a/b*; Erg: ergosterol ( $\text{mg g}^{-1}$  dry weight); Chit: chitin ( $\text{mg g}^{-1}$  dry weight); Ch/E: chitin to ergosterol ratio; Arg: arginine ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ ); Taa: total aminoacids ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ ); %Arg: percentage of arginine of the total aa content;  $\text{NH}_4$ :  $\text{NH}_4^+$  ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ ); N: nitrogen ( $\text{mg g}^{-1}$ ); C: carbon ( $\text{mg g}^{-1}$ ); C/N: carbon to nitrogen ratio; Gyr: gyrophoric acid ( $\text{CA g}^{-1}$ ); Amax: maximal assimilation rate ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ); DR15: dark respiration at 15 °C ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ); inos: inositol ( $\text{mg g}^{-1}$ ); arab: arabitól ( $\text{mg g}^{-1}$ ); rib: ribitol ( $\text{mg g}^{-1}$ ); man: mannitol ( $\text{mg g}^{-1}$ ); r/m: ribitol to mannitol ratio; r/m+a: ribitol to mannitol+arabitól ratio; glu: glucose ( $\text{mg g}^{-1}$ ); gal: galactose ( $\text{mg g}^{-1}$ ); fru: fructose ( $\text{mg g}^{-1}$ ); suc: sucrose ( $\text{mg g}^{-1}$ ); Tsug: total sugars ( $\text{mg g}^{-1}$ ).

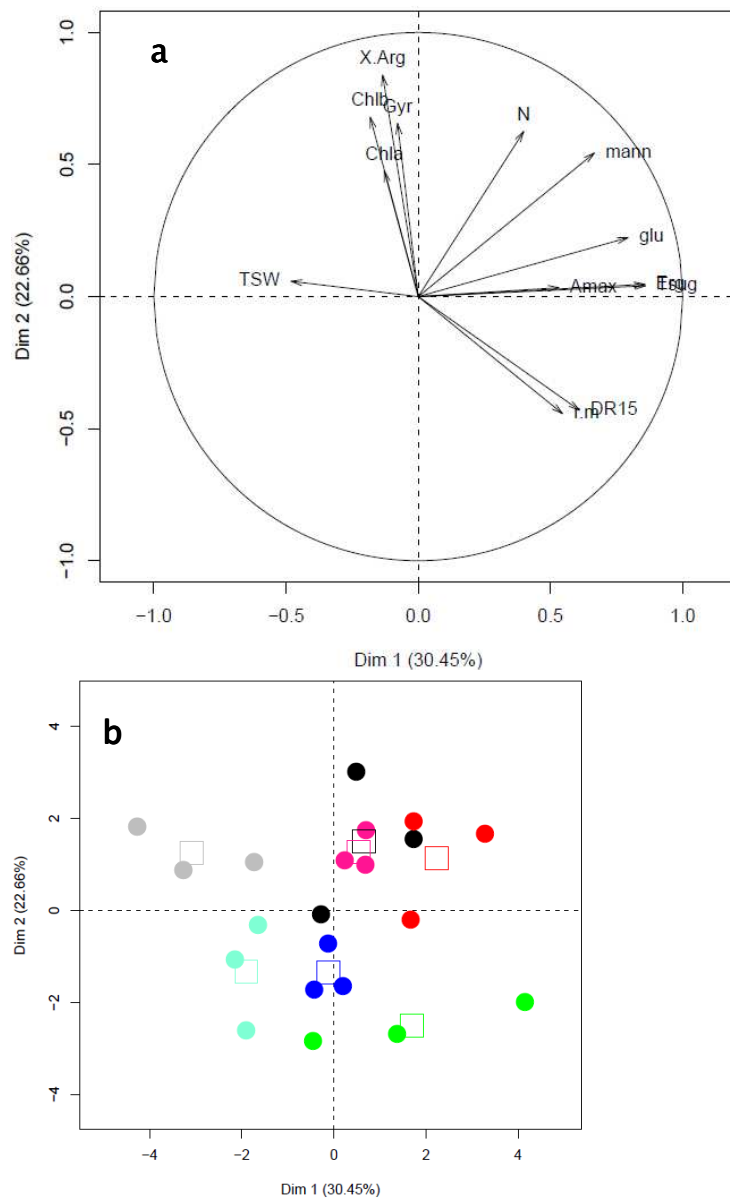


Fig. 4a.14: ACP de *Lasallia hispanica*. (a) Mapa de factores de las variables. (b) Mapa de factores de los individuos. Feb en negro; Abr en rojo; Jun en verde; Ago en azul; Sep en azul claro; Oct en rosa; Dic en gris. El cuadrado indica la media del mes. PCA of *Lasallia hispanica*. (a) Variables factor map. (b) Individuals factor map. Feb in black; Apr in red; Jun in green; Aug in blue; Sep in light blue; Oct in pink; Dec in grey. The square indicates the average of each month.

En este ACP (Fig. 4a.14) encontramos al lado izquierdo las muestras procedentes de meses con condiciones climáticas más duras: Ago y Sep en verano y Dic en invierno. En el lado derecho aparecen las muestras de los meses más suaves, Abr y Oct. Las muestras de Feb y Jun, como meses de transición, aparecen a ambos lados del eje y cerca de él. El segundo eje separa en su lado positivo las muestras de Feb, Abr, Oct y Dic, y en el negativo los datos de verano: Jun, Ago y Sep. In this PCA (Fig 4a.14) we find at its left side the samples from the most extreme climatic conditions: Aug and Sep in summer and Dec in winter. On the right side, we find the samples from months with milder conditions, namely, Apr and Oct. Feb and Jun, as transition months, have their samples in both sides of the axis. The second axis shows in its positive side the data from Feb, Apr, Oct and Dec, and on its negative side, the data taken in summer: Jun, Aug and Sep.

	eigenvalue	% of variance	cumulative % of variance
Comp 1	3,9585	30,4502	30,4503
Comp 2	2,9462	22,6634	53,1136
Comp 3	1,7229	13,2528	66,3665
Comp 4	1,2212	9,3935	75,7600

Tabla 4a.4: Valores propios, porcentaje de varianza y porcentaje acumulado de varianza en *L. hispanica*. Eigenvalues, percentage of variance and cumulative percentage of variance for *Lasallia hispanica*.

	Dim.1	Dim.2	Dim.3	Dim.4
TSW	-0,4808	0,0580	-0,2220	0,7736
Chla	-0,1286	0,4757	0,4592	-0,0208
Chlb	-0,1818	0,6789	0,3361	0,1415
Erg	0,8566	0,0467	0,1123	0,2888
%Arg	-0,1348	0,8385	-0,0914	-0,1368
N	0,3984	0,6251	-0,3384	-0,1328
Gyr	-0,0784	0,6558	0,4176	-0,3139
Amax	0,5310	0,0338	0,7326	0,2110
DR15	0,6094	-0,4301	0,0251	-0,4476
mann	0,6657	0,5437	-0,2283	0,2914
r.m	0,5455	-0,4431	0,5355	0,1893
glu	0,7929	0,2231	-0,2954	-0,0867
Tsug	0,8592	0,0407	-0,2766	0,1044

Tabla 4a.5: Correlación entre las variables y las componentes en *Lasallia hispanica*. Correlation between variables and components for *Lasallia hispanica*.

	Dim.1	Dim.2	Dim.3	Dim.4
TSW	5,8395	0,1144	2,8612	49,0082
Chla	0,4179	7,6814	12,2367	0,0354
Chlb	0,8350	15,6422	6,5568	1,6387
Erg	18,5345	0,0740	0,7314	6,8279
X,Arg	0,4592	23,8645	0,4853	1,5335
N	4,0094	13,2621	6,6466	1,4444
Gyr	0,1554	14,5988	10,1198	8,0668
Amax	7,1231	0,0389	31,1508	3,6467
DR15	9,3814	6,2787	0,0365	16,4042
mann	11,1963	10,0347	3,0259	6,9512
r,m	7,5178	6,6646	16,6422	2,9345
glu	15,8806	1,6898	5,0656	0,6158
Tsug	18,6499	0,0562	4,4412	0,8927

Tabla 4a.6: Contribución de cada variable a cada componente en *Lasallia hispanica*. Contributions of each variable to each component for *Lasallia hispanica*.

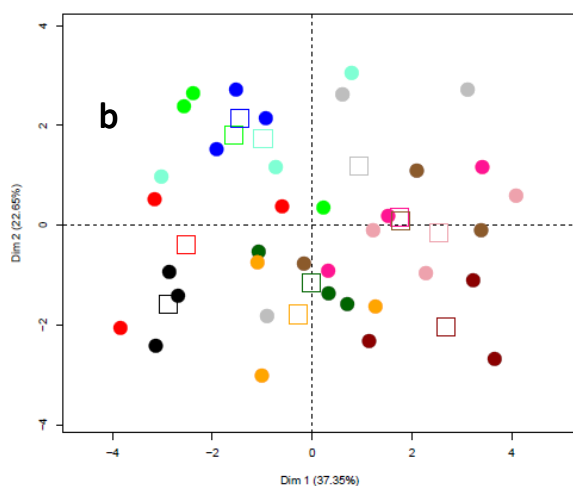
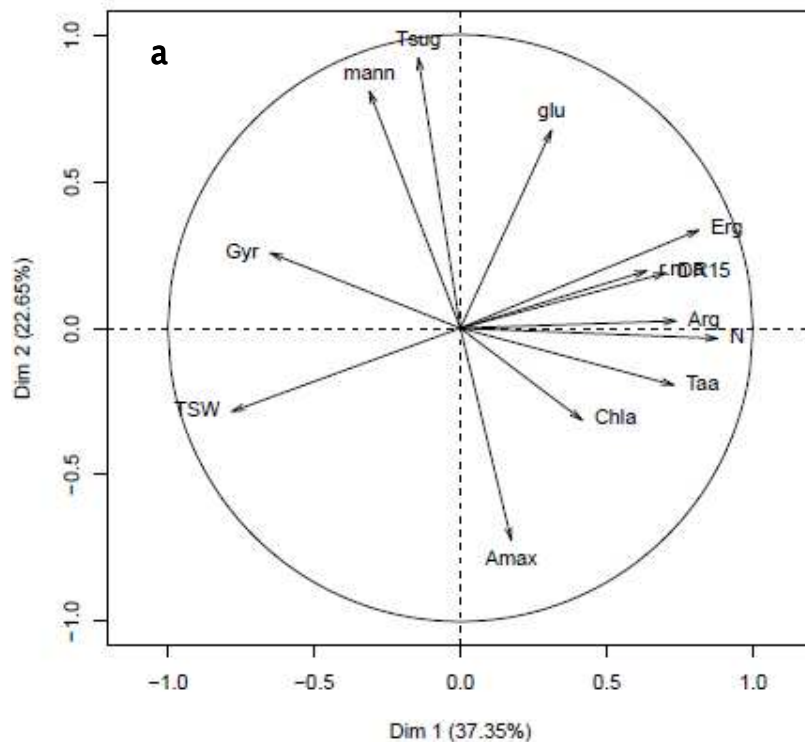


Fig. 4a.15: ACP de *Lasallia pustulata*. (a) Mapa de factores de las variables. (b) Mapa de factores de los individuos. Ene en negro; Feb en rojo; Marzo en verde; Abr en azul; Mayo en azul claro; Jun en rosa; Jul en gris; Ago en pardo; Sep en verde oscuro; Oct en rosa claro; Nov en rojo oscuro; Dic en naranja. El cuadrado indica la media del mes. PCA of *Lasallia hispanica*. (a) Variables factor map. (b) Individuals factor map. Jan in black; Feb in red; Mar in green; Apr in blue; May in light blue; Jun in pink; Jul in grey; Aug in brown; Sep in deep green; Oct in pale pink; Nov in deep red; Dec in orange. The square indicates the average of each month.

Con respecto al primer eje del ACP de *L. pustulata* (Fig. 4a.15) los valores de los 5 primeros meses del año se sitúan en el lado negativo, indicando que en esos meses TSW y Gyr tienen valores más altos y Erg, Arg, Taa, N, DR y r/m+a más bajos que en Jun, Jul, Ago, Oct y Nov, que aparecen en el extremo opuesto. Sep y Dic muestran valores intermedios. La segunda componente separa los meses de primavera e inicio de verano de los del final del verano, otoño e invierno. Los meses de Mar a Jul aparecen a la izquierda y tienen por tanto una Amáx más alta, pero menor cantidad de mann, glu y Tsug que los meses de Sep a Feb. Respective to the first axis of PCA of *L. pustulata* (Fig. 4a.15), values from the first 5 months of the year are located at the negative side, indicating that on these months TSW and Gyr are higher and Erg, Arg, Taa, N, DR and r/m+a lower than in Jun, Jul Aug, Oct and Nov, which appear on the opposite extreme. Sep and Dec have intermediate values. The second component separates spring and the beginning of summer months from late summer, autumn and winter months. Indeed, months from Mar to Jul appear on the left side, and they have therefore higher Amax, but lower mann, glu and Tsug content than months from Sep to Feb.

	eigenvalue	% of variance	cumulative % of variance
Comp 1	4,8559	37,3534	37,3534
Comp 2	2,9442	22,6477	60,0011
Comp 3	1,4466	11,1280	71,1291
Comp 4	0,9788	7,5292	78,6583

Tabla 4a.7: Valores propios, porcentaje de varianza y porcentaje acumulado de varianza en *L. pustulata*.  
Eigenvalues, % of variance and cumulative % of variance for *Lasallia pustulata*.

	Dim 1	Dim 2	Dim 3	Dim 4
TSW	-0,7802	-0,2839	0,0879	0,2782
Chla	0,4161	-0,3131	0,7264	0,0493
Erg	0,8151	0,3343	0,0553	-0,3110
Arg	0,7361	0,0247	-0,3324	0,4794
Taa	0,7298	-0,1940	-0,3076	0,4038
N	0,8787	-0,0352	0,1744	0,2334
Gyr	-0,6488	0,2558	-0,3948	0,2870
Amax	0,1743	-0,7221	0,3073	0,0279
DR15	0,7019	0,1878	-0,0051	-0,0804
mann	-0,3108	0,8074	0,2094	0,1625
r,m,a	0,6365	0,1951	-0,4527	-0,3544
glu	0,3114	0,6737	0,3639	0,3320
Tsug	-0,1437	0,9211	0,2025	-0,0551

Tabla 4a.8: Correlación entre las variables y las componentes en *Lasallia pustulata*. Correlation between variables and components for *Lasallia pustulata*.

	Dim 1	Dim 2	Dim 3	Dim 4
TSW	12,5347	2,7367	0,5337	7,9087
Chla	3,5655	3,3292	36,4791	0,2482
Erg	13,6812	3,7955	0,2117	9,8830
Arg	11,1598	0,0207	7,6379	23,4804
Taa	10,9673	1,2780	6,5420	16,6563
N	15,9001	0,0421	2,1033	5,5644
Gyr	8,6685	2,2232	10,7751	8,4136
Amax	0,6255	17,7098	6,5287	0,0795
DR15	10,1442	1,1980	0,0018	0,6612
mann	1,9892	22,1406	3,0317	2,6986
r,m,a	8,3421	1,2935	14,1663	12,8340
glu	1,9967	15,4147	9,1533	11,2615
Tsug	0,4251	28,8180	2,8354	0,3106

Tabla 4a.9: Contribuciones de cada variable a cada componente de *Lasallia pustulata*. Contributions of each variable to each component for *Lasallia pustulata*.

	TSW	Chla	Chlb	Erg	% Arg	N	Gyr	Amax	DR15	mann	r/m	glu	Tsug	Precip	TM	Tm	Tav	Rad	
TSW		0,57	0,39	0,33	0,96	0,70	0,46	0,30	<b>0,01</b>	0,80	0,34	0,11	0,16	0,90	0,05	0,07	0,06	<b>0,04</b>	TSW
Chla	-0,13		0,10	0,62	0,19	0,80	0,20	0,36	0,11	0,60	0,56	0,98	0,66	0,10	0,41	0,44	0,42	0,38	Chla
Chlb	0,2	0,37		0,69	0,09	0,42	<b>0,01</b>	0,62	0,24	0,25	0,34	0,61	0,43	<b>0,00</b>	<b>0,01</b>	<b>0,03</b>	<b>0,02</b>	<b>0,00</b>	Chlb
Erg	-0,23	-0,12	-0,09		0,81	0,16	0,73	<b>0,00</b>	0,09	<b>0,00</b>	<b>0,02</b>	<b>0,01</b>	<b>0,00</b>	0,88	0,26	0,13	0,20	0,79	Erg
% Arg	0,01	0,30	0,38	-0,06		<b>0,01</b>	<b>0,02</b>	0,80	0,06	0,16	<b>0,04</b>	0,85	0,45	0,31	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	% Arg
N	-0,09	-0,06	0,19	0,32	<b>0,58</b>		0,24	0,78	0,78	<b>0,02</b>	0,46	<b>0,02</b>	0,16	0,64	0,10	0,10	0,10	0,07	N
Gyr	-0,17	0,29	<b>0,57</b>	-0,08	<b>0,49</b>	0,27		0,44	0,45	0,63	0,61	0,94	0,52	<b>0,04</b>	0,32	0,43	0,36	0,16	Gyr
Amax	-0,24	0,21	0,11	<b>0,63</b>	-0,06	0,06	0,18		0,34	0,37	<b>0,00</b>	0,45	0,39	<b>0,04</b>	0,32	0,23	0,28	0,91	Amax
DR15	<b>-0,57</b>	-0,36	-0,27	0,38	<b>-0,41</b>	0,07	-0,17	0,22		0,78	0,06	0,12	0,07	0,57	<b>0,03</b>	<b>0,05</b>	<b>0,03</b>	<b>0,02</b>	DR15
mann	-0,06	0,12	0,26	<b>0,62</b>	0,32	<b>0,49</b>	0,11	0,21	0,06		0,96	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	0,31	<b>0,02</b>	<b>0,01</b>	<b>0,01</b>	0,15	mann
r/m	-0,22	-0,13	-0,22	<b>0,50</b>	<b>-0,45</b>	-0,17	-0,12	<b>0,67</b>	<b>0,42</b>	0,01		0,46	0,19	0,28	0,99	0,75	0,88	0,16	r/m
glu	-0,36	-0,01	-0,12	<b>0,55</b>	0,04	<b>0,51</b>	-0,02	0,18	0,35	<b>0,65</b>	0,17		<b>0,00</b>	0,90	0,91	0,73	0,83	0,62	glu
Tsug	-0,32	-0,10	-0,18	<b>0,66</b>	-0,17	0,32	-0,15	0,20	<b>0,41</b>	<b>0,76</b>	0,30	<b>0,75</b>		0,90	0,95	0,65	0,81	0,39	Tsug
Precip	-0,03	0,37	<b>0,75</b>	0,03	0,23	0,11	<b>0,45</b>	<b>0,45</b>	-0,13	0,24	0,24	0,03	0,03		<b>0,02</b>	<b>0,02</b>	<b>0,02</b>	<b>0,02</b>	Precip
TM	<b>-0,43</b>	-0,19	<b>-0,53</b>	-0,26	<b>-0,64</b>	-0,37	-0,23	-0,23	<b>0,48</b>	<b>-0,52</b>	0,00	-0,03	-0,02	<b>-0,52</b>		<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	TM
Tm	-0,4	-0,18	<b>-0,48</b>	-0,34	<b>-0,6</b>	-0,37	-0,18	-0,27	<b>0,44</b>	<b>-0,57</b>	-0,07	-0,08	-0,10	<b>-0,49</b>	<b>0,99</b>		<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	Tm
Tav	<b>-0,42</b>	-0,19	<b>-0,51</b>	-0,29	<b>-0,62</b>	-0,37	-0,21	-0,25	<b>0,46</b>	<b>-0,54</b>	-0,03	-0,05	-0,05	<b>-0,51</b>	<b>1,00</b>	<b>1,00</b>		<b>0,00</b>	Tav
Rad	<b>-0,44</b>	-0,20	<b>-0,61</b>	0,06	<b>-0,75</b>	-0,40	-0,32	0,03	<b>0,52</b>	-0,33	0,32	0,12	0,20	<b>-0,49</b>	<b>0,89</b>	<b>0,84</b>	<b>0,87</b>		Rad
	TSW	Chla	Chlb	Erg	% Arg	N	Gyr	Amax	DR15	mann	r/m	glu	Tsug	Precip	TM	Tm	Tav	Rad	

Fig. 4a.16: Matriz de correlación de las variables de los ACP previos y las variables meteorológicas, para *Lasallia hispanica*.

Correlation matrix of the variables of PCA and the meteorological variables for *Lasallia hispanica*.

