

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Biología Vegetal II



TESIS DOCTORAL

Título

**Fotosíntesis, crecimiento y resistencia a ambientes extremos
en líquenes de regiones polares y alpinas.**

**Photosynthesis, growth and resistance to extreme
environments in lichens from polar and alpine regions.**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

José Raggio Quilez

Directores

**Leopoldo García Sancho
Thomas George Allan Green**

Madrid, 2013

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA**

Departamento de Biología Vegetal II



**FOTOSÍNTESIS, CRECIMIENTO Y RESISTENCIA
A AMBIENTES EXTREMOS EN LÍQUENES DE
REGIONES POLARES Y ALPINAS**

**PHOTOSYNTHESIS, GROWTH AND RESISTANCE
TO EXTREME ENVIRONMENTS IN LICHENS
FROM POLAR AND ALPINE REGIONS**

MEMORIA DE TESIS DOCTORAL PRESENTADA POR

JOSE RAGGIO QUILEZ

Vº Bº de los directores:

Dr. Leopoldo García Sancho

Dr. Thomas George Allan Green

MADRID, 2013

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA**

Departamento de Biología Vegetal II



**FOTOSÍNTESIS, CRECIMIENTO Y RESISTENCIA
A AMBIENTES EXTREMOS EN LÍQUENES DE
REGIONES POLARES Y ALPINAS**

**PHOTOSYNTHESIS, GROWTH AND RESISTANCE
TO EXTREME ENVIRONMENTS IN LICHENS
FROM POLAR AND ALPINE REGIONS**

Memoria para optar al grado de Doctor
en CIENCIAS (Sección Farmacia) que
presenta el Licenciado
JOSE RAGGIO QUILÉZ

Este trabajo ha sido dirigido por:

LEOPOLDO GARCIA SANCHO
(Facultad de Farmacia, UCM)

**THOMAS GEORGE ALLAN
GREEN**
(Facultad de Farmacia, UCM)

MADRID, 2013

Don Leopoldo García Sancho, Doctor en Ciencias Biológicas y Catedrático de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, Don Thomas George Allan Green, Doctor en Ciencias Biológicas y Profesor contratado en la Universidad Complutense de Madrid informan que:

La memoria titulada “Fotosíntesis, crecimiento y resistencia a ambientes extremos en líquenes de regiones polares y alpinas”, que presenta José Raggio Quílez, Licenciado en Farmacia, 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 Marzo de 2013

Fdo: Leopoldo García Sancho

Fdo: Thomas George Allan Green

RECONOCIMIENTOS Y AGRADECIMIENTOS

Bien, sonará a tópico pero es la pura verdad, tengo mucho que agradecer. Una tesis de estas características nunca habría salido adelante sin el apoyo de muchas personas e instituciones. Voy a intentar ser breve porque la tesis ya es suficientemente larga, aunque lo cierto es que esta sección merecería un capítulo más con su introducción, material y métodos, resultados y discusión. Así de importante ha sido realmente la ayuda recibida.

Al antiguo Ministerio de Ciencia e Innovación por conceder el proyecto CGL2006-12179-CO2-01 en el cual se engloba esta tesis doctoral.

Leo, tengo mucho que agradecerte. En primer lugar contaste conmigo para la primera expedición a Navarino, no tenía ningún tipo de experiencia pero me lo ofreciste y de ahí proviene todo. Luego me permitiste dedicarme a la investigación contando conmigo para la beca fpi y más tarde me abriste las puertas de la Antártida, un sueño hecho realidad. Espero haberme quedado con algo de tu capacidad de generar ciencia y de contarla.

Allan, it has been a great opportunity for me to have you here during these years, I have learnt a lot from you. Thanks for your direction in the thesis, your help with the papers and, in general, your positive and generous attitude to any request. Thanks also for the opportunity of going to the Dry Valleys, as I said before, a dream come true.

Ana, mi tercera directora en la sombra. Es una maravilla tenerte cerca para cualquier cosa, gracias por haberme dedicado siempre tu tiempo y tus esfuerzos para solucionar todos los líos que han ido surgiendo.

A todo el Departamento de Biología Vegetal II de la Facultad de Farmacia de la UCM, donde he tenido un ambiente de trabajo muy bueno durante estos años. Gracias a profes, técnicos, Charo y a todos los que me habéis ayudado de una manera u otra todo este tiempo. Un agradecimiento especial a todos los que habéis sido mis compañeros, no os nombro porque sois muchos pero os tengo en la cabeza. Tengo grandes recuerdos de

nuestras comidas de los primeros años en la sala blanca (más sobremesa los viernes), salidas de copas, congresos, viajes etc.

A Guille, Pilar, Olga y Emilia por permitirme participar en el trabajo de actividad farmacológica de sustancias líquénicas, como farmacéutico me apetecía mucho colaborar en un trabajo así.

Al departamento de Estratigrafía de la facultad de Geología de la UCM, especialmente a Gervasio, por enseñarme a manejar la cuchilla de diamante tan bien que ahora sigo teniendo diez dedos en las manos. Sin tu ayuda el capítulo II de esta tesis no habría sido posible.

To Dr. Peter Crittenden and the School of Biology at the University of Nottingham, UK, for all the help, explanations and teaching that I had during my research stay there. Without your help, chapter number III of this thesis would not be there.

To Dr. David Galloway for his help in the identification of some *Placopsis* samples in Tierra de Fuego.

A varias instituciones, el CSIC y la UTM, por su apoyo y ayuda en mi viaje a la Antártida marítima, así como a todo el personal de la BAE Juan Carlos I en isla Livingston. To Antarctica New Zealand, for all their help and advices during my stay in Scott Base and in the McMurdo Dry Valleys. El apoyo logístico de la UTM y Antarctica New Zealand hizo posible que el capítulo IV de esta tesis saliera adelante sin grandes congelaciones. A la fundación Omora y a la Universidad de Magallanes, por su ayuda en las expediciones a Tierra de Fuego. Al INTA y a la Agencia Espacial Europea, sin los cuales el capítulo V no hubiera sido posible.

A Asun y a Carmen, del CSIC, por todo vuestro apoyo y ayuda con el trabajo de las *Circinarias* astronautas. Muchas gracias por todo vuestro tiempo y amabilidad.

Mer, por toda la ayuda que me has ofrecido durante este tiempo, especialmente por las charlas infinitas que nos hemos pegado sobre ciencia y sobre todos los aspectos de la vida que nos interesan. Ha sido un auténtico lujo compartir contigo laboratorio (“cubeteo”), cenas, cervezas y viajes todos estos años. Al final hemos ascendido a nivel de primos, ahí es nada.....

Sergio, tengo que agradecerte cantidad todas las ideas que me diste para la tesis cuando trabajabas en el departamento, verás algunas de ellas claramente reflejadas. También te debo cantidad de muestras que has recogido por mí que han hecho posibles partes de los capítulos I y III. Hemos colaborado en varios artículos y he aprendido cantidad de cosas de ti como investigador, espero haber parasitado todo lo posible. Un auténtico lujo que seamos colegas.

A todos los músicos que han hecho la escritura de esta tesis más llevadera, especialmente en los momentos duros. Ludovico Einaudi, Wilco, Massive Attack, Jimi Hendrix, The Police, Pink Floyd, John Coltrane, Beatles y algunos otros que me vienen a la cabeza al recordarme encerrado entre papeles y libros intentando sacar esto adelante.

A mis padres, Elisa y Benito, siempre estáis ahí, pase lo que pase, y eso es una maravilla. Gracias por respetar mis elecciones aunque a veces hayáis pensado que no eran las más correctas. Mi padre me ha transmitido parte de su espíritu aventurero, más con actos que con palabras. A mis hermanas, Eli y May, por estar siempre a mi lado y tenerme tan en cuenta para todo. A mis primos, auténtica esencia. A todos los colegas que se han tomado una cerveza cuando ha hecho falta. A Yago, Gon, Largo y Chore por haberme acompañado al monte tantos fines de semana a muestrear, convertísteis algo duro en algo divertido. A mis tíos Ana y Rafa, un ejemplo a seguir en el mundo de la investigación. A mi tía Pili, por su constante estímulo intelectual.

Inma, la traca final. Cuantas veces te habrás venido conmigo a la montaña a recolectar calmando mi fobia al volante por carreteras sinuosas. Vaya pasada tu ayuda desinteresada con la maquetación, con todas las presentaciones, con la estadística, con la informática. Vaya estímulo tus opiniones científicas a todos los niveles. Te has tragado uno por uno todos los problemas que esta tesis ha generado, y siempre has

devuelto aspectos positivos (...”los conviertes en praderas sosegadas”...), ideas brillantes. Gracias por darme el empujón adecuado en algunos momentos concretos (te debo mucho por eso), y estar siempre conmigo, en la salud y en la enfermedad, en la riqueza (no te preocupes, ya nos forraremos) y en la pobreza. Diez años de felicidad, ¿Cómo se agradece esto?. Más años.....

Al final no he sido breve.....

Madrid, Enero 2013.

INDICE

GENERAL SUMMARY	1
INTRODUCCION GENERAL/GENERAL INTRODUCTION	7
OBJETIVOS / OBJECTIVES	19

CAPÍTULO I: Estudio ecofisiológico de distintos tipos de líquenes adaptados a entornos de media y alta montaña

1. Introducción	27
1.1. Generalidades de las zona de estudio	27
1.2. Antecedentes y Objetivos	33
2. Material y Métodos	37
2.1. Descripción de localidades y especies	37
2.2. Intercambio gaseoso	42
2.3. Fluorescencia de la clorofila <i>a</i>	49
2.4. Análisis de pigmentos	55
2.5. Análisis estadístico	56
3. Resultados	56
3.1. Relaciones hídricas en líquenes de montaña	56
3.2. Curvas de luz y temperatura en líquenes de montaña	59
3.3. Contenido en clorofila, fotosíntesis por clorofila y fotosíntesis bruta	66
3.4. Fluorescencia de la clorofila <i>a</i> en líquenes de montaña	69
4. Discusión	79

CAPÍTULO II: Relación entre fotosíntesis y tamaño en especies del género *Rhizocarpon* subgénero *Rhizocarpon*. Implicaciones en liquenometría

1. Introducción	91
1.1. Generalidades de la zona de estudio	91
1.2. Antecedentes y Objetivos	91
2. Material y Métodos	96
2.1 Descripción del grupo	96
2.2. Descripción de la localidad y recolección de muestras	97
2.3. Selección y separación de muestras en laboratorio	99
2.4. Intercambio gaseoso	99
2.5. Fluorescencia de la clorofila <i>a</i>	100
2.6. Análisis de pigmentos	102

2.7. Análisis estadístico-----	102
3. Resultados -----	102
3.1. Relación entre fotosíntesis y tamaño del talo-----	102
3.2. Fv/Fm y clorofila en centro y periferia de los talos-----	107
4. Discusión -----	108

CAPÍTULO III: Comparación ecofisiológica entre tres especies del género *Placopsis*, líquenes pioneros en morrenas glaciares recientemente expuestas en un entorno subantártico ----- 115

1. Introducción -----	117
1.1 Generalidades de la zona de estudio -----	117
1.2 Antecedentes y Objetivos -----	120
2. Material y métodos -----	125
2.1 Descripción de la localidad y recogida de muestras -----	125
2.2 Descripción de las especies -----	126
2.3 Reducción de acetileno -----	128
2.4 Determinación de la concentración de N y P -----	129
2.5 Intercambio gaseoso -----	130
2.6 Relación superficie / peso -----	130
2.7 Análisis estadístico -----	131
3. Resultados -----	131
3.1 Reducción de acetileno -----	131
3.2 Concentración de N y P -----	133
3.3 Intercambio gaseoso -----	136
3.4 Relación superficie / peso-----	141
4. Discusión -----	142

CAPÍTULO IV: Estudio comparativo a largo plazo de la actividad metabólica y el microclima de líquenes de la Antártida marítima y la Antártida continental---- 149

1. Introducción -----	151
1.1 Generalidades de la zona de estudio -----	151
1.2 Antecedentes y Objetivos -----	160
2. Material y métodos -----	165
2.1 Localidades y descripción de las especies -----	165

2.2 Moni-DA, descripción de la estación de medida -----	171
3. Resultados -----	174
4. Discusión -----	193

CAPÍTULO V: Resistencia del líquen vagante *Circinaria gyrosa* a condiciones espaciales extremas: Resultados de experimentos con vuelo real----- 203

1. Introducción -----	205
1.1 Generalidades de la zona de estudio -----	205
1.2 Antecedentes y Objetivos -----	207
2. Material y métodos -----	210
2.1 Descripción de la especie y características de la localidad de recolección -----	210
2.2 Condiciones experimentales del vuelo espacial-----	212
2.3 Medidas de fluorescencia de la clorofila <i>a</i> -----	215
2.4 Medidas de intercambio gaseoso -----	215
2.5 Análisis de microscopía-----	216
2.6 Cromatografía de capa fina -----	217
2.7 Análisis estadístico -----	217
3. Resultados -----	217
3.1 Fluorescencia de la clorofila <i>a</i> -----	217
3.2 Intercambio gaseoso -----	220
3.3 Análisis de microscopía-----	222
3.4 Cromatografía de capa fina -----	226
4. Discusión -----	226

CONCLUSIONES GENERALES / GENERAL CONCLUSIONS ----- 233

RESUMEN EXTENSO Y PLANTEAMIENTOS FUTUROS / LONG SUMMARY AND FUTURE POSSIBILITIES ----- 239

BIBLIOGRAFIA ----- 255

GENERAL SUMMARY

INTRODUCTION AND OBJECTIVES

Lichens are symbiotic organisms composed of an heterotrophic partner (a fungus, the mycobiont) and an autotrophic photosynthetic partner (green alga or cyanobacteria, the photobiont). The result of the relationship has been clearly successful, with lichens dominating around of the 8% of all terrestrial ecosystems (Larson 1987). A high proportion of these ecosystems belong to extreme regions of the world, as deserts, high mountains and poles, where the conditions for life are too hard for other types of vegetation as vascular plants. The nature of the symbiosis, together with it being poikilohydric, are key to understanding the resistance of these organisms to extreme environmental conditions, such as high and low temperatures, drought, strong winds, frost, lack of light and snow. An understanding of the physiological behaviour of cryptogamic vegetation living in these types of habitats is important because they are crucial to the ecosystems dynamics of large regions of the world, being essential contributors to nutrients cycles (Elbert et al. 2012) and possible plant succession processes (Kurina and Vitousek 1999). In addition, polar and alpine regions are considered to be under ecological risk of irreversible damage by the International Panel of Climate Change (IPCC), and the study of lichens from these regions can help to establish protection strategies and to predict the effect of possible environmental changes. Despite this, factors controlling productivity and lichens growth are poorly understood (Palmqvist 2000). The research efforts developed in the last decade in poles and high mountains regions still leave many questions open, particularly regarding the relationships between metabolism and growth, and the limits of the resistance to extreme environments. This research work attempts to use photosynthesis to help clarify these two general questions.

CONTENT OF THE RESEARCH AND MAIN RESULTS

The manuscript is organized in five chapters. Chapters I and II are focused on alpine environments. Using gas exchange, chlorophyll fluorescence and pigment extraction techniques, an ecophysiological catalogue of some alpine lichens has been developed. The relationship between gross photosynthesis and aspects of growth has also been studied. Also using gas exchange techniques, chapter II studies the relationship between thallus size and photosynthesis in samples from *Rhizocarpon*, the genus most used in

lichenometry. The controversy related with the use of the technique is discussed. Chapter III targets polar regions with a general ecophysiological study of species from the genus *Placopsis* in the subantarctic region of Tierra de Fuego. The genus has some of the fastest growth rates known for crustose lichens (Sancho et al. 2011). In addition to gas exchange, nitrogen fixation and nutrients content techniques have been used to assess correlations between all the metabolic parameters measured. Chapter IV uses long term chlorophyll *a* fluorescence monitoring in Antarctica to compare microclimate and metabolic activity at two Antarctic extremes, The South Shetland Island in maritime Antarctica and the McMurdo Dry Valleys in the continent. Large differences in activity period were found between the regions. The McMurdo Dry Valleys are considered a polar desert and one of the most extreme environments in the world. Lichens in this region had extremely low periods of activity during the monitoring period. As the limits to survival for lichens seems to be outside of planet Earth, Chapter V uses gas exchange, chlorophyll fluorescence and ultrastructural analysis to study the resistance of the fruticose lichen *Circinaria gyrosa* to space conditions in a real flight experiment developed by the European Space Agency (ESA).

CONCLUSIONS

In relation to the first objective, the link between photosynthesis and growth, the main conclusions are: Crustose lichens from mountain regions showed higher gross photosynthesis with degree of development. The technique of lichenometry is supported from a physiological point of view. Cephalodia and nitrogen fixation are key to understanding the fast growth rates of *Placopsis* samples in Tierra del Fuego. The different amounts of activity between lichens living in Antarctic extremes fit well with the large difference in growth rates found in the past between both regions.

For the second objective, the resistance of lichens to extreme environments, we conclude that: Lichens studied have shown physiological adaptation to mountain conditions, resistance to N deficient environments with good physiological performance, resistance to polar desert conditions through long periods of inactivity, and clear ability to recover after 10 days exposed to the outer space conditions. The different species belonging to *Umbilicaria* genus in both Antarctic extremes share

similar physiological limits to temperature. The crustose sample monitored in the Mc Murdo Dry Valleys show physiological adaptations to polar deserts conditions.

REFERENCES

- Elbert W, Weber B, Burrows S, Steinkamp J, Büdel B, Andreae MO y Pöschl U (2012) Contribution of cryptogamic covers to the global cycles of carbon and nitrogen. *Nature Geoscience* 5: 459-462
- Kurina, LM y Vitousek PM (1999) Control over the accumulation and decline of a nitrogen fixing lichen, *Stereocaulon vulcani*, on young Hawaiian lava flows. *Journal of Ecology* 87: 784-799
- Larson DW (1987) The absorption and release of water by lichens. *Bibliotheca Lichenologica* 25: 351-360
- Palmqvist K (2000) Carbon economy in lichens. *New Phytologist* 148: 11-36
- Sancho LG, Palacios D, Green TGA, Vivas M y Pintado A (2011) Extreme high lichens growth rates detected in recently deglaciated areas in Tierra del Fuego. *Polar Biology* 34: 813-822

INTRODUCCIÓN GENERAL / GENERAL INTRODUCTION

La fotosíntesis, en esencia, consiste en la liberación del oxígeno integrante de la molécula de agua y el almacenamiento del poder reductor resultante en compuestos carbonados que constituyen la materia viva. A nivel químico es un proceso de oxidoreducción en el que un reductor de electrones (el agua) se oxida y un aceptor (el anhídrido carbónico u otro) se reduce (B. Coll et al. 1982).

Los primeros procariotas fotosintéticos cambiaron la composición de una atmósfera fuertemente anóxica, y sentaron las bases para la evolución de la vida en la Tierra. Los dos productos principales de la fotosíntesis (el oxígeno y los carbohidratos), son fundamentales para los seres vivos. El oxígeno se convirtió en el requisito fundamental para el desarrollo de la respiración, que es la forma más eficaz de oxidación biológica, proporcionando energía para el metabolismo y el mantenimiento celular. Los carbohidratos representan el sustrato para dicha respiración y son el punto de partida para una amplia diversidad de procesos biosintéticos (Larcher 1995).

Los productos de la fotosíntesis son, por tanto, determinantes para el desarrollo de la vida en la Tierra, pero a la hora de valorar el proceso no solo se debe observar el producto final, sino la manera de conseguirlo. La relevancia de que la energía lumínica se transforme en energía química a través de los tejidos fotosintéticos es inmensa. La masa vegetal que cubre todo el planeta es una fuente incalculable y renovable de bioenergía (Larcher 1995). La fotosíntesis es sin duda la reacción química más importante del planeta y constituye el proceso fundamental de la vida (B. Coll et al. 1982).

Los líquenes son organismos simbiotes, formados por un hongo (el micobionte) y uno o más organismos fotosintéticos (fotobiontes), que normalmente son un alga, una cianobacteria ó ambos (Nash 2008). También merece la pena mencionar la diversidad y abundancia de bacterias encontradas en la superficie de los líquenes, añadiendo más complejidad a la asociación (Grube et al. 2009) La naturaleza de la simbiosis líquénica sigue siendo fuente de controversia, ya que mantiene la duda sobre si la relación es mutualística (con todos los miembros sacando beneficio de la asociación) o si más bien es un parasitismo controlado donde el hongo obtiene la mayor parte de las ventajas, regulando el metabolismo y el crecimiento de los fotobiontes. Las relaciones entre los simbiotes pueden ser complejas, especialmente si entran en juego más invitados, como

pueden ser los hongos y los líquenes liquenícolas, hongos y líquenes que crecen sobre líquenes. La naturaleza de dicha complejidad ha impulsado a algunos autores a proponer a ciertos tipos de líquenes como ecosistemas en miniatura (Seaward 1988).

Independientemente del tipo de relación entre los distintos componentes de un líquen, la asociación ha sido suficientemente exitosa como para que colonicen múltiples ecosistemas terrestres, entre ellos algunos de los más extremos. Una cifra que puede indicar la relevancia de estos organismos a nivel global es que dominan aproximadamente el 8% de los ecosistemas terrestres, tanto a nivel de diversidad de especies como de abundancia cuantitativa (Larson 1987). Buena parte de estas zonas corresponde a regiones polares y alpinas (Kappen 1988), donde los líquenes deben resistir situaciones extremas de bajas temperaturas, heladas, fuertes vientos, ausencia de radiación fotosintética durante largos periodos, exceso de radiación ultravioleta y sequía (Green et al. 2007). En muchos ecosistemas de alta montaña los líquenes comienzan a dominar al aumentar la altitud, donde las condiciones para la supervivencia son más duras y comienzan a desaparecer otros grupos de plantas. En la Antártida son la vegetación dominante tanto en la Antártida marítima como en la extrema Antártida continental (Peat et al. 2007), donde la ausencia de luz en buena parte del año, la escasa precipitación y las bajas temperaturas marcan una auténtica frontera para la vida de organismos eucariotas pluricelulares. En el Ártico son un componente fundamental de la vegetación de tundra, formándose auténticas praderas de gran extensión compuestas por líquenes que en muchas ocasiones tienen capacidad de fijar nitrógeno atmosférico (Kappen 1988). De esta manera se convierten en actores fundamentales para regular el equilibrio de nutrientes en estos ecosistemas fríos de escasa actividad biológica.

A pesar de todas estas evidencias, se sabe poco acerca de su productividad y de los factores que regulan su crecimiento (Palmqvist 2000). Aunque en los últimos años se han realizado numerosos estudios que han profundizado sobre la productividad y la capacidad de supervivencia de estos organismos en regiones extremas (Kappen 2000, Green et al. 2007; Green 2009), muchas incógnitas permanecen abiertas, especialmente en lo que atañe a la relación entre crecimiento y metabolismo y en los límites de dicha supervivencia.