	TSW	Chla	Erg	Arg	Taa	N	Gyr	Amax	DR15	mann	r/m+a	glu	Tsug	Precip	TM	Tm	Tav	Rad	
TSW		0,56	0,00	0,00	0,02	0,00	0,01	0,80	0,00	0,77	0,00	0,18	0,31	0,44	0,01	0,01	0,01	0,01	TSW
Chla	-0,10		0,16	0,82	0,18	0,00	0,00	0,01	0,08	0,18	0,71	0,40	0,23	0,37	0,04	0,02	0,03	0,28	Chla
Erg	-0,80	0,24		0,02	0,01	0,00	0,00	0,80	0,00	0,96	0,00	0,02	0,20	0,70	0,01	0,01	0,01	0,00	Erg
Arg	-0,51	0,04	0,40		0,00	0,00	0,06	0,96	0,02	0,19	0,01	0,07	0,33	0,48	0,02	0,01	0,02	0,08	Arg
Taa	-0,40	0,23	0,43	0,74		0,00	0,15	0,25	0,00	0,08	0,01	0,93	0,05	0,73	0,05	0,03	0,04	0,29	Taa
N	-0,65	0,47	0,66	0,70	0,65		0,00	0,17	0,01	0,16	0,03	0,03	0,50	0,18	0,00	0,00	0,00	0,00	N
Gyr	0,45	-0,54	-0,49	-0,32	-0,25	-0,58		0,06	0,08	0,01	0,10	0,51	0,19	0,95	0,01	0,01	0,01	0,07	Gyr
Amax	0,04	0,40	-0,04	0,01	0,19	0,24	-0,32		0,87	0,01	0,43	0,06	0,00	0,25	0,91	0,51	0,73	0,15	Amax
DR15	-0,55	0,30	0,62	0,38	0,49	0,46	-0,30	-0,03		0,81	0,00	0,06	0,87	0,42	0,07	0,08	0,07	0,09	DR15
mann	0,05	-0,23	-0,01	-0,22	-0,30	-0,24	0,43	-0,44	-0,04		0,26	0,01	0,00	0,98	0,17	0,08	0,13	0,66	mann
r/m+a	-0,54	-0,06	0,63	0,46	0,42	0,36	-0,28	-0,14	0,48	-0,19		0,48	0,84	0,77	0,10	0,18	0,13	0,02	r/m+a
glu	-0,23	0,14	0,38	0,31	0,01	0,36	-0,11	-0,31	0,32	0,45	0,12		0,00	0,14	0,03	0,06	0,04	0,00	glu
Tsug	-0,18	-0,21	0,22	-0,17	-0,32	-0,12	0,22	-0,57	-0,03	0,85	0,04	0,57		0,17	0,98	0,61	0,81	0,24	Tsug
Precip	0,13	0,15	-0,07	-0,12	0,06	-0,23	-0,01	0,20	0,14	0,00	0,05	-0,25	-0,23		0,00	0,00	0,00	0,00	Precip
TM	-0,43	0,34	0,44	0,39	0,32	0,60	-0,43	0,02	0,31	-0,23	0,28	0,37	0,00	-0,61		0,00	0,00	0,00	TM
Tm	-0,41	0,38	0,40	0,41	0,36	0,62	-0,45	0,11	0,30	-0,29	0,23	0,32	-0,09	-0,56	0,99		0,00	0,00	Tm
Tav	-0,42	0,36	0,42	0,40	0,34	0,61	-0,44	0,06	0,31	-0,26	0,26	0,35	-0,04	-0,59	1	1		0,00	Tav
Rad	-0,44	0,18	0,51	0,30	0,18	0,50	-0,31	-0,25	0,29	-0,08	0,39	0,46	0,20	-0,69	0,89	0,83	0,87		Rad
	TSW	Chla	Erg	Arg	Taa	N	Gyr	Amax	DR15	mann	r/m+a	glu	Tsug	Precip	TM	Tm	Tav	Rad	

Fig. 4a.17: Matriz de correlación de las variables de los ACP previos y las variables meteorológicas, para *Lasallia pustulata*.

Correlation matrix of the variables of PCA and the meteorological variables for *Lasallia pustulata*.

	eigenvalue	% of variance	cumulative % of variance
Comp 1	4,5643	28,5268	28,5268
Comp 2	4,0162	25,1010	53,6279
Comp 3	2,0649	12,9057	66,5336
Comp 4	1,5887	9,9296	76,4632

Tabla 4a.10: Valores propios, porcentaje de varianza y porcentaje acumulado de varianza del ACP de *Lasallia hispanica* de la Fig. 4.19. **Eigenvalues, percentage of variance and cumulative percentage of variance for the *Lasallia hispanica* PCA on Fig. 4.19.**

	Dim 1	Dim 2	Dim 3	Dim 4
TSW	0,3073	-0,4488	-0,1769	-0,7070
Chla	0,4274	-0,0419	0,3407	0,3415
Chlb	0,7706	-0,0448	0,3057	0,1270
Erg	-0,0159	0,8618	0,0148	-0,2736
X,Arg	0,7942	-0,0241	-0,2897	0,2626
N	0,4557	0,4563	-0,4731	0,2094
Gyr	0,5589	0,0249	0,2738	0,5318
Amax	0,1028	0,5780	0,6550	-0,1524
DR15	-0,5657	0,5269	0,0869	0,2305
mann	0,4300	0,7331	-0,3225	-0,0875
r,m	-0,3120	0,5239	0,5924	-0,3392
glu	-0,0133	0,7921	-0,3389	0,1785
Tsug	-0,1310	0,8431	-0,2674	-0,0398
Precip	0,6223	0,2122	0,5887	0,0306
Tav	-0,8363	-0,2035	0,0221	0,4528
Rad	-0,9086	0,1024	0,1276	0,2173

Tabla 4a.11: Correlación entre las variables y las componentes del ACP de *Lasallia hispanica* de la Fig. 4.19. **Correlation between variables and components for the *Lasallia hispanica* PCA on Fig. 4.19.**

	Dim 1	Dim 2	Dim 3	Dim 4
TSW	2,0692	5,0158	1,5155	31,4586
Chla	4,0017	0,0438	5,6203	7,3387
Chlb	13,0115	0,0499	4,5247	1,0150
Erg	0,0055	18,4943	0,0106	4,7115
X,Arg	13,8184	0,0144	4,0635	4,3388
N	4,5494	5,1843	10,8391	2,7602
Gyr	6,8440	0,0154	3,6306	17,8018
Amax	0,2314	8,3178	20,7762	1,4619
DR15	7,0108	6,9137	0,3659	3,3447
mann	4,0505	13,3802	5,0372	0,4816
r,m	2,1332	6,8339	16,9958	7,2441
glu	0,0039	15,6239	5,5623	2,0063
Tsug	0,3760	17,6995	3,4632	0,0998
Precip	8,4852	1,1214	16,7828	0,0590
Tav	15,3223	1,0307	0,0237	12,9060
Rad	18,0870	0,2609	0,7886	2,9723

Tabla 4a.12: Contribuciones de cada variable a cada componente del ACP de *Lasallia hispanica* de la Fig. 4.19. **Contributions of each variable to each component for the *Lasallia hispanica* PCA on Fig. 4.19.**



	eigenvalue	% of variance	cumulative % of variance
Comp 1	5,6545	35,3403	35,3403
Comp 2	3,1580	19,7373	55,0777
Comp 3	1,8538	11,5861	66,6638
Comp 4	1,4315	8,9469	75,6106

Tabla 4a.13: Valores propios, porcentaje de varianza y porcentaje acumulado de varianza del ACP de *Lasallia pustulata* de la Fig. 4.20. Eigenvalues, % of variance and cumulative % of variance for the *Lasallia pustulata* PCA on Fig. 4.20.

	Dim 1	Dim 2	Dim 3	Dim 4
TSW	-0,7744	-0,1498	-0,2599	0,0485
Chla	0,3988	-0,3596	-0,1858	0,7094
Erg	0,8126	0,1850	0,2888	0,1207
Arg	0,7041	-0,0873	0,1716	-0,3496
Taa	0,6538	-0,3314	0,2631	-0,2592
N	0,8821	-0,1228	-0,0601	0,1024
Gyr	-0,6249	0,3239	0,1141	-0,3507
Amax	0,0771	-0,7417	-0,1435	0,2856
DR15	0,6548	0,0115	0,4211	0,1381
mann	-0,2616	0,7722	0,2696	0,3043
r,m,a	0,6106	0,0618	0,3997	-0,3506
glu	0,4127	0,6377	-0,0206	0,3310
Tsug	-0,0414	0,9117	0,1411	0,2349
Precip	-0,2596	-0,4246	0,7301	0,3051
Tav	0,7414	0,0947	-0,5668	-0,0316
Rad	0,6917	0,3962	-0,4981	-0,1160

Tabla 4a.14: Correlación entre las variables y las componentes del ACP de *Lasallia pustulata* de la Fig. 4.20. Correlation between variables and components for the *Lasallia pustulata* PCA on Fig. 4.20.

	Dim 1	Dim 2	Dim 3	Dim 4
TSW	10,6062	0,7105	3,6450	0,1646
Chla	2,8123	4,0937	1,8613	35,1562
Erg	11,6771	1,0834	4,4990	1,0172
Arg	8,7676	0,2416	1,5880	8,5373
Taa	7,5598	3,4773	3,7331	4,6928
N	13,7611	0,4779	0,1948	0,7320
Gyr	6,9064	3,3224	0,7019	8,5937
Amax	0,1051	17,4217	1,1115	5,6979
DR15	7,5836	0,0042	9,5647	1,3326
mann	1,2101	18,8844	3,9201	6,4679
r,m,a	6,5926	0,1207	8,6196	8,5857
glu	3,0117	12,8777	0,0229	7,6548
Tsug	0,0303	26,3200	1,0742	3,8535
Precip	1,1917	5,7090	28,7516	6,5033
Tav	9,7222	0,2838	17,3273	0,0699
Rad	8,4622	4,9717	13,3850	0,9407

Tabla 4a.15: Contribuciones de cada variable a cada componente del ACP de *Lasallia pustulata* de la Fig. 4.20. Contributions of each variable to each component for the *Lasallia pustulata* PCA on Fig. 4.20.

**5. ESTUDIO DE LA VARIACIÓN ESTACIONAL EN LA  
FLUORESCENCIA DE LA CHLA EN POBLACIONES DE *LASALLIA*  
*HISPANICA* Y *L. PUSTULATA* MEDIANTE MEDIDAS DE CAMPO Y DE  
LABORATORIO**



## INTRODUCCIÓN

Las medidas de fluorescencia de la Chla constituyen un arma poderosa, muy sensible y no invasiva para la evaluación de la vitalidad del fotosistema II (FS II), como aproximación a la capacidad fotosintética (Maxwell & Jonson, 2000). Aunque, a diferencia de en plantas vasculares (Demmig & Björkman, 1987; Genty *et al.*, 1989), en briófitos y líquenes no hay una relación directa y clara entre la tasa de transporte de electrones (ETR, parámetro que se obtiene a partir de medidas de fluorescencia) y la fijación de CO<sub>2</sub> (Leisner *et al.*, 1997; Green *et al.*, 1998; Proctor & Smirnoff, 2011), sigue siendo un modo rápido y conveniente de medir la eficiencia fotosintética (v.gr., Schreiber *et al.*, 1994; Lange *et al.*, 1996) y, por esta razón, se ha empleado ampliamente y ha proporcionado mucha información sobre la respuesta de los líquenes a las condiciones ambientales adversas (v.gr., Bilger *et al.*, 1989; Scheidegger *et al.*, 1997; Barták *et al.*, 2003; Sancho *et al.*, 2007). También se utiliza de manera frecuente en experimentos de seguimiento a largo plazo en condiciones naturales, con el objeto de detectar la actividad de los líquenes y a partir de ella deducir su balance anual de carbono y su crecimiento potencial (Schroeter *et al.*, 1991, 1992, 1995; Lange *et al.*, 1999) o de evaluar el efecto de la contaminación (Calatayud *et al.*, 1996; Niewiadomska *et al.*, 1998).

La bibliografía científica sobre variación estacional de la fluorescencia de la Chla se ha visto incrementada en los últimos años, aunque aún es escasa (v.gr., MacKenzie *et al.*, 2001, 2003; Baruffo & Tretiach, 2007; Tretiach *et al.*, 2007; Pirintsos *et al.*, 2011). Baruffo y Tretiach (2007) midieron la respuesta de la fluorescencia a lo largo de un año, tomando medidas en campo de F<sub>0</sub>, F<sub>m</sub> y F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub> cada tres meses en *Punctelia subrudecta*. Encontraron los valores más altos en Diciembre, cuando no había dosel arbóreo y los niveles lumínicos y la disponibilidad de agua eran adecuados. Vrábliková *et al.* (2006) midieron los cambios en fluorescencia de *Xanthoria parietina* durante un ciclo estacional. Esta especie prospera con facilidad en entornos bien iluminados y es muy tolerante a las altas irradiaciones. Estos autores encontraron un aumento de los valores de F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub> desde un mínimo en Mayo hasta un máximo en Enero. El rendimiento cuántico bajo condiciones de iluminación (ΦFS II) mostraba el mismo patrón, mientras que el de NPQ y VAZ era opuesto. A pesar de su tolerancia a la luz intensa, estos autores encontraron fotoinhibición tras un tratamiento de luz intensa en las muestras recogidas al principio de la primavera, lo que indica una cierta adaptación de las muestras a las condiciones de luz predominantes en esa época. Pirintsos *et al.* (2011) evaluaron la fluorescencia de la Chla en *Pseudevernia furfuracea* y *Evernia prunastri* durante el verano y encontraron en ambas especies un descenso de los valores hasta Agosto, seguido por la recuperación en Septiembre, atribuible a las primeras lluvias otoñales, tras la sequía estival del clima mediterráneo de Creta.

A pesar de la ingente bibliografía sobre fluorescencia de la Chla el conocimiento de los factores que influyen en ella aún es pobre y es probable que las condiciones climáticas de los días previos a las medidas tenga una gran influencia en los resultados (Ogaya *et al.*, 2010). Como consecuencia, la comparación entre distintas especies o en

distintos momentos se dificulta mucho. Sería necesario establecer una base sólida para hacer posibles estas comparaciones.

En el presente trabajo hemos estudiado la respuesta estacional de la fluorescencia de la Chla de las dos únicas especies del género *Lasallia* presentes en la Península Ibérica, a saber, *L. hispanica* y *L. pustulata*. Nuestro objetivo era averiguar si dos poblaciones coexistentes de estas especies mostraban diferencias en su fluorescencia entre ellas y/o tendencias estacionales. También evaluamos la influencia de las condiciones climáticas previas a las medidas de fluorescencia haciendo medidas en campo y después en el laboratorio, tras un periodo de acondicionamiento de 48h.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Especies utilizadas

Para este estudio elegimos una localidad cerca de Madrid, en la Silla de Felipe II, El Escorial (N 40° 34' 5'', W 9° 8' 45'', 1070 m.s.n.m.), donde fuimos una vez al mes desde el primero de Octubre de 2008 hasta el 31 de Agosto de 2009 para recolectar muestras y llevar a cabo medidas de fluorescencia en el campo. En esta localidad la vegetación dominante es un bosque aclarado de roble melojo (*Quercus pyrenaica* Willd.), rico en especies epífitas de briófitos y líquenes (Belinchón *et al.*, 2007). Esta especie tiene un follaje marcescente, especialmente en las ramas jóvenes. Las hojas nuevas aparecen a finales de Abril en esta localidad, y la floración tiene lugar poco después. En este bosque hay algunos bloques de granito dispersos, que proporcionan un nicho para la aparición de especies de musgos y líquenes saxícolas. Entre estos últimos se encuentran *Lasallia pustulata* (L.) Mérat y *L. hispanica* (Frey) L.G. Sancho & A. Crespo. *Lasallia hispanica* es una especie endémica del Mediterráneo, que aparece desde los 1000 m.s.n.m. hasta las cumbres más altas del Sistema Central (Pico Almanzor, 2592 m), siempre en superficies verticales muy expuestas y venteadas. *Lasallia pustulata* por el contrario, es una especie de amplia distribución en Europa, que aparece desde el nivel del mar hasta unos 1700 m de altitud, normalmente en zonas más protegidas (Sancho, 1986; Sancho & Crespo, 1989; Codogno & Sancho, 1991). Elegimos una sola roca, distinta para cada especie con el objeto de minimizar los efectos de cambiar el lugar de muestreo y tomamos muestras de ellas a lo largo de todo el año. La roca de *L. hispanica* no tenía suficientes talos para poder tomar muestras todos los meses, por lo que los datos de laboratorio son bimensuales (recogida de muestras al principio de Febrero, Abril, Junio, Agosto, Septiembre, Octubre y Diciembre). Sin embargo, la roca de *L. pustulata* tenía tal cantidad de talos de esta especie que permitió un muestreo mensual.

### Medidas de fluorescencia

Se eligieron cuidadosamente ocho talos de cada especie con aspecto saludable para su seguimiento en el campo a lo largo de todo el año. Estos talos crecían también sobre las mismas rocas de las que se tomaron las muestras para las medidas de laboratorio. Las medidas de fluorescencia de campo y laboratorio se llevaron a cabo con un fluorímetro MINI-PAM (Walz, Effeltrich, Alemania). Se tomaron medidas del

rendimiento cuántico máximo del FS II ( $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$ ) en 10 puntos en cada talo.  $F_0$  es el valor mínimo de fluorescencia de la Chl *a* y  $F_m$  es el valor máximo de fluorescencia en muestras completamente hidratadas y pre-adaptadas a oscuridad durante 20 minutos cubiertas por una tela negra.  $F_m$  se determinó tras un pulso de saturación (8000  $\mu\text{moles de fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , durante 0'8 s). Las medidas de campo se llevaron a cabo el mismo día que se recogieron las muestras para las medidas ecofisiológicas, al comienzo de cada mes y a la misma hora del día. En Diciembre encontramos la roca de *L. pustulata* completamente cubierta de nieve, que tuvimos que apartar para alcanzar los talos. Al estar más expuesta, la roca de *L. hispanica* no tenía nieve, pero los talos estaban completamente congelados, lo que imposibilitó medir su fluorescencia. Las medidas de laboratorio se llevaron a cabo con los talos recolectados para las medidas de intercambio gaseoso cuyos resultados se han expuesto en el capítulo anterior y antes de hacer éstas. Las muestras se sometieron a un periodo de acondicionamiento de dos días a condiciones controladas de temperatura (10 °C) y régimen lumínico (12h a 100  $\mu\text{moles de fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ /12 h en oscuridad) e hidratados una vez al día con agua mineral. Se seleccionaron seis puntos en cada una de las tres réplicas y se midió  $F_v/F_m$  tras la completa hidratación de los talos y su pre-adaptación a oscuridad durante 20 min. En total, el número de medidas fue siempre superior a 70 en el campo e igual a 18 en el laboratorio para cada especie.

### **Análisis estadísticos**

Los análisis estadísticos se hicieron en R 2.10.0 0 (R Development Core Team, 2009) con la ayuda de los paquetes multcomp (Hothorn *et al.*, 2008), Hmisc (Harrell, 2006) y FactoMineR (Husson *et al.*, 2012). Las diferencias en fluorescencia entre las especies se analizaron mediante t-tests. Para evaluar las diferencias a lo largo del año dentro de cada especie se llevaron a cabo ANOVAs de una vía. Se hizo un ANOVA de dos vías para valorar la influencia de los factores “Mes” y “Tipo” de medida (“Campo” o “Laboratorio”) y la interacción entre ambos. Se calculó el coeficiente de correlación de Pearson para ver el efecto de las variables ambientales en los valores de fluorescencia. Los gráficos se hicieron en SigmaPlot 10.0 (Chicago, Illinois, EEUU).

## **RESULTADOS**

Las condiciones meteorológicas previas a las medidas de campo y la recolección de los talos para las medidas de laboratorio se muestran en la Tabla 5.1, con datos de precipitación, temperatura media e irradiación para los 2, 5, 10 y 30 días previos (medias para la temperatura y sumas para la precipitación y la irradiación). Los valores mensuales están representados en la Fig. 4.4 (Capítulo 4), donde se puede observar un típico ombroclima mediterráneo, con una estacionalidad marcada en cuanto a temperatura y régimen de lluvias, con el resultado de la sequía estival característica.

Ambas especies mostraron cambios estacionales a lo largo del año. Los datos de  $F_v/F_m$  para ambas especies se muestran en la Fig. 5.1 y los valores numéricos en la Tabla 5.2. Los resultados para *L. hispanica* van desde 0'383 (Sep, campo) a 0'646 (Feb, laboratorio) y para *L. pustulata* desde 0'477 (Abr, campo) a 0'733 (Nov, campo). Con la

excepción del valor de Abril en campo, *L. pustulata* siempre mostró valores más altos que *L. hispanica* y, en la mayoría de los casos, la diferencia era estadísticamente significativa tanto para valores de campo como de laboratorio.

Mes	P 2	Tm2	Irr 2	P 5	Tm5	Irr 5	P 10	Tm10	Irr 10	P 30	Tm30	Irr 30
Ene	5	5.8	11960	9.2	6.1	24870	10	5.6	46070	72.3	6.4	207250
Feb	0,5	2.7	9010	7.1	6.5	32500	17.5	6.0	71620	35.1	3.4	193200
Mar	3	5.6	13260	3.6	7.5	44780	3.6	8.8	122560	71.5	6.7	340440
Abr	0	10.7	43890	0	7.9	93890	0	9.3	186740	16.1	11.0	586870
May	0,3	11.7	49730	1.1	10.3	109620	1.1	11.9	241810	43	10.1	541190
Jun	10,2	21.7	52550	10.2	19.3	143550	23.4	17.3	247360	33.7	16.4	828070
Jul	0	23.8	59540	0	21.7	140960	0	22.1	297040	19.5	21.2	799220
Ago	0,7	20.8	51710	0.7	23.7	139360	0.7	24.1	289520	2	23.7	960940
Sep	0	25.9	48580	0	25.3	123390	0.7	25.4	246270	1.8	25.2	702100
Oct	0	16.7	36760	0	15.4	82290	6.1	15.1	167910	59.5	17.6	597760
Nov	0,5	5.6	15640	14.5	9.8	46280	37	10.9	98860	83.2	13.0	319360
Dic	0,7	1.3	12120	11.1	1.6	40390	15.8	4.0	83120	39.2	6.9	286120

Tabla 5.1: Condiciones meteorológicas 2, 5, 10 o 30 días antes de las medidas de campo y recolección de las muestras para las medidas de laboratorio. Valores de precipitación (P n, en mm), temperatura media (Tmn, en °C) e irradiación (Irr n, en Mega Julios m<sup>-2</sup>). Datos de la AEMET, como se explica en el capítulo anterior.