En esta tesis doctoral se pretende profundizar sobre estas cuestiones con un enfoque variado, pero siempre usando a la fotosíntesis como hilo conductor, ya que nos aporta información esencial en ambos aspectos. Desde el punto de vista de la relación entre crecimiento y metabolismo, parece fuera de toda duda que la fotosíntesis es fundamental para entender como estos organismos gestionan sus recursos energéticos. En regiones extremas este aspecto cobra especial relevancia, ya que buena parte de los carbohidratos generados en el proceso fotosintético deben ser utilizados para el desarrollo de estrategias defensivas frente al ambiente que garanticen la supervivencia (Nybakken et al. 2004; Aubert et al. 2007). El equilibrio entre recursos derivados a resistir y a crecer es sutil y fundamental para entender la presencia o ausencia de vida en ambientes extremos.

Respecto a la segunda cuestión, la referida a los límites de la supervivencia de los líquenes en ambientes extremos, la fotosíntesis vuelve a jugar un papel fundamental a la hora de interpretar factores de respuesta al estrés. Los equipos de trabajo de campo y de laboratorio permiten evaluar el complejo proceso de la fotosíntesis en distintas partes de su desarrollo, por lo que se obtiene información completa de cómo responde a factores de estrés. Una de las características fundamentales para explicar la existencia de los líquenes en dichos hábitats es la capacidad de resistencia. Como organismos poiquilohídricos que son, los líquenes mantienen su contenido hídrico en equilibrio con el ambiente manteniéndose inactivos cuando están secos (Kappen y Valladares 2007). Por tanto, parte de este trabajo de investigación se centrará en dicha capacidad de resistencia, ya que como se verá a lo largo de esta memoria, los experimentos llevados a cabo a día de hoy han dejado múltiples puertas abiertas que impiden marcar los límites de la resistencia mencionada.

La memoria doctoral está estructurada en cinco capítulos. El capítulo I es un catálogo ecofisiológico de líquenes típicos de ambientes de media y alta montaña mediterránea. Con él se pretenden dos objetivos principales. En primer lugar aumentar la información disponible sobre los líquenes típicos de estos ecosistemas, entre la que se incluyen tasas de fotosíntesis y respiración en distintas condiciones de luz y temperatura, curvas de deshidratación, contenido en pigmentos fotosintéticos y posibles estrategias de adaptación a las características comunes de los ambientes alpinos. Este tipo de información en ambientes de montaña es escasa en la literatura, que se ha centrado

mucho más en las regiones polares, especialmente en la Antártida. La información es especialmente escasa si nos referimos al biotipo crustáceo, que presenta múltiples dificultades a la hora de recolección y transporte de las muestras, así como para llevar a cabo el trabajo de laboratorio. Para solventar esta falta de información, 6 de las 8 especies utilizadas en el catálogo ecofisiológico de líquenes de montaña tienen biotipo crustáceo (al igual que la mayoría de especies utilizadas en el resto de capítulos). En segundo lugar, las especies escogidas presentan diferencias en sus formas de crecimiento, por lo que se ha aprovechado para establecer un vínculo entre tipo de crecimiento y fotosíntesis en especies que comparten los matices propios de un ambiente de media o alta montaña.

El capítulo II continúa con la investigación en las regiones de montaña, y profundiza en el concepto fotosíntesis y crecimiento. La liquenometría es una técnica que utiliza la tasa de crecimiento de ciertos líquenes crustáceos para datar superficies. La técnica ha sido usada por múltiples investigadores de distintas disciplinas científicas, y su uso ha ido acompañado de cierta polémica que la tacha de inexacta (Loso y Doak 2006; Armstrong 2011). En este capítulo se pretende aportar información fisiológica que relacione tamaño de los talos y fotosíntesis en especies del género *Rhizocarpon sp.*, el más utilizado en este tipo de medidas. Esta información es novedosa, ya que el crecimiento de la especie se ha estudiado desde infinidad de puntos de vista, pero nunca desde la fotosíntesis como parámetro fundamental a la hora de entender el crecimiento. La información aportada puede ayudar a aclarar si el uso de la técnica es más o menos adecuado y a entender mejor el papel de la fotosíntesis en el crecimiento de este tipo de líquenes.

La liquenometría y el estudio ecofisiológico de líquenes crustáceos adaptados a regiones frías nos llevan al capítulo III, pero en esta ocasión se hace un tránsito desde el hábitat de montaña a las regiones polares, en concreto la región subantártica de Tierra de Fuego, en el sur de Chile. En este entorno se estudió en profundidad la vegetación y los procesos geomorfológicos de una morrena glacial en el canal Beagle, a 55° de latitud sur. El capítulo III comprende el estudio ecofisiológico de un género de líquenes crustáceos muy habitual en la región (*Placopsis sp.*) que tiene la peculiaridad de presentar cianobacterias agrupadas en estructuras especiales, los cefalodios, especializados en la fijación de nitrógeno atmosférico. El estudio ecofisiológico global

permitirá entender mucho mejor el crecimiento de los líquenes crustáceos con mayores tasas de crecimiento del mundo (*Placopsis perrugosa*) (Sancho et al 2011). Aparte de entender mejor el crecimiento poco estudiado de estos líquenes crustáceos tripartitos, el capítulo aporta información novedosa sobre la importancia de este tipo de organismos en Tierra de Fuego, que tiene unas de las tasas de deposición de nitrógeno más bajas del planeta (Dentener et al. 2006). Buena parte de esta importancia reside en su carácter de primocolonizadores y favorecedores de la posterior sucesión vegetal en las morrenas glaciares.

En el capítulo IV se continúa el estudio de los líquenes en regiones polares, en esta ocasión con un trabajo de campo que compara metabolismo y microclima de líquenes en dos regiones contrastadas de la Antártida. Por un lado, las islas Shetland del Sur, en la Antártida marítima, 62°S, una de las zonas del planeta más óptimas para el desarrollo de vegetación no vascular (Green 2009), con la mayor biodiversidad de líquenes de toda la Antártida (Sancho et al. 1999). Por otro lado, los Valles Secos de McMurdo, en el desierto de Ross, 77°S, Antártida continental, una de las regiones del planeta más extremas para el desarrollo de la vida (Pointing et al. 2009). La monitorización de metabolismo y microclima en ambas regiones a la vez durante más de cuatro meses ayudará a entender las diferencias de abundancia de vida en ambas regiones, las relaciones entre fotosíntesis, tamaño y crecimiento de los talos en las dos localidades, y las estrategias utilizadas por estos organismos para sobrevivir en el entorno más hostil del planeta.

Los Valles Secos de McMurdo han sido utilizados como laboratorio para desarrollar experimentos de investigación en astrobiología, ya que es la zona del planeta Tierra más similar a Marte en cuanto a clima y relieve (Marchant y Head 2007). La detección en esta región de microorganismos y líquenes endolíticos viviendo en el interior de las rocas (Friedmann y Ocampo 1976) llevó a pensar en la posibilidad de análogos fuera de nuestro planeta, lo que abrió numerosas líneas de investigación donde los Valles Secos de McMurdo jugaban un papel fundamental para planificar y desarrollar experimentos en el campo de la astrobiología. En el capítulo IV se aborda la cuestión de como consiguen sobrevivir en los Valles Secos las especies de líquenes epilíticos allí presentes. Su mera presencia en el desierto más seco y frío del planeta supone todo un éxito, ya que pone de manifiesto que dentro del planeta Tierra la vida se abre paso en

los hábitats más hostiles. Con el capítulo V se profundiza en la línea de investigación que busca los límites de la resistencia de los líquenes a ambientes extremos fuera del planeta Tierra. El desarrollo de este tipo de experimentos puede abrir puertas (por ahora siempre especulativas) a la posibilidad de transferencia de vida interplanetaria, lo que podría conducir al enriquecimiento del debate sobre los posibles orígenes de la vida en nuestro planeta.

GENERAL INTRODUCTION

Photosynthesis, as carried out by most photosynthetic organisms, results in the liberation of the oxygen from a water molecule and the storage of the reducing power in carbon compounds that are the basis of the living matter. It is, in a chemical sense, an oxidation-reduction procedure where an electron donor (water) gets oxidized and an acceptor (carbon dioxide or other) gets reduced (B. Coll et al. 1982).

The first photosynthetic prokaryotes changed the composition of an anoxic atmosphere, and seized the basis for the evolution of life in Earth. The two main products of photosynthesis (oxygen and carbohydrates) are essential for living beings. Oxygen allowed the development of oxidative respiration, that is the most efficient way of biological oxidation, providing energy for metabolism and cellular maintenance. Carbohydrates are the substrates for respiration and also are the starting point for a wide diversity of biological procedures (Larcher 1995).

Products from photosynthesis are essential then for development of life in Earth and the importance of light energy being transformed into chemical energy through photosynthetic tissues is huge. The plant biomass that covers Earth surface is an inestimable and renewable source of energy (Larcher 1995). Photosynthesis is the most important chemical reaction in the planet and is the basis of life.

Lichens are symbiotic organisms formed by a heterotrophic fungus (mycobiont) that receive its carbon compounds from one or more photosynthetic partners (photobionts), that are normally an algae, a cyanobacteria, or sometimes both (Nash 2008). It is also worthy to mention the high diversity and abundance of bacteria living in the surface of the lichens, adding more complexity to the association (Grube et al. 2009) The nature of this symbiosis is still a source of controversy because it is not clear if the relationship is mutualistic or a controlled parasitism, where the fungus gets most of the profit from the algae. The relationships between the partners can be complex, especially if more members are included. Some good examples of this are the lichens and fungi that live on other lichens (lichenicolous species). As a result, some authors have proposed the lichens as miniature ecosystems (Seaward 1988).

Regardless of the type of relationship, the association has been very successful and lichens can be present in many terrestrial ecosystems. They are especially important in extreme habitats and lichens dominate around the 8% of all the terrestrial ecosystems in terms of species diversity and quantitative abundance (Larson 1987). Many of these terrestrial regions are in polar and alpine regions (Kappen 1988), where lichens must survive situations of very low temperatures, frost, strong winds, lack of photosynthetic radiation during part of the year, high UV radiation and drought (Green et al. 2007). In many high mountain environments lichens become the most abundant vegetation at higher altitudes, where survival conditions are harder and some other plants disappear. In Antarctica they are the main terrestrial vegetation in both, the maritime peninsula and in the main continent (Peat et al. 2007), where the environmental conditions in some parts suppose a real frontier for life. In the Arctic, lichens are very important components of tundra vegetation, creating large prairies with the ability to fix atmospheric nitrogen (Kappen 1988). As a result, they are important organisms in the regulation of nutrient relationships in these cold ecosystems with limited biological activity.

Despite their ecological importance, we still know little about lichen productivity and factors controlling their growth (Palmqvist 2000). Although in the last years many works have been focussed in lichen productivity and survival ability in extreme regions (Kappen 2000; Green et al. 2007; Green 2009), many questions remain open, especially the relationship between metabolism and growth and the limits of their survival ability.

This thesis investigates these latter two issues using photosynthesis as the main probe in the study. Photosynthesis provides information about the two issues. Considering first the relationship between metabolism and growth, it is clear that knowledge about carbon fixation is essential to understand how these organisms control their energy resources. This is especially important in extreme habitats, because some of these resources have to be used in defensive strategies against the environment. Knowledge of the balance between resources used for growth and survival is important to understand lichen success in harsh regions. With respect to the second objective, the limits of the survival ability, photosynthesis has a key role again as method for evaluating environmental stress. One important characteristic to understand lichens presence is their ability to resist environmental extremes. Being poikilohydric organisms, the

water content of lichens is in equilibrium with the environment, and they become inactive when they are dry. Therefore, part of this work will be focussed on determining the limits of this resistance.

The thesis is organized in five chapters. Chapter I is an ecophysiological description of typical lichens from medium and high Mediterranean mountain environments. In this study we have two main objectives. The first is to improve the information available about lichens from these regions. Good examples of the information given are photosynthesis and respiration values under different conditions of light and temperature, water curves, pigments content and physiological adaptations to high alpine regions. This type of information is very limited in the literature, because research has always been focussed mainly in Polar Regions, especially Antarctica. Available information is even more limited for crustose lichens. Research on crustose species faces many inconveniences including collection and transportation of the samples, as well as an inability to separate the lichen from its substrate which provides many problems for laboratory measurements. To solve this lack of information, 6 of 8 species used in the chapter has a crustose growth form. The second objective aimed here is related to the different growth forms of the species studied. The morphological gradient observed in the samples is useful to study the relationship between growth and photosynthesis in mountain species.

Chapter II continues research on alpine lichens and the relationships between photosynthesis and growth. Lichenometry is a technique that uses growth rates of crustose lichens for surfaces dating. It has been used by many different researchers from different disciplines and remains a little controversial, with some researchers considering it inaccurate (Loso and Doak 2006, Armstrong 2011). The aim of this chapter is to try to obtain data linking photosynthesis and thallus size, working with yellow-green species of *Rhizocarpon*, the lichen genus most used in lichenometry. This information seems to be new and original. The genus has been extensively studied from different points of view, but physiological data supporting growth models are absent in the literature.

Lichenometry and the ecophysiological study of cold adapted lichens appear also in chapter III. There is a transition here from alpine to polar ecosystems, in particular by

studying lichens in a subantarctic region in South Chile, Tierra de Fuego. A complete study of vegetation and geomorphology was carried out in a glacial moraine in Beagle Channel, at 55° S of latitude. Chapter III provides an ecophysiological study of the crustose genus *Placopsis*, which is widespread in the region. The species in this genus have, in addition to their primary green algal photobiont, groups of cyanobacteria in wart-like structures called cephalodia, which have the ability of fixing atmospheric nitrogen. The ecophysiological study provides information about the mechanisms that support the high growth rates seen in some of these species, the highest ever measured (Sancho et al. 2011). Besides improving the knowledge of growth in these tripartite lichens, the chapter provides information about the ecological relevance of this type of organisms in Tierra de Fuego, a region that has one of the lowest nitrogen deposition rates on the world (Dentener et al. 2006).

Chapter IV remains in Polar Regions with a field work that compares metabolism and microclimate in lichens from two different regions of Antarctica. First the South Shetland Islands in maritime Antarctica, 62° S, a planetary hotspot for cryptogamic plants development (Green 2009). Second, the McMurdo Dry Valleys in the Ross desert, 77° S, continental Antarctica, one of the most hostile regions on Earth for life (Pointing et al. 2009). Continuous monitoring of metabolism and microclimate in both regions over more than four months helps to understand the differences in life abundance, relationships between photosynthesis and thallus size and adaptation strategies to one of the harshest ecosystems on the planet.

The McMurdo Dry Valleys have been used as a natural laboratory to develop astrobiology experiments because is the region of the world thought to be more similar to Mars in climate and relief (Marchant and Head 2007). Friedmann and Ocampo (1976) found endolithic lichens and microorganisms living inside rocks, a strategy now considered as a possibility for life forms outside Earth. Chapter IV investigates how lichens manage to survive in such an extreme place. Their presence means that life can be succesful in some of the worst habitats that exist on the planet. Also fully connected with this, chapter number V is focussed on the limits of lichens to extreme conditions, in particular, looking for those limits in the outer space. The development of experiments in astrobiology can help in the understanding of possible life transfer between planets and of the origins of life in Earth.

OBJETIVOS GENERALES / GENERAL OBJECTIVES

Esquematizando el contenido de la introducción, los objetivos generales de esta memoria doctoral quedan resumidos de la siguiente manera:

1. Aportar información novedosa sobre las relaciones existentes entre fotosíntesis y crecimiento en líquenes adaptados a regiones polares y alpinas:

1.1. Conocer la relación entre morfología y metabolismo en distintas especies de líquenes representativas de ambientes de media y alta montaña.

1.2. Conocer la relación entre fotosíntesis y tamaño de los talos verde amarillentos del género bipolar *Rhizocarpon* con el fin de abordar el uso de la liquenometría desde el punto de vista fisiológico

1.3. Realizar un estudio ecofisiológico completo de tres especies del género *Placopsis* en morrenas glaciares de Tierra del Fuego con el fin de entender sus elevadas tasas de crecimiento

1.4. Llevar a cabo una monitorización a largo plazo de metabolismo y microclima en líquenes de hábitats contrastados en la Antártida con el fin de entender sus diferencias en abundancia, tamaño y tasas de crecimiento

2. Profundizar en el conocimiento de las estrategias adaptativas que usan los líquenes para sobrevivir en distintos ambientes extremos, así como en los límites de dicha resistencia:

2.1. Entender mejor los mecanismos fisiológicos de adaptación a los ambientes alpinos.

2.2. Profundizar en la capacidad pionera de colonización que presenta el género *Placopsis* en un entorno subantártico fuertemente deficitario en nitrógeno.

2.3. Aportar información novedosa sobre la capacidad de supervivencia de líquenes epilíticos en un desierto polar hiperárido.

2.4. Intentar acotar los límites de la resistencia que los líquenes pueden presentar bajo condiciones ambientales extremas.

Summarizing the content of the general introduction, the main objectives of this research work are:

1. To produce new information about the relationships between growth and photosynthesis in lichens from polar and alpine regions:

1.1 To discover the link between morphology and photosynthesis in different species of lichens from alpine environments

1.2 To discover the relationship between photosynthesis and thallus size in yellow-green species of the crustose alpine genus *Rhizocarpon* in order to address the use of lichenometry from a physiological perspective

1.3 To develop a complete ecophysiological study of three species belonging to the genus *Placopsis* on glacial moraines in Tierra del Fuego in order to understand the fast growth rates reported

1.4 To do a long term monitoring of metabolism and microclimate in lichens living in Antarctic extremes to clarify the differences in growth rates, thallus size and abundance between both regions

2. To better understand the basis of survival strategies that lichens use in extreme environments and to clarify the limits of the resistance

2.1 To understand the physiological mechanisms involved in the adaptation to alpine environments

2.2 To better understand the pioneer colonization ability of *Placopsis* species living in a nitrogen deficient habitat

2.3 To understand the survival strategies used by epilithic lichens in an hyper arid polar desert

2.4 To try to establish limits to the survival capacity of lichens to extreme environmental conditions

CAPITULO I. ESTUDIO ECOFISIOLÓGICO DE DISTINTOS TIPOS DE LÍQUENES ADAPTADOS A ENTORNOS DE MEDIA Y ALTA MONTAÑA.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. GENERALIDADES DE LAS ZONAS DE ESTUDIO

Las regiones alpinas se localizan por encima del límite del bosque, presentan una temperatura media del mes más cálido por debajo de los 10 °C (Green 2009) y están dominadas por una vegetación caracterizada por pastizales y una variada flora criptogámica, principalmente musgos y líquenes. Körner (1999) considera que existen tendencias climáticas comunes a la hora de hablar de los climas en las regiones alpinas que son importantes para entender de manera global el funcionamiento de los ecosistemas vegetales de alta montaña. Entre estas tendencias climáticas globales cabe destacar la disminución de presión, temperatura y contenido en humedad atmosféricas al ir aumentando la altura, al igual que se observa una tendencia general a aumentar la radiación ultravioleta. A pesar de estos rasgos comunes, el clima presente en cada región biogeográfica determinará las características concretas de la vegetación de alta montaña en cada lugar, por lo que las regiones alpinas pueden presentar diferencias locales entre ellas.

Para llevar a cabo el trabajo relacionado con este capítulo se han escogido 8 especies de líquenes de ambientes de media y alta montaña mediterránea. Dichas especies son, en su mayoría, representativas de este tipo de ecosistemas, por lo que suelen presentar una distribución cosmopolita y bipolar. De las 8 especies escogidas, 6 se recolectaron en el Sistema Central, una en Sierra Nevada y otra en la parte central de la Cordillera de los Andes, en las proximidades de Santiago de Chile.

A continuación se pasa a la descripción básica de cada una de las tres regiones con el fin de contextualizar el entorno donde se ha recolectado cada una de las muestras. Aunque en los tres casos se hacen descripciones muy generales, el Sistema Central presenta cierto protagonismo ya que la mayoría de especies recolectadas son de esta región montañosa.

El Sistema Central español divide la gran meseta castellana en dos partes, separa las cuencas hidrográficas de los ríos Duero y Tago (Figura 1) y compone un extenso macizo montañoso con casi 500 km de recorrido este-oeste y una altura máxima de 2.592 m en el Pico Almanzor, perteneciente a la Sierra de Gredos. Está compuesto por diversas cadenas montañosas unidas entre sí, de este a oeste: Sierra de Somosierra-Ayllón, Sierra de Guadarrama, Sierra de Gredos, Sierra Gata-Peña de Francia y Sierra de Estrella en Portugal como parte más occidental del macizo. La evolución reciente del Sistema Central ha configurado tres dominios bien marcados, uno central y dos de borde; el central comprende las sierras de Gredos y Guadarrama y se caracteriza por el dominio de materiales cristalinos, de origen plutónico en su parte central y occidental y de origen metamórfico en las zonas orientales. Los dominios de borde comprenden la parte occidental y oriental del sistema y se observa una disminución de las rocas cristalinas, a veces ausencia de las plutónicas y un menor grado de transformación en las metamórficas (Pedraza 1994). El sustrato geológico tiende a ser de naturaleza silícea mayoritariamente (Gavilán 1994) con predominancia de elementos graníticos hasta la parte más oriental de la Sierra de Guadarrama y toda la Sierra de Ayllón, donde encontramos abundancia de pizarras, esquistos ricos en mica y cuarcitas (Rico 1983).



Figura 1. Sistema Central español con sus componentes principales. Mapa tomado del US National Geophysical Data Center.

1) Sierra de Ayllón- Somosierra.

La Sierra de Ayllón ocupa la parte más oriental del Sistema Central, más concretamente se sitúa entre las provincias de Segovia y Guadalajara. Los materiales geológicos son de naturaleza silíceas. El Pico del Lobo es su punto más alto con 2.272 m y está compuesto mayormente por pizarras, esquistos ricos en mica y cuarcita. Presenta como rasgo característico una disimetría entre sus dos vertientes. La septentrional tiene gran simplicidad orográfica y la meridional es más compleja, con rellanos y elevaciones intermedias entre las superficies de las cumbres y los piedemontes (Pedraza 1994). El modelado glaciar queda reducido a las cumbres con pequeños glaciares de circo, destacando los de Cebollera y el Pico del Lobo, localizados en ambas vertientes y siempre por encima de los 1.900 m de altitud (Pedraza 1994).

2) Sierra de Guadarrama.

Forma parte del dominio central del Sistema Central y delimita con la sierra de Somosierra-Ayllón al este y con la Sierra de Gredos al oeste. Está formada por bloques elevados (*horst*) y hundidos (*grabens*). Presenta dos cordales principales, uno de orientación NE-SW formado por El Nevero-Peñalara-Abantos-Malagón y otro E-W formado por La Cabrera-Morcuera-Cuerda Larga-Sierra de La Mujer Muerta. Los dos cordales delimitan el Valle del Paular. La altura media de la sierra es de 2.000 m y su pico más alto es Peñalara con 2.430 m.

La constitución litológica de la Sierra es mayormente paleozoica dominada por materiales cristalinos, de origen plutónico (principalmente granitoides) en las partes central y occidental y de origen metamórfico (principalmente gneises) en las zonas más orientales (Pintado 1996).