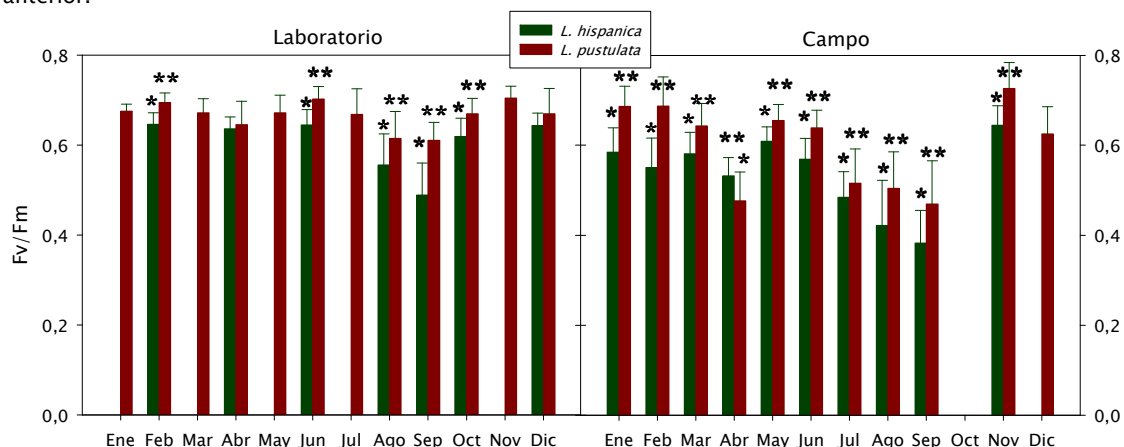


Fig. 5.1: Diferencias entre las dos especies. Los asteriscos indican diferencias significativas por t-tests, para  $p < 0.01$ ;  $n > 70$  en las medidas de campo y  $n = 18$  en las de laboratorio. Las barras indican el ES.

Month	<i>L. hispanica</i>			<i>L. pustulata</i>		
	Field	Lab	$\Delta$ Fv/Fm	Field	Lab	$\Delta$ Fv/Fm
Jan	0.590±0.005	---	---	0.689±0.004	0.676±0.004	-0.013
Feb	0.551±0.007	0.646±0.006	0.095	0.687±0.007	0.695±0.005	0.008
Mar	0.582±0.005	---	---	0.643±0.005	0.672±0.008	0.029
Apr	0.533±0.004	0.636±0.006	0.103	0.477±0.007	0.646±0.013	0.169
May	0.610±0.003	---	---	0.655±0.004	0.672±0.010	0.017
Jun	0.571±0.005	0.645±0.008	0.074	0.639±0.004	0.702±0.007	0.063
Jul	0.485±0.006	---	---	0.516±0.008	0.681±0.006	0.165
Aug	0.423±0.011	0.556±0.020	0.133	0.505±0.008	0.615±0.014	0.110
Sep	0.383±0.008	0.489±0.020	0.106	0.480±0.008	0.611±0.010	0.131
Oct	---	0.620±0.010	---	---	0.670±0.008	---
Nov	0.644±0.005	---	---	0.733±0.002	0.705±0.006	-0.028
Dec	---	0.644±0.007	---	0.625±0.006	0.670±0.013	0.045

Table 5.2: Medias±ES de los valores de Fv/Fm obtenidos en el campo y tras el acondicionamiento en el laboratorio de las dos especies de *Lasallia*. Las diferencias significativas se muestran en las Figs. 5.1 y 5.2.  $\Delta$  Fv/Fm indica la diferencia numérica entre los valores de campo y los de laboratorio.

Ambas especies mostraron un descenso de fluorescencia significativo en verano, seguido de una recuperación de Fv/Fm al comienzo del otoño (Fig. 5.2, Tabla 5.2).

Ambas especies mostraron también algunas diferencias en el valor de Fv/Fm medido en el campo y los valores obtenidos en el laboratorio tras dos días de acondicionamiento bajo condiciones idénticas todo el año (Fig. 5.2, Tabla 5.2). En todos los casos, estas diferencias fueron estadísticamente significativas para ambas especies y para un valor de  $p < 0'001$  (t-tests). En ambas especies, con la excepción de Enero y Noviembre en *L. pustulata*, los valores más altos de Fv/Fm se obtuvieron tras el periodo de acondicionamiento en el laboratorio. Las diferencias solían ser mayores en verano para *L. pustulata* (v.gr., 0'165 en Jul vs. 0'008 en Feb, Tabla 5.2), pero no para *L. hispanica*, que mantuvo una diferencia relativamente constante entre las medidas de campo y de laboratorio a lo largo del año (la diferencia máxima se alcanzó en Ago, 0'133, y la mínima se midió en Jun, 0'074, Tabla 5.2). en la Fig. 5.2 se comparan las medidas hechas en el campo y en el laboratorio para ambas especies. En los dos casos, los valores obtenidos tras el acondicionamiento eran más parecidos que los medidos en el campo. No hubo diferencias significativas en invierno, primavera y otoño, pero en verano se encontraron valores significativamente más bajos.

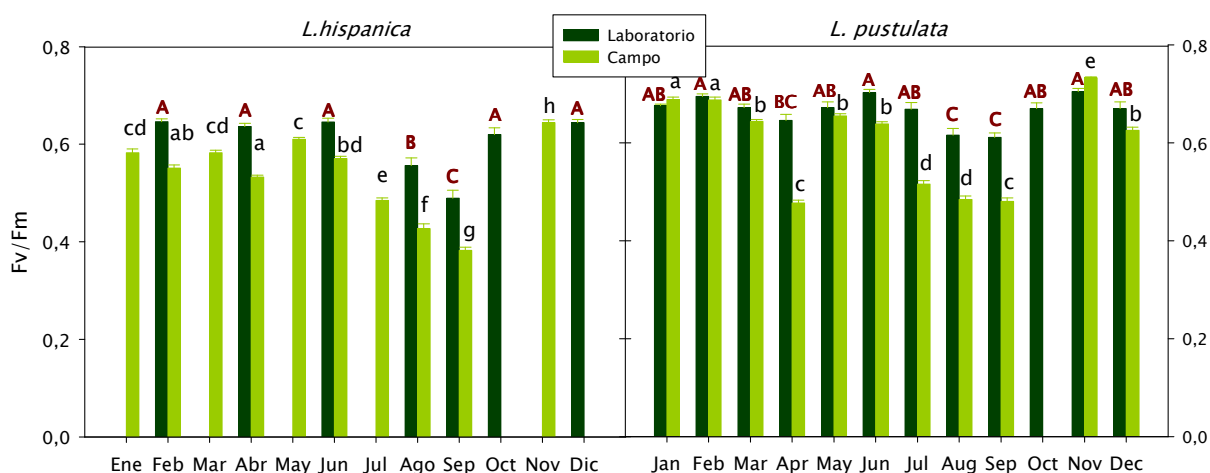


Fig. 5.2: Las diferencias entre los valores obtenidos en campo y laboratorio fueron estadísticamente significativas en todos los casos, según t-tests, para  $p < 0.001$ . *Lasallia hispanica*, izquierda; *L. pustulata*, derecha. Las diferencias dentro de cada especie y tratamiento se evaluaron por ANOVAs de una vía. Las barras con diferentes minúsculas muestran diferencias significativas en los valores de campo. Las letras mayúsculas rojas indican diferencias significativas en los datos de laboratorio.

Se hizo un ANOVA de dos vías para ambas especies con los factores “Mes” y “Tipo de medida” (niveles “Campo” y “Laboratorio”). Este análisis mostró un efecto significativo de ambos factores, así como de la interacción de ellos para ambas especies (Tabla 5.3). Esto confirma que el efecto de la estacionalidad es distinto en medidas de campo y de laboratorio.

Las dos especies difirieron en la relación entre sus valores de Fv/Fm (tanto en campo como en laboratorio) y las tasas máximas de fotosíntesis neta (Amáx, datos del



capítulo 4) (Fig. 5.3 y Tabla 5.4). Los coeficientes de correlación fueron mucho mejores para *L. hispanica*, mientras que *L. pustulata* mostró valores más bajos y ninguno significativo.

Factor	<i>L. hispanica</i>			<i>L. pustulata</i>		
	gl	F	p	gl	F	p
Mes	11	173.69	<0.001	11	216.40	<0.001
Tipo	1	344.34	<0.001	1	191.70	<0.001
Mes*Tipo	10	2.45	0.040	10	19.55	<0.001

Tabla 5.3: Resultados del ANOVA de dos vías para ambas especies y los factores “Mes” y “Tipo de medida” (niveles “Campo” y “Laboratorio”); gl: grados de libertad; F: F de Fisher-Snedecor.

	<i>L. hispanica</i>		<i>L. pustulata</i>	
	r	p	r	p
Fv/Fm Campo vs. Amáx temp. campo	0.92	0.026	0.02	0.958
Fv/Fm Campo vs. Amáx 15 °C	0.83	0.085	-0.37	0.266
Fv/Fm Laboratorio vs. Amáx temp. campo	0.79	0.033	0.18	0.582
Fv/Fm Laboratorio vs. Amáx 15°C	0.77	0.042	-0.37	0.236

Tabla 5.4: Parámetros de las correlaciones de la Fig. 5.3.

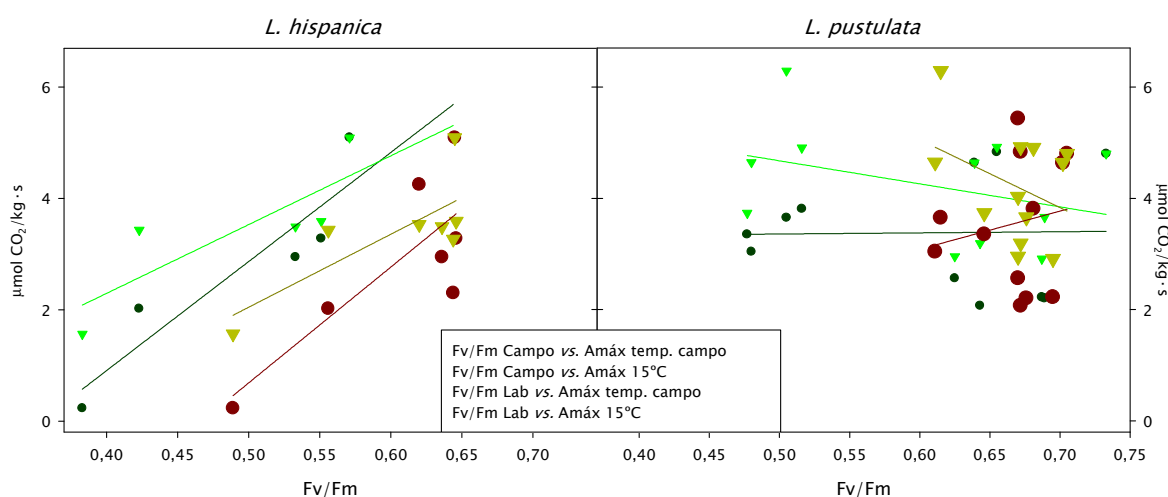


Fig. 5.3: Regresiones lineales entre los valores de fluorescencia obtenidos en el campo (verde oscuro y claro) o en el laboratorio (rojo y amarillo oscuros) y las medidas de intercambio gaseoso obtenidas en el laboratorio a la temperatura media de cada mes (círculos en verde y en rojo oscuros) y a una temperatura fija de 15 °C (triángulos invertidos en verde claro y amarillo oscuro). Los parámetros de las correlaciones están en la Tabla 5.4).

Se hicieron análisis de correlación entre las variables climáticas durante cada uno de los cuatro periodos (2, 5, 10 y 30 días, Tabla 5.1) y los valores de  $F_v/F_m$  en ambas especies, tanto en el campo como en el laboratorio, tras las 48 h de acondicionamiento. Los coeficientes de correlación de Pearson ( $r$ ) y los valores de  $p$  se muestran en las Tablas 5.5 y 5.6. Todas las correlaciones son muy significativas, pero fueron mucho mayores para *L. hispanica* en los datos de campo (de media, un 73% más altas que las correlaciones con los valores de laboratorio), mientras que *L. pustulata* mostró coeficientes similares, aunque en general ligeramente más altos para los valores de campo (un 7%).

	Campo		Laboratorio	
	r	p	r	p
P 2	0.69	<0.001	0.42	<0.001
Tm2	-0.61	<0.001	-0.36	<0.001
Irr 2	-0.59	<0.001	-0.31	<0.001
P 5	0.31	<0.001	0.26	<0.001
Tm5	-0.59	<0.001	-0.31	<0.001
Irr 5	-0.59	<0.001	-0.28	<0.001
P 10	0.65	<0.001	0.43	<0.001
Tm10	-0.55	<0.001	-0.31	<0.001
Irr 10	-0.57	<0.001	-0.27	<0.001
P 30	0.59	<0.001	0.45	<0.001
Tm30	-0.58	<0.001	-0.35	<0.001
Irr 30	-0.59	<0.001	-0.3	<0.001

Tabla 5.5: Coeficiente de correlación de Pearson (r) y valor de p de las correlaciones en *Lasallia hispanica* entre las medidas de fluorescencia en el campo (izqda.) y en el laboratorio (dcha.) y los valores de precipitación (P n), temperatura media (Tmn) e irradiación (Irr n) los 2, 5, 10 y 30 días previos a las medidas.

	Campo		Laboratorio	
	r	p	r	p
P 2	0.69	<0.001	0.60	<0.001
Tm2	-0.64	<0.001	-0.66	<0.001
Irr 2	-0.52	<0.001	-0.40	<0.001
P 5	0.28	<0.001	0.26	0.010
Tm5	-0.60	<0.001	-0.56	<0.001
Irr 5	-0.44	<0.001	-0.40	<0.001
P 10	0.54	<0.001	0.50	<0.001
Tm10	-0.65	<0.001	-0.61	<0.001
Irr 10	-0.48	<0.001	-0.41	<0.001
P 30	0.47	<0.001	0.52	<0.001
Tm30	-0.65	<0.001	-0.66	<0.001
Irr 30	-0.49	<0.001	-0.48	<0.001

Tabla 5.6: Coeficiente de correlación de Pearson (r) y valor de p de las correlaciones en *Lasallia pustulata* entre las medidas de fluorescencia en el campo (izqda.) y en el laboratorio (dcha.) y los valores de precipitación (P n), temperatura media (Tmn) e irradiación (Irr n) los 2, 5, 10 y 30 días previos a las medidas.

## DISCUSIÓN

Las diferencias encontradas en estas medidas de fluorescencia están de acuerdo con muchos de los resultados obtenidos en el capítulo anterior. Pudimos ver en él muchas diferencias entre estas dos poblaciones coexistentes de *Lasallia* y las interpretamos como resultado de los diferentes microhábitats en que ambas viven, que son a su vez resultado de la segregación de nicho, un fenómeno que posibilita su coexistencia (Larson, 1984; Scott & Larson, 1986; Hestmark, 1997; Sonesson *et al.*, 2011). Al ocupar *L. hispanica* un nicho más expuesto, aparentemente sufre de manera más acusada los efectos del clima y esto se refleja en diferencias mayores en los valores de algunos parámetros a lo largo del año, v.gr., la productividad fotosintética, la eficiencia fotosintética (KF) o el índice de peso específico del talo (IPE) (véase el capítulo anterior). Hemos encontrado un comportamiento similar en los resultados de la fluorescencia. Con la única excepción del valor de campo de Abril, *L. hispanica* mostró siempre valores más bajos de Fv/Fm que *L. pustulata* (Fig. 5.1). *Lasallia hispanica* también parece estar más influenciada por las condiciones climáticas previas a las medidas de campo y a la recolección, como sugiere el hecho de que el efecto del acondicionamiento previo en el laboratorio fuera similar a lo largo de todo el año (Fig.

5.2, Tabla 5.2). No fue éste el caso de *L. pustulata*, que mostró valores muy parecidos entre campo y laboratorio a lo largo de todo el año, con la excepción del periodo estival y el mes de Abril.

Los resultados sugieren que *L. hispanica* estuvo siempre sometida a condiciones adversas, que provocaron la disminución de sus valores de Fv/Fm en el campo, pero, tras un periodo de 2 días de acondicionamiento, mostró una buena capacidad de recuperación. Probablemente esta especie tiene que hacer frente a condiciones más difíciles por ser su hábitat más expuesto. Aunque no disponemos de datos microclimáticos, esa exposición mayor probablemente comprende rangos más amplios de temperatura, mayor exposición al viento y mayor intensidad lumínica. Como hemos visto en los capítulos anteriores, al tener *L. hispanica* una estrategia de hidratación aero-higrófila (mientras que la de *L. pustulata* es sustrato-higrófila, Sancho & Kappen, 1989), se deseca mucho más fácilmente (Valladares *et al.*, 1998), y experimenta por tanto procesos de deshidratación más frecuentemente.

*Lasallia pustulata* no pareció necesitar recuperación en meses como Ene o Nov, donde los valores de campo fueron incluso ligeramente más altos. Podemos asumir que los meses marcados con una "A" en las medidas de laboratorio para ambas especies (Fig. 5.2) muestran el valor potencial máximo de Fv/Fm para ambas especies (de media, 0'634 para *L. hispanica* y 0'683 para *L. pustulata*, ambos valores indican un estado saludable del FS II, según Jensen, 2002). *Lasallia hispanica* sólo muestra un valor de campo parecido en Nov, pero *L. pustulata* tiene valores a ese nivel en Ene, Feb, Mar, May, Jun, Noy y Dic, lo que indica que el FS II está en condiciones óptimas.

Ni *L. pustulata* ni *L. hispanica* fueron capaces de recuperar su máximo valor potencial de Fv/Fm en Ago y sep. Pirentos *et al.* (2011) también encontraron valores más bajos de Fv/Fm bajo condiciones de sequía estival, y Larsson *et al.* (2009) observaron un efecto negativo de las altas temperaturas en Fv/Fm. *Lasallia pustulata* no pudo alcanzar una recuperación completa en Abr, y *L. hispanica* incluso mostró valores más altos que ella en el campo. Este resultado es notable y muy interesante. En los 10 días previos a las medidas de Abr no se registró ninguna precipitación, una situación sólo comparable a Jul. Abril fue el cuarto mes más seco, tras Sep, Ago y Jul. Pero además, el incremento de la irradiación en comparación con Mar fue considerable, y en Abr no había dosel arbóreo que ofreciera protección, ya que las hojas comienzan a salir en Mayo en este bosque. Vrábliková *et al.* (2006) observaron un descenso de los valores de Fv/Fm del solsticio de invierno hasta principios de Mayo, debido a un proceso reversible de fotoinhibición provocado por el incremento de luz solar y duración del día en una población expuesta de *Xanthoria parietina*, que recuperó unos buenos niveles a partir de Mayo. Estos autores explicaron este fenómeno de aclimatación como resultado del aumento de la síntesis de parietina, un componente fúngico con actividad fotoprotectora. En el presente estudio hemos observado la misma aclimatación en nuestras muestras. En los capítulos anteriores descartamos la hipótesis de un posible efecto fotoprotector del ácido girofórico y no se detectaron otros compuestos fúngicos (datos no mostrados). En el caso de *L.*

*pustulata* la recuperación de los valores de Fv/Fm en Mayo puede deberse parcialmente al comienzo del desarrollo del dosel. En *L. hispanica* la recuperación de Mayo sólo puede atribuirse al incremento de la disponibilidad de agua en ese mes, que es también la explicación más probable para la recuperación de *L. pustulata*. Se ha asumido durante mucho tiempo que los líquenes deshidratados son resistentes a altos niveles lumínicos, pues la desecación reduce la penetración de la luz a través del córtex (Gauslaa & Solhaug, 2001) y estabiliza el aparato fotosintético al provocar la desconexión funcional de sus componentes (Bilger *et al.*, 1989). Pero bajo condiciones naturales los líquenes están expuestos a altas irradiaciones durante periodos largos en estado seco, y el daño provocado por la fotoinhibición bajo el exceso de luz se acumula a lo largo de un periodo de varios días, mientras que el tiempo sigue siendo demasiado seco para permitir la activación de los mecanismos de activación en el campo (Gauslaa & Solhaug, 1999). Barták *et al.* (2008) observaron que la duración de la irradiación tenía una influencia mayor en los valores de fluorescencia de talos de *L. pustulata* que la intensidad y frecuencia de esa irradiación. Los bajos valores observados en esta especie y su incapacidad para recuperarse tras el periodo de acondicionamiento en el laboratorio son una consecuencia del efecto combinado del súbito incremento de irradiación con la ausencia de hidratación que permitiría la activación de los mecanismos de reparación. Esta combinación de factores está probablemente detrás también de los valores más bajos de Fv/Fm en *L. hispanica* en Abr, en comparación con los meses previo y siguiente. Pero esta especie es capaz de recuperar su mayor potencial tras el acondicionamiento ya en Abril. Esto sugiere que *L. hispanica* es más tolerante y resistente a las condiciones adversas, tanto de alta irradiación, como de sequía, lo que apoya de nuevo los resultados obtenidos en los dos capítulos previos. La importancia de la disponibilidad de agua queda refrendada por el hecho de que ambas especies están expuestas a un nivel lumínico similar entre Nov y May (crecen en la misma orientación en sus respectivas rocas). El hecho de que *L. pustulata* parezca más afectada por las condiciones ambientales sólo en verano, cuando el dosel está completamente desarrollado, implica que el estrés hídrico es entonces un factor más importante que la temperatura o la luz.

El daño que muestran los talos de *L. pustulata* en Abril no es permanente, ya que pudimos observar una recuperación completa de esos mismos talos en Mayo. Por esta razón, es lógico pensar que un periodo de acondicionamiento más largo habría ayudado a alcanzar una recuperación completa, y es probable que también hubiera sido útil en los meses de verano. Esto parece sugerir que el estado del aparato fotosintético se ve muy influenciado por las condiciones climáticas de los días previos a las medidas de campo, más que ser un resultado irreversible de la estacionalidad. De hecho, mirando los valores de laboratorio de ambas especies (Fig. 5.2), se puede concluir que muestran o una cierta aclimatación a lo largo del año o una gran capacidad de recuperación de los valores máximos de Fv/Fm en un corto periodo de acondicionamiento, con la excepción de Ago y Sep para ambas especies.

La diferencia en las correlaciones entre los valores de fluorescencia y de Amáx para cada especie es también interesante (Fig. 5.3, Tabla 5.4). En el caso de *L.*

*hispanica* estas correlaciones son muy buenas (Tabla 5.4), pero no son tan altas en *L. pustulata*. La relación entre la ETR derivada de las medidas de fluorescencia y las tasas de intercambio de CO<sub>2</sub> es bastante clara en plantas vasculares (Demmig & Björkman, 1987; Genty *et al.*, 1989) y también Lange *et al.* (1996) encontraron una buena correlación en dos especies de líquenes (*Peltigera leucophlebia* y *P. neckeri*), pero otros estudios han demostrado la imposibilidad de calcular la ganancia de CO<sub>2</sub> sólo a partir de datos de fluorescencia (Leisner *et al.*, 1997; Green *et al.*, 1998), debido al flujo de electrones no asimilatorio y las diferentes respuestas que muestran la fluorescencia y el intercambio gaseoso frente a la saturación hídrica. MacKenzie *et al.* (2001) observaron una buena correlación en verano y una mala correlación en invierno. En el presente estudio, aunque no hemos calculado ETR, es lógico pensar que unos valores más altos de Fv/Fm estarán relacionados con mayores tasas de Amáx, pues indican un estado saludable del FS II (Jensen, 2002). En este estudio el estado hídrico no debería ser un problema, pues hemos comparado valores máximos de Fv/Fm, obtenidos en talos completamente hidratados, con tasas de intercambio gaseoso en talos con contenido hídrico óptimo. Green *et al.* (1998) explicaron el flujo no asimilatorio de electrones como una estrategia fotoprotectora que probablemente aumentaría con el aumento de estrés lumínico, como en el caso de las muestras invernales de MacKenzie *et al.* (2001). En nuestro caso, el hecho de que tuviéramos más puntos en las correlaciones de *L. pustulata* no afectaba al valor de los coeficientes, pues al quitar los meses en los que carecemos de datos para *L. hispanica*, las correlaciones de *L. pustulata* siguen siendo bajas y no significativas. El hecho de que las tasas de FN de *L. hispanica*, al igual que los valores de fluorescencia, bajen tanto en verano, mientras que *L. pustulata* no acusa tanto ese descenso en sus tasas de FN (Figs. 4.8, 4.10, 4.11, capítulo 4), pero sí en las de fluorescencia, es lo que probablemente condiciona los resultados de las correlaciones, pero aún carecemos de datos para poder explicar satisfactoriamente las diferencias observadas.

**5. COMPARISON OF CHLA FLUORESCENCE IN POPULATIONS  
OF *LASALLIA HISPANICA* AND *L. PUSTULATA* IN THE FIELD AND  
UNDER LABORATORY CONDITIONS ALONG A SEASONAL GRADIENT**



## INTRODUCTION

Chlorophyll fluorescence is a powerful tool, highly sensitive and non-invasive, to assess the vitality of photosystem II (PS II), as a proxy for photosynthesis (Maxwell & Johnson, 2000). Although, in contrast with vascular plants (Demmig & Björkman, 1987; Genty *et al.*, 1989), there is not a direct and clear relationship in bryophytes and lichens between ETR (electron transport rate, as a parameter obtained from fluorescence measurements) and CO<sub>2</sub> fixation (Leisner *et al.*, 1997; Green *et al.*, 1998; Proctor & Smirnoff, 2011), it is still a fast and convenient way of measuring the photosynthetic efficiency (e.g., Schreiber *et al.*, 1994; Lange *et al.*, 1996) and, for this reason, it has been widely used and has provided much understanding of the response of lichens to environmental stressing conditions (e.g., Bilger *et al.*, 1989; Scheidegger *et al.*, 1997; Barták *et al.*, 2003; Sancho *et al.*, 2007). It is also frequently used in field based long term monitoring experiments, aiming to detect lichen activity and to deduce carbon budget and potential growth (Schroeter *et al.*, 1991, 1992, 1995; Lange *et al.*, 1999) or to assess the effect of pollution (Calatayud *et al.*, 1996; Niewiadomska *et al.*, 1998).

The literature about seasonal variation on Chla fluorescence on lichens has increased in recent years, although it is still scarce (e.g., MacKenzie *et al.*, 2001, 2003; Baruffo & Tretiach, 2007; Tretiach *et al.*, 2007; Pirintsos *et al.*, 2011). Baruffo & Tretiach (2007) measured the response of fluorescence over a year, making field measurements of F<sub>0</sub>, F<sub>m</sub> and F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub> once every three months in *Punctelia subrudecta*, finding the highest values in December, when no canopy was present and light levels and water availability were suitable. Vráblíková *et al.* (2006) measured over a seasonal cycle the changes in Chla fluorescence of *Xanthoria parietina*, a successful species in well lit environments, and very tolerant to high irradiances. They found an increase in the values of F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub> from the minimum in May until the maximum in January. Light adapted quantum yield (ΦPS II) showed the same pattern, whereas NPQ and VAZ were opposite. Despite its tolerance to intense light, they found photoinhibition after a high light treatment in the samples of early spring, indicating an acclimation to the prevalent light conditions. Pirintsos *et al.* (2011) assessed the Chla fluorescence of *Pseudevernia furfuracea* and *Evernia prunastri* during the summer, finding in both species a decrease in values until August followed by a recovery in September, attributable to the first rains in Autumn, after the summer drought of the Mediterranean climate of Crete.

In spite of the extensive literature on Chla fluorescence, the knowledge about the factors that influence it is still poor, and it is possible that the climatic conditions of the days prior to measurements could highly influence the results (Ogaya *et al.*, 2010), thus making comparisons among species or at different periods more difficult. It would be necessary to establish a solid basis to make these comparisons feasible.

We have studied the seasonal response of the Chla fluorescence of the only two species of *Lasallia* present in the Iberian Peninsula, namely, *Lasallia hispanica* and *L. pustulata*. Our aim with this study was to find out whether two coexisting populations of these species showed any differences and any seasonal trends in their Chla fluorescence



response. We also investigated the influence of the previous climatic conditions on Chla fluorescence by performing measurements in the field and then in the laboratory, after a preconditioning period of 48 h.

## MATERIAL AND METHODS

### Lichen material

For this study, we chose a location near Madrid, in Silla de Felipe II, El Escorial (N 40° 34' 5'', W 9° 8' 45'', 1070 m. a. s. l.), where we went once a month from 1<sup>st</sup> October 2008 until 31<sup>st</sup> August 2009 to collect samples and perform fluorescence field measurements. At this locality, the dominant vegetation is an oak forest (*Quercus pyrenaica* Willd.), rich in epiphytic bryophyte and lichen species (Belinchón *et al.*, 2007). This species of oak has marcescent foliage, especially in young branches. The new leaves appear at the end of April in this locality and the flowering takes place shortly after. In this forest there are some scattered granite boulders, where many saxicolous lichen species appear. Among them, we can find *Lasallia pustulata* (L.) Mérat and *L. hispanica* (Frey) L.G. Sancho & A. Crespo. *Lasallia hispanica* is an endemic mediterranean species, appearing from 1000 m.a.s.l. until the highest summits of Iberian Sistema Central (Almanzor, 2592 m), in vertical, very exposed and windy surfaces. *L. pustulata* is a widely distributed species, which appears from sea level until 1700 m. a. s. l., usually in more protected habitats (Sancho, 1986; Sancho & Crespo, 1989; Codogno & Sancho, 1991). For both species we selected a single rock (one for each) in order to minimise site sampling effects and took samples over the year. Samples of *L. hispanica* could be taken, and hence, measured under laboratory conditions, only every two months (at the beginning of February, April, June, August, September, October and December), due to the fact that the selected rock had not enough thalli to allow monthly sampling. In contrast, the rock of *L. pustulata* had enough samples to allow a monthly collection.

### Fluorescence measurements

Thalli of *Lasallia hispanica* and *L. pustulata* were carefully selected for a monitoring of their physiological status during the whole year in the field. We monitored the same 8 healthy looking thalli from each species living attached to the same rocks from which we took the samples for laboratory measurements. Field and laboratory fluorescence measurements were carried out using a fluorometer MINI-PAM (Walz, Effeltrich, Germany). The maximal photochemical quantum yield of PS II,  $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$  was measured in ten points in each thallus.  $F_0$ : minimum Chla fluorescence and  $F_m$ : maximum Chla fluorescence were measured on a sample that has been dark-adapted for 20 minutes using a black velvet cloth.  $F_m$  was determined using a saturating pulse (8000  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , lasting 0.8 s). These field measurements were carried out the same day of collection of samples for ecophysiological measurements, at the beginning of each month and at the same time of the day. In December we found the rock of *L. pustulata* completely covered by snow, and had to remove it to reach the thalli. Being more exposed, the rock of *L. hispanica* had no snow cover, but the thalli were completely frozen, making fluorescence measurements impossible. Laboratory measurements were performed using the thalli collected for the gas exchange measurements in the previous

chapter. Six points were selected in each replicate, measuring Fv/Fm on them, again after 20 min of dark adaptation and full hydration. The number of measurements was more than 70 for field measurements and 18 for laboratory measurements for each species.

### Statistics

Statistical analyses were conducted in R 2.10.0 (R Development Core Team, 2009) with the help of the packages multcomp (Hothorn *et al.*, 2008), Hmisc (Harrell, 2006) and FactoMineR (Husson *et al.*, 2012). Differences on fluorescence between the two species were analysed by t-tests. One way ANOVA analyses were performed to look for differences within each species along the year. A two way ANOVA was performed to test the influence of the factors Month and Type of measurement (field or lab conditions) and their interaction. Pearson's product moment correlation coefficient was calculated to see the effect of environmental variables on the fluorescence values. Graphs were made using SigmaPlot 10.0 (Chicago, Illinois, USA).

### RESULTS

The meteorological conditions prior to field measurements and collection of thalli for the laboratory measurements are shown in Table 5.1, with data for precipitation, average temperature and irradiation for the previous 2, 5, 10 and 30 days (average for temperature and totals for precipitation and irradiation). The month values are plotted in Fig. 4.4 (Chapter 4), where a typical mediterranean climograph is observed, with a marked seasonality on temperature and rain regime, which result in the characteristic summer drought.

Month	P 2	Tav2	Irr 2	P 5	Tav5	Irr 5	P 10	Tav10	Irr 10	P 30	Tav30	Irr 30
Jan	5	5.8	11960	9.2	6.1	24870	10	5.6	46070	72.3	6.4	207250
Feb	0,5	2.7	9010	7.1	6.5	32500	17.5	6.0	71620	35.1	3.4	193200
Mar	3	5.6	13260	3.6	7.5	44780	3.6	8.8	122560	71.5	6.7	340440
Apr	0	10.7	43890	0	7.9	93890	0	9.3	186740	16.1	11.0	586870
May	0,3	11.7	49730	1.1	10.3	109620	1.1	11.9	241810	43	10.1	541190
Jun	10,2	21.7	52550	10.2	19.3	143550	23.4	17.3	247360	33.7	16.4	828070
Jul	0	23.8	59540	0	21.7	140960	0	22.1	297040	19.5	21.2	799220
Aug	0,7	20.8	51710	0.7	23.7	139360	0.7	24.1	289520	2	23.7	960940
Sep	0	25.9	48580	0	25.3	123390	0.7	25.4	246270	1.8	25.2	702100
Oct	0	16.7	36760	0	15.4	82290	6.1	15.1	167910	59.5	17.6	597760
Nov	0,5	5.6	15640	14.5	9.8	46280	37	10.9	98860	83.2	13.0	319360
Dic	0,7	1.3	12120	11.1	1.6	40390	15.8	4.0	83120	39.2	6.9	286120

Table 5.1: Meteorological conditions 2 days, 5 days, 10 days or 30 days prior to field measurements and collection for lab measurements. Values of precipitation (P n, in mm), average temperature (Tavn, in °C) and irradiation (Irr n, in Mega Joules m<sup>-2</sup>). Data from AEMET, as explained in the previous chapter.

Both species showed seasonal changes over the year. Fv/Fm data for both species is shown in Fig. 5.1 and numeric values are in Table 5.2. Results for *L. hispanica* range from 0.383 (Sep, field) to 0.646 (Feb, lab) and for *L. pustulata* from 0.477 (Apr, field) to 0.733 (Nov, field). Apart from April in field data, *L. pustulata* always had higher values than *L. hispanica* and, in most cases, the difference was statistically significant for both field and laboratory generated data.

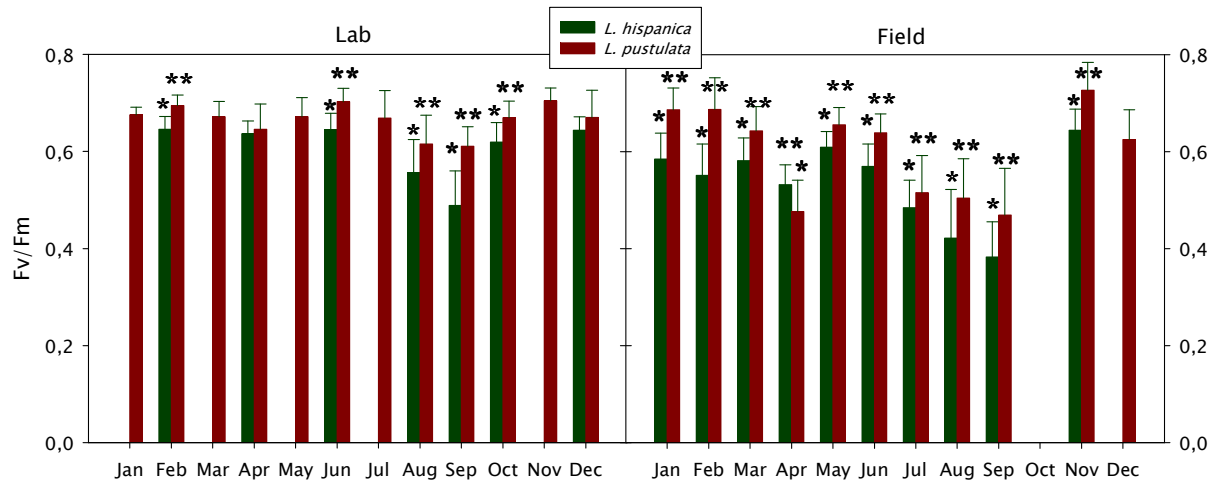


Fig. 5.1: Differences between the two species. Asterisks indicate statistically significant differences by t-tests, for  $p < 0.01$ ;  $n > 70$  for field measurements and  $n = 18$  for lab measurements. Bars indicate SE.

Both species show a significant decrease of fluorescence values in summer, followed by a recovery of Fv/Fm at the beginning of autumn (Fig. 5.2, Table 5.2).

Month	<i>L. hispanica</i>			<i>L. pustulata</i>		
	Field	Lab	$\Delta$ Fv/Fm	Field	Lab	$\Delta$ Fv/Fm
Jan	0.590±0.005	---	---	0.689±0.004	0.676±0.004	-0.013
Feb	0.551±0.007	0.646±0.006	0.095	0.687±0.007	0.695±0.005	0.008
Mar	0.582±0.005	---	---	0.643±0.005	0.672±0.008	0.029
Apr	0.533±0.004	0.636±0.006	0.103	0.477±0.007	0.646±0.013	0.169
May	0.610±0.003	---	---	0.655±0.004	0.672±0.010	0.017
Jun	0.571±0.005	0.645±0.008	0.074	0.639±0.004	0.702±0.007	0.063
Jul	0.485±0.006	---	---	0.516±0.008	0.681±0.006	0.165
Aug	0.423±0.011	0.556±0.020	0.133	0.505±0.008	0.615±0.014	0.110
Sep	0.383±0.008	0.489±0.020	0.106	0.480±0.008	0.611±0.010	0.131
Oct	---	0.620±0.010	---	---	0.670±0.008	---
Nov	0.644±0.005	---	---	0.733±0.002	0.705±0.006	-0.028
Dec	---	0.644±0.007	---	0.625±0.006	0.670±0.013	0.045

Table 5.2: Mean±SE of Fv/Fm values obtained in the field and after lab preconditioning in the two species of *Lasallia*. Statistically significant differences are shown on Figs. 5.1 and 5.2.  $\Delta$  Fv/Fm indicates the numerical difference between lab values and field values.

Both species also showed some differences between Fv/Fm measured in the field and values determined later in the laboratory after two days treatment under similar conditions (Fig. 5.2, Table 5.2). In all the cases, these differences were statistically significant for both species and for a p-value < 0.001 (t-tests). For both species, with the exception of January and November for *L. pustulata*, the highest values of Fv/Fm were obtained after the preconditioning period in the laboratory. Differences tended to be larger in summer for *L. pustulata*, (e.g., 0.165 in Jul vs. 0.008 in Feb, Table 5.2), but not for *L. hispanica*, which maintained a relatively constant difference between laboratory and field over the year (maximal difference was 0.133 in Aug, and minimal was 0.074 in Jun) (Table 5.2). Fig. 5.2 compares measurements made in the field and laboratory for each species. For both, the values obtained after preconditioning in the laboratory were more

similar than those measured in the field. There were no significant differences in the winter, spring and autumn, but significantly lower values were found in summer.

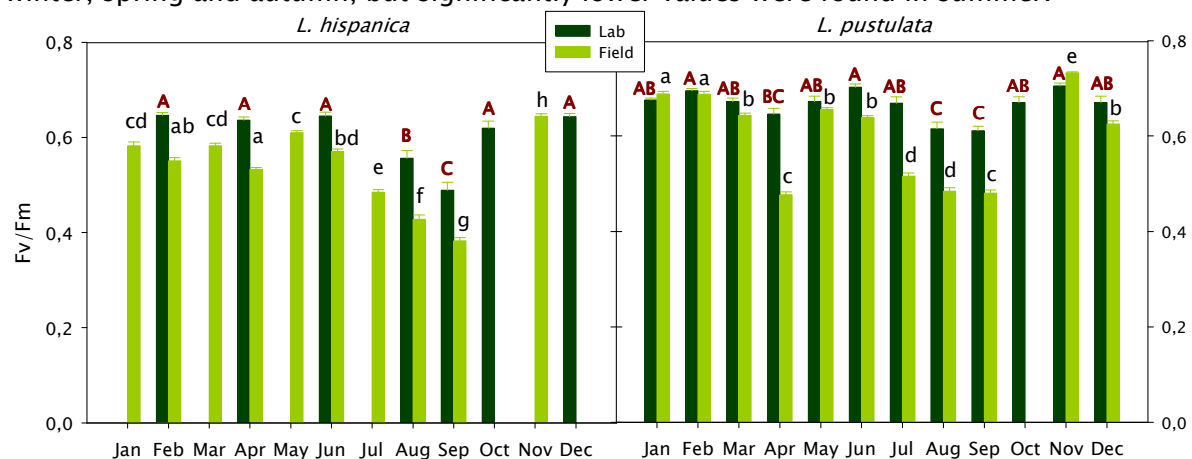


Fig. 5.2: The differences between the values obtained in the lab and in the field were statistically significant in all the cases, by t-test, for  $p < 0.001$ . *Lasallia hispanica*, left; *L. pustulata*, right. One way ANOVAs were performed to see significant differences within each treatment. Bars with different little letters show significant differences in field values. Capital red letters indicate significant differences in lab data.

A two way ANOVA was performed for both species for the factors ‘Month’ and ‘Type of measurement’ (‘Lab’ and ‘Field’) and showed a significant effect of both factors, as well as of the interaction between them for the two species (Table 5.3). This confirms the different effect that seasonality has in laboratory and field measurements.

Factor	<i>L. hispanica</i>			<i>L. pustulata</i>		
	df	F	p	df	F	p
Month	11	173.69	<0.001	11	216.40	<0.001
Type	1	344.34	<0.001	1	191.70	<0.001
Month*Type	10	2.45	0.040	10	19.55	<0.001

Table 5.3: Results of the two way ANOVA performed for both species for the factors ‘Month’ and ‘Type of measurement’ (‘Lab’ and ‘Field’).

The two species differed in their relationships between Fv/Fm, both in the field and after the preconditioning period in the laboratory, and the maximal net photosynthetic rates (data from Chapter 4) (Fig. 5.3, and Table 5.4). The correlation coefficients were much better for *L. hispanica* whilst *L. pustulata* had lower  $r$ , none of which were significant.