Los procesos glaciares se redujeron a las zonas superiores de las laderas de macizos como el de los Montes Carpetanos y ambas vertientes de la sierra de la Cuerda Larga, resultando de ello cuencas de acumulación modeladas en circo, arcos morrénicos y ,sólo excepcionalmente, complejos de lengua (Pedraza 1994).

3) Sierras de Gredos y Estrella.

La Sierra de Gredos forma parte del dominio central junto a Guadarrama y está delimitada por esta al este y la Sierra de Gata al oeste. La fisionomía es consecuencia también de la alternancia entre *horts* y *grabens* y la sierra está dividida en tres grandes macizos, el oriental, el central (con la cota más alta en el pico Almanzor, 2.595 m) y el occidental. El sustrato geológico es mayoritariamente granítico con aparición de gneis en algunas zonas como producto del metamorfismo de contacto.

Es la parte del Sistema Central donde el glaciario alcanzó su mayor intensidad, por lo que el modelado glaciar es muy notable. Dicho modelado quedó definido por glaciares de valle, de ladera y de circo y se extiende desde los 2.300 hasta los 1.400 m aproximadamente (Pedraza 1994).

La Sierra de Estrella conforma el extremo más occidental de todo el Sistema Central, presenta una altitud máxima de prácticamente 2.000 m y sus características litológicas son las ya mencionadas para el extremo occidental del Sistema Central.

El macizo de **Sierra Nevada** se encuentra al sur de la Península Ibérica en la alineación interior del Sistema Penibético. Sus características de altitud y latitud le confieren una gran riqueza biológica y la convierten en un interesante objetivo para estudios relacionados con cambio climático o cualquier tipo de modificación ambiental (Aspizua et al. 2010). Este sistema montañoso marcó el límite sur del avance del hielo en Europa durante el cuaternario, albergó glaciares durante la pequeña edad de hielo y presenta las montañas más al sur de Europa capaces de albergar suelos de permafrost en sus cumbres (Gómez et al. 2001). Su punto más alto es el Mulhacén, que con 3.478 m constituye la montaña más alta de la Península.

El sustrato geológico presenta, según Puga et al. (1974), dos mantos principales, el Manto del Veleta y el Manto del Mulhacén. El primero está formado por una serie monótona de micaesquistos con algunas intercalaciones de cuarcitas. El del Mulhacén es mucho más variado con micaesquistos, gneises, anfíbolitas, mármoles, etc y está formado por dos unidades estructurales bien definidas que los autores catalogan como B

y C, ambas expuestas a un metamorfismo mayor que los materiales del Manto del Veleta.

La Cordillera de Los Andes es uno de los macizos montañosos más grandes del mundo, con una longitud análoga al continente sudamericano, ya que nace en las proximidades del mar Caribe y llega prácticamente hasta Cabo de Hornos en el extremo sur del continente. Su altitud media está alrededor de los 4.000 m, presenta varios picos que superan los 6.000 m y su montaña más elevada es el Aconcagua, en Argentina, con 6.962 m de altura. Están formados por tres vastas regiones que los dividen de norte a sur en Andes septentrionales, Andes centrales y Andes australes.

La zona de Los Andes donde hemos recogido muestras es la región de los Andes de Santiago, en las proximidades de Santiago de Chile. Borde (1966) destaca como características distintivas de la región dentro de la cordillera de Los Andes la estrechez del macizo montañoso, la altitud, la actividad volcánica, la nitidez de las exposiciones Norte y Sur y la presencia de abundantes valles amplios y profundos. El mismo autor hace un meticuloso estudio geológico de la región que complementa el trabajo de Gonzales (1950) que clasificó el perfil de la cordillera en la zona en cuatro unidades estratigráficas distintas con distintos niveles de complejidad y edad.

En cuanto a la **bioclimatología**, todas las regiones donde se ha recolectado material comparten características de montaña mediterránea, aunque parece evidente que la altitud de la Cordillera de los Andes puede condicionar la aparición de los pisos de vegetación a altitudes diferentes

El macrobioclima Mediterráneo está definido por Rivas Martínez (2005) como todos los territorios extratropicales de la Tierra- independientemente de su altitud y valor de continentalidad- comprendidos entre los 23° y 52° N y S en los que existen al menos dos meses consecutivos de aridez durante el periodo cálido del año. Entre las latitudes 23° y 35° N y S debe cumplirse también que haya una temperatura media anual inferior a los 25 °C, que la temperatura media de las mínimas del mes más frío del año sea inferior a 10 °C o un índice de termicidad compensado inferior a 580.

Dentro de los pisos bioclimáticos definidos por Rivas Martínez (1983) para la región mediterránea merece la pena destacar brevemente aquellos en los que se han recolectado muestras tanto en el Sistema Central como en Sierra Nevada:

- Piso crioromediterráneo. Aparece en las altas cordilleras ibéricas mediterráneas que superan los 2.100 m en la zona del Sistema Central y los 2.700 m en las montañas béticas. No hay presencia de árboles y la vegetación presente es mayormente acidófila, representada por pastizales, céspedes y vegetación de pedregal. Los principales valores termoclimáticos son temperatura media anual (T) menor de 4 °C, media de las mínimas del mes más frío (m) menor de -7 °C, media de las máximas del mes más frío (M) menor de 0 °C, índice de termicidad (It) menor de -30. Las heladas pueden ocurrir durante todo el año y el ombroclima es en general hiperhúmedo.

- Piso oromediterráneo. Existe sólo en las montañas más elevadas de la Península, entre las que se encuentran las zonas de estudio. El límite altitudinal inferior oscila entre los 1.600 y 2.000 m. Los ecosistemas maduros tienden a tener vocación forestal poco densa aunque esto no siempre ocurre y depende de distintas variables climáticas de cada zona. La vegetación dominante son árboles y arbustos de los géneros *Pinus*, *Juniperus* y *Cytisus*. Los valores termoclimáticos más importantes del piso son: temperatura media anual (T) entre 4 y 8 °C, media de las mínimas del mes más frío (m) entre -4 y -7 °C, media de las máximas del mes más frío entre 0 y 2 °C, índice de termicidad (It) entre -30 y 60. El ombroclima oscila entre el hiperhúmedo y el subhúmedo.

- Piso supramediterráneo. Muy extendido por la Península Ibérica, es dominante en las áreas pedemontales de las altas montañas centrales y meridionales. Los ecosistemas maduros tienen todos carácter forestal y sus características termoclimáticas principales son: temperatura media anual (T) entre 8 y 15 °C, media de las mínimas del mes más frío (m) entre -1 y -4°C, media de las máximas del mes más frío entre 2 y 9 °C, índice de termicidad entre 60 y 210. La elevada variabilidad ombroclimática (del seco inferior al hiperhúmedo) condiciona una destacada variación de la vegetación.

1.2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Los líquenes crustáceos se definen por estar íntimamente unidos al sustrato, de tal manera que no se pueden separar del mismo sin destruirlo. Dentro del biotipo aparecen distintos subtipos, entre los que podemos destacar talos endolíticos, lobados, escuamulosos, areolados ó efigurados. La forma de organización de los talos de los distintos subtipos puede ser tanto homómera como heterómera (Büdel y Scheidegger 2008).

La importante presencia de líquenes crustáceos en muchas regiones del planeta no va acompañada de un pertinente estudio ecofisiológico de los mismos si lo comparamos con líquenes foliáceos y fruticulosos, que han generado una bibliografía mucho más abundante. Algunos de los motivos que podrían explicar esta diferencia de conocimiento son las bajas tasas de fotosíntesis y respiración de muchas especies crustáceas, lo que dificulta sus medidas, y la incapacidad de separar los talos del sustrato (Schroeter et al. 1992), lo que genera múltiples dificultades a la hora de obtener medidas precisas de contenido hídrico en los talos estudiados.

Entre los autores que han hecho esfuerzos por abordar el comportamiento fisiológico de especies crustáceas destacan los trabajos de Lange. *Lecanora muralis* ha sido la especie más estudiada de todas y la información relacionada con su funcionamiento fisiológico si que es abundante. Lange y colaboradores llevaron a cabo estudios exhaustivos en los que detectaron la presencia de una fuerte depresión de la fotosíntesis a altos contenidos hídricos en especies como *L. muralis* y *Xanthoria calcicola*, (Lange y Green 1996; Lange et al. 1997a) pero no en el crustáceo terrícola *Diploschistes muscorum* (Lange y Green 1997). Siguiendo con *L. muralis*, Leisner et al. (1997) llevaron a cabo una monitorización del comportamiento de la especie en el campo haciendo medidas simultáneas de intercambio gaseoso y fluorescencia, encontrando discrepancias entre ambas técnicas. Lange (2002; 2003a; 2003b) llevó a cabo uno de los estudios más representativos que se hayan hecho hasta la fecha respecto a la fisiología de líquenes crustáceos usando de nuevo el mismo protagonista (*L. muralis*). En estos trabajos, el autor estudió exhaustivamente el comportamiento del líquen en el laboratorio, su respuesta metabólica ante condiciones naturales y el balance de ganancia de carbono asociado a estas medidas. Otros trabajos que merece la pena destacar son aquellos

realizados con costras biológicas, ya que muchas especies que las forman son crustáceas (Lange et al. 1994; Lange et al. 1997b), así como otros trabajos sobre fisiología de líquenes crustáceos y endolíticos llevados a cabo por otros autores (Coxson y Kershaw 1983a, b; Wessels y Kappen 1993; Tretiach y Pecchiari 1995; Tretiach y Gelletti 1997).

Una característica importante de la forma de crecimiento crustácea es su fuerte unión al sustrato. La pérdida de agua se produce exclusivamente por la cara superior expuesta y cuando crecen sobre rocas inclinadas se pueden aprovechar del flujo de agua para hidratarse. Estas características les permiten colonizar hábitats como superficies de rocas desnudas y expuestas (Büdel y Scheidegger 2008) y muchas especies crustáceas de crecimiento lento están especialmente adaptadas a algunos de los ecosistemas más extremos del planeta (Armstrong y Bradwell 2010) como pueden ser los desiertos, la alta montaña y las regiones polares.

Los ecosistemas fríos suponen aproximadamente el 8% de la superficie terrestre, con un 3% del total cubierto por la vegetación nival/alpina y el 5% restante correspondiente a la tundra ártica (Körner 1995). En la Antártida, se ha realizado un esfuerzo importante en los últimos años para entender la ecofisiología de los líquenes con el fin de aportar más información sobre su adaptación a un ambiente tan extremo. Los trabajos existentes inciden más de nuevo en especies foliáceas y fruticulosas, pero aún así algunos autores se han aproximado al estudio de los crustáceos, en su mayoría con medidas de intercambio gaseoso y fluorescencia en el campo (Kappen et al. 1990; Schroeter et al. 1991; 1992). También se ha abordado el complejo estudio de la fisiología de líquenes endolíticos de los Valles Secos en la Antártica Continental (Kappen y Friedmann 1983) y el estudio de algunos líquenes antárticos foliáceos iguales o similares a los que se incluyen en este estudio (Bartak et al. 2005; Pannowitz et al. 2006).

En cualquier caso, la experimentación en ecofisiología de líquenes polares es mucho más abundante que la existente para líquenes de regiones alpinas, por lo que el conocimiento del comportamiento fotosintético de criptógamas en altura es escaso (Reiter et al. 2008). La alta montaña es un ambiente extremo para la vegetación porque presenta alta intensidad de radiación visible y ultravioleta, bajas temperaturas buena

parte del año, gran incidencia de heladas y nevadas, fuertes vientos y corta duración de la estación de crecimiento (Kappen 1988; Körner 1999; Green 2009).

Entre los trabajos publicados los más abundantes son aquellos llevados a cabo en el género *Umbilicaria* (Sancho y Kappen 1989; Sancho et al. 1997a; Reiter et al. 2006), un claro representante foliáceo de la flora liquénica de alta montaña. Otros trabajos cuentan con algunas de las especies propuestas en este estudio, especialmente la especie foliácea *Xanthoria elegans*, que ha sido abordada bajo varios puntos de vista por distintos autores (Heber et al. 2000; Nybakken et al. 2004; Aubert et al. 2007; Reiter et al. 2008; Sancho et al. 2007a; De la Torre et al. 2010) y especies crustáceas del grupo *Rhizocarpon*, (Coxson y Kershaw 1983b; Heber et al. 2000; Sancho et al. 2007a; De la Torre et al. 2010). En cualquier caso, las adaptaciones fisiológicas que permiten a los líquenes vivir en estos ecosistemas extremos son poco conocidas, mucho más si incluimos el biotipo crustáceo, especialmente abundante en dichos hábitats y muy poco estudiado.

El primer objetivo de este capítulo es llevar a cabo un estudio ecofisiológico en el laboratorio de varias especies de líquenes (en su mayoría crustáceos) abundantes en la media y alta montaña con el fin de entender su comportamiento fisiológico y sus estrategias adaptativas a dicho ambiente extremo. Las especies escogidas son las crustáceas *Dimelena oreina*, *Rhizocarpon sp.*, *Lecanora rupícola* y *Pertusaria corallina*, la crustácea lobulada *Lecanora concolor*, la crustácea bulada *Ophioparma ventosa* y las foliáceas *Xanthoria elegans* y *Rhizoplaca melanophthalma*. Todas son abundantes y fácilmente reconocibles en este tipo de ecosistemas. A través del análisis de intercambio gaseoso, pigmentos y fluorescencia en el laboratorio se pretenden encontrar tendencias comunes de adaptación a pesar de trabajar con especies diferentes con distintas formas de crecimiento y recolectadas en localidades también diferentes. Los líquenes han sido propuestos en múltiples ocasiones como bioindicadores de cambio ambiental (Sancho et al. 2007b), ya que a pesar de colonizar ambientes totalmente dispares, en muchas ocasiones aparecen adaptados a unas condiciones ambientales muy concretas. Otra característica que les convierte especialmente útiles en el campo de la bioindicación es la distribución bipolar y cosmopolita de muchos líquenes, lo que permite comparar la evolución de las mismas especies en distintas partes de planeta.

Los ecosistemas polares y alpinos han sido propuestos como zonas especialmente sensibles a posibles cambios ambientales (Körner 1999; Crabtree y Ellis 2010) por lo que la demostración de patrones adaptativos comunes en líquenes que viven en estos ecosistemas reforzaría su valor como indicadores de cambio. Muchas plantas de montaña no toleran la competencia (Klanderud 2008) por lo que cambios bióticos debidos a aumentos de temperatura o de disponibilidad de nutrientes podría afectar significativamente la composición de las comunidades (Mooney 1991).

El segundo objetivo es aportar información que pueda relacionar la fotosíntesis con distintas formas de crecimiento en líquenes adaptados a ambientes extremos. A pesar de que la relación entre fotosíntesis y crecimiento se va a estudiar en profundidad en el siguiente capítulo dentro del género *Rhizocarpon*, el gradiente de formas de crecimiento en las muestras escogidas supone una oportunidad perfecta para comparar fotosíntesis con distintos tipos de crecimiento en líquenes. De esta manera se refuerza una de las líneas principales de esta tesis doctoral, en la que se busca aportar información nueva sobre la relación entre ambos parámetros.

Numerosos autores han intentado llevar a cabo estudios de crecimiento en distintos biotipos de líquenes, pero la información fisiológica relacionada a dicho fenómeno no es abundante. Entre los parámetros fisiológicos que convendría vincular al crecimiento con más asiduidad destacan la fotosíntesis y factores relacionados (pigmentos fotosintéticos), la respiración, el contenido y la fijación de nitrógeno y el metabolismo de otros nutrientes esenciales para el crecimiento como el fósforo (Crittenden et al. 1994).

En este capítulo se aporta información sobre fotosíntesis (analizada desde el intercambio gaseoso y desde la fluorescencia), respiración y contenido en clorofilas con el objetivo de aclarar su relación con las distintas formas de crecimiento seleccionadas.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. DESCRIPCIÓN DE LOCALIDADES Y ESPECIES

Para facilitar la clasificación del material de trabajo se han considerado muestras de alta montaña a aquellas recolectadas por encima de los 2000 m de altitud. Las especies recolectadas entre los 1000 y 2000 m han sido catalogadas como de media montaña. Dentro de cada localidad todos los talos de cada especie fueron recolectados con la misma orientación y durante el mismo mes del año, ya que en varios casos se llevó a cabo más de una recolección. Se usaron martillo, escoplo y sobres de papel para transportar el material al laboratorio donde las identificaciones fueron confirmadas usando lupa binocular, reactivos químicos y microscopio en los casos que fuera necesario. Se escogieron distintas especies de líquenes crustáceos y foliáceos que fuesen abundantes en ecosistemas de montaña y que mostrasen un gradiente en su forma de crecimiento. Este gradiente recoge desde lo más crustáceo o íntimamente unido al sustrato hasta algunos ejemplos de líquenes foliáceos, totalmente despegados del mismo. Como formas intermedias que completen la transición se ha utilizado un talo placoidimorfo y otro bulado. En la medida de lo posible se buscaron especies o grupos de especies que fueran fácilmente identificables a la lupa, aunque este criterio no se cumple en todos los casos. Dentro de cada localidad los talos de la misma especie fueron recolectados donde presentasen un óptimo de distribución. Las características litológicas del sustrato y de vegetación de cada localidad son las descritas para cada sistema montañoso y piso bioclimático en el apartado 2 de la introducción.

A continuación se describen las especies seleccionadas junto a las localidades de muestreo. Los reactivos de identificación química responden a las siguientes iniciales: 1. Hidróxido potásico (K) 2. Hipoclorito sódico (C). 3. Parafenilendiamina (P). 4 Solución de yodo (I).

Lecanora rupicola (L.) Zahlbr. es un líquen crustáceo con talo fisurado-areolado de color gris. Apotecios lecanorinos, normalmente con pruina densa de color grisáceo, a menudo con el margen deformado del mismo color del talo, con disco de plano a convexo. Esporas unicelulares incoloras.

Reacciones: Talo K+ amarillo intenso, C- (raramente C+ anaranjado), P+ amarillo. Disco C+ y KC+ amarillo/anaranjado, P-.

Ecología y distribución: Generalmente en roca silícea, desde superficies horizontales a verticales, generalmente en rocas ricas en nutrientes. Por toda Europa (Wirth et al. 2004). Blaha et al. (2006) propusieron que la elevada amplitud ecológica de la especie podía estar ser debida a la baja selectividad que la especie mostró por su fotobionte.

Descripción de la localidad. Sistema Central, Sierra de Somosierra-Ayllón, Pico del Lobo. 41° 11' 3.4" N 3° 28' 54" O. 2.234 m de altitud (cumbre). Piso crioromediterráneo. Se recolectó *L. rupicola* en rocas planas, grandes, sin inclinación o con ligero grado de inclinación. Se llevaron a cabo dos recolecciones, una en octubre de 2008 y otra en octubre de 2009.

Pertusaria corallina (L.) Arnold es un líquen crustáceo con talo de color gris blanquecino con muchos isidios distribuidos por toda la superficie. El talo es grueso, de fisurado a fisurado-areolado, a menudo extenso, densamente cubierto de isidios cilíndricos en general simples, raramente ramificados, a menudo erectos de hasta 0,3 mm de grosor y hasta 1 mm de altura. Muy raramente con apotecios.

Reacciones: K+ amarillo, pasando a pardo rojizo después, C-, P+ amarillo que pasa a anaranjado.

Ecología y distribución: En rocas silíceas de lugares lluviosos, expuestas a la luz, a menudo en superficies verticales. Sobre todo en montañas medias y altas. Desde la zona boreal a la región mediterránea. (Wirth et al. 2004).

La especie se podría confundir con *P. pseudocarallina* y *P. isidioides*. *P. pseudocarallina* da una reacción rojo fuerte clara en contacto con el reactivo K y presenta isidios con los ápices pardos. *P. isidioides* es muy poco frecuente con talo insensible a los reactivos. Schmidt y Lumbsch (2004) encontraron buena relación entre los metabolitos secundarios y la genética dentro del género, por lo que los consideraron como un carácter taxonómico importante.

Descripción de la localidad. Sistema Central Sierra de Estrella, Portugal, subida a Torre desde Covilha, Portugal. 40°17'40" N 7° 32' 10" O. 1300 m de altitud. Piso supramediterráneo. En la subida desde la localidad de Covilha hacia la Torre se

recolectó *P. corallina* en grandes rocas graníticas en el suelo, sin inclinación. La recolección se llevó a cabo en marzo de 2009.

Rhizocarpon sp. es un género que engloba líquenes crustáceos areolados caracterizado por la presencia de hipotalo. Se recolectaron exclusivamente talos verde-amarillos. En el capítulo II se ofrece más información sobre el género y un resumen sobre los problemas relacionados con su taxonomía que se pueden aplicar a las muestras usadas en este capítulo

Descripción de la localidad: Sistema Central. Sierra de Guadarrama. Peñalara. 40° 51' N 3° 57' O. 2.430 m de altitud (cumbre). Piso crioromediterráneo. Se recolectaron talos verde amarillentos del género en rocas de naturaleza silícea, graníticas sin inclinación marcada. Se llevaron a cabo dos recolecciones en agosto de 2009 y agosto de 2010.

***Dimelaena oreina* (Ach.) Norman** es una especie crustácea de talo fisurado-areolado, lobulado en la periferia, bien conocida por su color verde amarillo con ácido úsnico en el córtex, sus apotecios lecanorinos y su hipotecio hialino. Sólo en la Península Ibérica se han encontrado cuatro quimiótipos distintos (Calatayud y Rico 1999). Presenta esporas bicelulares pardas.

Reacciones: Talo K+ amarillento que pasa minutos después a parduzco, C+ carmín o C- en función de la química. Médula I+ azul (Wirth et al. 2004)

Ecología y distribución: Se distribuye en Europa desde Escandinavia hasta el Mediterráneo, está ampliamente presente en zonas boreales y templadas del hemisferio norte y es conocida también para el hemisferio sur (Calatayud y Rico 1999).

Descripción de la localidad. Sistema Central. Sierra de Gredos. Cueva del Maragato. 1400 m de altitud. Piso supramediterráneo. Se recolectó *D. oreina* sobre una pared de roca silícea granítica con exposición sur, fuertemente soleada. La recolección se llevó a cabo en abril de 2008.

Lecanora concolor Ramond es un líquen crustáceo lobulado que forma medallones de color de amarillo pálido a verdosos. El talo es robusto, orbicular y lobulado. Los lóbulos son estrechos, convexos y de superficie lisa. Los apotecios son lecanorinos, de disco plano o convexo y margen talino sinuoso y del mismo color del talo (Wirth et al. 2004).

Reacciones: Talo K-.

Ecología y distribución: En pisos altos de nuestras cordilleras, sobre rocas silíceas soleadas, donde forma una llamativa comunidad pionera junto *Lecidea atrobrunnea* (Wirth et al. 2004).

Lecanora muralis es una especie similar a *L. concolor* que podría compartir hábitat, aunque según Wirth et al (2004) la primera tiende a parecer con preferencia en cotas más bajas. El color del disco del apotecio es normalmente más fácil de distinguir del talo en *L. muralis*, aunque esta característica puede ser variable, y los lóbulos tienden a ser menos robustos. Sancho (1986) diferencia una coloración negruzca en la cara inferior de los lóbulos en *L. muralis* que no aparece en *L. concolor*.

Descripción de la localidad. Sistema Central. Sierra de Gredos. Subida desde la Plataforma de Gredos a la Laguna de Gredos. 40° 16' 14" N 5° 15' O. 2100 m. Pisos oro o crioromediterráneo. Se recolectó *L. concolor* sobre rocas grandes silíceas graníticas sin inclinación marcada. Se llevaron a cabo dos recolecciones, en octubre de 2008 y octubre de 2009.

Ophioparma ventosa (L.) Norman es un líquen crustáceo de talo grueso fácilmente identificable en la alta montaña debido a sus apotecios de color rojo intenso. La tonalidad de colores del talo oscila desde gris-verdoso amarillo-verdoso. Presenta areolas pequeñas, irregulares y alargadas. Los apotecios presentan disco de color rojo-oscuro a rojo-pardo, plano de hasta 2,5 mm de anchura y margen talino diferenciado. Tiene esporas estrechas y largas, aciculares, con varios septos transversales.

Reacciones: Médula K+ amarillo-anaranjado, C-, P+ amarillo-anaranjado. Disco del apotecio K+ azul.

Ecología y distribución: En las cordilleras ibéricas aparece en los pisos subalpino y alpino y oromediterráneo y crioromediterráneo en paredes de rocas grandes, expuestas y venteadas (Wirth et al. 2004).

Descripción de la localidad. Sistema Central. Sierra de Guadarrama. La Najarra. 40° 38' N 3° 49' O. 2100 m de altitud. Piso crioromediterráneo. Se recolectó *O. ventosa* en las paredes de grandes rocas silíceas, graníticas muy expuestas. Se llevaron a cabo recolecciones en octubre de 2008, 2009 y 2010.

Xanthoria elegans (Link) Th. Fr. líquen foliáceo de lóbulos estrechos, forma de roseta. El talo es de color anaranjado a rojo, de hasta tres cm de diámetro; presenta lóbulos dispuestos radialmente, largos y estrechos, ramificados en ángulo agudo, formando abanico, convexos o circulares en sección transversal, con márgenes incurvados, solamente los ápices aplanados; cara inferior de color blanquecino, a menudo con protuberancias longitudinales, con puntos de fijación aislados. Los apotecios son del mismo color del talo, frecuentes, planos y con margen, concentrados en el centro del talo.

Reacciones: K+ púrpura, C-, P- (Wirth et al. 2004).

Ecología y distribución: Circumpolar, ártico a templado (Sancho 1986). Sobre roca caliza o silícea y sobre roca artificial (muros, tejas...). En la Península Ibérica en zonas altas de montaña (Wirth et al. 2004).

Se diferencia de otras especies del género *Xanthoria* (*X. parietina*, *X. calcicola*) en que presenta los lóbulos más estrechos que estas. Algunas especies del género *Caloplaca* (*C. saxicola*, *C. flavescens*) también podrían provocar confusión en la identificación, pero estas son especies crustáceas totalmente adheridas al sustrato (Wirth et al. 2004).

Casares y Llimona (1984) indican que la especie (en la misma localidad) busca lugares más o menos protegidos, en paredes mayormente de orientación sur, es nitrófila y abundante.

Descripción de la localidad. Sistema Penibético, Sierra Nevada, proximidades del parking, Peñones de San Francisco. 37° 5' 40" N 3° 23' 27" O. 2510 m de altitud. Piso oromediterráneo. Se recolectó *X. elegans* en paredes verticales. Las recolecciones se llevaron a cabo en junio de 2008 y junio 2009.

Rhizoplaca melanophthalma DC. Leuckert es un líquen foliáceo amarillo, amarillo-verde, gris-verde a negro (en lugares muy expuestos). Presenta apotecios abundantes, lecanorinos con el disco de color variable, desde amarillo-verde pálido hasta marrón-

negro. Himenio con parte superior color oro. Como metabolitos secundarios presenta, entre otros, ácidos úsnico, rangifórmico y zeorina (Øvstedal y Smith 2001).

Ecología y distribución: Es una especie ornitocropófila con distintos rangos de tolerancia a la luz y que aparece abundantemente en posaderos de aves, aprovechando los nutrientes estas generan. Distribución cosmopolita con óptimo circunmediterráneo-alpino (Sancho 1986).

La especie presenta una amplia variabilidad morfológica, química y ecológica (Arup y Grube 2000). Recientemente el grupo de especies relacionado con *R. melanophthalma* ha sido propuesto como modelo para estudiar la especiación en ascolíquenes y los resultados apuntan a un mayor número de especies que el conocido hasta ahora dentro del género (Leavitt et al. 2011).

Descripción de la localidad. Cordillera de Los Andes, Andes de la Región de Santiago, subida hacia Cerro Plomo, cerca de Santiago de Chile, Chile. 33° 37' 3,9" N 69° 59' 36" O. 2970 m de altitud. Se recolectó *R. melanophthalma* sobre grandes bloques de piedra con orientación sur.

Todas las especies mencionadas aparecen representadas en la figura 2.

2.2. INTERCAMBIO GASEOSO

2.2.1 Técnica y descripción del sistema de medida

Las medidas de intercambio gaseoso se llevaron a cabo con un sistema de minicubeta CMS400 fabricado por la compañía alemana Walz. El aparato funciona con un sistema de flujo abierto de aire y está formado por una unidad central que contiene un detector de infrarrojo (Binos 100, Leybold-Heraeus, Alemania) para medir concentraciones de gases y una cubeta de plexiglas donde se introduce la muestra biológica. Antes de entrar en el sistema, el aire procedente del exterior atraviesa un filtro de partículas y se mezcla en un bidón de 20 litros de volumen para evitar picos de CO₂.

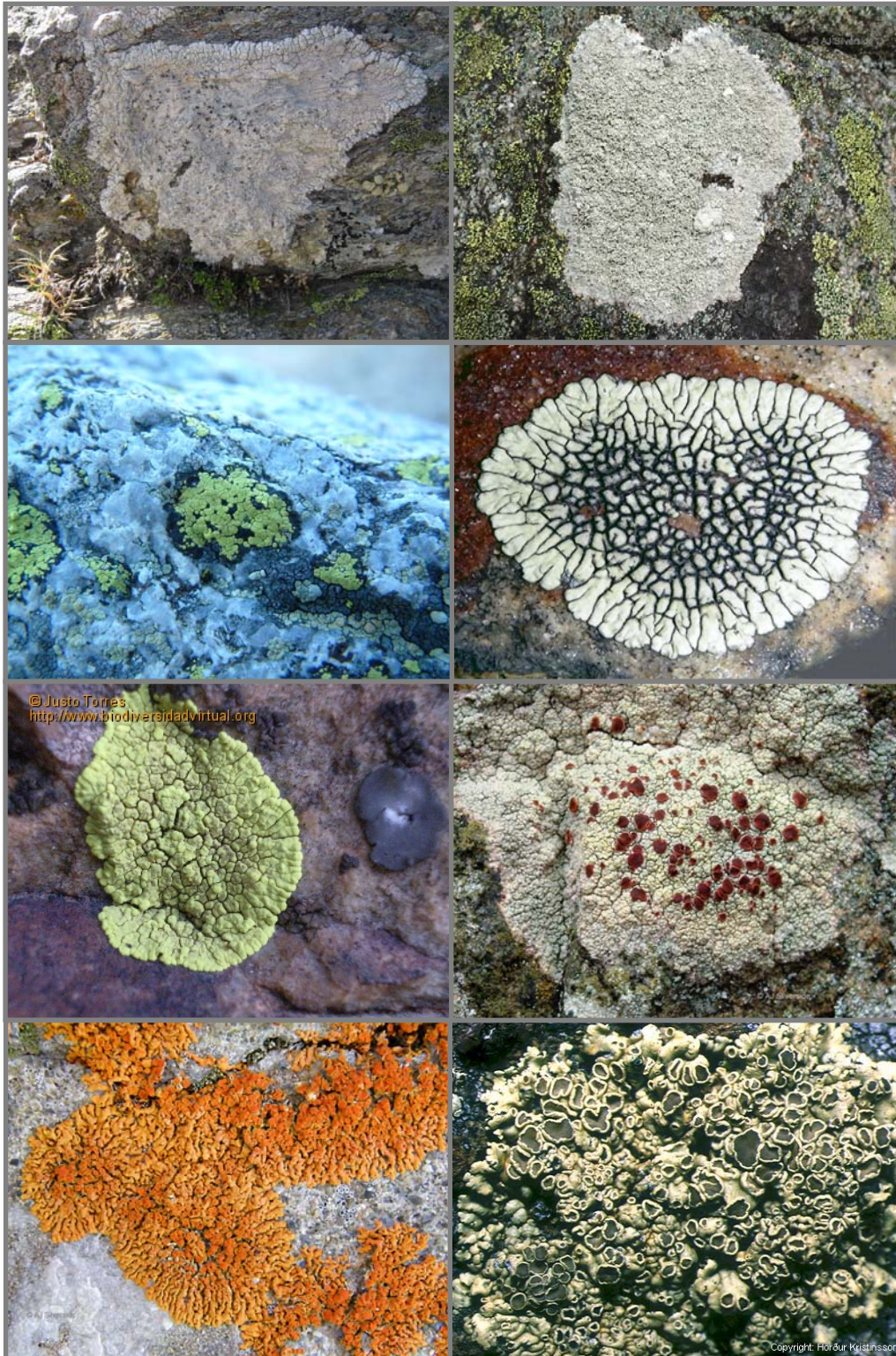


Figura 2. De izquierda a derecha y de arriba abajo: *L. rupicola*, *P. corallina*, *Rhizocarpon sp.*, *D. oreina*, *L. concolor*, *O. ventosa*, *X. elegans* y *R. melanophthalma*. Las fotos de *P. corallina*, *O. ventosa* y *X. elegans* proceden de www.lichens.lastdragon.org; *L. concolor* de (www.biodiversidadvirtual.org); *R. melanophthalma* (H.Kristinnsson, Flóráíslands-Fléttu). *D.oreina* (nhm2.vio.no)

El funcionamiento del aparato está descrito por Kappen (1983) y consiste en la comparación de la concentración de H₂O y CO₂ gas que pasan por el detector de infrarrojo a través de dos corrientes de aire, una que atraviesa la cubeta con la muestra biológica y otra que recorre un espacio vacío con el mismo volumen que la cubeta. El diferencial de H₂O y CO₂ medido entre ambas corrientes de aire es debido por tanto a la muestra biológica, diferenciándose así los procesos de fotosíntesis y respiración. Ambas corrientes llegan a la vez al detector de infrarrojo gracias a unas bombas que mantienen el flujo constante. Una vez en el detector, primero se mide la cantidad de agua y acto seguido se elimina con un condensador (MGK1, Alemania) y se mide el CO₂ en una corriente de aire seca. El rango de medida del analizador es de ± 50 ppm y su sensibilidad es de $\pm 0,1$ ppm. La figura 3 muestra el aparato funcionando en el laboratorio.

El CMS 400 permite trabajar con condiciones controladas de radiación, humedad y temperatura, por lo que se pueden obtener gradientes que permitan conocer estrategias adaptativas de las muestras a su entorno. El interior de la cubeta (permeable a la luz) consta de un sensor de humedad, un sensor para la temperatura del aire, un termopar (Ni-Cr-Ni, 0,1 mm de diámetro) para medir la temperatura del talo liquénico y un sensor de luz. Junto a la cubeta hay una fuente de luz (KL 2500 LCD, Schott, Alemania) unida a una fibra óptica (Walz, Alemania) que permite exponer a las muestras a distintas radiaciones lumínicas sin aumentar la temperatura de forma significativa.

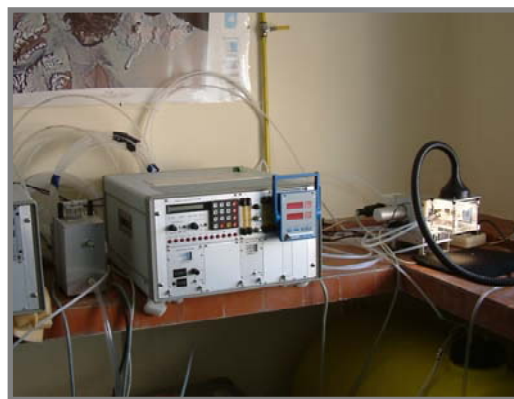


Figura 3. CMS 400 trabajando en el laboratorio.

2.2.2 Protocolo de trabajo.

Las medidas de intercambio gaseoso, se hicieron, en la medida de lo posible, dentro del primer mes después de la recogida de las mismas en el campo. De esta manera se intentó estandarizar el posible efecto del paso del tiempo sobre las medidas metabólicas. En los casos en los que no fue posible medir dentro del primer mes tras la recolección se procedió a la congelación de los talos a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$; este procedimiento no tiene efectos negativos sobre el metabolismo de los líquenes (Kappen y Lange 1970), que en muchas ocasiones soportan temperaturas mucho más bajas en sus hábitats, por lo que quedan en estado de latencia hasta que se lleva a cabo el proceso de revitalización.

La revitalización es un proceso que nos permite homogeneizar el estado fisiológico de las muestras antes de empezar a medir, intentando reducir así en medida de lo posible el efecto de la historia individual de cada talo. Se revitalizaron las muestras durante un periodo de tres días. Para llevar a cabo dicho proceso se usó un frigorífico con puertas de cristal transparentes en la parte superior y se situó debajo de una fuente de luz. Las condiciones fueron, ciclos de 12h luz/12h oscuridad, $12\text{ }^{\circ}\text{C}$ de temperatura y $100\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ de intensidad lumínica. Cada grupo de muestras fue medido durante la primera semana tras la revitalización, para evitar así que más o menos días de reactivación pudieran tener algún tipo de efecto sobre el metabolismo.

Todas las muestras fueron hidratadas a saturación antes de iniciar las medidas de intercambio gaseoso. Se hidrataron por inmersión durante 30 minutos en agua mineral, para conseguir una hidratación más parecida a la que produce la lluvia en la que hay disueltos distintos minerales. A partir de aquí se llevaron a cabo dos procedimientos distintos:

2.2.1. Curvas de deshidratación

Se llevaron a cabo los primeros días de cada semana con el fin de conocer la evolución de la fotosíntesis neta con el contenido hídrico (existen varios tipos de comportamientos en líquenes, Lange et al. 1995) y para conocer con precisión el óptimo contenido hídrico de cada talo a una temperatura concreta. Las muestras hidratadas a saturación se pesaron y se introdujeron en la cubeta con una radiación constante de $400\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ y $15\text{ }^{\circ}\text{C}$

de temperatura. Se escogió esa radiación porque en condiciones normales no es saturante para los fotosistemas (al menos en líquenes de alta montaña). La temperatura escogida se justifica en que está también próxima a los óptimos y supone un punto intermedio en las escalas de temperaturas que se usaron en las curvas de luz. Para monitorizar la evolución de la fotosíntesis con el contenido hídrico se sacaron las muestras de la cubeta para pesarlas en una balanza de precisión (Sartorius, Alemania, 10 mg-220 g) cada 15-30 minutos hasta llegar al óptimo hídrico y cada 30 minutos posteriormente. Así se determinaron tanto el tiempo necesario para alcanzar el máximo o 100% de fotosíntesis neta como el tiempo total de actividad. El porcentaje de humedad ambiental bajo el que se llevaron a cabo las medidas osciló entre el 50% y el 60%. El experimento se dio por finalizado cuando el contenido hídrico del talo no fue suficiente para conseguir fotosíntesis neta. Se utilizaron 5 muestras de cada especie para representar las nubes de puntos de cada curva de deshidratación, y posteriormente se ajustaron a las ecuaciones que presentaron el mayor índice de correlación. Se usó el programa sigmaplot 10.0 (Systal Software, San José, California) para dichos ajustes.

2.2.2 Curvas de luz

Las curvas de luz se llevaron a cabo usando un gradiente de radiación de 0, 400, 800 y 1200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y un gradiente de temperaturas de 0, 5, 10, 15, 20 y 25 °C. A 0 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ se midió la respiración en oscuridad (RO). A continuación se midió a 400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, que al ser una radiación no saturante para la fotosíntesis permitió llegar al óptimo de hidratación de cada muestra. Una vez dentro de dicho óptimo se aumentó la radiación a 800 y 1200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante 5 minutos cada una con el fin de conseguir el valor de máxima asimilación fotosintética a cada temperatura.

Los líquenes con mayor grado de adhesión al sustrato mostraron una tendencia muy rápida a la deshidratación a temperaturas superiores a 15 °C, es decir, era complicado mantenerlos en el óptimo de hidratación a altas radiaciones. Para subsanar este problema en la medida de lo posible dichas muestras se volvieron a hidratar a saturación tras la primera medida a 400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y se volvieron introducir en la cubeta directamente a la misma radiación, pasando posteriormente a radiaciones altas. El efecto de dicha rehidratación sobre la fotosíntesis pareció insignificante siempre que al rehidratar se estuviera en las proximidades del óptimo de hidratación, ya que de lo

contrario se podría generar cierto estrés en las algas que conllevarse una disminución de la fotosíntesis. La fotosíntesis bruta se obtuvo sumando la tasa de fotosíntesis neta a cada radiación a la tasa de respiración en oscuridad, ya que cada muestra debe compensar la respiración del talo antes de empezar a ganar CO₂ de manera neta bajo la luz. El número de muestras usado para representar las curvas de luz a cada temperatura varió en función de la especie. *D. oreina* mostró escasa variabilidad interespecífica y se usaron 4 talos a cada una de las temperaturas, aunque con la mayoría se estandarizó el número de réplicas a n=5. En algunos casos (como *X. elegans*) la elevada variabilidad de las medidas a algunas temperaturas condujo a una mayor replicación, llegando hasta las 14 muestras a 15 °C. Se trabajó con un grupo de muestras a 0, 5, 10, y 15 °C y con otro distinto a 15, 20 y 25 °C, con el fin de evitar muchos días de medida en las mismas muestras. Cada una de las muestras estuvo expuesta a un máximo de 5 días de medidas de intercambio gaseoso. Los valores a 15 °C sirvieron como nexo entre ambos grupos muestrales. La figura 4 muestra un esquema de los dos procedimientos comentados.

INTERCAMBIO GASEOSO



Figura 4. Protocolos de trabajo en curvas de deshidratación y curvas de luz.

Con el fin de no perder información imprescindible para entender la respuesta de las muestras a la luz, se han realizado curvas de luz detalladas para todas las especies a 0, 25, 50, 100, 200, 400, 800 y 1200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y 15 °C. Esta temperatura permite llevar

a cabo curvas más largas con mayor margen para evitar la deshidratación que temperaturas mayores. Se han añadido estas curvas de luz incluyendo radiaciones de baja intensidad para poder obtener información precisa de los puntos de compensación de luz, puntos de saturación de luz y rendimiento cuántico, todos parámetros importantes para conocer la adaptación de las especies estudiadas a las condiciones de montaña. Los datos se han obtenido por ajuste de las curvas a la función de Smith (Green et al. 1997) usando el programa sigmapolt 10.0. La función de Smith viene definida por la siguiente ecuación:

$$f = \frac{a \times PPF D}{\sqrt{1 + \left(\frac{a \times PPF D}{b}\right)^2}} - RO$$

Donde a y b vienen definidos por la pendiente de la curva y la máxima tasa bruta de asimilación fotosintética respectivamente. El mínimo número de réplicas de cada especie utilizado para llevar a cabo estas curvas fue n=4 para *R. melanophthalma* y *P. corallina*, con un número de réplicas de n=5 para el resto de especies.

El aparato de intercambio gaseoso mide la fotosíntesis neta y la respiración en oscuridad como cantidad de CO₂ aportada o retirada de la corriente de aire en forma de partes por millón (ppm). Para poder homogeneizar los datos y compararlos es necesario referir esas ppm a un peso seco, una superficie o una cantidad de clorofila. Al estar la mayoría de nuestros líquenes íntimamente unidos al sustrato no es posible separarlos y medir el peso del talo con precisión. Por tanto hemos expresado la fotosíntesis por unidad de superficie y en función del contenido en clorofila. Para el cálculo de la superficie de los talos se utilizó el programa de análisis de imagen Image J (National Institute of Health, Bethesda Maryland, USA). Para el cálculo de la fotosíntesis por unidad de superficie se utilizó la siguiente fórmula:

$$FN / RO(\mu mol CO_2 m^{-2} s^{-1}) = \frac{ppm CO_2 \left(F \left(\frac{ml}{min} \right) \times \frac{60}{1000} \right) \times 1.811 \times 10^4}{44.011 \times 3600 \times S(cm^2)}$$

Donde las únicas variables a introducir son las ppm obtenidas con el detector de infrarrojo, el flujo en ml por minuto y la superficie del talo en cm^2 . El resto de valores sirven para transformar las unidades y son constantes durante el experimento.

Y, por último, para calcular la fotosíntesis por unidad de clorofila:

$$FN(\text{mgCO}_2\text{mgchl}^{-1}\text{h}^{-1}) = \frac{\text{ppmCO}_2 \left(F \left(\frac{\text{ml}}{\text{min}} \right) \times \frac{60}{1000} \right) \times 1.811}{1000 \times \text{chl}(\text{mg})}$$

Donde las variables a introducir son las ppm CO_2 , el flujo del aparato (F) y la clorofila del talo en mg (chl).

2.3. FLUORESCENCIA DE LA CLOROFILA *a*

2.3.1. Técnica y descripción del aparato

Las moléculas de clorofila se encuentran en la membrana del tilacoide de los cloroplastos agrupadas junto a otros pigmentos formando los fotosistemas, estructuras encargadas de captar la luz incidente (complejo antena) y dirigirla a los centros de reacción, donde una molécula de clorofila *a* cederá un electrón a un aceptor primario iniciando la fase lumínica de la fotosíntesis. En dicho proceso se encuentran involucrados tanto el fotosistema I (P 700) como el II (P 680), que se diferencian en el óptimo de absorción de sus moléculas de clorofila respectivas, 700 y 680 nm (B. Coll et al. 1980).

La fluorescencia de la clorofila como técnica de trabajo en fisiología vegetal tiene su origen en los descubrimientos llevados a cabo en la década de los sesenta por Kautsky y colaboradores (Kautsky et al. 1960). El llamado efecto Kautsky (figura 5) consiste en la observación de un aumento de la fluorescencia de la clorofila *a* al pasar un tejido fotosintéticamente activo de la oscuridad a la luz, así como una disminución de la misma tras el primer segundo en iluminación, que se explica por mecanismos de atenuación de dicha señal de fluorescencia (Maxwell y Johnson 2000).