	<i>L. hispanica</i>		<i>L. pustulata</i>	
	r	p	r	p
Fv/Fm Field vs. Amax month temp.	0.92	0.026	0.02	0.958
Fv/Fm Field vs. Amax 15 °C	0.83	0.085	-0.37	0.266
Fv/Fm Lab vs. Amax month temp.	0.79	0.033	0.18	0.582
Fv/Fm Lab vs. Amax 15°C	0.77	0.042	-0.37	0.236

Table 5.4: Parameters of the correlations on Fig. 5.3

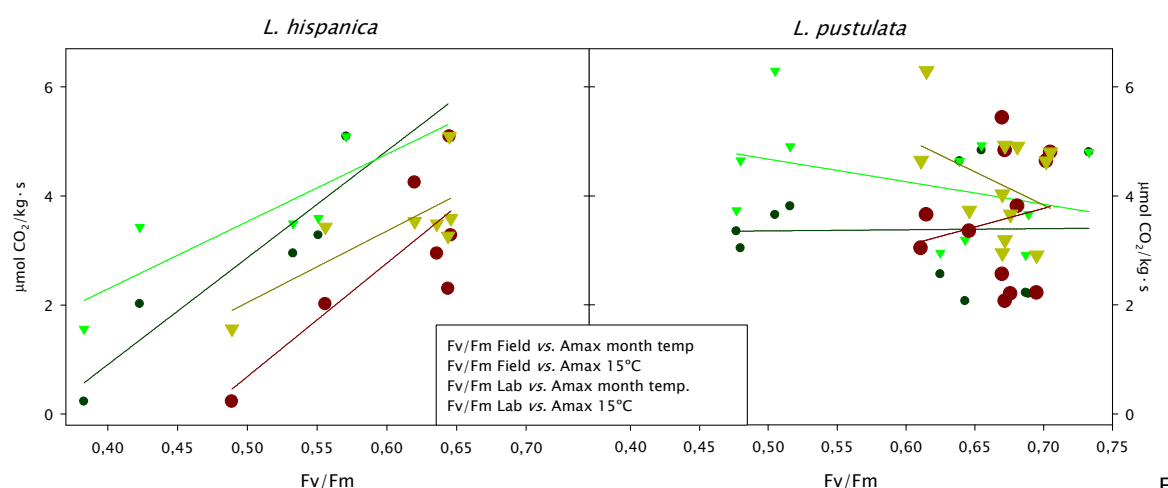


fig. 5.3: Linear regressions between the fluorescence values obtained in the field (deep and light green) or in the lab (deep red and deep yellow) and the gas exchange results obtained in the lab at the mean temperature of each month (deep green and red circles) and at a fixed temperature of 15 °C (green and deep yellow inverted triangles). The parameters of the correlations are given on Table 5.4.

Correlation tests were performed between the climatic values during each of the four periods and Fv/Fm of both species, both in the field and after the laboratory preconditioning. Pearson's *r* and *p* values are shown on Tables 5.6 and 5.7. All the correlations were highly significant but were much higher for *L. hispanica* for data obtained in the field (a 73% higher on average), whilst *L. pustulata* had similar coefficients, although in general, slightly higher (7%) for field data.

	Field		Lab	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
P 2	0.69	<0.001	0.42	<0.001
Tav2	-0.61	<0.001	-0.36	<0.001
Irr 2	-0.59	<0.001	-0.31	<0.001
P 5	0.31	<0.001	0.26	<0.001
Tav5	-0.59	<0.001	-0.31	<0.001
Irr 5	-0.59	<0.001	-0.28	<0.001
P 10	0.65	<0.001	0.43	<0.001
Tav10	-0.55	<0.001	-0.31	<0.001
Irr 10	-0.57	<0.001	-0.27	<0.001
P 30	0.59	<0.001	0.45	<0.001
Tav30	-0.58	<0.001	-0.35	<0.001
Irr 30	-0.59	<0.001	-0.3	<0.001

Table 5.6: Pearson's product moment correlation coefficient (*r*) and *p* value of the correlation for *Lasallia hispanica* between fluorescence measurements in the field (left) and in the lab (right) and values of precipitation (P *n*), average temperature (Tav*n*) and irradiation (Irr *n*) 2 days, 5 days, 10 days or 30 days prior to the measurements.

## DISCUSSION

The differences found in these fluorescence measurements are fully in accordance with many of the results obtained in the previous chapter. We could see then many differences between these two coexistent populations of *Lasallia* and interpreted them as a result of the different microhabitat they presented, which is in turn a result of the niche segregation that enables their coexistence (Larson, 1984; Scott & Larson, 1986; Hestmark, 1997; Sonesson *et al.*, 2011). As *L. hispanica* occupies a more exposed niche, it apparently suffers more from the effects of the climate, and this is reflected in the more

contrasting values found for some parameters along the year, e.g., photosynthetic productivity, photosynthetic efficiency (KF) or TSW (see the previous chapter). We have seen a similar behaviour in the Chl<sub>a</sub> fluorescence results. With the only exception of the field measurements in April, *Lasallia hispanica* always had lower values of Fv/Fm (Fig. 5.1). It also seemed to be further influenced by the climatic conditions prior to field measurements and collection, as suggested by the fact that the effect of the preconditioning period in the laboratory was similar along the entire year (Fig. 5.2, Table 5.2). This was not the case for *L. pustulata*, which had very similar field and laboratory values along all the year, with the exception of summer and Apr.

	Field		Lab	
	r	p	r	p
P 2	0.69	<0.001	0.60	<0.001
Tav2	-0.64	<0.001	-0.66	<0.001
Irr 2	-0.52	<0.001	-0.40	<0.001
P 5	0.28	<0.001	0.26	0.010
Tav5	-0.60	<0.001	-0.56	<0.001
Irr 5	-0.44	<0.001	-0.40	<0.001
P 10	0.54	<0.001	0.50	<0.001
Tav10	-0.65	<0.001	-0.61	<0.001
Irr 10	-0.48	<0.001	-0.41	<0.001
P 30	0.47	<0.001	0.52	<0.001
Tav30	-0.65	<0.001	-0.66	<0.001
Irr 30	-0.49	<0.001	-0.48	<0.001

Table 5.7: Pearson's product moment correlation coefficient (r) and p value of the correlation for *Lasallia pustulata* between fluorescence measurements in the field (left) and in the lab (right) and values of precipitation (P n), average temperature (Tavn) and irradiation (Irr n) 2 days, 5 days, 10 days or 30 days prior to the measurements.

The results suggest that *L. hispanica* is always under more stressing conditions, which lower its Fv/Fm value in the field but, after a period of 2 days preconditioning, it showed good recovery. This species probably has to face higher stress because of its more exposed habitat. Although no microclimatic data are available, the greater exposure probably means higher temperature ranges, more exposure to wind, in addition to higher light intensity. As we have seen in the previous chapters, the fact that *L. hispanica* has an aero-hygrophytic strategy, whilst *L. pustulata* has a substrate-hygrophytic one (Sancho & Kappen, 1989), also means that the former gets dry much more easily (Valladares *et al.*, 1998), thus experiencing more frequent desiccation processes.

*Lasallia pustulata* did not seem to need any recovery in months like Jan or Nov, when the field values were even slightly higher. We can assume that the months marked with "A" in laboratory measurements for both species (Fig. 5.2) show their maximal potential Fv/Fm value (on average, 0.634 for *L. hispanica* and 0.683 for *L. pustulata*, both values that indicate a healthy state of PS II, according to Jensen, 2002). *Lasallia hispanica* only shows a similar field value in Nov, but *L. pustulata* has similar high field values in Jan, Feb, Mar, May, Jun, Nov and Dec, indicating no stress on PS II.

Neither *L. pustulata* nor *L. hispanica* were able to recover their highest potential Fv/Fm value in Aug and Sep. Pirintsos *et al.* (2011) also found depressed Fv/Fm under drought summer conditions, and Larsson *et al.* (2009) reported a negative effect of high temperatures on Fv/Fm. Whereas *L. pustulata* could not reach a complete recovery in Apr, *L. hispanica* had higher field values than it in the laboratory. This is remarkable and very

interesting indeed. On the 10 days prior to Apr measurements, no precipitation was registered, a situation only comparable to Jul. April was the fourth driest month, after Sep, Aug and Jul. But moreover, the increase on irradiation compared with Mar was considerable, and in Apr no protection could be offered by canopy, which only develops in this forest at the beginning of May. Vráblíková *et al.* (2006) reported a decrease of Fv/Fm values from winter solstice until early May due to a photoinhibitory process following the increase in solar light and day length in an exposed population of *Xanthoria parietina*, which recovered good values from May on. They explained this acclimation as a result of the enhanced synthesis of the photoprotective fungal compound parietin. In our study, we observe the same acclimation in our samples. We discarded gyrophoric acid as a photoprotective molecule (see chapters 2 and 3) and no other fungal compound was detected (data not shown). In the case of *L. pustulata* the recovery of the Fv/Fm values in May could be partly due to the development of the canopy. In *L. hispanica* the recovery in May may solely be explained by the increase in water availability in this month, which could be also the most likely explanation for the recovery in *L. pustulata*. Desiccated lichens have been assumed to be resistant to high light, as desiccation reduces its transmittance through the cortex (Gauslaa & Solhaug, 2001) and stabilises the photosynthetic apparatus by causing a functional disconnection of its components (Bilger *et al.*, 1989), but under natural conditions, lichens are exposed to high light during long periods in the dry state, and damage due to photoinhibition under excessive irradiation gradually accumulates over a period of several days, as long as the weather remains too dry for the repairing mechanisms to become activated in the field (Gauslaa & Solhaug, 1999). Barták *et al.* (2008) reported that the duration of irradiation had a greater influence on the fluorescence values of thalli of *L. pustulata* than the intensity and frequency of high irradiance. The low values observed in this species and its inability to recover after the preconditioning in the laboratory are a consequence of the combined effect of a sudden increase in irradiation with the absence of hydration that would allow to activate the repairing mechanisms. This combination of factors is probably also behind the lower field value of Fv/Fm in *L. hispanica* in Apr, compared to the previous and the next month. But this species is able to recover its highest potential level after the preconditioning already in Apr. This suggests that *L. hispanica* is more tolerant and resistant to stressing conditions, both of high light and drought, further supporting the results of the two previous chapters. The importance of water availability is also clear from the fact that both species have a similar light level between Nov and May (they grew in the same orientation in their respective rocks). The fact that *L. pustulata* seems more affected by ambient conditions only in summer, when canopy is fully developed, means that water stress is then a more important factor than temperature or light.

The damage of *L. pustulata* thalli in April is not permanent, as we observed a full recovery of those very thalli in May. For this reason, we think that a longer preconditioning period in the laboratory would have helped to reach a complete recovery, and it is likely that it would have also been very helpful in the case of summer depression. This seems to suggest that the state of the photosynthetic apparatus is very influenced by the climatic conditions of the days prior to field measurements, rather than being an irreversible result of the seasonality. In fact, if we look at the laboratory values in both

species (Fig. 5.2), we could say that they show either a sort of acclimation along the year or a very efficient ability to recover maximal Fv/Fm in a short preconditioning period, with the exception of Aug and Sep for both *Lasalliae*.

The different correlation between the fluorescence values and Amax for each species is also interesting (Fig. 5.3, Table 5.4). In the case of *L. hispanica* this correlation is very good (Table 5.4), but it is not for *L. pustulata*. The relationship between the ETR derived from Chl fluorescence and CO<sub>2</sub> exchange rates is fairly clear for vascular plants (Demmig & Björkman, 1987; Genty *et al.*, 1989) and also Lange *et al.* (1996) found a very good correlation in two lichen species (*Peltigera leucophlebia* and *P. neckeri*), but in other studies it has been demonstrated the impossibility of calculating CO<sub>2</sub> gain only from fluorescence data (Leisner *et al.*, 1997; Green *et al.*, 1998), due to non-assimilatory electron flow and the different response to water supersaturation of fluorescence and gas exchange. MacKenzie *et al.* (2001) reported a high correlation in summer and a low correlation in winter. In our case, although we have not calculated ETR, it is logical to think that high Fv/Fm values could be related to high Amax values, as they indicate a healthy state of the PS II (Jensen, 2002). In this study water status should not be a problem, as we have compared maximal Fv/Fm values, obtained with fully hydrated thalli, with gas exchange rates obtained at optimal hydrated thalli. Green *et al.* (1998) explained the non-assimilatory electron flow as a photoprotective strategy which would likely increase with increasing light stress, as in the case of the winter samples of MacKenzie *et al.* (2001). In our case, the fact that we had more points for the correlations in *L. pustulata* does not affect the correlation coefficients, as when removing the months where we lack data from *L. hispanica*, the correlations in *L. pustulata* are still low and non-significant. The fact that the NP rates of *L. hispanica*, like fluorescence values, decrease dramatically in summer, whilst *L. pustulata* does not show so strong an influence in NP (Figs. 4.8, 4.10, 4.11, chapter 4), but it does in fluorescence, is probably conditioning the results of the correlations, but we still lack data to be able to explain satisfactorily the observed differences.





## CONCLUSIONES

### Gradiente latitudinal

- *Umbilicaria decussata* mostró una gran variabilidad en muchos de los parámetros medidos, lo que aparentemente posibilita a esta especie prosperar en la mayoría de las regiones de clima polar–alpino del mundo.
- Aunque esta especie es capaz de hacer frente a las condiciones más duras terrestres, como las que existen en la Antártida continental, es en las altas montañas de zonas de baja latitud donde *U. decussata* muestra las tasas fotosintéticas más altas, así como mayores cantidades de metabolitos, tanto algales como fúngicos.
- Al estar presente en la mayoría de las zonas alpinas y polares de la Tierra, *U. decussata* podría ser una especie de gran utilidad indicadora de la salud de esos ambientes y un buen objetivo para el seguimiento biológico de los cambios actuales relacionados con el cambio climático que sufren estas zonas.

### Gradiente altitudinal

- Las dos especies simpátricas estudiadas, *Lasallia hispanica* y *Lasallia pustulata*, difieren en su respuesta a la altitud. La altitud resultó ser más influyente en el rendimiento fisiológico de *L. hispanica* que en el de *L. pustulata*. La diferencia existente en la distribución altitudinal de estas dos especies está determinada por la tolerancia de *L. hispanica* a ambientes más difíciles. Esta especie vive en lugares más altos que *L. pustulata* y debe, por tanto, soportar temperaturas más extremas, mayores irradiaciones y episodios de hidratación más irregulares y escasos. Por esta razón, su inversión en protección es mayor y es capaz de vivir en condiciones donde *L. pustulata* ya no puede competir.
- No se observaron respuestas morfológicas o anatómicas claras a la altitud en ninguna de las dos especies. Sin embargo, sí se encontró una tendencia clara en ambas a mostrar mayores valores de peso específico del talo hacia altitudes superiores.

### Estacionalidad

- La influencia de la estacionalidad en líquenes mediterráneos ha quedado de manifiesto con las diferencias en los resultados obtenidos a lo largo de un año completo de medidas ecofisiológicas. Ambas especies de *Lasallia* mostraron una depresión de su rendimiento fotosintético al final del verano. *Lasallia hispanica* también mostró un marcado descenso de las tasas fotosintéticas en esa época del año, mientras que *L. pustulata* no se vio tan afectada.

- El daño en el aparato fotosintético debido a las condiciones adversas no es permanente, y se observó una rápida recuperación en los valores de  $F_v/F_m$  tras un corto periodo de acondicionamiento en el laboratorio, así como en las tasas fotosintéticas y otros parámetros, tras las primeras lluvias de otoño.
- La influencia de las condiciones ambientales es más marcada en *L. hispanica*, como consecuencia del hábitat más expuesto en el que vive. *Lasallia pustulata*, al estar más protegida por el dosel arbóreo en nuestra área de estudio, no acusa tan profundamente los cambios a lo largo del año.
- Las máximas tasas fotosintéticas a menudo no se relacionan con productividad (mayores cantidades de pigmentos, azúcares y aminoácidos, lo que sugiere que hay una variable más influyente en la productividad que la Amáx, y es, con mucha probabilidad, el tiempo de actividad.
- En general, la mayor variabilidad en las respuestas de *L. hispanica* es una indicación de su capacidad para tolerar condiciones más duras, y le permite establecerse y medrar en ambientes difíciles.
- De acuerdo con los resultados de estos estudios, la estacionalidad y las condiciones climáticas deberían tenerse en cuenta a la hora de diseñar experimentos y recolectar muestras o tomar medidas en el campo, pues pueden afectar al estado fisiológico de las muestras dificultando su comparación.

## CONCLUSIONS

### Latitudinal gradient

- *Umbilicaria decussata* showed a large variability in most of the measured physiological variables, which apparently enables this species to thrive in most of the regions with a polar–alpine climate worldwide.
- Although the species is able to cope with the harshest conditions on Earth surface as high latitudes in Antarctica, it is at the highest elevations at low latitudes where *U. decussata* shows the highest photosynthetic rates, as well as higher amounts of metabolites, both algal and fungal.
- Being present in most of the alpine and polar areas on Earth, *U. decussata* could be a very useful indicator species of the health of those environments and a good target for biomonitoring the current changes related to global change that are affecting those areas.

### Altitudinal gradient

- The two sympatric species studied, *Lasallia hispanica* and *Lasallia pustulata*, differed in their response to altitude. Altitude was much more an influent factor for the physiological performance of *L. hispanica* than for *L. pustulata*. The difference on the altitudinal distribution between them is determined by the tolerance of *L. hispanica* to harsher environments. This species lives in higher places than *L. pustulata* and thus must endure more extreme temperatures, higher irradianations and more irregular and scarce hydration episodes. For this reason, it invests more resources on protection and is able to survive under conditions where *L. pustulata* is no longer able to compete.
- No clear morphological or anatomical responses to altitude were observed on both species. However, a clear tendency to have higher thallus specific weight values with increasing altitude was detected.

### Seasonality

- The influence of seasonality on Mediterranean lichens is clear from the differences on the results obtained along a whole year of eco physiological measurements. Both *Lasallia* species showed a depression of fluorescence yield at the end of the summer. *Lasallia hispanica* also showed dramatic decreases of photosynthetic performance at that time, while *L. pustulata* was not so affected.
- The damage on the photosynthetic apparatus due to adverse conditions is not permanent, and a fast recovery was observed on Fv/Fm values after a short

preconditioning period in the laboratory, as well as on photosynthetic rates and other parameters after the first rains of autumn.

– The influence of the environmental conditions is more marked in *L. hispanica*, as a consequence of its more exposed habitat. *Lasallia pustulata*, more protected by the canopy in our study area, does not suffer so deeply the changes along the year.

– Maximal photosynthetic rates are often not related with productivity (higher amounts of pigments, sugars and amino acids), which suggests that there is a higher influent variable than  $A_{max}$  on productivity, most likely, active time.

– Overall, the higher variability on the responses of *L. hispanica* is an indication of its ability to tolerate harsher conditions and enables it to establish and thrive on difficult environments.

– According to the results of these studies, seasonality and climatic conditions should be taken into account on experiment design and sample collections or field measurements, as they can affect the physiological state of the samples, making comparisons difficult.

**BIBLIOGRAFÍA**  
**LITERATURE CITED**



- Adams, M.S. (1971). Temperature response of carbon dioxide exchange of *Cladonia rangiferina* from the Wisconsin pine barrens, and comparison with an alpine population. *Amer. Midland Nat.* 86, 224–227.
- AEMET. Agencia estatal de meteorología. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Gobierno de España.
- Agustí, S., Enríquez, S., Frost-Christensen, H., Sand-Jensen, K., Duarte, C.M. (1994). Light harvesting among photosynthetic organisms. *Functional Ecology* 8, 273–279.
- Ahmadjian, V. (1993). *The Lichen Symbiosis*. John Wiley & Sons, Inc., New York. 250 pp.
- Ahmadjian, V. (1995). Lichens are more important than you think. *BioScience* 45(3), 124.
- Amigo, J. & Ramírez, C. (1998). A bioclimatic classification of Chile: woodland communities in the temperate zone. *Plant Ecology*, 136(1), 9–26.
- Archaux, F. (2004). Breeding upwards when climate is becoming warmer: no bird response in the French Alps. *Ibis* 146, 138–144.
- Arróniz-Crespo, M., Gwynn-Jones, D., Callaghan, T. V., Núñez-Olivera, E., Martínez-Abaigar, J., Horton, P., Phoenix, G. K. (2011). Impacts of long-term enhanced UV-B radiation on bryophytes in two sub-Arctic heathland sites of contrasting water availability. *Annals of Botany* 108 (3), 557–565.
- Barnes, J.D., Balaguer, L., Manrique, E., Elvira, S., Davison, A.W. (1992). A reappraisal of the use of DMSO for the extraction and determination of chlorophylls a and b in lichens and higher plants. *Environmental and Experimental Botany* 32(2), 85–100.
- Barták, M., Vráblíková, H. & Hájek, J. (2003) Sensitivity of photosystem 2 of Antarctic lichens to high irradiance stress: fluorometric study of fruticose (*Usnea antarctica*) and foliose (*Umbilicaria decussata*) species. *Photosynthetica* 41, 497–504.
- Barták, M., Vráblíková-Cempírková, H., Štepigová, J., Hájek, J., Váczi, P. & Večeřová, K. (2008) Duration of irradiation rather than quantity and frequency of high irradiance inhibits photosynthetic processes in the lichen *Lasallia pustulata*. *Photosynthetica*, 46, 161–169.
- Baruffo, L., & Tretiach, M. (2007). Seasonal variation of Fo, Fm, and Fv/Fm in an epiphytic population of the lichen *Punctelia subrudecta* (Nyl.) Krog. *Lichenologist* 39(6), 555–565.
- Beaman, J. H. (1962). The timberlines of Iztaccihuatl and Popocatepetl, Mexico. *Ecology* 43, 377–385.
- Beckett, R.P., Kranner, I., Minibayeva, F. V. (2008). Stress physiology and the symbiosis. In: *Lichen Biology*. Nash III, T. H. (ed.). Cambridge University Press, Cambridge. viii+486 pages, pp. 134–151.
- Belinchón R., Martínez I., Escudero A., Aragón G., Valladares F. (2007). Edge effect on epiphytic communities in a Mediterranean *Quercus pyrenaica* forest. *Journal of Vegetation Science* 18: 81–90.
- Beniston, M. (2003). Climatic change in mountain regions: a review of possible impacts. *Clim. Change* 59, 5–31.
- Bilger, W., Rimke, S., Schreiber, U., Lange, O.L. (1989) Inhibition of energy-transfer to photosystem II in lichens by dehydration: different properties of reversibility with green and blue-green phycobionts. *Journal of Plant Physiology* 134, 261–268.
- Bird, M.I., Chivas, A.R., Head, J. (1996). A latitudinal gradient in carbon turnover times in forest soils. *Nature* 381, 143–146.
- Björkman, O. (1981). Responses to different quantum flux densities. In: *Physiological plant ecology I. Responses to the physical environment*. Lange, O.L., Nobel, P.S., Osmond, C.B., Ziegler, H. (eds.). Encyclopedia of plant physiology, vol. 12A. Berlín, Alemania. Springer Verlag, 57–108.



- Björkman, O. & Demmig-Adams, B. (1994). Regulation of photosynthetic light energy capture, conversion, and dissipation in leaves of higher plants. In: *Ecophysiology of Photosynthesis*, E-D. Schulze, M.M. Caldwell (Eds.), Springer-Verlag, pp. 17-47.
- Boardman, N.K. (1977). Comparative photosynthesis of sun and shade plants. *Annu Rev Plant Physiol* 28, 355-377.
- Bradshaw, A.D. (1965). Evolutionary significance of phenotypic plasticity in plants. *Adv Genet* 13, 115-155.
- Büdel, B. & Lange, O.L. (1994). The role of cortical and epinecral layers in the lichen genus *Peltula*. *Cryptogamic Botany* 4, 262-269.
- Calatayud, A., Deltoro, V.I., Barreno, E., del Valle-Tascón, S. (1997). Changes in in vivo chlorophyll fluorescence quenching in lichen thalli as a function of water content and suggestion of zeaxanthin-associated photoprotection. *Physiol. Plant.* 101, 93-102.
- Calatayud, A., Sanz, M. J., Calvo, E., Barreno, E., del Valle-Tascón, S. (1996). Chlorophyll *a* fluorescence and chlorophyll content in *Parmelia quercina* thalli from a polluted region of northern Castellón (Spain). *Lichenologist* 28, 49-65.
- Cavalier-Smith, T. (1987). The Simultaneous Symbiotic Origin of Mitochondria, Chloroplasts, and Microbodies. *Endocytobiology* 503, 55-71.
- Chapin, F.S. III, Bloom, A.J., Field, C.B., Waring, R.H. (1987). Plant responses to multiple environmental factors. *BioScience* 37, 49-57.
- CNIG. Centro Nacional de Información Geográfica. Ministerio de Fomento, Gobierno de España.
- Codogno, M., Sancho, L.G. (1991). Distribution patterns of the lichen family Umbilicariaceae in the W Mediterranean Basin (Iberian Peninsula, S France and Italy). *Botanika Chronika* 10, 901-910.
- Comunidad de Madrid (2002). Plan de Ordenación de los Recursos Naturales Parque Natural de Peñalara y su Área de Influencia Socioeconómica. Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio.
- Cordell, S., Goldstein, G., Mueller-Dombois, D., Webb, D. & Vitousek, P. M. (1998). Physiological and morphological variation in *Metrosideros polymorpha*, a dominant Hawaiian tree species, along an altitudinal gradient: the role of phenotypic plasticity. *Oecologia* 113, 188-196.
- Cowan, I.R., Lange, O.L., Green, T.G.A. (1992). Carbon-dioxide exchange in lichens: determination of transport and carboxylation characteristics. *Planta* 187(2), 282-294.
- Coxson, D.S. (1987). Effects of desiccation on net photosynthetic activity in the basidiomycete lichen *Cora pavonia* E. Fries from the cloud/mist zone of the tropical volcano La Soufrière (Guadeloupe). *The Bryologist* 90(3), 241-245.
- Coxson, D.S., Brown, D., Kershaw, K.A. (1983). The interaction between CO<sub>2</sub> diffusion and the degree of thallus hydration in lichens: some further comments. *New Phytologist* 93, 247-260.
- Coxson, D.S. & Mackey, R.L. (1990). Diel periodicity of photosynthetic response in the subalpine moss *Pohlia wahlenbergii*. *Bryologist* 93, 417-422.
- Craine J.M., Lee W.G. (2003). Covariation in leaf and root traits for native and non-native grasses along an altitudinal gradient in New Zealand. *Oecologia* 134, 471-478.
- Creveld, M. (1981). Epilithic Lichen Communities in the Alpine Zone of Southern Norway. *Bibliotheca Lichenologica* 17. J. Cramer, Vaduz. 288 pp.
- Crimmins, S.M., Dobrowski, S.Z., Greenberg, J.A., Abatzoglou, J.T. & Mynsberge, A.R. (2011). Changes in climatic water balance drive downhill shifts in plant species optimum elevations. *Science* 331, 324-327.

- Crittenden, P.D. (1991). Ecological significance of necromass production in mat-forming lichens. *Lichenologist* 23, 323–331.
- Crittenden, P.D. (1998). Nutrient exchange in an Antarctic macrolichen during summer snowfall–snow melt events. *New Phytologist* 139(4), 697–707.
- Crittenden, P.D., Kalucka, I., Oliver, E. (1994). Does nitrogen supply limit the growth of lichens? *Cryptogamic Botany* 4, 143–155.
- Dahlman, L., Näsholm, T., Palmqvist, K. (2002). Growth, nitrogen uptake, and resource allocation in the two tripartite lichens *Nephroma arcticum* and *Peltigera aphthosa* during nitrogen stress. *New Phytologist* 153, 307–315.
- Dahlman, L. & Palmqvist, K. (2003). Growth in two foliose tripartite lichens, *Nephroma arcticum* and *Peltigera aphthosa*: empirical modelling of external vs. internal factors. *Functional Ecology* 17, 821–831.
- Dahlman, L., Persson, J., Näsholm, T., Palmqvist, K. (2003). Carbon and nitrogen distribution in the green algal lichens *Hypogymnia physodes* and *Platismatia glauca* in relation to nutrient supply. *Planta* 217, 41–48.
- Dahlman, L., Zetherström, M., Sundberg, B., Näsholm, T., Palmqvist, K. (2001). Measuring ergosterol and chitin in lichens. In: Kranner I, Beckett R, Varma A (eds) *Protocols in lichenology–culturing, biochemistry, physiology and use in biomonitoring*. Springer, Berlín Heidelberg New York, pp 348–362.
- Dale, M. P. & Causton, D.R. (1992). Use of the Chlorophyll a/b Ratio as a Bioassay for the Light Environment of a Plant. *Functional Ecology*, 6 (2), 190–196.
- Davis, A.J., Jenkinson, L.S., Lawton, J.H., Shorrocks, B. & Wood, S. (1998). Making mistakes when predicting shifts in species range in response to global warming. *Nature*, 391, 783–786.
- Demmig, B. & Björkman, O. (1987). Comparison of the effect of excessive light on chlorophyll fluorescence (77 K) and photon yield of O<sub>2</sub> evolution in leaves of higher plants. *Planta* 171, 171–184.
- Demmig-Adams, B. & Adams III, W.W. (1996). The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis, *Trends Plant Sci.* 1, 21–26.
- Diamond, J. (1986). Overview: laboratory experiments, field experiments and natural experiments. In: Diamond, J. & Case, T.J. (Eds.), *Community ecology*. Harber and Rowe, New York. pp. 3– 22.
- Dietrich, M. & Scheidegger, C. (1997). Frequency, diversity and ecological strategies of epiphytic lichens in the Swiss Central Plateau and the Pre-Alps. *Lichenologist* 29 (3), 237–258.
- Dietz, S., Büdel, B., Lange, O.L., Bilger, W. (2000). Transmittance of light through the cortex of lichens from contrasting habitats. In: Schroeter, B., Schlenzog, M., Green, T.G.A. (eds.): *New Aspects in Cryptogamic Research. Contributions in Honour of Ludger Kappen*. Bibliotheca Lichenologica, J. Cramer, Berlín, Stuttgart, pp. 171–182.
- Duane, W.J., Pepin, N.C., Losleben, M.L. & Hardy, D.R. (2008). General characteristics of temperature and humidity variability on Kilimanjaro, Tanzania. *Arctic, Antarctic and Alpine Research*, 40(2), 323, 334.
- Ekblad, A. & Näsholm, T. (1996). Determination of chitin in fungi and mycorrhizal roots by an improved HPLC analysis of glucosamine. *Plant and Soil* 178, 29–35.
- Ekblad, A., Wallander, H., Näsholm, T. (1998). Chitin and ergosterol combined to measure total and living fungal biomass in ectomycorrhizae. *New Phytologist* 138, 143–149.
- Elith, J., Graham, C.H., Anderson, R.P., Dudik, M., Ferrier, S., Guisan, A., Hijmans, R.J., Huettmann, F., Lethwick, J.R., Lehmann, A., Li, J., Lohmann, L.G., Loiselle, B.A., Manion, G., Moritz, C., Nakamura, M., Nakazawa, Y., Overton, j.M.M., Townsend Peterson, A., Phillips, S.J., Richardson, K., Scachetti-Pereira, R., Schapire, R.E., Soberón, J., Williams, S., Wisz, M.S, Zimmermann, N.E. (2006). Novel methods

- improve prediction of species' distributions from occurrence data. *Ecography* 29,129–151.
- Enríquez, S., Duarte, C.M., Sand-Jensen, K., Nielsen, S.L. (1996) Broad-scale comparison of photosynthetic rates across phototrophic organisms. *Oecologia* 108,197–206.
- Epstein, E. (1972). *Mineral nutrients in Plants: Principles and Perspective*. Wiley, New York.
- Eriksson, O. & Winka, K. (1998). Families and higher taxa of *Ascomycota*. *Myconet* 1, 17–24.
- Fahselt, D. (1994a). Carbon metabolism in lichens. *Symbiosis* 17(2–3), 127–182.
- Fahselt, D. (1994b). Secondary biochemistry of lichens. *Symbiosis* 16(2), 117–165.
- Fairman, J. G., Jr., Nair, U.S., Christopher, S.A., Mölg, T. (2011). Land use change impacts on regional climate over Kilimanjaro. *J. Geophys. Res.*, 116, D03110.
- Farrar, J.F. (1976). Ecological physiology of the lichen *Hypogymnia physodes*. II. Effects of wetting and drying cycles and the concept of 'physiological buffering'. *New Phytologist* 77, 105–113.
- Farrar, J.F. (1978). Ecological physiology of the lichen *Hypogymnia physodes*. IV. Carbon allocation at low temperatures. *New Phytologist* 81, 65–69.
- Farrar, J.F. (1988). Physiological buffering. In: M. Galun (ed.): *CRC Handbook of Lichenology. Volume II*. CRC Press, Inc., Boca Raton, pp. 101–106.
- 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 (6), 1208–1232.
- Fitter, A.H., Graves, J.D., Self, G.K., Brown, T.K., Bogie, D., Taylor, K. (1998). Root production, turnover and respiration under two grassland types along an altitudinal gradient: influence of temperature and solar radiation. *Oecologia* 114, 20–30.
- Frahm, J.P. (1990). The altitudinal zonation of bryophytes on M. Kinabalu. *Nova Hedwigia* 51, 133–149.
- Frahm, J.P. & Gradstein, S.R. (1991). An altitudinal zonation of tropical rain forests using bryophytes. *Journal of Biogeography* 18, 669–676.
- Fukami, T. & Wardle, D.A. (2005). Long term ecological dynamics: reciprocal insights from natural and anthropogenic gradients. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B – Biological Sciences* 272, 2105–2115.
- Gaio-Oliveira, G., Dahlman, L., Máguas, C., Palmqvist, K. (2004) Growth in relation to microclimatic conditions and physiological characteristics of four *Lobaria pulmonaria* populations in two contrasting habitats. *Ecography* 27, 13–28.
- Galloway, D.J., Aptroot, A. (1995). Bipolar lichens: a review. *Cryptogamic Botany* 5(2), 184–191.
- Galloway, J.N., Townsend, A.R., Erisman, J.W., Bekunda, M., Cai, Z., Freney, J.R., Martinelli, L.A., Seitzinger, S.P., Sutton, M.A. (2008). Transformation of the nitrogen cycle: Recent trends, questions, and potential solutions. *Science* 320,889–892.
- Galun M (1988) Lichenization. In: *Handbook of Lichenology*. Volume II. M. Galun (ed.) CRC Press, Inc., Boca Raton, pp. 153–169.
- Gargas, A., DePriest, P.T., Grube, M., Tehler, A. (1995). Multiple origins of lichen symbioses in fungi suggested by SSU rDNA phylogeny. *Science* 268 (5216), 1492–1495.
- Garty, J., Karary, Y., Harel, J. (1993). The impact of air pollution on the integrity of cell membranes and chlorophyll in the lichen *Ramalina duriaei* (De Not.) Bagl. transplanted to industrial sites in Israel. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 24 (4), 455–460.
- Garty, J., Ronen, R., Galun, M., (1985). Correlation between chlorophyll degradation and the amount of some elements in the lichen *Ramalina duriaei* (De Not.) Jatta. *Environmental and Experimental Botany* 25, 67–74.
- Gasulla Vidal, F. (2009). Insights on desiccation tolerance of the lichen photobiont *Trebouxia* sp. pl. In both thalline and isolated ones. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia.

- Gauslaa, Y. & Coxson, D. (2011). Interspecific and intraspecific variations in water storage in epiphytic old forest foliose lichens. *Botany* 89 (11), 787–798.
- Gauslaa, Y. & Solhaug, K.A. (1996). Differences in the susceptibility to light stress between epiphytic lichens of ancient and young boreal forest stands. *Functional Ecology* 10, 344–354.
- Gauslaa, Y. & Solhaug, K.A. (1998). The significance of thallus size for the water economy of the cyanobacterial old-forest lichen *Degelia plumbea*. *Oecologia* 116, 76–84.
- Gauslaa, Y. & Solhaug, K.A. (1999). High-light damage in air-dry thalli of the old forest lichen *Lobaria pulmonaria* – interactions of irradiance, exposure duration and high temperature. *Journal of Experimental Botany* 50 (334), 697–705.
- Gauslaa, Y. & Solhaug, K.A. (2001). Fungal melanins as a sun screen for symbiotic green algae in the lichen *Lobaria pulmonaria*. *Oecologia* 126(4), 462–471.
- Gavilán, R. (1994). Estudio de las relaciones entre la vegetación y el clima en el Sistema Central Español. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid.
- Genty, B., Briantais, I.M., Baker, N. R. (1989). The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta* 990, 87–92.
- Gholz, H.L., Wedin, D., Smitherman, S., Harmon, M.E., Parton, W.J. (2000). Long term dynamics of pine and hardwood litter in contrasting environments: toward a global model of decomposition. *Global Change Biol.* 6, 751–755.
- Gorin, P.A.J., Baron, M., Iacomini, M. (1988). Storage products of lichens. In: *Handbook of Lichenology*. Volume III. M. Galun (ed.) CRC Press, Inc., Boca Raton, pp. 9–23.
- Grau, O., Grytnes, J.A., Birks, H.J.B. (2007). A comparison of altitudinal species richness patterns of bryophytes with other plant groups in Nepal, Central Himalaya. *Journal of Biogeography*, 34, 1907–1915.
- Green, T.G.A., Büdel, B., Meyer, A., Zellner, H., Lange, O.L. (1997). Temperate rainforest lichens in New Zealand, light response of photosynthesis. *New Zealand Journal of Botany* 35, 493–504.
- Green, T.G.A., Kilian, E., Lange, O.L. (1991). *Pseudocyphellaria dissimilis*: a desiccation-sensitive, highly shade-adapted lichen from New Zealand. *Oecologia* 85, 498–503.
- Green, T.G.A. & Lange, O.L. (1991). Ecophysiological adaptations of the lichen genera *Pseudocyphellaria* and *Sticta* to south temperate rainforests. *Lichenologist* 23 (3), 267–282.
- Green, T.G.A. & Lange, O.L. (1994). Photosynthesis in poikilohydric plants: a comparison of lichens and bryophytes. In: Schulze, E.D., Caldwell, M.C. (eds.): *Ecophysiology of Photosynthesis*. Ecological Studies, Springer-Verlag, Berlín, Heidelberg, New York, pp. 319–341.
- Green, T.G.A., Meyer, A., Büdel, B., Zellner, H., Lange, O.L. (1995). Diel patterns of CO<sub>2</sub>-exchange for six lichens from a temperate rain forest in New Zealand. *Symbiosis* 18 (3), 251–273.
- Green, T.G.A., Sancho, L.G., Pintado, A. (2011a). Ecophysiology of Desiccation/Rehydration Cycles in Mosses and Lichens. In: *Plant Desiccation Tolerance*. Lüttge, U., Beck, A., Erwin, Bartels, D. (eds.), 121–137. Ecological Studies, Springer, ISBN 978-3-642-19106-0, Berlín Heidelberg, Alemania.
- Green, T.G.A., Sancho, L.G., Pintado, A., Schroeter, B. (2011b). Functional and spatial pressures on terrestrial vegetation in Antarctica forced by global warming. *Polar Biology* 34 (11), 1643–1656.
- Green, T.G.A., Sancho, L.G., Türk, R., Seppelt, R.D., Hogg, I.D. (2011c). High diversity of lichens at 84°S, Queen Maud Mountains, suggests preglacial survival of species in the Ross Sea region, Antarctica. *Polar Biology* 34(8), 1211–1220.

- Green, T.G.A., Schroeter, B., Kappen, L., Seppelt, R.D., Maseyk, K. (1998). An assessment of the relationship between chlorophyll a fluorescence and CO<sub>2</sub> gas exchange from field measurements on a moss and lichen. *Planta* 206, 611–618.
- Green, T.G.A., Snelgar, W.P., Wilkins, A.L. (1985). Photosynthesis, water relations and thallus structure of *Stictaceae* lichens. In: Brown, D.H. (ed) *Lichen physiology and cell Biology*. Plenum, New York.
- Grytnes, J.A., Heegaard, E., Ihlen, P.G. (2006) Species richness of vascular plants, bryophytes, and lichens along an altitudinal gradient in western Norway. *Acta Oecologica-International Journal of Ecology*, 29, 241–246.
- Hadley, A. (2010). CombineZP. <<http://www.hadleyweb.pwp.blueyonder.co.uk>>.
- Hájek, J., Barták, M., Dubov, J. (2006). Inhibition of photosynthetic processes in foliose lichens induced by temperature and osmotic stress. *Biologia Plantarum* 50(4), 624–634.
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T., Ryan, P.D. (2001). PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4 (1), 9pp. [http://palaeo-electronica.org/2001\\_1/past/issue1\\_01.htm](http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm)
- Harrell, Jr. F.E., with contributions from many other users (2012). Hmisc: Harrell Miscellaneous. R package version 3.9–3. <<http://CRAN.R-project.org/web/packages/Hmisc>>.
- Havaux, M. & Niyogi, M.M. (1999). The violoxanthin cycle protects plants from photooxidative damage by more than one mechanism, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 8762–8767.
- Heber, U. & Lüttge, U. (2011). Lichens and Bryophytes: Light Stress and Photoinhibition in Desiccation/Rehydration Cycles – Mechanisms of Photoprotection. In: *Plant Desiccation Tolerance*. Lüttge, U., Beck, A., Erwin, Bartels, D. (eds.), 121–137. Ecological Studies, Springer, Berlin Heidelberg, Alemania.
- Hemp, A. (2009). Climate change and its impact on the forests of Kilimanjaro. *African Journal of Ecology* 47, 3–10.
- Hestmark, G. (1992). Sex, size, competition and escape – strategies of reproduction and dispersal in *Lasallia pustulata* (*Umbilicariaceae*, *Ascomycetes*). *Oecologia* 92, 305–312.
- Hestmark, G. (1997). Competitive behaviour of umbilicate lichens – an experimental approach. *Oecologia* 111, 523–528.
- Hestmark, G., Schroeter, B., Kappen, L. (1997). Intrathalline and size-dependent patterns of activity in *Lasallia pustulata* and their possible consequences for competitive interactions. *Functional Ecology* 11, 318–322.
- Hestmark, G., Skogedal, O., Skullerud, Ø. (2004). Growth, reproduction, and population structure in four alpine lichens during 240 years of primary colonization. *Canadian Journal of Botany* 82, 1356–1362.
- Hijmans, R.J., Cameron, S.E., Parra, J.L., Jones, P.G., Jarvis, A. (2005). Very high resolution interpolated global terrestrial climate surfaces. *International Journal of Climatology*, 25, 1965–1978.
- Hilmo, O. (2002). Growth and morphological response of old-forest lichens transplanted into a young and an old *Picea abies* forest. *Ecography* 25, 329–335.
- Honegger, R. (1991). Functional aspects of the lichen symbiosis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 42, 553–578.
- Hothorn, T., Bretz, F., Westfall, P. (2008). Simultaneous Inference in General Parametric Models. *Biometrical Journal* 50(3), 346–363.
- Hovenden, M.J. (2000): Seasonal trends in nitrogen status of Antarctic lichens. *Annals of Botany* 86(4), 717–721.
- Hyvärinen, M. & Crittenden, P.D. (1998). Growth of the cushion-forming lichen, *Cladonia portentosa*, at nitrogen-polluted and unpolluted heathland sites. *Environmental and experimental botany* 40, 67–76.