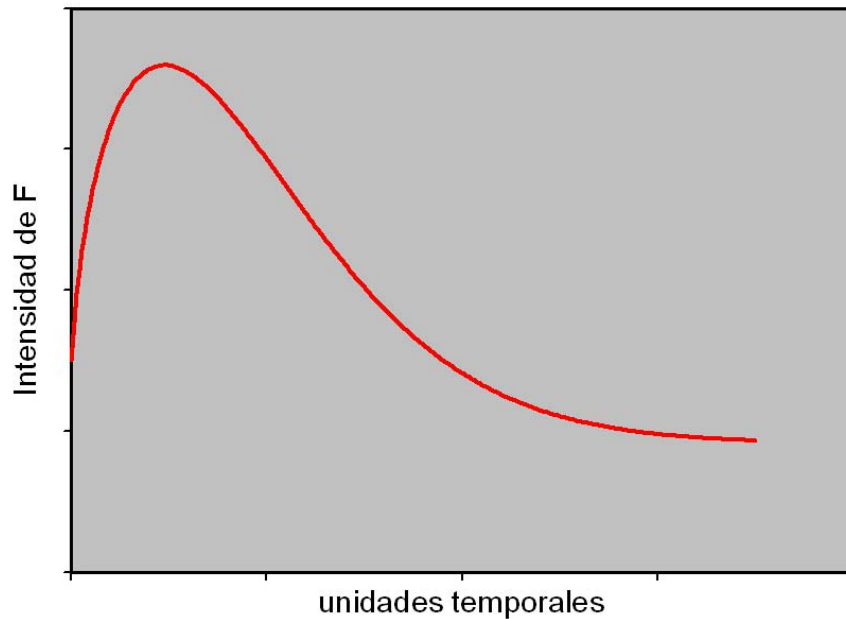


Figura 5. Efecto Kautsky, aumento y rápida disminución de la señal de fluorescencia al pasar un tejido fotosintético de la oscuridad a luz. Unidades temporales en segundos

Estos trabajos permitieron entender que la energía recibida tras iluminar una muestra vegetal con actividad fotosintética, se podía disipar a través de tres mecanismos. En primer lugar, parte de la energía se puede eliminar en forma de fluorescencia, para lo cual es necesario que un electrón de la clorofila *a* previamente promocionado a un nivel energético superior vuelva a su nivel energético de reposo. En segundo lugar, la energía lumínica puede dirigirse a los aceptores primarios de electrones iniciando la ruta fotosintética, y por último, la energía incidente se puede eliminar en forma de calor a través de distintos mecanismos de protección. El hecho de que estos tres mecanismos compitan entre si nos permite obtener información sobre cada uno a través de los otros, ya que el aumento de uno de los tres llevará asociada la disminución de los otros dos. Por tanto, la medida del rendimiento de la señal de fluorescencia de la clorofila *a* nos permitirá obtener información sobre cambios en la eficacia de la ruta fotoquímica y en la disipación de energía en forma de calor. La aparición de sistemas de medición con luz modulada fueron los que realmente hicieron que la técnica de la fluorescencia fuera aplicable como indicador de fotosíntesis de manera generalizada. Esta fuente de luz modulada permite que el detector del aparato mida exclusivamente la respuesta de fluorescencia correspondiente a la luz emitida, eliminando cualquier otro ruido de fondo y permitiendo trabajar en condiciones de iluminación ambiental (Maxwell y Johnson 2000).

Para determinar la diferencia del efecto entre los dos factores atenuantes de la señal de fluorescencia se utiliza el método del pulso de luz saturante representado en la figura 6. El método consiste en adaptar una muestra vegetal a oscuridad y medir su fluorescencia basal o F_0 en condiciones de luz no actínica (luz que no inicia el transporte electrónico en los centros de reacción). Después se saturan todos los centros de reacción con un pulso de luz breve pero muy potente, de tal manera que la señal de fluorescencia obtenida es la fluorescencia máxima o F_m . A continuación se repite el proceso con la muestra adaptada a luz y se calcula la fluorescencia basal en luz, F_t , así como la fluorescencia máxima en luz, F_m' .

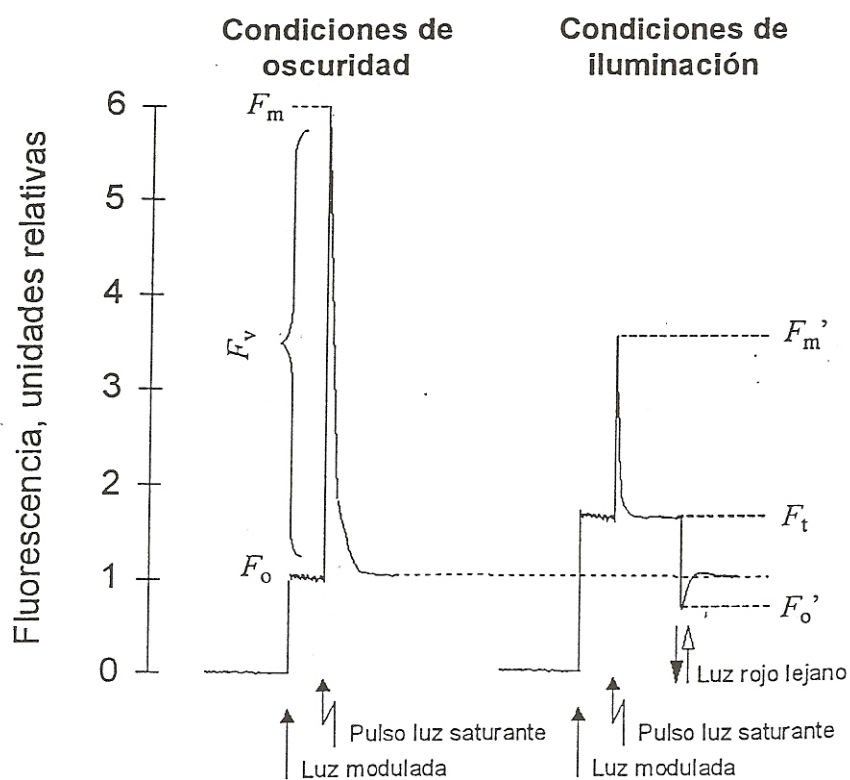


Figura 6. Esquema del método del pulso de luz saturante

Así, según Schreiber et al. (1994) se puede calcular la máxima eficiencia cuántica del fotosistema II (F_v/F_m) en condiciones de oscuridad a través de la siguiente ecuación:

$$(F_v/F_m) = (F_m - F_0) / F_m$$

Es un valor potencial y se utiliza como referente para conocer el estado del fotosistema II, siendo valores óptimos aquellos alrededor de 0,8 en plantas vasculares (Fracheboud 2003). Los líquenes suelen presentar valores óptimos ligeramente inferiores.

Tras aplicar iluminación constante, la fluorescencia experimenta un aumento debido a un período refractario en el que las enzimas fotosintéticas deben ser activadas por luz, tras el cual comienza a disminuir debido a los dos mecanismos de atenuación ya mencionados. En estas condiciones se puede calcular el rendimiento cuántico del transporte de electrones en el fotosistema II (Φ PSII) (Maxwell y Johnson 2000):

$$\Phi\text{PSII} = (F_m' - F_t) / F_m'$$

Φ PSII es un indicador de la eficacia de los centros de reacción en condiciones de iluminación. Estima la eficacia del PS II usando la luz recibida para reducir el aceptor primario de electrones (Q_A) en la ruta fotosintética (Baker 2008). Al ser un ratio, Φ PSII es un parámetro adecuado para establecer comparaciones entre distintos individuos cuyas distintas características morfológicas o distintos contenidos en clorofila podrían generar distintos valores de fluorescencia.

El valor cualitativo de Φ PSII como indicador de actividad fotosintética puede pasar a índice cuantitativo si se convierte en tasa de transporte de electrones o ETR, indicador de capacidad fotosintética *in vivo* (Genty et al. 1989). En plantas vasculares se calcula según la siguiente fórmula:

$$\text{ETR} = \Phi\text{PSII} \times \text{PPFD} \times 0,5 \times 0,84 \text{ (Del Prado 2001)}$$

Donde PPFD es la radiación incidente en la superficie de la hoja, 0,84 un indicador de la radiación realmente absorbida y 0,5 un factor de corrección que determina la partición de la energía incidente en los fotosistemas I y II. A pesar de la buena correlación existente en muchos casos entre ETR y fijación de CO_2 en plantas vasculares, ciertos fenómenos como la fotorespiración pueden generar un transporte electrónico no fotosintético que podría inducir a error. Por tanto, en determinadas situaciones, el parámetro ETR debe ser considerado con precaución. En líquenes, donde no se puede hacer una estimación precisa sobre la cantidad real de radiación que llega al

fotobionte, la correlación entre el ETR y la fijación de CO₂ es normalmente débil (Leisner et al. 1997; Green et al. 1998; Lange et al. 1999; Del Prado 2001).

Para el cálculo de la atenuación no fotoquímica (qP) de la fluorescencia es necesario conocer el parámetro F₀' , que se puede definir como la fluorescencia mínima de una muestra preiluminada, y se calcula iluminando la muestra con luz roja lejana (Del Prado 2001). El término (qP) es un indicador de la cantidad de centros de reacción que se encuentran abiertos (Maxwell y Johnson 2000) y viene definido por la siguiente ecuación:

$$qP = (F_m' - F_t) / (F_m' - F_0')$$

La atenuación no fotoquímica (NPQ) viene determinada por las diferencias entre las fluorescencias máximas en luz y en oscuridad, se puede calcular a partir de la siguiente ecuación:

$$NPQ = (F_m - F_m') / F_m' \text{ (Fracheboud 2003)}$$

Para llevar a cabo las medidas de fluorescencia se utilizó un fluorómetro portátil tipo MINI PAM (Walz, Alemania, figura 7). El aparato está formado por una unidad central y una fibra óptica que transmite la señal luminosa desde la unidad central y recoge la señal de fluorescencia desde la muestra. La unidad central contiene los componentes necesarios para generar y detectar la señal de fluorescencia, el sistema de adquisición y almacenamiento de datos, una fuente de luz actínica o fotosintéticamente activa, una batería recargable de 12V y un teclado y una pantalla para programar las medidas. La señal de fluorescencia es generada con una luz roja modulada emitida por un diodo emisor de luz (LED). La emisión de pulsos de saturación y de medidas continuadas con luz actínica se lleva a cabo con una lámpara halógena en miniatura (Bellaphot, Osram) de 8V y 20W de potencia. La fibra óptica conectada a la unidad central tiene un diámetro de 5,5 mm, 100 cm de longitud y está formada por numerosas fibras pequeñas de 70 μm que aseguran un campo de iluminación homogéneo.



Figura 7. MINIPAM funcionando en el laboratorio

2.3.2. Protocolo de trabajo.

Cinco talos de cada una de las especies incluidas en el catálogo de líquenes de montaña fueron seleccionadas para llevar a cabo las medidas de fluorescencia. Las muestras fueron hidratadas a saturación por inmersión en agua mineral durante 20 minutos, durante los cuales los centros de reacción en los fotosistemas quedaron “abiertos” o totalmente oxidados por la ausencia de luz. Durante el primer día de medidas se determinaron los Fv/Fm de todas las muestras, tomándose 3 medidas por talo y cinco talos por cada especie. Así se obtuvo una medida fiable de Fv/Fm para cada especie que sirvió como valor de referencia. En los siguientes días se llevaron a cabo las curvas de inducción y recuperación a tres radiaciones distintas, 112, 367 y 1115 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, midiéndose solamente una radiación por talo y día para evitar el posible estrés de las algas por repetidos ciclos de hidratación y deshidratación. Tras esto las muestras fueron colocadas bajo una plantilla de plástico transparente con agujeros del grosor de la fibra óptica para permitir mantener la misma en un punto fijo durante las curvas de inducción. La plantilla permitió establecer una referencia para determinar una posición fija dentro del talo sobre la que se pudiera repetir las medidas en días consecutivos. Las curvas de inducción y recuperación anteriormente mencionadas comienzan con una medida del Fv/Fm de la muestra previamente adaptada a oscuridad. Después la muestra es expuesta a una radiación determinada y tras sucesivos pulsos de saturación se monitoriza el valor de ΦPSII cada 20 segundos durante un período de 4 minutos con iluminación fija y constante. El proceso de recuperación consiste en volver a oscurecer las muestras y ver la evolución del ΦPSII durante 9 minutos sin luz a distintos intervalos de tiempo. Para unificar la terminología en tablas y gráficas, así como a lo

largo del texto en la sección de resultados y en la discusión, se ha utilizado el término Yield (rendimiento de la señal de fluorescencia) como sustituto de Fv/Fm y Φ PSII. Aparte de todas las especies del estudio, en el análisis de la fluorescencia a distintas radiaciones se incluyó una especie crustácea terrícola del género *Lepraria*, con una ecología de sombra muy definida ya que se recolectó bajo grandes bloques de piedra en un pinar de la Sierra de Guadarrama a 1800 m de altitud. Esta especie se escogió como control de las especies más expuestas a la radiación.

2.4. ANÁLISIS DE PIGMENTOS

Para llevar a cabo la cuantificación de clorofilas en cada una de las especies estudiadas se siguió el método de extracción propuesto por Barnes et al. (1992). Muchas de las especies estudiadas son especies crustáceas con un alto grado de adhesión al sustrato, por lo que la separación total entre líquen y sustrato resultó dificultosa. Para evitar contaminación en las medidas de peso de cada muestra a extraer se procedió a medir la clorofila en mg/m^2 , que es una unidad frecuente de medida clorofila en líquenes crustáceos (Lange et al. 1994; Tretiach y Pecchiari 1995). De esta manera se tomó un mínimo de tres muestras de $0,5 \text{ cm}^2$ de cada talo y se utilizaron 5 talos por especie. Para delimitar los $0,5 \text{ cm}^2$ de cada muestra se utilizaron recuadros de papel milimetrado con esa superficie y se rascó con una lanceta toda la superficie seleccionada. Las muestras se lavaron 6 veces en acetona saturada en CaCO_3 para extraer previamente todas las sustancias líquénicas que pudieran generar una degradación de clorofila a feofitina (Brown y Hooker 1977; Barnes et al. 1992). La saturación en CaCO_3 se llevó a cabo para evitar un medio ácido durante la extracción. Tras los seis lavados se procedió a la extracción de las clorofilas en 5ml de DMSO, también saturado en CaCO_3 . Los extractos se mantuvieron en estufa a 65°C durante 40 minutos, y posteriormente se midieron previa protección de la luz a distintas longitudes de onda:

-A 664,9 y 648,2 nm se midieron las concentraciones de clorofila *a* y *b* siguiendo las siguientes ecuaciones (Barnes et al. 1992):

$$\text{Clorofila } a = 14,85 \times A_{664,9} - 5,14 \times A_{648,2}$$

$$\text{Clorofila } b = 25,48 \times A_{648,2} - 7,36 \times A_{664,9}$$

Las cantidades obtenidas a raíz de estas ecuaciones se refirieron al volumen de extracción (5 ml) y posteriormente a la superficie de la muestra extraída (0,5 cm²).

A 750 nm se midió la turbidez del extracto. A 435 y 415 nm se midió el PQa (A435nm / A415 nm) o índice de feofitinización, un indicador de la degradación de clorofila a feofitina (Ronen y Galun 1984; Balaguer y Manrique 1991). Para llevar a cabo las medidas de absorbancia se utilizó un espectrofotómetro UVIKON XL de doble haz con rango de longitud de onda 180-900 nm y precisión de $\pm 0,025$ nm.

2.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para buscar diferencias estadísticas entre los distintos grupos muestrales se llevaron a cabo ANOVAS simples con un nivel de significancia de $p \leq 0,05$, añadiendo un test de Duncan de análisis múltiple de rango en los casos necesarios. Se usó el programa Statsgraphic versión 5.1. Para los ajustes de las nubes de puntos y las curvas se usó sigmaplot 10.0.

3. RESULTADOS

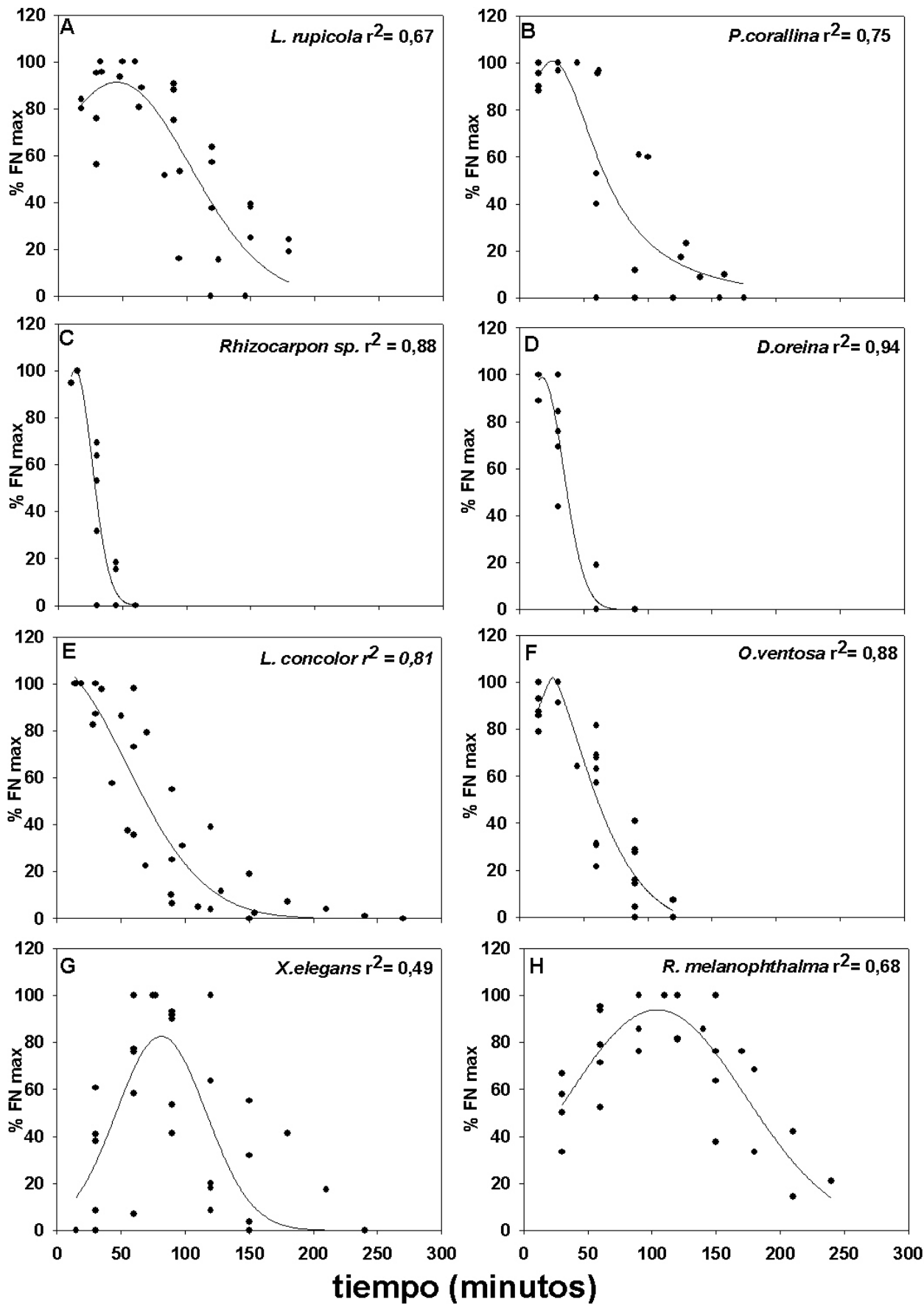
3.1. RELACIONES HÍDRICAS EN LÍQUENES DE MONTAÑA

La figura 8, compuesta por varias gráficas (A-H), muestra la relación observada en el laboratorio entre el porcentaje respecto al máximo de la fotosíntesis neta (% FN) frente al tiempo (minutos) a $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y 15°C tras hidratación máxima para todas las especies. Las gráficas que van de la 8A a la 8D (*L. rupicola*, *P. corallina*, *Rhizocarpon sp.*, *D. oreina*) pertenecen a líquenes que fueron catalogados como crustáceos debido a su elevado grado de unión al sustrato. Las gráficas 8E y 8F pertenecen a líquenes que presentan formas intermedias, con *L. concolor* como crustáceo lobulado y *O. ventosa* como crustáceo bulado según la clasificación de Barreno y Rico (1984). Las figuras 8G y 8H representan a las especies *X. elegans* y *R. melanophthalma* respectivamente, ambas especies foliáceas y por tanto no totalmente adheridas al sustrato. Mientras la primera presenta un mayor número de puntos de unión a la roca, la segunda presenta sólo uno, siendo un líquen foliáceo umbilicado.

Como se puede observar, *Rhizocarpon sp.* y *D. oreina* presentaron numerosas similitudes entre sus curvas respectivas (8C y 8D). En ambos casos se observó la ausencia de depresión de la fotosíntesis neta a altos contenidos hídricos (primeros minutos), ya que las máximas tasas se obtuvieron nada más comenzar las medidas. También compartieron un escaso periodo de actividad, ya que la fotosíntesis neta llegó a 0 pasados los 50 minutos en el caso de *Rhizocarpon sp.* y poco después en el caso de *D. oreina*. Las otras dos especies catalogadas como dentro del grupo de crustáceos son *L. rupicola* y *P. corallina* (8A y 8B). En *P. corallina* tampoco se apreció depresión de la fotosíntesis neta a altos contenidos hídricos, pero presentó un mayor período de actividad que alcanza la ventana entre 150 y 200 minutos, por lo que se observó una diferencia considerable con las dos especies citadas anteriormente. En el caso *L. rupicola*, se apreció una ligera disminución de la fotosíntesis neta a altos contenidos hídricos, aunque en ningún caso se puede asegurar que sea intensa. El periodo de actividad hasta la inactividad metabólica fue parecido al observado en *P. corallina*.

El segundo grupo de líquenes, *L. concolor* y *O. ventosa*, corresponden a las curvas 8E y 8F respectivamente. *L. concolor* presentó máxima actividad a altos contenidos hídricos y una tendencia hacia un periodo más largo de actividad. *O. ventosa* mostró una leve disminución de la actividad fotosintética al principio de la curva similar a la que se apreció en *L. rupicola*, así como una tendencia a inactivarse antes que *L. concolor*.

X. elegans y *R. melanophthalma*, los dos líquenes foliáceos con menor grado de adhesión al sustrato presentaron comportamientos similares. En ambos casos aparece una depresión definida de la actividad fotosintética a altos contenidos hídricos seguida de otra fase de máxima actividad que coincide con el óptimo de hidratación de cada especie. Esta fase de óptimo aparece ligeramente antes en *X. elegans* que en *R. melanophthalma*. Como ocurre en el resto de especies, la actividad fotosintética tiende a cero según va avanzando la deshidratación de los talos. Los talos de *X. elegans* mostraron una mayor depresión de la fotosíntesis neta a altos contenidos hídricos (con valores entorno al 20% de la actividad fotosintética máxima) que los de *R. melanophthalma*, (con valores iniciales entre el 40% y 50% de la máxima actividad fotosintética), si bien es cierto que el índice de correlación de la curva en el caso de la primera es menor (Figuras 8G y 8H).