- Hyvärinen, M. & Crittenden, P.D. (2000). P-33 translocation in the thallus of the mat-forming lichen *Cladonia portentosa*. *New Phytologist* 145, 281–288.
- Inselsbacher, E., Öhlund, J., Jämtgård, S., Huss-Danell, K., Näsholm, T. (2011). The potential of microdialysis to monitor organic and inorganic nitrogen compounds in soil. *Soil Biol Biochem* 43, 1321–1332.
- IPCC (2007). *Climate Change 2007: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [Core Writing Team, Pachauri, R.K and Reisinger, A. (eds.)]. IPCC, Geneva, Switzerland, 104 pp.
- Jensen, M. (2002). Measurement of chlorophyll fluorescence in lichens. In *Protocols in Lichenology. Culturing, Biochemistry, Ecophysiology and Use in Biomonitoring*. I. Kranner, R. P. Beckett, A. K. Varma, eds., pp. 135–151. Springer, Berlin.
- Joffre, R., Rambal, S., Damesin, C. (2007). Functional attributes in Mediterranean-type ecosystems. In: *Functional plant ecology*. Pugnaire, F., Valladares, F. (eds.) pp. 285–312. CRC Publishers, New York.
- Johansson, O., Nordin, A., Olofsson, J., Palmqvist, K. (2010). Responses of epiphytic lichens to an experimental whole-tree nitrogen-deposition gradient. *New Phytologist* 188 (4), 1075–1084.
- Kalin Arroyo M. T., Armesto J. J., Villagrán C. (1981). Plant phenological patterns in the high Andean cordillera of central Chile. *J. Ecol.* 69,205–223.
- Kallio, P., & Heinonen, S. (1971). Influence of short-term low temperature on net photosynthesis in some subarctic lichens. *Rept. Kevo Subarctic Res. Sta.* 8, 63–72.
- Kappen, L. (1973). Response to extreme environments. In: *The Lichens*: V. Ahmadjian & M. E. Hale (eds.). Academic Press, New York and London, pp. 311–380.
- Kappen, L. (1983). Ecology and physiology of the Antarctic fruticose lichen *Usnea sulphurea* (Koenig) Th. Fries. *Polar Biology* 1, 249–255.
- Kappen, L. (1988). Ecophysiological relationships in different climatic regions. In: M. Galun (ed.): *CRC Handbook of Lichenology. Volume II*. CRC Press, Inc., Boca Raton, pp. 37–100.
- Kappen, L. & Straka, H. (1988). Pollen and spores transport into the Antarctic. *Polar Biology* 8, 173–180.
- Kershaw, K.A. (1975). Studies on lichen-dominated systems. XIV. The comparative ecology of *Alectoria nitidula* and *Cladina alpestris*. *Canadian Journal of Botany* 53, 2608–2613.
- Kershaw, K.A. (1983). The thermal operating-environment of a lichen. *Lichenologist* 15, 191–207.
- Kershaw, K.A. (1985). *Physiological Ecology of Lichens*. Cambridge University Press, Cambridge. 293 pp.
- Kershaw, K.A. & MacFarlane, J.D. (1980). Physiological-environmental interactions in lichens. X. Light as an ecological factor. *New Phytologist* 84, 687–702.
- Kershaw, K.A. & MacFarlane, J.D. (1982). Physiological-environmental interactions in lichens. XIII. Seasonal constancy of nitrogenase activity, net photosynthesis and respiration, in *Collema furfuraceum* (Arn.) DR. *New Phytologist* 90, 723–734.
- Kessler, M. (2000). Altitudinal zonation of Andean cryptogam communities. *J. Biogeogr.* 27, 275–282.
- Körner, C. (1999). *Alpine Plant Life: Functional Plant Ecology of High Mountain Ecosystems* (Springer, Berlin), pp. 1–338.
- Körner, C. (2007). The use of “altitude” in ecological research. *Trends Ecol Evol* 22,569–574.
- Körner, C., Larcher, W. (1988) Plant life in cold climates. In: Long, S.F., Woodward, F.I. (eds.), *Plants and temperature* (Symp. Soc. Exp. Biol. 42). The Company of Biol Ltd, Cambridge, pp 25–57.



- Körner, C. & Paulsen, J. (2004). A world-wide study of high altitude treeline temperatures. *Journal of Biogeography* 31, 713–732.
- Körner, C., Paulsen, J., Spehn, E.M. (2011). A definition of mountains and their bioclimatic belts for global comparisons of biodiversity data. *Alpine Botany* DOI 10.1007/s00035-011-0094-4.
- Kranner, I., Beckett, R., Hochman, A., Nash III, T. H. (2008). Desiccation-tolerance in lichens: a review. *The Bryologist* 111(4), 576–593.
- Lambers, H. (1985). Respiration in intact plants and tissues: its regulation and dependence on environmental factors, metabolism and invaded organisms. *In: Douce R, Day DA, eds. Higher plant respiration*. Berlín, Alemania: Springer Verlag, 418–465.
- Lange, O.L. (1965). Der CO<sub>2</sub>-Gaswechsel von Flechten bei tiefen Temperaturen. *Planta* 64, 1–19.
- Lange, O.L. (2002). Photosynthetic productivity of the epilithic lichen *Lecanora muralis*: long-term field monitoring of CO<sub>2</sub> exchange and its physiological interpretation. I. Dependence of photosynthesis on water content, light, temperature, and CO<sub>2</sub> concentration from laboratory measurements. *Flora* 197(4), 233–249.
- Lange, O.L. (2003a). Photosynthetic productivity of the epilithic lichen *Lecanora muralis*: long-term field monitoring of CO<sub>2</sub> exchange and its physiological interpretation. II. Diel and seasonal patterns of net photosynthesis and respiration. *Flora* 198, 55–70.
- Lange, O.L. (2003b). Photosynthetic productivity of the epilithic lichen *Lecanora muralis*: long-term field monitoring of CO<sub>2</sub> exchange and its physiological interpretation. III. Diel, seasonal and annual carbon budgets. *Flora* 198, 277–292.
- Lange, O.L. & Green, T.G.A. (2005). Lichens show that fungi can acclimate their respiration to seasonal changes in temperature. *Oecologia* 142, 11–19.
- Lange, O.L. & Green, T.G.A. (2006). Nocturnal respiration of lichens in their natural habitat is not affected by preceding diurnal net photosynthesis. *Oecologia* 148, 396, 404.
- Lange, O.L. & Kilian, E. (1985). Reaktivierung der Photosynthese trockener Flechten durch Wasserdampfaufnahme aus dem Luftraum: Artspezifisch unterschiedliches Verhalten. *Flora* 176, 7–23.
- Lange, O.L. & Redón, J. (1983). Epiphytische Flechten im Bereich einer chilenischen "Nebeloase" (Fray Jorge). II. Ökophysiologische Charakterisierung von CO<sub>2</sub>- Gaswechsel und Wasserhaushalt. *Flora* 174: 245–284.
- Lange, O.L., Belnap, J., Reichenberger, H., Meyer, A. (1997). Photosynthesis of green algal soil crust lichens from arid lands in southern Utah, USA: role of water content on light and temperature responses of CO<sub>2</sub> exchange. *Flora* 192, 1–15.
- Lange, O.L., Büdel, B., Heber, U., Meyer, A., Zellner, H., Green, T.G.A. (1993). Temperate rainforest lichens in New Zealand: high thallus water content can severely limit photosynthetic CO<sub>2</sub> exchange. *Oecologia* 95, 303–313.
- Lange, O.L., Büdel, B., Meyer, A., Zellner, H., Zotz, G. (2000) Lichen carbon gain under tropical conditions: water relations and CO<sub>2</sub> exchange of three *Leptogium* species of a lower montane rainforest in Panama. *Flora* 195, 172–190.
- Lange, O.L., Green, T.G.A., Heber, U. (2001). Hydration-dependent photosynthetic production of lichens: what do laboratory studies tell us about field performance. *Journal of Experimental Botany* 52 (363): 2033–2042.
- Lange, O.L., Green, T.G.A., Meyer, A., Zellner, H. (2007). Water relations and carbon dioxide exchange of epiphytic lichens in the Namib fog desert. *Flora* 202, 479–487.
- Lange, O.L., Green, T.G.A., Reichenberger, H. (1999). The response of lichen photosynthesis to external CO<sub>2</sub> concentration and its interaction with thallus water-status. *Journal of Plant Physiology* 154, 157–166.
- Lange, O.L., Green, T.G.A., Reichenberger, H., Meyer, A. (1996). Photosynthetic depression at high thallus water contents in lichens: concurrent use of gas exchange and

- fluorescence techniques with a cyanobacterial and a green algal *Peltigera* species. *Botanica Acta* 109, 43–50.
- Lange, O.L., Kilian, E., Ziegler, H. (1986). Water vapour uptake and photosynthesis of lichens: performance differences in species with green and blue-green algae as phycobionts. *Oecologia* 71, 104–110.
- Lange, O.L., Leisner, J.M.R., Bilger, W. (1999). Chlorophyll fluorescence characteristics of the cyanobacterial lichen *Peltigera rufescens* under field conditions. II. Diel and annual distribution of metabolic activity and possible mechanisms to avoid photoinhibition. *Flora* 194, 413–430.
- Lange, O.L., Meyer, A., Ullmann, I., Zellner, H. (1991). Mikroklima, Wassergehalt und Photosynthese von Flechten in der küstennahen Nebelzone der Namib-Wüste: Messungen während der herbstlichen Witterungsperiode. *Flora* 185 (4), 233–266.
- Lange, O.L., Reichenberger, H., Meyer, A. (1995). High thallus water content and photosynthetic CO<sub>2</sub> exchange of lichens. Laboratory experiments with soil crust species from local xerothermic steppe formations in Franconia, Germany. In: *Contributions to lichenology in Honour of Gerhard Follmann*. Daniëls, F.J.A., Schulz, M., Peine, J. (eds.). Geobotanical and Phytotaxonomical Study Group, Botanical Institute, University of Cologne, Cologne, pp. 139–153.
- Lange, O.L., Schulze, E.D., Koch, W. (1970). Experimentell-ökologische Untersuchungen an Flechten der Negev-Wüste. II. CO<sub>2</sub>-Gaswechsel und Wasserhaushalt von *Ramalina maciformis* (Del.) Bory am natürlichen Standort während der sommerlichen Trockenperiode. *Flora* 159, 38–62.
- Lange, O.L., Tenhunen, J.D. (1982). Water relations and photosynthesis of desert lichens. *Journal of the Hattori Botanical Laboratory* 53, 309–313.
- Lara, A., Aravena, J.C., Villalba, R., Wolodarsky-Franke, A., Luckman, B., Wilson, R. (2001). Dendroclimatology of high-elevation *Nothofagus pumilio* forests at their northern distribution limit in the central Andes of Chile. *Canadian Journal of Forest Research* 31, 925–936.
- Larcher, W. & Vareschi, V. (1988). Variation in morphology and functional traits of *Dictyonema glabratum* from contrasting habitats in the Venezuelan Andes. *Lichenologist* 20 (3), 269–277.
- Larcher, W. (1995). *Physiological plant ecology*. Springer Verlag, Berlin, Alemania.
- Larsen Vilsholm, R., Wolseley, P.A., Søchting, U., Chimonides, P.J. (2009). Biomonitoring with lichens on twigs. *Lichenologist* 41, 189–202.
- Larson, D.W. (1979). Preliminary studies of the physiological ecology of *Umbilicaria* lichens. *Canadian Journal of Botany* 57, 1398–1406.
- Larson, D.W. (1980). Seasonal change in the pattern of net CO<sub>2</sub> exchange in *Umbilicaria* lichens. *New Phytologist* 84, 349–369.
- Larson, D.W. (1982). Environmental stress and *Umbilicaria* lichens: the effect of subzero temperature pretreatments. *Oecologia* 55, 268–278.
- Larson, D.W. (1984). Habitat overlap/niche segregation in two *Umbilicaria* lichens: a possible mechanism. *Oecologia* 62, 118–125.
- Larson, D.W. (1987). The absorption and release of water by lichens. In: E. Peveling (ed.): *Progress and Problems in Lichenology in the Eighties*. Bibliotheca Lichenologica No. 25. J. Cramer, Berlin–Stuttgart, pp. 351–360.
- Larson, D.W., Kershaw, K.A. (1976). Studies on lichen-dominated systems. XVIII. Morphological control of evaporation in lichens. *Canadian Journal of Botany* 54, 2061–2073.
- Larsson, P., Večeřová, K., Cempírková, H., Solhaug, K.A., Gauslaa, Y. (2009). Does UV-B influence biomass growth in lichens deficient in sun-screening pigments?. *Environmental and Experimental Botany* 67(1), 215–221.



- Larsson, P., Solhaug, K.A., Gauslaa, Y. (2012). Seasonal partitioning of growth into biomass and area expansion in a cephalolichen and a cyanolichen of the old forest genus *Lobaria*. *New Phytologist* 194 (4), 991–1000.
- Lawton, R.O., Nair, U.S., Pielke, R.A., Welch, R.M. (2001). Climatic impact of tropical lowland deforestation on nearby montane cloud forests. *Science* 294, 584–587.
- Lê, S., Josse, J., Husson, F. (2008). FactomineR: An r package for multivariate analysis. *Journal of Statistical Software*, 25(1), 1–18.
- Lechowicz, M.J. & Adams, M.S. (1974). Ecology of *Cladonia* lichens. II. Comparative physiological ecology of *C. mitis*, *C. rangiferina* and *C. uncialis*. *Canadian Journal of Botany* 52, 411–422.
- Lechowicz, M.J. & Adams, M.S. (1979). Net CO<sub>2</sub> exchange in *Cladonia* lichen species endemic to southeastern North America. *Photosynthetica* 13, 155–162.
- Legaz, M.E., Avalos, A., de Torres, M., Escribano, M.I., González, A., Martín-Falquina, A., Perez-Urria, E., Vicente, C. (1986a). Annual variations in arginine metabolism and phenolic content of *Evernia prunastri*. *Environmental and Experimental Botany* 26, 385–396.
- Legaz, M.E., Vicente, C., Ascaso, C., Pereira, E.C., Xavier Filho, L. (1986b). Pigment analysis of sun and shade populations of *Cladonia verticillaris*. *Biochemical Systematics and Ecology* 14, 575–582.
- Leisner, J.M.R., Green, T.G.A., Lange, O.L. (1997). Photobiont activity of a temperate crustose lichen: long-term chlorophyll fluorescence and CO<sub>2</sub> exchange measurements in the field. *Symbiosis* 23(2+3), 165–182.
- Lenoir, J., Gegout, J.C., Guisan, A., Vittoz, P., Wohlgemuth, T., Zimmermann, N.E., Dullinger, S., Pauli, H., Willner, W., Svenning J.C. (2010). Going against the flow: potential mechanisms for unexpected downslope range shifts in a warming climate. *Ecography*, 33, 295–303.
- Levesque, E., Henry G.H.R., Svoboda, J. (1997). Phenological and growth responses of *Papaver radicum* along altitudinal gradients in the Canadian high arctic. *Global Change Biology* 3, 125–145.
- Levins, R. (1968). *Evolution in Changing Environments*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey.
- Li, C., Liu, S., Berninger, F. (2004). *Picea* seedlings show apparent acclimation to drought with increasing altitude in the eastern Himalaya. *Trees Struct Funct* 18, 277–283.
- Li, C., Xu, G., Zang, R., Korpelainen, H., Berninger, F. (2007). Sex-related differences in leaf morphological and physiological responses in *Hippophae rhamnoides* along an altitudinal gradient. *Tree Physiol.* 27,399–406.
- Li, C., Zhang, X., Liu, X., Luukkanen, O., Berninger, F. (2006). Leaf morphological and physiological responses of *Quercus aquifolioides* along an altitudinal gradient. *Silva Fennica* 40, 5–13.
- Løfall, B. P. & Timdal, E. (2005). *Umbilicaria decussata* and *U. lyngei* in Norway and Svalbard. *Graphis Scripta* 17(2), 43–47.
- Loppi, S., Pirintsos, S.A., De Dominicis, V. (1997). Analysis of the distribution of epiphytic lichens on *Quercus pubescens* along an altitudinal gradient in a Mediterranean area (Tuscany, central Italy). *Israel Journal of Plant Sciences* 45, 53–58.
- Lord, J.M., Kelly, D. (1999). Seed production in *Festuca novae-zelandiae*: the effect of altitude and pre-dispersal predation. *New Zealand Journal of Botany*, 37 (3), 503–509.
- MacFarlane, J.D. & Kershaw, K.A. (1978). Thermal sensitivity in lichens. *Science* 201, 739–741.
- MacFarlane, J.D., Kershaw, K.A., Webber, M.R. (1983). Physiological–environmental interactions in lichens. XVII. Phenotypic differences in the seasonal pattern of net photosynthesis in *Cladonia rangiferina*. *New Phytologist* 94, 217–233.

- MacKenzie, T.D.B., Johnson, J., Campbell, D.A. (2004). Environmental change provokes rapid macromolecular reallocations within the photosynthetic system in a static population of photobionts in the lichen *Lobaria pulmonaria*. *Lichenologist* 36(6), 425–433.
- MacKenzie, T.D.B., Król, M., Huner, N.P.A., Campbell, D.A. (2002). Seasonal changes in chlorophyll fluorescence quenching and the induction and capacity of the photoprotective xanthophyll cycle in *Lobaria pulmonaria*. *Canadian Journal of Botany* 80(3), 255–261.
- MacKenzie, T.D.B., MacDonald, T.M., Dubois, L.A., Campbell, D.A. (2001). Seasonal changes in temperature and light drive acclimation of photosynthetic physiology and macromolecular content in *Lobaria pulmonaria*. *Planta* 214, 57–66.
- Mäkinen, H., Nöjd, P., Kahle, H.P., Neumann, U., Tveite, B., Mielikäinen, K., Röhle, H., Spiecker, H. (2002). Radial growth variation of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) across latitudinal and altitudinal gradients in central and northern Europe. *Forest Ecology and Management* 171, 243–259.
- Margulis, L. (1970). *Origin of eukaryotic cells*. Yale University Press, New Haven.
- Maxwell, K. & Johnson, G.N. (2000). Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *J. Exp. Bot.* 51, 659–668.
- Millar, C.I., Westfall, R.D., Delany, D.L., King, J.C., Graumlich, L.J. (2004). Response of subalpine conifers in the Sierra Nevada, California, USA, to 20th-century warming and decadal climate variability. *Arctic Antarctic and Alpine Research* 36, 181–200.
- Muñoz, J., Felicísimo, Á.M., Cabezas, F., Burgaz, A.R., Martínez, I. (2004) Wind as a long-distance dispersal vehicle in the Southern Hemisphere. *Science* 304, 1144–1147.
- Nair, U.S., Lawton, R.O., Welch, R.M., Pielke Sr., R.A. (2003) Impact of land use on Costa Rican tropical montane cloud forests: Sensitivity of cumulus cloud field characteristics to lowland deforestation. *J. Geophys. Res.*, 108 (D7), 4206.
- Nash, T.H. III (1996). Nutrients, elemental accumulation and mineral cycling. In: *Lichen biology*. Nash, T.H. III (ed.). Cambridge University Press, Cambridge, pp 136–153
- Nash, T.H. III, Moser, T.J., Link, S.O. (1980). Nonrandom variation of gas exchange within arctic lichens. *Canadian Journal of Botany* 58, 1181–1186.
- Nash, T.H., III & Olafsen, A.G. (1995): Climate change and the ecophysiological response of Arctic lichens. *Lichenologist* 27(6), 559–565.
- Nelsen, M. P. & Gargas, A. (2009). Assessing clonality and chemotype monophyly in *Thamnotia* (*Pertusariales: Icmadophilaceae*). *The Bryologist* 112, 42–53.
- Nicotra, A. B., Hermes, J. P., Jones, C. S., & Schlichting, C. D. (2007). Geographic variation and plasticity to water and nutrients in *Pelargonium australe*. *New Phytologist* 176 (1), 136–149.
- Niewiadomska, E., Jarowiecka, D., Czarnota, P. (1998). Effect of different levels of air pollution on photosynthetic activity of some lichens. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 67, 259–262.
- Nimis, P.L. (1993). *The Lichens of Italy*. Museo Regionale di Scienze Naturali, Turin. 897 pp.
- Ogaya, R., Peñuelas, J., Asensio, D., Llusà, J. (2011). Chlorophyll fluorescent responses to temperature and water availability in two co-dominant Mediterranean shrub and tree species in a long-term field experiment simulating climate change. *Environ. Exp. Bot.* 71, 123–127.
- Palmqvist, K. (2000). Carbon economy of lichens. *New Phytologist* 148, 11–36.
- Palmqvist, K. & Dahlman, L. (2006). Responses of the green algal foliose lichen *Platismatia glauca* to increased nitrogen supply. *New Phytologist* 171, 343–356.