Figuras 8A-8H. Porcentaje de máxima fotosíntesis neta frente a tiempo en 8 especies de líquenes de montaña

3.2. CURVAS DE LUZ Y TEMPERATURA EN LÍQUENES DE MONTAÑA

Las curvas de luz y temperatura llevadas a cabo sobre todas las especies del estudio nos aportan información útil sobre el comportamiento metabólico de los líquenes en condiciones cambiantes de luz y temperatura, por lo que podemos saber como están de adaptados a las condiciones de montaña.

La figura 9A-9H nos muestra las curvas de luz siguiendo el mismo orden que se ha usado para las curvas de deshidratación, y la figura 10A-10H hace lo mismo en el caso de la respuesta observada a la temperatura. Las figuras 9A-9D representan las curvas de los cuatro líquenes crustáceos menos desarrollados. Se puede observar como los perfiles de las cuatro curvas fueron bastante parecidos, con tasas de respiración y fotosíntesis neta dentro de rangos similares.

Las tablas 1 y 2 muestran a su vez los valores de máxima tasa fotosintética neta (A_{max}) y respiración en oscuridad (RO) para todas las especies a cada una de las temperaturas estudiadas.

L. rupicola (9A) mostró una temperatura óptima para la fotosíntesis neta a 15 °C, con $1,93 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y una RO a la misma temperatura de $0,81 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. *P. corallina* (9B) presentó un óptimo también a 15 °C para la fotosíntesis neta ($2,23 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), incluso más próximo al valor obtenido a los 10 °C ($2,12 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) que al valor obtenido a 20 °C ($1,80 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), que en condiciones normales es una temperatura más favorable para el proceso fotosintético. La RO a la temperatura óptima fue de $1,51 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, considerablemente mayor que la obtenida para *L. rupicola*. *Rhizocarpon sp.* y *D. oreina* mostraron también óptimos de temperatura a 15 °C. La primera obtuvo $2,71 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de A_{max} y $1,04 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de RO, mientras la segunda obtuvo valores de $2,38$ y $0,88 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ para A_{max} y RO respectivamente a la temperatura óptima.

La figuras 9E y 9F corresponden a las especies *L. concolor* y *O. ventosa*, con biotipo crustáceo lobulado y bulado respectivamente. Ambas especies mostraron curvas de luz más separadas entre temperaturas y mayores tasas que las obtenidas para el primer grupo de líquenes. *L. concolor* presentó un óptimo de temperatura a 20 °C con $4,98$

$\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de Amax y 1,22 de RO (RO a 15 °C fue 1,07 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), mientras *O. ventosa* mostró 3,35 y 2,35 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ respectivamente para un temperatura óptima de nuevo de 15 °C.

Nótese como en el caso de *O. ventosa* el aumento en Amax respecto al grupo anterior va acompañado de un aumento en RO, mientras que para *L. concolor* se produce un aumento característico en Amax mientras que la RO mantiene tasas dentro del rango del grupo anterior.

Las figuras 9G y 9H corresponden a *X. elegans* y *R. melanophthalma* respectivamente, las dos especies con biotipo foliáceo. *X. elegans* mostró su óptimo de temperatura a 20 °C con valores de 4,79 y 3,67 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ para Amax y RO, pero con un balance de Amax/RO mucho más favorable a 15 °C (4,61 y 2,10 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). *R. melanophthalma* obtuvo un óptimo de temperatura entre 10-15 °C, con valores idénticos de Amax para ambas, siendo con diferencia la especie más productiva con un valor de Amax de 8,68 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y una RO de 3,39 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Todas las especies mostraron una tendencia a la saturación en todas las curvas de luz estudiadas, pero en ningún caso hubo señal de fotoinhibición, ya que en todas las especies la fotosíntesis neta aumentó al llevar a los líquenes a altas radiaciones (1200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$).

La temperatura óptima para la fotosíntesis neta apareció mayormente a 15 °C, con dos especies con óptimos a 20 °C. Algunas llegaron a presentar tasas muy próximas al óptimo a los 10 °C. La evolución de la fotosíntesis neta y de la respiración en función de la temperatura a distintos niveles de radiación se ve con más claridad en las figuras 10A-10H. Con estas gráficas se pueden confirmar las tendencias mencionadas.

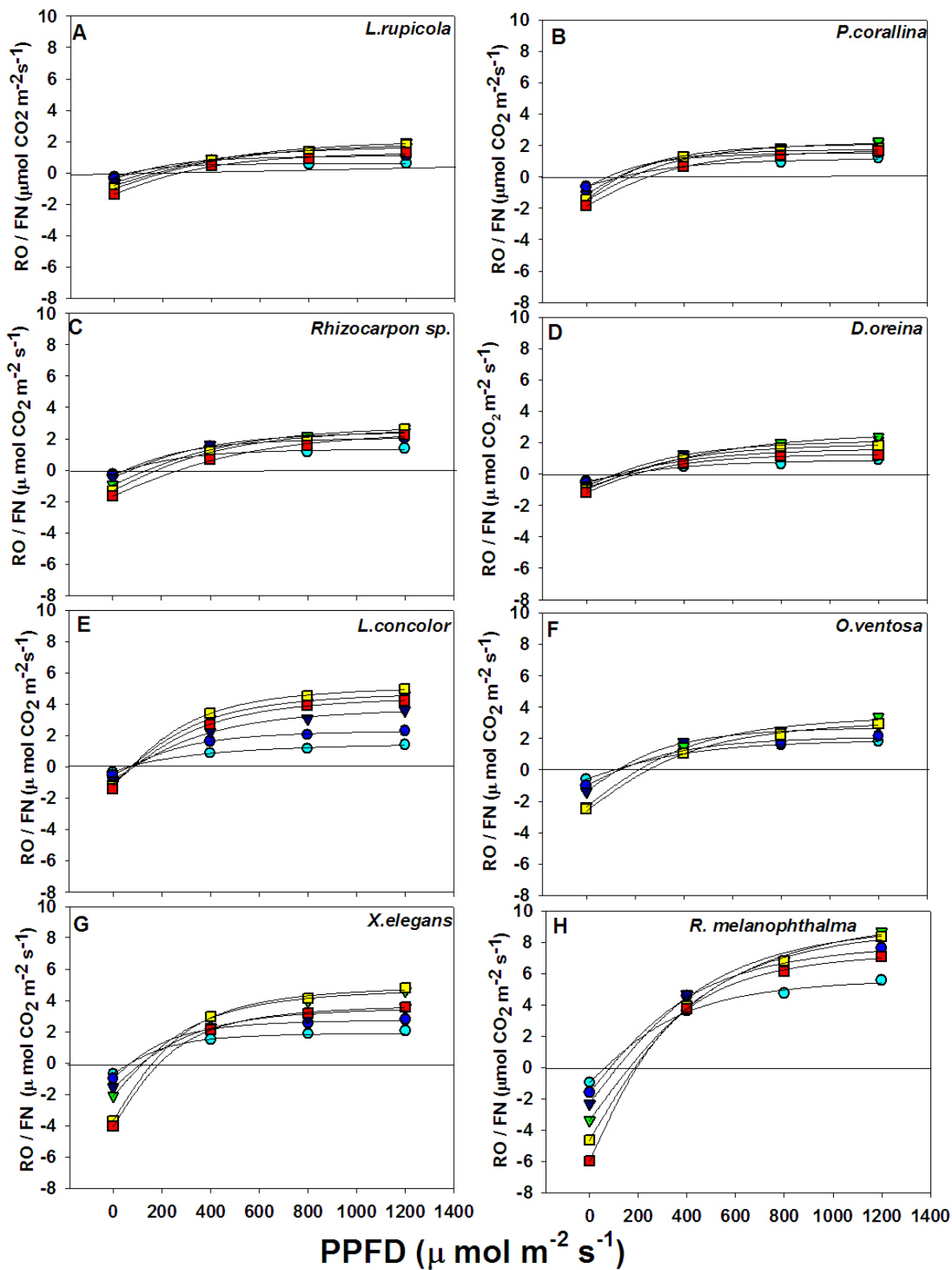
La tabla 3 muestra los datos obtenidos a partir de las curvas de luz detalladas (que también se ajustaron a la función de Smith) para todas las especies estudiadas. El haber detallado más la curva con la inclusión de radiaciones de baja intensidad permite aumentar la precisión de las medidas de los puntos de compensación de luz, de saturación de luz, y el rendimiento cuántico.

La especie con mayor punto de compensación de luz fue *D. oreina*, con $114 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, seguida de *R. melanophthalma* y *Rhizocarpon sp.*. Tras estas especies siguen *P. corallina*, *L. rupicola* y *X. elegans*, todas con valores similares entre sí y muy próximos a las especies anteriores. El valor próximo a $90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ parece el más habitual dentro de todo el grupo. Más apartada, en último lugar, aparece *L. concolor*, con $60,7 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

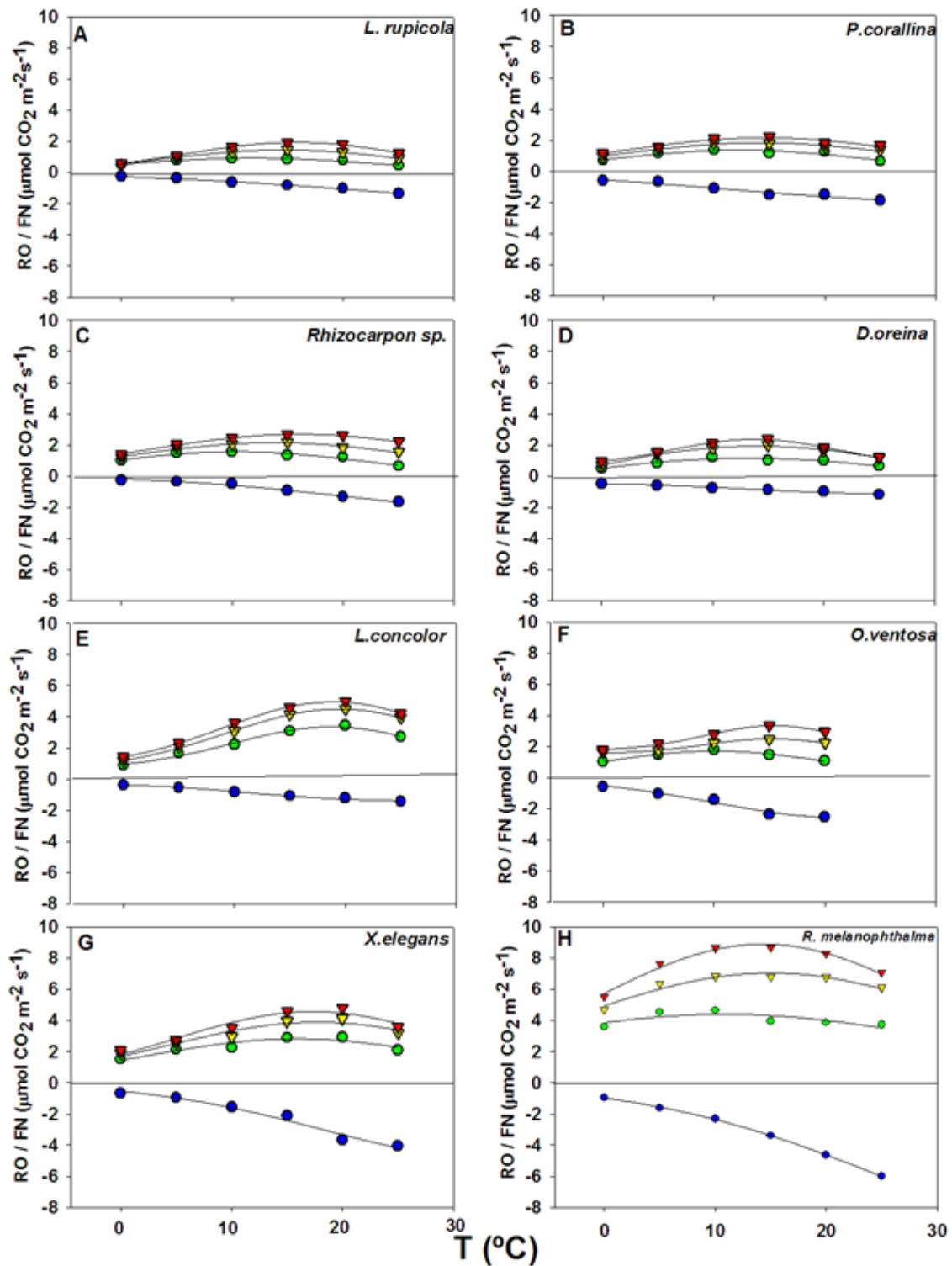
Los puntos de saturación de luz parecen ir relacionados, al menos a grandes rasgos, con los puntos de compensación. La especie con mayor punto de compensación (*D. oreina*) muestra también el mayor punto de saturación junto a *R. melanophthalma*, cumpliéndose la misma relación con la que menor punto de compensación presentó, *L. concolor*, que obtuvo un punto de saturación de $487,3 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. El resto de especies obtuvieron puntos de saturación intermedios que estuvieron cerca de los $600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

El rendimiento cuántico ó Φ , es un indicador de la eficacia fotosintética (Kershaw 1985) a través de la capacidad del aparato fotosintético de aprovechar la luz incidente. La tabla 3 muestra el valor más alto para *L. concolor*, seguida de cerca de *R. melanophthalma* y después *X. elegans*. El valor más bajo corresponde a *D. oreina*, la especie con mayores puntos de compensación y de saturación de luz de todas las estudiadas.

Como se puede observar, *O. ventosa* no aparece incluida ni en las tablas, ni en las curvas de luz detalladas, ya que las muestras destinadas a ello presentaron algún tipo de alteración durante su almacenamiento en el congelador que provocó una intensa degradación de las mismas, dando señales muy bajas de fotosíntesis que no han sido incluidas



Figuras 9A-9H. Evolución de la respiración en oscuridad y la fotosíntesis neta en función de la luz incidente (PPFD) en todas las especies del estudio a distintas temperaturas. Círculo azul claro (0°C), círculo azul oscuro (5°C), triángulo azul oscuro (10°C), triángulo verde (15°C), cuadrado amarillo (20°C), cuadrado rojo (25°C). Todas las curvas se ajustaron a la función de Smith, siendo en todos los casos $r^2 \geq 0,986$ y $p < 0,05$.



Figuras 10A -10H. Evolución de la respiración en oscuridad y la fotosíntesis neta en función de la temperatura a distintas radiaciones. Círculos azules ($0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), círculos verdes ($400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), triángulo amarillo ($800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), triángulo rojo ($1200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Las curvas se han ajustado a funciones gaussianas de 3 y 4 parámetros. En todos los casos $r^2 \geq 0,84$ excepto en *R. melanophthalma* (H) $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, donde $r^2 = 0,55$

Especie	FN 0°C	FN 5°C	FN 10°C	FN 15°C	FN 20°C	FN 25°C
<i>L.rupicola</i>	0,68±0,18	1,10±0,22	1,65±0,24	1,93±0,37	1,80±0,39	1,28±0,42
<i>P.corallina</i>	1,19±0,43	1,54±0,82	2,12±0,87	2,23±0,60	1,81±0,56	1,66±0,65
<i>Rhizocarpon sp.</i>	1,37±0,35	2,07±0,38	2,44±0,38	2,64±0,44	2,59±0,55	2,21±0,69
<i>D.oreina</i>	0,94±0,24	1,54±0,44	2,12±0,30	2,38±0,33	1,83±0,66	1,23±0,28
<i>L.concolor</i>	1,42±0,39	2,29±0,51	3,60±1,30	4,59±1,36	4,98±1,36	4,22±1,27
<i>O.ventosa</i>	1,81±0,48	2,16±0,55	2,80±0,63	3,35±1,02	2,87±0,33	0,96±0,22
<i>X.elegans</i>	2,09±1,09	2,77±1,50	3,53±1,59	4,61±1,63	4,80±1,17	3,57±1,06
<i>R.melanophthalma</i>	5,56±1,75	7,63±1,90	8,68±1,91	8,68±2,07	8,31±2,12	7,07±1,80

Tabla 1. Tasas de fotosíntesis neta (FN) con desviación estándar en $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ a $1200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de radiación para todas las especies estudiadas a distintas temperaturas. La máxima tasa de asimilación (Amax) para cada especie está marcada en negrita

Especies	RO 0°C	RO 5°C	RO 10°C	RO 15°C	RO20°C	RO 25°C
<i>L.rupicola</i>	0,26±0,07	0,37±0,09	0,62±0,13	0,81±0,12	1,00±0,06	1,35±0,18
<i>P.corallina</i>	0,60±0,19	0,65±0,27	1,11±0,58	1,51±0,58	1,47±0,32	1,86±0,43
<i>Rhizocarpon sp.</i>	0,25±0,15	0,34±0,40	0,49±0,34	0,94±0,30	1,31±0,24	1,31±0,24
<i>D.oreina</i>	0,47±0,17	0,58±0,11	0,76±0,15	0,88±0,19	0,99±0,16	1,18±0,14
<i>L.concolor</i>	0,37±0,11	0,55±0,17	0,84±0,26	1,07±0,29	1,22±0,36	1,44±0,57
<i>O.ventosa</i>	0,58±0,10	1,01±0,18	1,41±0,32	2,35±1,09	2,63±0,94	4,30±0,40
<i>X.elegans</i>	0,68±0,60	0,97±0,74	1,58±0,95	2,11±0,57	3,68±1,48	4,06±0,87
<i>R.melanophthalma</i>	0,96±0,51	1,61±0,46	2,30±0,97	3,39±0,36	4,64±0,60	5,99±1,64

Tabla 2. Respiración en oscuridad (RO) con desviación estándar en $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ para todas las especies estudiadas a distintas temperaturas. La tasa respiratoria asociada a Amax en cada especie aparece marcada en negrita

Especies	PCL ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	PSL ($\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$)	Φ	R^2	p
<i>L.rupicola</i> n=5	88,77	609,66	0,010	0,994	<0,0001
<i>P.corallina</i> n=4	89,58	542,08	0,012	0,980	<0,0001
<i>Rhizocarpon sp.</i> n=5	90,48	575,36	0,011	0,984	<0,0001
<i>D.oreina</i> n=5	113,96	782,42	0,007	0,991	<0,0001
<i>L.concolor</i> n=5	60,69	487,28	0,026	0,971	<0,0001
<i>X.elegans</i> n=5	85,62	599,25	0,026	0,976	<0,0001
<i>R.melanophthalma</i> n=4	93,95	783,74	0,025	0,993	<0,0001

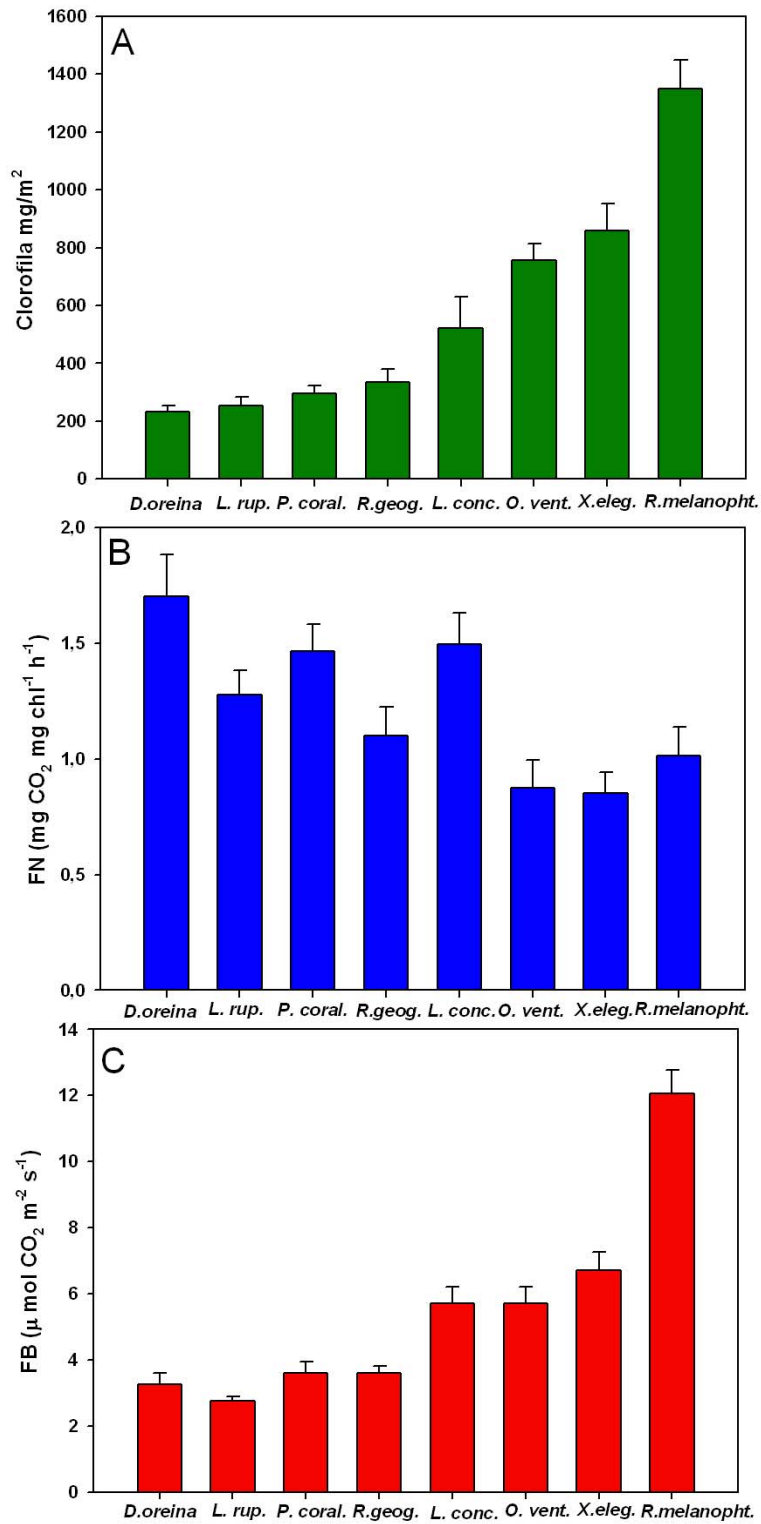
Tabla 3. Punto de compensación de luz (PCL), punto de saturación de luz (PSL), rendimiento cuántico(Φ) y ajustes de las funciones de Smith respectivas en cada una de las curvas de luz de luz detalladas a 15 °C de temperatura

3.3. CONTENIDO EN CLOROFILA, FOTOSÍNTESIS POR CLOROFILA Y FOTOSÍNTESIS BRUTA

El gráfico 11A-11C muestra, respectivamente, el contenido en clorofila en mg/m^2 , la fotosíntesis neta en función del contenido en clorofila en $\text{mg CO}_2 \text{ mg clorofila}^{-1}\text{h}^{-1}$ a 15°C y la fotosíntesis bruta en $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ a 15°C para todas las especies estudiadas.