- Palmqvist, K. & Sundberg, B. (2000). Light use efficiency of dry matter gain in five macrolichens: relative impact of microclimate conditions and species-specific traits. *Plant, Cell and Environment* 23, 1–14.
- Palmqvist, K., Campbell, D., Ekblad, A., Johansson, H. (1998). Photosynthetic capacity in relation to nitrogen content and its partitioning in lichens with different photobionts. *Plant, Cell and Environment* 21, 361–372.
- Palmqvist, K., Dahlman, L., Jonsson, A., Nash III, T.H. (2008). The carbon economy of lichens. In: *Lichen Biology*. Nash III, T. H. (ed.). Cambridge University Press, Cambridge. viii+486 pages, pp. 182–215.
- Palmqvist, K., Dahlman, L., Valladares, F., Tehler, A., Sancho, L.G., Mattson, J.-E. (2002). CO<sub>2</sub> exchange and thallus nitrogen across 75 contrasting lichen associations from different climate zones. *Oecologia* 133, 295–306.
- Pannewitz, S., Schlenzog, M., Green, T.G.A., Sancho, L.G., Schroeter, B. (2003). Are lichens active under snow in continental Antarctica? *Oecologia* 135, 30–38.
- Pereyra, M.T., Prieto, A., Bernabé, M., Leal, J.A. (2003): Studies of new polysaccharides from *Lasallia pustulata* (L.) Hoffm. *Lichenologist* 35(2), 177–185.
- Pérez-Ortega, S. (2004). Biodiversidad líquénica en la Reserva Integral de Muniellos (Asturias). Tesis doctoral. Facultad de Ciencias, Universidad de Valencia.
- Phillips, S.J., Anderson, R.P., Schapire, R.E. (2006). Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecological Modelling* 190, 231–259.
- Phillips, S.J., Dudík, M., Schapire, R.E. (2004). A maximum entropy approach to species distribution modeling. In *Proceedings of the Twenty-First International Conference on Machine Learning*, pp. 655–662.
- Pigliucci, M. (2001). *Phenotypic Plasticity: Beyond Nature and Nurture*. John Hopkins University Press, Baltimore.
- Pintado, A. (1996). Estudio ecofisiológico del grupo *Ramalina polymorpha* en la Sierra de Guadarrama. Tesis doctoral. Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid.
- Pintado, A. & Sancho, L.G. (2002). Ecological significance of net photosynthesis activation by water vapour uptake in *Ramalina capitata* from rain protected habitats in central Spain. *Lichenologist* 34(5), 403–413.
- Pintado, A., Sancho, L.G., Green, T.G.A., Blanquer, J.M., Lázaro, R., (2005). Functional ecology of the biological soil crust in semiarid SE Spain: sun and shade populations of *Diploschistes diacapsis* (Ach.) Lumbsch. *Lichenologist* 37, 425–432.
- Pintado, A., Sancho, L.G., Valladares, F. (2001). The influence of microclimate on the composition of lichen communities along an altitudinal gradient in the maritime Antarctic. *Symbiosis* 31, 69–84.
- Pintado, A., Valladares, F., Sancho, L.G. (1997). Exploring phenotypic plasticity in the lichen *Ramalina capitata*: morphology, water relations and chlorophyll content in North- and South-facing populations. *Annals of Botany* 80, 345–353.
- Pirintsos, S.A., Diamantopoulos, J., Stamou, G.P. (1993). Analysis of the vertical distribution of epiphytic lichens on *Pinus nigra*. *Vegetatio* 109(1), 63–70.
- Pirintsos, S.A., Diamantopoulos, J., Stamou, G.P. (1995). Analysis of the distribution of epiphytic lichens within homogeneous *Fagus sylvatica* stands along an altitudinal gradient (Mount Olympos, Greece). *Vegetatio* 116(1), 33–40.
- Pirintsos, S.A., Paoli, L., Loppi, S., Kotzabasis, K. (2011). Photosynthetic performance of lichen transplants as early indicator of climatic stress along an altitudinal gradient in the arid Mediterranean area *Climatic Change* 107 (3–4), 305–328.

- Planelles, V. & Legaz, M.E. (1987). Purification and some properties of the secreted arginase of the lichen *Evernia prunastri* and its regulation by usnic acid. *Plant Science* 51(1), 9–16.
- Powles, S. (1984). Photoinhibition of photosynthesis induced by visible light. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35, 15–44.
- Proctor, M.C.F. & Smirnov, N. (2011). Ecophysiology of photosynthesis in bryophytes: major roles for oxygen photoreduction and non-photochemical quenching? *Physiologia Plantarum* 141, 130–140.
- Prosser, C.L. (1955). Physiological variation in animals. *Biological Reviews*, 30, 229–262.
- R Development Core Team (2009). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3–900051–07–0, URL <http://www.R-project.org>.
- Raggio, J., Pintado, A., Ascaso, C., De La Torre, R., De Los Ríos, A., Wierzchos, J., Horneck, G., Sancho L.G. (2011). Whole Lichen Thalli Survive Exposure to Space Conditions: Results of Lithopanspermia Experiment with *Aspicilia fruticulosa*. *Astrobiology* 11, 281–292.
- Ramstad, S. & Hestmark, G. (2001). Population structure and size-dependent reproductive effort in *Umbilicaria spodochoa*. *Mycologia* 93 (3), 453–458.
- Raven, J.A. (1992). Energy and nutrient acquisition by autotrophic symbioses and their asymbiotic ancestors. *Symbiosis* 14, 33–60.
- Reiter, R., Green, T.G.A., Schroeter, B., Türk, R. (2007). Photosynthesis of three *Umbilicaria* species from lichen-dominated communities of the alpine/nival belt of the Alps measured under controlled conditions. *Phyton (Austria)* 46 (2), 247–258.
- Reiter, R., Höftberger, M., Green, T.G.A., Türk, R. (2008). Photosynthesis of lichens from lichen-dominated communities in the alpine/nival belt of the Alps — II: laboratory and field measurements of CO<sub>2</sub> exchange and water relations. *Flora* 203(1), 34–46.
- Rikkinen J. (1997). Habitat shifts and morphological variation of *Pseudevernia furfuracea* along a topographical gradient. *Symbolae Botanicae Upsaliensis* 32, 223–245.
- Røhr, P.C., Killingtveit, Å. (2003). Rainfall distribution on the slopes of Mt. Kilimanjaro. *Hydrological Sciences Journal–Journal des Sciences Hydrologiques* 48, 65–78.
- Ronen, R. & Galun, M. (1984). Pigment extraction from lichens with dimethylsulfoxide (DMSO) and estimation of chlorophyll degradation. *Environ Exp Bot* 24,239–245
- Rundel, P.W. (1982). The role of morphology in the water relations of desert lichens. *Journal of the Hattori Botanical Laboratory* 53, 315–320.
- Rundel, P.W. (1995). Adaptive significance of some morphological and physiological characteristics in Mediterranean plants: facts and fallacies. In: *Time scales of biological responses to water constraints*. J. Roy, J. Aronson, F. di Castri, (eds.) pp 119–139. SP Academic, Amsterdam.
- Sala, O. E., Chapin, F.S. III, Armesto, J.J., Berlow, E., Bloomfield, J. Dirzo, R., Huber–Sanwald, E., Huenneke, L.F., Jackson, R.B., Kinzig, A., Leemans, R., Lodge, D.M., Mooney, H.A., Oesterheld, M., Poff, N.L., Sykes, M.T., Walker, B.H., Walker, M., Wall, D.H. (2000). Global biodiversity scenarios for the year 2100. *Science* 287,1770–1774.
- Salt, G. (1954). A contribution to the ecology of Upper Kilimanjaro. *Journal of Ecology* 42,375–423.
- Sancho, L.G. (1986). Flora y vegetación líquénica saxícola de los pisos oro– y criomediterráneo del Sistema Central español. Tesis Doctoral. Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid.
- Sancho, L.G. (2001). Ecophysiology of oromediterranean lichens. Functional and morphological adaptations of lichens from the Spanish Mediterranean mountains. *Notiziario della Società Lichenologica Italiana* 14, 37–45.

- Sancho, L.G. & Crespo, A. (1989). *Lasallia hispanica* and related species. *Lichenologist* 21, 45–58.
- Sancho, L.G. & Kappen, L. (1989). Photosynthesis and water relations and the role of anatomy in *Umbilicariaceae* (Lichenes) from central Spain. *Oecologia* 81(4), 473–480.
- Sancho, L.G., Pintado, A., Green, T.G.A., Pannowitz, S., Schroeter, B. (2003). Photosynthetic and morphological variation within and among populations of the Antarctic lichen *Umbilicaria aprina*: implications of the thallus size. In: Jensen, M (ed.): *Lichenological Contributions in Honour of G.B. Feige*. Bibliotheca Lichenologica, J. Cramer, Berlín, Stuttgart, pp. 299–311.
- Sancho, L.G., de la Torre, R., Horneck, G., Ascaso, C., de los Ríos, A., Pintado, A., Wierzchos, J., Schuster, M. (2007). Lichens survive in space: results from the 2005 LICHENS experiment. *Astrobiology* 7, 443–454.
- Sancho, L.G., Valladares, F., Ascaso, C. (1994). Effect of hydration on colour and temperature in thalli of *Umbilicariaceae*. *Cryptogamic Botany* 4(2), 227–232.
- Sancho, L. G., Valladares, F., Schroeter, B., Kappen, L. (2000). Ecophysiology of Antarctic versus temperate populations of a bipolar lichen: the key role of the photosynthetic partner. In: W. Davison, C. Howard-Williams & P. Broady (eds.): *Antarctic Ecosystems: models for wider ecological understanding*. Caxton Press, Christchurch, NZ, pp 190–194.
- Sarmiento, G. (1986). Ecologically crucial features of climate in high tropical mountains. In: Vuilleumier, F., Monasterio, M. (Eds): *High Altitude Tropical Biogeography*, Oxford University Press, Oxford, pp. 11–45.
- Scheidegger, C., Schroeter, B., Frey, B. (1995). Structural and functional processes during water vapour uptake and desiccation in selected lichens with green algal photobionts. *Planta* 197(2), 399–409.
- Scheidegger, C., Frey, B., Schroeter, B. (1997). Cellular water uptake, translocation and PSII activation during rehydration of desiccated *Lobaria pulmonaria* and *Nephroma bellum*. *Bibliotheca Lichenologica* 67, 105–117.
- Schipperges, B., Kappen, L., Sonesson, M. (1995). Intraspecific variations of morphology and physiology of temperate to arctic populations of *Cetraria nivalis*. *Lichenologist* 21, 517–529.
- Schlenzog, M., Schroeter, B., Green, T.G.A. (2000). Water dependent photosynthetic activity of lichens from New Zealand: differences in the green algal and the cyanobacterial thallus parts of photosymbiodemes. In: Schroeter, B., Schlenzog, M., Green, T.G.A. (eds.): *New Aspects in Cryptogamic Research. Contributions in Honour of Ludger Kappen*. Bibliotheca Lichenologica, J. Cramer, Berlín, Stuttgart, pp. 149–160.
- Schreiber, U., Bilger, W., Neubauer, C. (1994). Chlorophyll fluorescence as a noninvasive indicator for rapid assessment of *in vivo* photosynthesis. In Schulze, E.-D. and Caldwell, M.M. (eds) *Ecophysiology of Photosynthesis*, pp. 49–70. Springer-Verlag, Berlín.
- Schroeter, B., Kappen, L., Moldaenke, C. (1991). Continuous in situ recording of the photosynthetic activity of Antarctic lichens—established methods and a new approach. *Lichenologist* 23(3), 253–265.
- Schroeter, B., Green, T.G.A., Seppelt, R.D., Kappen, L. (1992). Monitoring photosynthetic activity of crustose lichens using a PAM-2000 fluorescence system. *Oecologia* 92(4). 457–462. Schroeter, B., Olech, M., Kappen, L., Heitland, W. (1995). Ecophysiological investigations of *Usnea antarctica* in the maritime Antarctic. I. Annual microclimatic conditions and potential primary production. *Antarctic Science* 7(3), 251–260.

- Schroeter, B., Green, T.G.A., Kappen, L., Seppelt, R.D. (1994). Carbon dioxide exchange at subzero temperatures. Field measurements on *Umbilicaria aprina* in Antarctica. *Cryptogamic Botany* 4(2), 233–241.
- Schroeter, B., Green, T.G.A., Pannowitz, S., Schlenzog, M., Sancho, L.G. (2010). Fourteen degrees of latitude and a continent apart: comparison of lichen activity over two years at continental and maritime Antarctic sites. *Antarctic Science* 22: 681–690.
- Schroeter, B., Green, T.G.A., Pannowitz, S., Schlenzog, M., Sancho, L.G. (2011). Summer variability, winter dormancy: Lichen activity over 3 years at Botany Bay, 77°S latitude, continental Antarctica. *Polar Biology* 34(1): 13–22.
- Schroeter, B., Olech, M., Kappen, L., Heitland, W. (1995). Ecophysiological investigations of *Usnea antarctica* in the maritime Antarctic. I. Annual microclimatic conditions and potential primary production. *Antarctic Science* 7(3), 251–260.
- Schulze, E.D., Beck, E., Müller-Hohenstein, K. (2002). *Pflanzenökologie*. Heidelberg, Berlín, Alemania: Spektrum Akademischer Verlag.
- Scott, M.G., Larson, D.W., 1986. The effect of winter field conditions on the distribution of two species of *Umbilicaria*. III. CO<sub>2</sub> exchange in thalli exposed to laboratory simulations of winter. *New Phytologist* 102, 327–343.
- Seriñá, E., Arroyo, R., Manrique, E. (1991). Variaciones intratalinas de sustancias liquénicas con la edad en *Lasallia pustulata* (L.) Mérat. *Acta Botánica Malacitana* 16(1), 157–163.
- Servei Meteorològic de Catalunya (2011). Anuaris de Dades meteorològiques. Generalitat de Catalunya.
- Smith, D.C., Muscatine, L., Lewis, D. (1969). Carbohydrate movement from autotrophs to heterotrophs in parasitic and mutualistic symbiosis. *Biol. Rev.* 44, 17–90.
- Snelgar, W.P. & Green, T.G.A. (1981). Ecologically-linked variation in morphology, actyelene reduction, and water relations in *Pseudocyphellaria dissimilis*. *New Phytologist* 87, 403–411.
- Søchting, U. (1995). Lichens as monitors of nitrogen deposition. *Cryptogamic Botany* 5(3): 264–269.
- Soini, E. (2005). Land use change patterns and livelihood dynamics on the slopes of Mount Kilimanjaro, Tanzania. *Agricultural Systems* 85,306–323.
- Sojo, F., Valladares, F., Sancho, L.G. (1997). Structural and physiological plasticity of the lichen *Catillaria corymbosa* in different microhabitats of the maritime Antarctica. *The Bryologist*, 100, 171–179.
- Solhaug, K.A. & Gauslaa, Y. (1996). Parietin, a photoprotective secondary product of the lichen *Xanthoria parietina*. *Oecologia* 108, 412–418.
- Solhaug, K.A., Gauslaa, Y., Nybakken, L., Bilger, W. (2003). UV-induction of sun-screening pigments in lichens. *New Phytologist* 158(1), 91–100.
- Sonesson, M. (1986). Photosynthesis in lichen populations from different altitudes in Swedish Lapland. *Polar Biology* 5, 113–124.
- Sonesson, M., Grimberg, Å., Sveinbjörnsson, B., Carlsson, B.Å. (2011). Seasonal variation in concentrations of carbohydrates and lipids in two epiphytic lichens with contrasting, snow-depth related distribution on subarctic birch trees. *The Bryologist* 114(3), 443–452.
- Stålfelt, M.G. (1939). Der Gasaustausch der Flechten. *Planta*, 29, 11–31.
- Stitt, M. (1991). Rising CO<sub>2</sub> levels and their potential significance for carbon flow in photosynthetic cells. *Plant Cell Environ.* 14:741–62.
- Strobl, A. & Türk, R. (1990). Untersuchungen zum Chlorophyllgehalt einiger subalpiner Flechtenarten. *Phyton [Austria]* 30(2), 247–264.
- Sultan, S. E. (2000). Phenotypic plasticity for plant development, function and life history. *Trends in Plant Science*, 5(12), 537–542.



- Sundberg, B., Ekblad, A., Näsholm, T., Palmqvist, K. (1999). Lichen respiration in relation to active time, temperature, nitrogen and ergosterol concentrations. *Functional Ecology* 13, 119–125.
- Sundberg, B., Näsholm, T., Palmqvist, K. (2001). The effect of nitrogen on growth and key thallus components in the two tripartite lichens, *Nephroma arcticum* and *Peltigera aphthosa*. *Plant, Cell and Environment* 24, 517–527.
- Swanson, A. & Fahselt, D. (1997). Effects of ultraviolet on polyphenolics of *Umbilicaria americana*. *Canadian Journal of Botany* 75, 284–289.
- Swanson, A., Fahselt, D., Smith, D. (1996). Phenolic levels in *Umbilicaria americana* in relation to enzyme polymorphism, altitude and sampling date. *Lichenologist* 28(4), 331–339.
- Tretiach, M. & Brown, D.H. (1995). Morphological and physiological differences between epilithic and epiphytic populations of the lichen *Parmelia pastillifera*. *Annals of Botany* 75(6), 627–632.
- Tretiach, M. & Carpanelli, A. (1992). Chlorophyll content and morphology as factors influencing the photosynthetic rate of *Parmelia caperata*. *Lichenologist* 24(1), 81–90.
- Tretiach, M., Crisafulli, P., Virgilio, D., Baruffo, L., Jensen, M. (2003). Seasonal variation of photoinhibition in an epiphytic population of the lichen *Parmelia sulcata*. In: Jensen, M (ed.): *Lichenological Contributions in Honour of G.B. Feige*. Bibliotheca Lichenologica, J. Cramer, Berlín, Stuttgart, pp. 313–327.
- Tretiach, M., Piccotto, M., Baruffo, L. (2007). Effects of ambient NO<sub>x</sub> on chlorophyll a fluorescence in transplanted *Flavoparmelia caperata*. *Environmental Science & Technology* 41(8), 2978–2984.
- Tschermak-Woess, E. (1988). The algal partner. In: *Handbook of Lichenology*. Volume I. M. Galun (ed.) CRC Press, Inc., Boca Raton, pp. 39–94.
- Türk, R. (1983). Laboruntersuchungen über den CO<sub>2</sub>-Gaswechsel von Flechten aus den mittleren Ostalpen. II. Die Abhängigkeit des CO<sub>2</sub>-Gaswechsels epigäischer, subalpiner Flechten und von *Pseudevernia furfuracea* vom Wassergehalt der Thalli. *Phyton [Austria]* 23, 1–18.
- Valladares, F. (1993). Estructura y propiedades físicas del Talo Liquéenico en la familia *Umbilicariaceae*. Tesis Doctoral. Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid.
- Valladares, F., Gianoli, E., Gómez, J.M. (2007). Ecological limits to plant phenotypic plasticity. *New Phytologist* 176, 749–763.
- Valladares, F., Sancho, L.G., Ascaso, C. (1996). Functional analysis of the intrathalline and intracellular chlorophyll concentrations in the lichen family Umbilicariaceae. *Annals of Botany* 78, 471–477.
- Valladares, F., Sancho, L.G., Manuel Chico, J., Manrique, E. (1997). Diferencias en la utilización fotosintética de radiaciones lumínicas elevadas por líquenes y plantas vasculares en la Antártida marítima. *Boletín de la Real Sociedad Española de Historia Natural (Biologica)* 93(1–4), 119–125.
- Valladares, F., Wierzchos, J., Ascaso, C. (1993). Porosimetric study of the lichen family *Umbilicariaceae*: anatomical interpretation and implications for water storage capacity of the thallus. *American Journal of Botany* 80(3), 263–272.
- Van Herk, C.M. (1999). Mapping of ammonia pollution with epiphytic lichens in the Netherlands. *Lichenologist* 31(1): 9–20.
- Vicente, C. & Xavier Filho, L. (1979). Urease regulation in *Cladonia verticilaris* (Raddi) Fr. *Phyton [Buenos Aires]* 37, 137–144.
- von Caemmerer, S. & Farquhar, G.D. (1981). Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta* 153, 376–387.

- Vráblíková, H., McEvoy, M., Solhaug, K.A., Barták, M., Gauslaa, Y. (2006). Annual variation in photoacclimation and photoprotection of the photobiont in the foliose lichen *Xanthoria parietina*. J. Photochem. Photobiol. B 83, 151–162.
- Wardle, D.A., Walker, L.R., Bardgett, R.D. (2004). Ecosystem properties and forest decline in contrasting long-term chronosequences. Science 305, 509–513.
- Watson, M.A. (1980). Shifts in patterns of microhabitat occupation by six closely related species of mosses along a complex altitudinal gradient. Oecologia, 47, 46–55.
- Watson, M.A. (1981). Patterns of microhabitat occupation of six closely related species of mosses along a complex altitudinal gradient. Ecology 62, 1067–1078.
- Weatherzone, The Weather Company Pty. Ltd. Sydney, Australia:  
<http://www.weatherzone.com.au/climate/station.jsp?lt=site&lc=71032>
- Weete, J.D. (1973). Sterols of the fungi, distribution and biosynthesis. Phytochemistry 1, 1843–1864.
- Weissman, L., Fraiberg, M., Shine, L., Garty, J., Hochman, A. (2006). Responses of antioxidants in the lichen *Ramalina lacera* may serve as an early-warning bioindicator system for the detection of air pollution stress. FEMS Microbiology Ecology 58(1), 41–53.
- Wellburn, A.R. (1994). The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. J. Plant Physiol 144, 307–313.
- Whittaker, R.H. (1975). *Communities and Ecosystems*, 2nd ed. MacMillan, New York.
- Wilhelmsen, J.B. (1959). Chlorophylls in the lichens *Peltigera*, *Parmelia*, and *Xanthoria*. Bot. Tidskr. 55(1), 30–36.
- Wornik, S. & Grube, M. (2010). Joint dispersal does not imply maintenance of partnerships in lichen symbioses. Microb. Ecol. 59, 150–157.
- Zotz, G. & Winter, K. (1994). Photosynthesis and carbon gain of the lichen, *Leptogium azureum*, in a lowland tropical forest. Flora 189, 179–186.
- Zotz, G. (1999). Altitudinal changes in diversity and abundance of non-vascular epiphytes in the tropics – an ecophysiological explanation. Selbyana 20(2), 256–260.