Como se puede observar en la figura 11A el contenido en clorofila por unidad de superficie presentó un claro orden ascendente desde las especies más adheridas al sustrato hasta las especies foliáceas. Los datos de clorofila aparecen expresados en la tabla 4. *D. oreina* es la especie que menos cantidad de clorofila presentó con $231,28 \text{ mg/m}^2$, pero como se puede observar en la figura 11B es la más eficiente al obtener la mayor tasa de fotosíntesis en función de clorofila a 15°C , $1,70 \text{ mg CO}_2 \text{ mg clorofila}^{-1}\text{h}^{-1}$. *L. rupicola*, *P. corallina* y *Rhizocarpon sp.* siguieron el mismo patrón, con las menores cantidades de clorofila pero con tasas de fotosíntesis neta en función de clorofila que indican un óptimo aprovechamiento de la misma (figuras 11 A y B, tabla 4). *L. concolor* y *O. ventosa* siguen el gradiente de contenido en clorofila en función de la distinta morfología, con la segunda con más clorofila que la primera, pero con *L. concolor* sacando más partido de la misma debido a la clara diferencia a su favor en la tasa de fotosíntesis neta por clorofila ($1,49$ frente a $0,87 \text{ mg CO}_2 \text{ mg clorofila}^{-1}\text{h}^{-1}$). *X. elegans* y *R. melanophthalma* volvieron a aparecer agrupadas respecto al contenido en clorofila, presentando las cantidades más elevadas por unidad de superficie, con una diferencia importante a favor de la segunda (Figura 11A, tabla 4).

A pesar de esas cantidades de clorofila, y aún teniendo en cuenta que son las especies más productivas por unidad de superficie, sus tasas de fotosíntesis neta en función de la clorofila son las más bajas de todas (Figura 11B, tabla 4) por lo que estos líquenes más productivos aprovechan peor sus contenidos en clorofila por unidad de superficie.



Figuras 11A-11C. Contenido en clorofila (mg/m^2), fotosíntesis neta respecto a clorofila a 15°C ($\text{mg CO}_2 \text{ mg clorofila}^{-1} \text{ h}^{-1}$) y fotosíntesis bruta a 15°C ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) en todas las especies estudiadas con error estándar incluido.

Especies	Clorofila (mg/m²)	NP_{15°C}/Chl (mgCO₂mgchl⁻¹h⁻¹)	FB_{15°C}/S (μmol CO₂ m⁻²s⁻¹)
<i>L.rupicola</i>	252,65±72,69 n=6	1,28± 0,26 n=6	2,74±0,44 n=8
<i>P.corallina</i>	295,02±63,10 n=5	1,46±0,26 n=5	3,59±1,10 n=10
<i>Rhizocarpon sp.</i>	335,98±100,57 n=5	1,10±0,28 n=5	3,59±0,64 n=8
<i>D.oreina</i>	231,28±48,18 n=5	1,70±0,40 n=5	3,26±0,85 n=6
<i>L.concolor</i>	521,54±241,54 n=5	1,49±0,31 n=5	5,71±1,37 n=8
<i>O.ventosa</i>	756,03±137,26 n=6	0,87±0,24 n=4	5,70±1,22 n=6
<i>X.elegans</i>	858,13±2645,00 n=8	0,85±0,20 n=5	6,72±2,06 n= 14
<i>R.melanophthalma</i>	1351,07±276,54 n=8	1,01±0,35 n=8	12,07±2,21 n=10

Tabla 4. Contenido en clorofila, fotosíntesis neta en función de la clorofila a 15 °C y fotosíntesis bruta a 15 °C de todas especies incluidas en el estudio. La desviación estándar y el número de réplicas medido aparecen junto a cada valor mostrado.

La figura 11C muestra la fotosíntesis bruta (interpretada como Amax+RO a 15 °C) en μmol CO₂ m⁻² s⁻¹ para todas las especies. Se observa con claridad la idea ya sugerida de que las especies crustáceas del primer grupo son las menos productivas, también en términos de fotosíntesis bruta. *L. rupicola* aparece como la menos productiva, presentando *D. oreina*, *P. corallina* y *Rhizocarpon sp.* valores muy parecidos entre sí (ver tabla 4). Siguiendo en productividad aparecen *L. concolor* y *O. ventosa*, con valores muy similares, y por último están las especies foliáceas, las más productivas por unidad de superficie, con *R. melanophthalma* presentando con claridad los mayores valores (tabla 4).

Las diferencias morfológicas entre las especies, así como los resultados fisiológicos obtenidos, sugieren una clasificación inicial en tres grupos para englobar a todas las

especies en función de su forma de crecimiento. El primer grupo estaría formado por especies crustáceas, y englobaría a *D. oreina*, *Rhizocarpon sp.*, *P. corallina* y *L. rupicola*. En segundo lugar estarían las especies crustáceas lobuladas y buladas; este segundo grupo correspondería a *L. concolor* y *O. ventosa*. Por último, el tercer grupo estaría formado por las especies foliáceas *X. elegans* y *R. melanophthalma*. Un primer análisis de varianza (ANOVA) complementado con un test de rango múltiple (Test de Duncan) indicó diferencias estadísticas significativas en respiración, fotosíntesis neta, fotosíntesis bruta y contenido en clorofila entre los tres grupos comentados ($p=0$ en todos los casos). Con el fin de aclarar si nuestra clasificación tenía un sentido estadístico real se buscaron diferencias estadísticas significativas para los mismos parámetros (respiración, fotosíntesis neta, fotosíntesis bruta y contenido en clorofila) entre los miembros de cada grupo, ya que al ser especies distintas el agrupamiento llevado a cabo podía ser ficticio. En el grupo 1 de líquenes crustáceos no obtuvimos diferencias significativas para fotosíntesis bruta, fotosíntesis neta y clorofila, pero sí para respiración ($p=0,0019$). El grupo 2 arrojó los mismos resultados que el 1, con diferencias significativas por ANOVA únicamente para la respiración ($p=0$). En cambio, el grupo de especies foliáceas mostró diferencias significativas para todos los parámetros estudiados, con $p=0$ para las dos fotosíntesis y respiración, y $p=0,026$ para el contenido en clorofila.

3.4. FLUORESCENCIA DE LA CLOROFILA *a* EN LÍQUENES DE MONTAÑA

Las figuras 12A-12H muestran la evolución del Yield de la fluorescencia durante las curvas de inducción a distintas radiaciones, 122, 367 y 1155 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Al inicio de las curvas se mide el Yield tras adaptación a oscuridad, por lo que se asumen como parámetros óptimos que sirven como referencia para evaluar el estado del fotosistema II. En todos los casos, tras esta primera medida, se somete a las muestras a una iluminación constante de intensidad determinada, mientras a través de pulsos de saturación se obtiene el valor del Yield consecutivamente. Tras cinco minutos la iluminación constante cesa y, de nuevo con pulsos de saturación, se va observando como el Yield se va recuperando en oscuridad hasta un valor final, en el que se puede determinar el grado del estrés lumínico generado por comparación con el factor de Yield inicial.

Como se puede observar en las figuras 12A- 12H, los Yields de partida por encima de 0,6 aparecen en *L. rupicola*, *L. concolor* y *X. elegans*. En los casos del resto de especies, los valores medios de Yield inicial son inferiores, fundamentalmente en torno a 0,5. Mientras en la mayoría de las especies los valores iniciales prácticamente se solapan a cada una de las tres radiaciones, *P. corallina* y *O. ventosa* presentan valores algo más separados. Las especies *L. rupicola*, *Rhizocarpon sp.*, *L. concolor* y *R. melanophthalma* muestran valores por encima del 90% del Yield inicial tras el periodo de recuperación en la curva de inducción a $1155 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Los valores de Yield respecto al inicial a 122 y 367 quedan cerca del 100% en todos los casos y en algunos hasta por encima. *P. corallina*, *O. ventosa* y *X. elegans* presentan en los tres casos valores de Yield por debajo del 90% respecto al valor inicial a $1155 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (tabla 5). *P. corallina* y *X. elegans* presentan valores elevados a 122 y $367 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y experimentan un cierto descenso a los $1155 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (figuras 12B y 12H). *O. ventosa* muestra valores por debajo del 90% a las tres radiaciones, aunque también es cierto que entre ellas se vieron escasas diferencias (figura 12F, Tabla 5).

La tendencia de los valores Yield a distintas radiaciones de la figura 12A-12H se complementa con los valores representados en la tabla 5. Esta muestra los porcentajes de Yield respecto al valor inicial a $1155 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, que es la radiación que puede generar procesos más marcados de fotoinhibición en las especies de montaña. Los porcentajes de Yield mencionados se pueden observar en tres momentos distintos de la curva de inducción, tras el primer pulso de saturación posterior a la adaptación a oscuridad (% Y 0'), tras el último pulso durante la fase lumínica de la curva previo a la recuperación (% Y 4,6') y tras el final del proceso de recuperación que equivale al final de cada curva (% Y 25'). Como se puede observar, al principio de la curva, los valores de Yield quedan considerablemente deprimidos en todas las especies, sin apreciarse diferencias estadísticas significativas entre ellas tras un tratamiento por ANOVA. El valor de porcentaje de Yield respecto al inicial tras el proceso de iluminación (% Y 4,6') es interesante desde el punto de vista de la fototolerancia, ya que indica la capacidad de los fotosistemas de adaptarse a la radiación que ha estado recibiendo. En este caso se observaron diferencias estadísticas significativas por ANOVA al analizar las 9 especies ($p= 0$), por lo que se desarrolló un test de Duncan o análisis múltiple de rango para determinar como se diferenciaban las especies entre sí. Como se puede observar en la tabla 5, la especie usada como control del género *Lepraria sp.* no mostró diferencias

significativas respecto a *X. elegans* pero sí frente al resto de especies, que a pesar de todo no mostraron ser un grupo compacto ya que se vieron diferencias significativas entre algunas de ellas. El valor del porcentaje de Yield respecto al inicial al final de la curva (% Y 25'), mostró una significancia estadística por ANOVA ($p=0$), y el análisis múltiple de rango mostró compactación estadística entre *Lepraria sp.*, *O. ventosa*, *X. elegans*, y *P. corallina*. Los valores obtenidos en el control de sombra si que fueron distintos estadísticamente respecto al resto de especies (tabla 5).

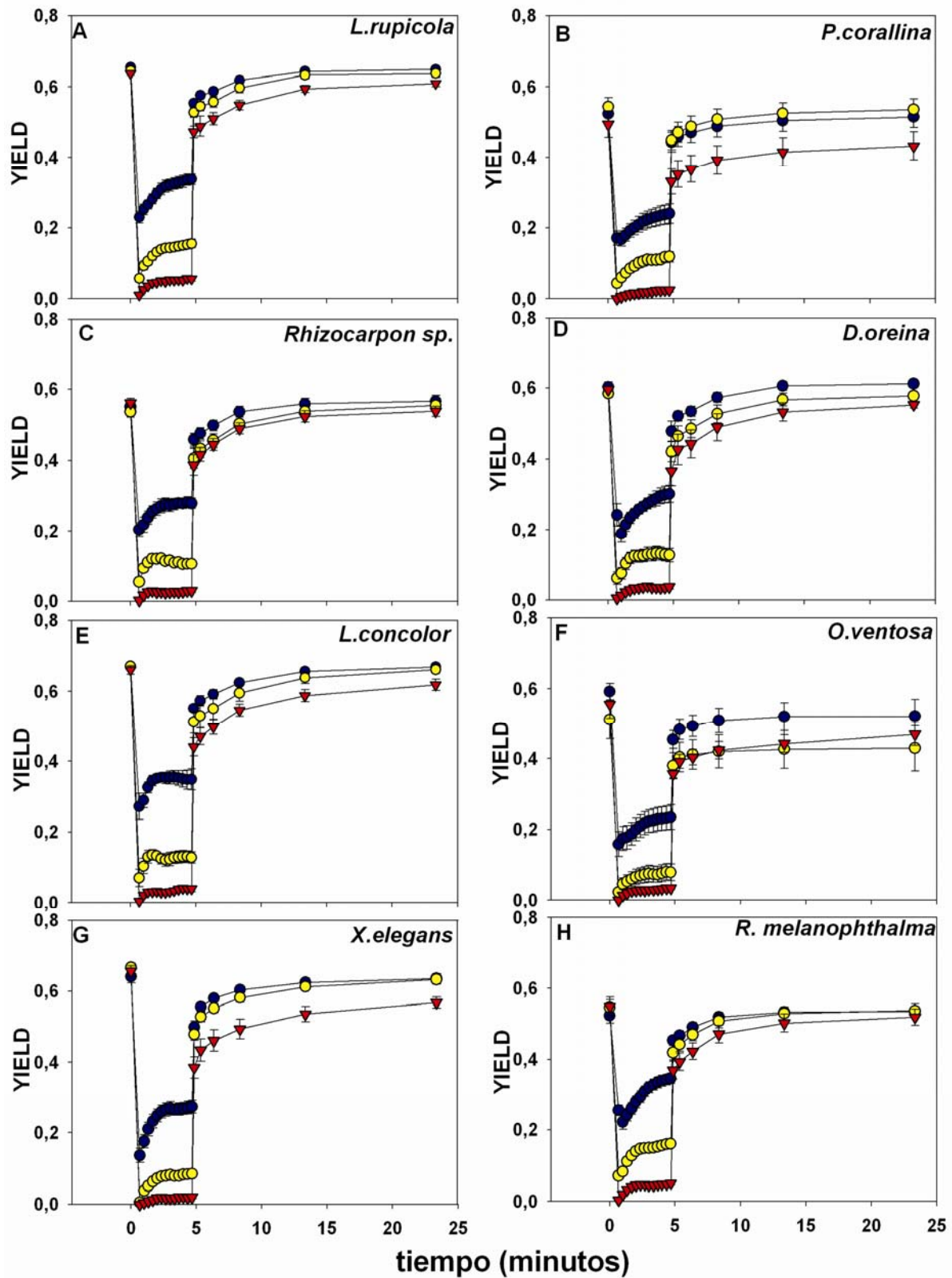
Como aparece indicado en el apartado de material y métodos, el cálculo de ETR se obtiene a través de la multiplicación del Yield por la radiación incidente, incluyendo factores de corrección. Las gráficas de ETR (13A-13H) presentan la utilidad de llevar a cabo un seguimiento del valor de transporte electrónico durante la primera fase de la fotosíntesis en distintos momentos durante los tres tratamientos lumínicos. *L. rupicola*, *R. melanophthalma* y *L. concolor* son las especies que mayores valores de ETR alcanzan, a $1115 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para la primera y a $367 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en el caso de las dos siguientes (figuras 13A, 13H, 13E y tabla 6). El resto de especies muestra valores inferiores en los máximos de ETR (tabla 6, figuras 13A-13H). *P. corallina* y *Rhizocarpon sp.* presentaron sus valores máximos de ETR a $367 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, mientras que *O. ventosa* lo presentó a $1155 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y, por último, *X. elegans* a $122 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Al cesar el periodo de luz y entrar en la fase de recuperación en oscuridad los valores de ETR descendieron en todos los caso a 0. Los valores de ETR máximo mostrados en la tabla 6 incluyen de nuevo un análisis estadístico por ANOVA entre las mismas que deparó un valor de $p=0$. El análisis múltiple de rango posterior mostró una diferencia estadística significativa entre el control y el resto de especies del estudio (que a la vez mostraron algunas diferencias entre ellas) indicando una mayor sensibilidad a la luz por parte de los fotosistemas del control adaptado a sombra respecto a las especies más expuestas.

Para finalizar con los resultados relacionados con las medidas de fluorescencia, las gráficas 14A-14H muestran la evolución del NPQ o atenuación (“quenchin”) no fotoquímico en todas las especies del estudio. Como se puede observar, todas presentan en común un incremento del NPQ al trabajar con radiaciones más elevadas. Los valores de NPQ se incrementaron en todos los casos al mantenerse la iluminación constante y disminuyeron de forma clara al iniciarse los periodos de recuperación en oscuridad. La

intensidad de los incrementos en luz depende de cada una de las especies. La especie control mostró los valores más altos, siendo estadísticamente distinto al resto de especies ($p= 0,0003$). Dentro de las demás especies *L. rupicola* presentó los valores más elevados, seguida por *L. concolor* y *X. elegans*. En siguiente lugar aparece *O. ventosa*. Tras estas cuatro especies encontramos un segundo grupo (*P. corallina*, *Rhizocarpon sp.*, y *R. melanophthalma*) con valores más bajos, en todos los casos inferiores a 1 y generalmente con menores diferencias entre cada una de las radiaciones. Los valores máximos de NPQ y las diferencias y similitudes estadísticas entre cada especie del estudio aparecen en la tabla 6.

Por último, con el fin de evaluar como influye en cada especie el paso de radiaciones bajas ($122 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) a altas ($1115 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) en el desarrollo de las curvas de inducción, hemos calculado los valores de los ratios obtenidos a cada una de estas radiaciones para los valores de Yield, ETR y NPQ. Dichos valores aparecen representados en la tabla 6 (Y1115/122, ETR 1115/122, NPQ 1115/122). En los dos primeros casos los valores de ANOVA mostraron diferencias estadísticas significativas entre las especies ($p= 0,0025$; $p= 0,0003$) y en el caso del NPQ no aparecieron dichas diferencias. En los ratios del Yield y del ETR se detectaron diferencias significativas entre el control y *L. rupicola* y *R. melanophthalma*.

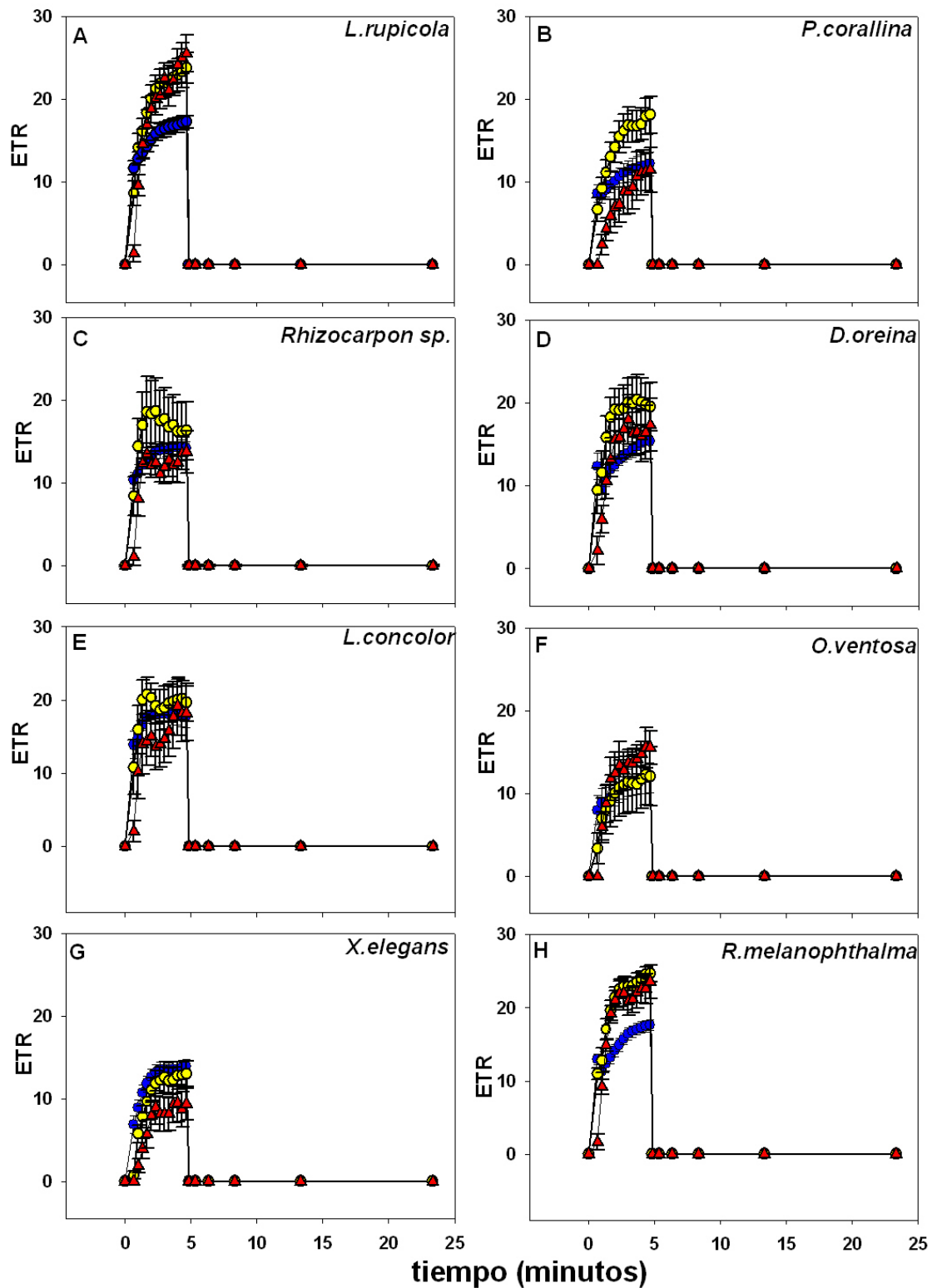
Las gráficas que representan la evolución de los valores de Yield, ETR y NPQ en los talos de *Lepraria sp.* aparecen representados en la figura 15, y son adecuadas para observar algunas de las diferencias y similitudes comentadas respecto a la respuesta a la luz entre el control de sombra y las especies más expuestas a la radiación.



Figuras 12A-12H. Evolución del YIELD con el tiempo durante las distintas curvas de inducción de luz realizada a 122 (círculos azules), 367 (círculos amarillos) y 1115 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (triángulos rojos) y su posterior recuperación en oscuridad en todas las especies del estudio. Todos los puntos representados muestran el valor del error estándar correspondiente.

Especies	% Y 0' (1115 μmolm-2s-1)	% Y 4,6' (1115 μmolm-2s-1)	% Y 25' (1115 μmolm-2s-1)
<i>L.rupicola</i> n=5	0,47±0,75 ^a	8,36± 2,63 ^{de}	94,30±2,00 ^b
<i>P.corallina</i> n=4	0 ^a	4,90±1,57 ^{bc}	87,26±2,54 ^a
<i>Rhizocarpon</i> sp. n=4	0,39±0,78 ^a	5,22±1,77 ^{bc}	95,75±0,99 ^b
<i>D.oreina</i> n=5	0,76±1,35 ^a	6,23±2,47 ^{cd}	92,80± 2,76 ^b
<i>L.concolor</i> n=5	0,67±0,96 ^a	5,91±2,71 ^c	93,58±2,88 ^b
<i>O.ventosa</i> n=4	0 ^a	5,96±0,77 ^{cd}	84,69±6,44 ^a
<i>X.elegans</i> n=5	0 ^a	3,07±1,35 ^{ab}	86,59±4,83 ^a
<i>R.melanophthalma</i> n=5	0,68±0,96 ^a	9,19±1,57 ^e	94,79±2,79 ^b
<i>Lepraria</i> sp. (control) n=4	0 ^a	1,60±0,36 ^a	85,59±1,61 ^a

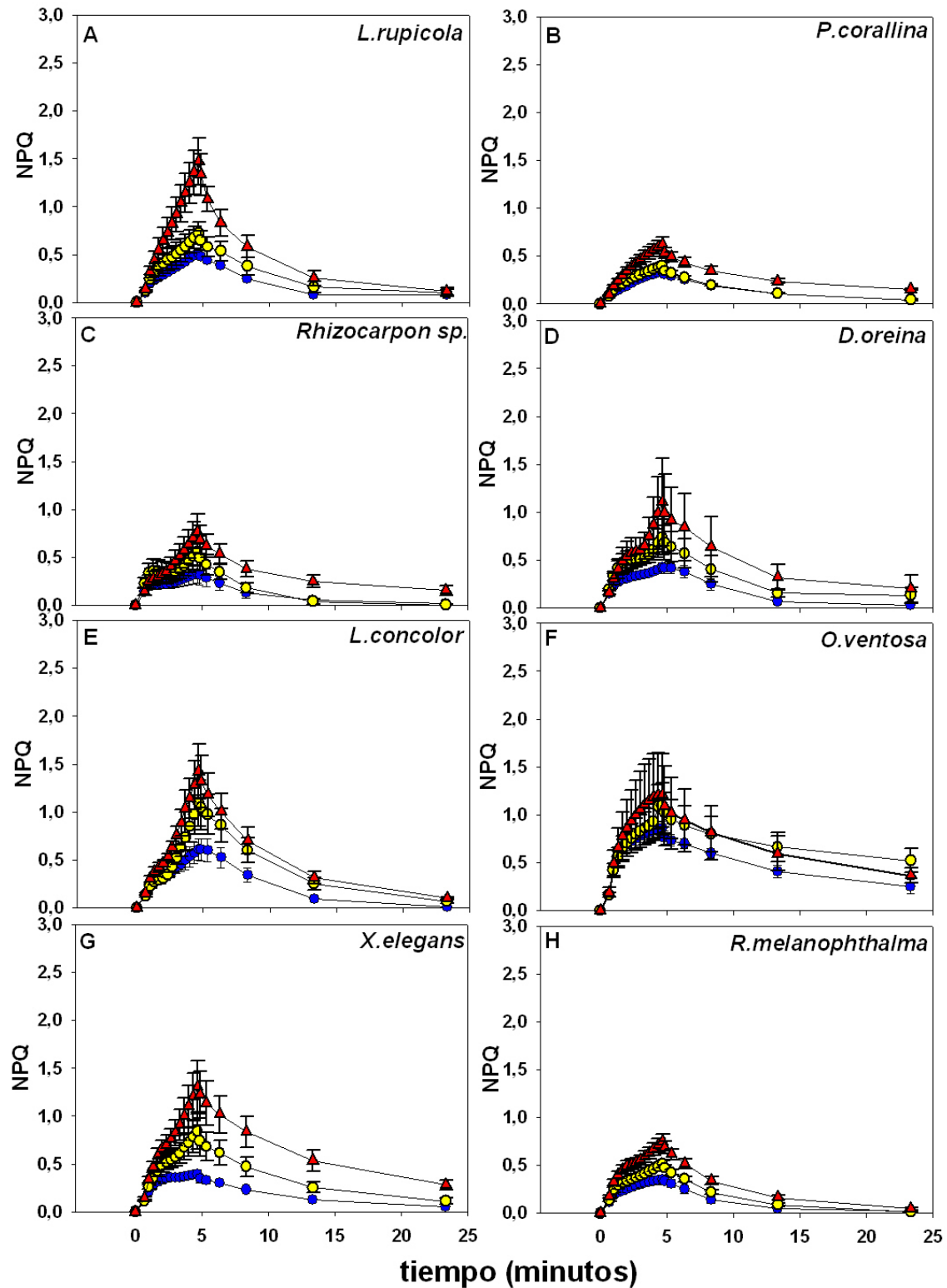
Tabla 5. Valores de porcentaje de Yield respecto al valor inicial en oscuridad en todas las especies del estudio (incluyendo el control de sombra) a 1115 μmol m⁻² s⁻¹. Los porcentajes se calcularon en distintos puntos de la curva de inducción, tras el primer pulso de luz (% Y 0'), tras finalizar el periodo de iluminación (%Y 4,6') y tras finalizar el periodo de recuperación en oscuridad (%Y 25'). Todos los valores aparecen acompañados de la desviación estándar correspondiente y del número de réplicas utilizado para cada tratamiento. Distintas letras dentro de la misma columna indican diferencias estadísticas significativas (ANOVA p≤ 0,05 y test de Duncan de rangos múltiples) entre las distintas especies para cada parámetro estudiado.



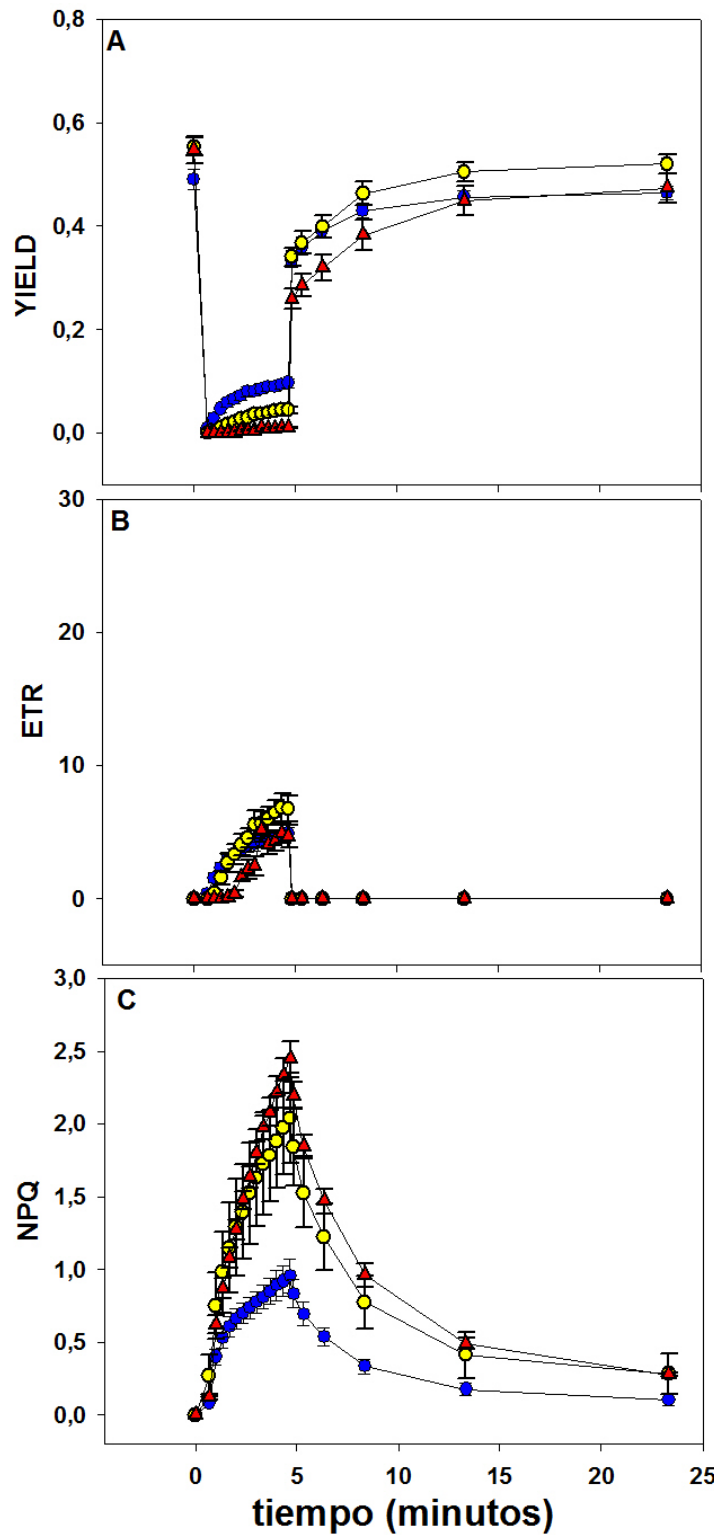
Figuras 13A-13H. Evolución del ETR con el tiempo durante las distintas curvas de inducción de luz realizada a 122 (círculos azules), 367 (círculos amarillos) y 1115 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (triángulos rojos) y su posterior recuperación en oscuridad en todas las especies del estudio. Todos los puntos representados muestran el valor del error estándar correspondiente.

Especies	Y 1115/122	ETR 1115/122	NPQ 1115/122	ETR MAX (PPFD)	NPQ MAX (PPFD)
<i>L.rupicola</i> n=5	0,15±0,04 ^c	1,47± 0,18 ^d	2,80±0,82 ^a	25,50±4,93 ^d (1115)	1,47±0,54 ^c (1115)
<i>P.corallina</i> n=4	0,10±0,02 ^{ab}	0,91±0,20 ^{ab}	1,96±0,23 ^a	18,10±5,02 ^{bc} (367)	0,62±0,13 ^a (1115)
<i>Rhizocarpon</i> sp. n=4	0,11±0,03 ^{ab}	1,00±0,29 ^b	3,32±1,83 ^a	18,68±2,97 ^{bc} (367)	0,77±0,36 (1115) ^{ab}
<i>D.oreina</i> n=5	0,12±0,03 ^{bc}	1,09±0,30 ^{bc}	2,19±1,45 ^a	20,36±6,78 ^{cd} (367)	1,10± 1,02 (1115) ^{abc}
<i>L.concolor</i> n=5	0,11±0,03 ^{ab}	0,99±0,31 ^b	2,38±0,57 ^a	20,76±5,08 ^{cd} (367)	1,42±0,64 (1115) ^{bc}
<i>O.ventosa</i> n=4	0,11±0,02 ^{bc}	1,05±0,16 ^{bc}	1,46±0,56 ^a	15,53±3,41 ^{bc} (1115)	1,21±0,73 (1115) ^{abc}
<i>X.elegans</i> n=5	0,07±0,03 ^a	0,67±0,29 ^a	3,16±0,81 ^a	13,86±2,05 ^b (122)	1,31±0,60 (1115) ^{abc}
<i>R.melanop.</i> n=5	0,15±0,03 ^c	1,34±0,30 ^{cd}	2,17±0,30 ^a	24,68±2,54 ^d (367)	0,74±0,18 (1115) ^{ab}
<i>Lepraria</i> sp. (control) n=4	0,09±0,01 ^{ab}	0,80±0,10 ^{ab}	2,57±0,82 ^a	6,84±2,42 ^a (367)	2,44±0,28 ^d (1115)

Tabla 6. Valores de los ratios obtenidos a 1115 y 122 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para los parámetros YIELD, ETR y NPQ y valores máximos de ETR y NPQ (con la radiación a la que se obtuvieron en $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ entre paréntesis en el caso de los dos últimos) en todas las especies del estudio incluyendo los valores de control en sombra. Todos los valores aparecen acompañados de la desviación estándar correspondiente y del número de réplicas utilizado para cada tratamiento. Distintas letras dentro de la misma columna indican diferencias estadísticas significativas (ANOVA $p \leq 0,05$ y test de Duncan de rangos múltiples) entre las distintas especies para cada parámetro estudiado.



Figuras 14A-14H. Evolución del NPQ con el tiempo durante las distintas curvas de inducción de luz realizada a 122 (círculos azules), 367 (círculos amarillos) y 1115 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (triángulos rojos) y su posterior recuperación en oscuridad en todas las especies del estudio. Todos los puntos representados muestran el valor del error estándar.



Figuras 15A-15C. Evolución del Yield (A), el ETR (B) y el NPQ (C) con el tiempo durante las distintas curvas de inducción de luz realizada a 122 (círculos azules), 367 (círculos amarillos) y 1115 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (triángulos rojos) y su posterior recuperación en oscuridad en las muestras control adaptadas a sombra (*Lepraria sp.*). Todos los puntos representados muestran el valor del error estándar correspondiente.

4. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este capítulo aportan información novedosa sobre el comportamiento de 8 especies recolectadas en ambientes de media y alta montaña. Salvo los casos de *X. elegans*, *R. melanophthalma* y *Rhizocarpon sp*, no hemos encontrado información fisiológica en la literatura respecto a las especies de este estudio y, como se ha comentado ya, el conocimiento del comportamiento fisiológico general de los líquenes en ambientes de montaña es escaso. Los resultados más llamativos que se han encontrado están relacionados con ciertas tendencias adaptativas comunes en las especies estudiadas y el gradiente observado que relaciona variables metabólicas con distintas formas de crecimiento dentro del grupo de líquenes seleccionado. Los talos crustáceos mostraron tolerancia de la fotosíntesis a altos contenidos hídricos, mientras que los foliáceos presentaron una depresión marcada. Respecto a la tolerancia a la temperatura se han observado tendencias generales que indican adaptación a valores bajos, y en relación a la radiación tanto el intercambio gaseoso como la fluorescencia mostraron una tolerancia general a intensidades lumínicas altas. A pesar de esta tolerancia a las altas radiaciones no se puede decir que las especies compartan una estrategia común de protección basada en la disipación de excesos de energía incidente en forma de calor. Respecto a la segunda conclusión, la buena correlación obtenida entre las distintas formas de crecimiento y los valores de fotosíntesis bruta indican que la fijación de carbono presenta un papel clave en el desarrollo de los distintos tipos de crecimiento. La base de esa mayor fotosíntesis parece estar determinada por una mayor disponibilidad de clorofila por unidad de superficie.

Todas las medidas de fotosíntesis, respiración, fluorescencia y clorofilas de este capítulo se han llevado a cabo en el laboratorio tras recolectar las muestras en su entorno natural. Aunque las medidas fisiológicas de laboratorio y de campo pueden arrojar alguna discrepancia, diversos autores han dado sobradas evidencias de que los estudios de laboratorio pueden predecir con precisión el comportamiento real en el campo (Lange y Green 1996; Leisner et al. 1997; Lange et al. 2001; Lange 2002), por lo que podemos decir que nuestros datos de laboratorio presentan relevancia ecológica. A pesar de esto asumimos que los líquenes en el campo pueden funcionar en condiciones subóptimas (especialmente en ambientes extremos, Lange et al. 1994), por lo que algunos máximos

metabólicos obtenidos en el laboratorio pueden ser medidas potenciales que no tienen por qué repetirse obligatoriamente en el campo.

El estudio de las relaciones hídricas (figuras 8A-8H) es fundamental para entender el comportamiento funcional de los líquenes en su entorno. Las formas de las curvas de deshidratación obtenidas muestran tendencias comunes entre los líquenes crustáceos, independientemente de su grado de desarrollo. Los foliáceos también presentan tendencias similares entre las dos especies pero distintas a los crustáceos. Es evidente por la literatura que muchas especies de líquenes presentan depresión de la fotosíntesis a altos contenidos hídricos. Esta depresión fotosintética ha sido explicada como una resistencia a la difusión del CO₂ en talos excesivamente hidratados (Kershaw 1985; Cowan et al. 1992; Green et al. 1994; Green y Lange 1994). Nuestros resultados muestran ausencia de depresión de la fotosíntesis a alto contenido hídrico en las especies *D. oreina* y *L. concolor*, casi inexistente en *Rhizocarpon sp.* y *P. corallina* y muy leve en *L. rupicola* y *O. ventosa*. Los foliáceos *X. elegans* y *R. melanophthalma* mostraron una clara depresión a altos contenidos hídricos. Los resultados obtenidos para los líquenes crustáceos no coinciden con las propuestas de Tretiach y Pecchiari (1995), que plantearon que la depresión a altos contenidos hídricos podía ser una característica común de la forma de crecimiento crustácea, mientras que los foliáceos mantendrían un comportamiento variable en función de la especie. Otros autores han propuesto depresión de la fotosíntesis a alto contenido hídrico para algunos líquenes crustáceos (Lange y Green 1997; Leisner 1997; Lange 2002, 2003a), pero los mismos autores han planteado que la existencia o ausencia de bajas tasas de fotosíntesis en condiciones de suprasaturación era específica de cada especie (Lange et al. 1995; Lange y Green, 1997), aportando casos de líquenes crustáceos terrícolas del género *Diploschistes* que no la presentaron. Estos mismos trabajos descartan la posibilidad de que la disponibilidad de agua en el ambiente sea la responsable de la existencia o ausencia de la depresión a alto contenido hídrico, ya que especies que compartían hábitat de manera íntima mostraron comportamientos hídricos opuestos. Esto nos hace descartar la posibilidad de que la escasa disponibilidad de agua en la montaña mediterránea durante buena parte del año esté detrás del comportamiento observado en los líquenes crustáceos. La estructura y anatomía de cada especie dentro de cada forma de crecimiento parece una explicación más probable. Estas características están detrás de la capacidad de un líquen de retener agua, y por tanto de la duración de su periodo de

actividad tras la hidratación. La idea ya ha sido sugerida por Lange y Green (1997) y podría explicar la ausencia de depresión a alto contenido hídrico de aquellas especies con periodos cortos de actividad, aunque sería contraria a su vez a los resultados obtenidos por Tretiach y Pecchiari (1995), donde líquenes endolíticos y epilíticos mostraron una depresión característica.

X. elegans y *R. melanophthalama*, foliáceas y con periodos de actividad mucho más prolongados que los líquenes crustáceos estudiados mostraron una depresión clara a altos contenidos hídricos que coincide con la bibliografía existente para la misma *X. elegans* en Los Alpes (Reiter et al. 2008), así como de otros líquenes foliáceos adaptados a entornos fríos (Sancho et al. 1997a; Pannowitz et al. 2006).

Las curvas de luz (9A-9H) mostraron tendencias similares en las especies crustáceas menos desarrolladas, ya que la fotosíntesis neta de las cuatro se desarrolló de manera compacta en todo el rango de temperaturas, indicando diferencias no muy grandes entre las mismas, lo cual puede ser un recurso muy útil para su correcta adaptación a un ambiente donde son habituales las temperaturas bajas. Las tasas de fotosíntesis neta máxima en torno a los $2 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (entre 1,93 y $2,64 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) refuerza la sensación de grupo de las cuatro especies. *O. ventosa* se despegó tanto en máxima tasa de fotosíntesis como en diferencias de fotosíntesis a las distintas temperaturas, sirviendo de transición para valores mayores en *L. concolor*, seguida de las dos especies foliáceas, con las mayores tasas de asimilación y mayores diferencias de fotosíntesis neta a las distintas temperaturas. La mayor diferencia de fotosíntesis neta a cada temperatura en las foliáceas es debida a las mayores tasas netas de asimilación, ya que siguen manteniendo rendimientos fotosintéticos altos a bajas temperaturas respecto a los máximos. El que aparezcan valores óptimos de temperatura bajos (entorno a los $10 \text{ }^\circ\text{C}$) coincidiendo con intensidades moderadas de radiación ($400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) indica una adaptación metabólica a bajas temperaturas. Esta idea cobra relevancia si se tiene en cuenta que los líquenes de ambientes extremos tienden a activarse bajo condiciones ambientales subóptimas, que coinciden normalmente con radiaciones bajas que permiten una deshidratación paulatina. Los valores de respiración en oscuridad aumentan con la temperatura en todas las especies, y presentan una evolución muy similar a la fotosíntesis neta para las distintas formas de crecimiento.

Los líquenes han demostrado en múltiples ocasiones la capacidad de desplazar sus óptimos de temperatura para la fotosíntesis con la finalidad de aproximarlos al ambiente (Lechowicz 1982), a pesar de que en muchas ocasiones las condiciones ambientales de los líquenes en periodos de actividad metabólica puede ser sorprendentemente similares en ambientes totalmente diferentes (Green et al. 2007). Lange y Green (2005) demostraron que los líquenes pueden adaptar sus tasas respiratorias en función de cambios estacionales de temperatura con el fin de optimizar sus ganancias de carbono. Aunque algunas especies (*X. elegans*, *L. concolor*) hayan alcanzado el óptimo de temperatura para la fotosíntesis neta a radiaciones altas a 20 °C, el conjunto de especies muestra una adaptación a las bajas temperaturas predominantes en la alta montaña. A parte de las altas tasas de fotosíntesis neta obtenidas a temperaturas bajas, la mayoría de las especies presentaron el óptimo de temperatura para la fotosíntesis neta a 15 °C, y en muchos casos con valores casi iguales a 10 °C. (Figuras 10A-10H, tablas 1 y 2). Nuestros resultados concuerdan bien con trabajos anteriores llevados a cabo con líquenes de alta montaña, donde se encontraron óptimos de fotosíntesis a 10 °C (Aubert et al. 2007; Reiter et al. 2008). El trabajo citado de Aubert y colaboradores postula que las altas tasas de fotosíntesis a bajas temperaturas en líquenes de alta montaña pueden permitir a los líquenes alpinos sacar provecho de escasas oportunidades de hidratación como el derretimiento del hielo, favoreciendo su crecimiento en condiciones ambientales duras.

Aparte de la evolución de la fotosíntesis y la respiración con la temperatura, otro factor importante que se debe tener en cuenta en las curvas obtenidas es la relación de la fotosíntesis con la luz. Las curvas 9A-9H muestran claramente que todas las curvas tienden a la saturación a radiaciones altas, pero en ninguna de las especies estudiadas se observa fotoinhibición a altas radiaciones, ya que en todos los casos la fotosíntesis neta aumenta al llegar a los 1200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Las curvas de luz detallada nos dan información precisa sobre la respuesta de todas las especies a las distintas intensidades lumínicas. Como se puede observar en la tabla 3, la especie con mayor punto de compensación y de saturación de luz fue la crustácea *D. oreina*, recolectada a una altitud de 1.400 m en una pared muy expuesta a la luz. El resto de especies presentaron unos puntos de compensación y saturación similares entre sí (a excepción de *L. concolor*), lo cual muestra una tolerancia similar a la luz a pesar de ser especies distintas recolectadas a distintas alturas. *L. concolor* presentó puntos de compensación y

saturación menores que el resto de especies; dicha diferencia no puede ser achacada al hábitat, ya que no estaba especialmente protegido de la radiación si lo comparamos con los microhábitats de las demás muestras, así que probablemente la diferencia se deba a características morfológicas o químicas particulares del talo. A pesar de tener los puntos de compensación y saturación más bajos, siguen siendo altos si los comparamos con líquenes de otros hábitats. Al igual que se ha comentado ya respecto a la temperatura, los líquenes han demostrado en muchos experimentos que pueden adaptar su metabolismo a las condiciones lumínicas ambientales (Kershaw y McFarlane 1980; Pintado et al. 2005). La capacidad de tolerar la intensa radiación es un factor fundamental por tanto para entender el grado de adaptación de los líquenes a su entorno. Todas las muestras de alta montaña medidas han mostrado una alta tolerancia a la radiación característica del hábitat en el que viven, sin mostrar diferencias claras en función de la morfología o la altura de sus localidades. Estos puntos de compensación son especialmente altos si los comparamos con algunos trabajos anteriores. Green et al. (1997) hicieron un estudio de distintos líquenes expuestos a un gradiente lumínico desde el interior de un bosque hasta el exterior del mismo en Nueva Zelanda; los puntos de compensación de luz medidos a 15 °C para las especies más protegidas fueron inferiores a 10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Lange et al. (1994) obtuvieron puntos de compensación de luz entre 27 y 43 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para tres especies de crustáceos pertenecientes a una costra biológica en el desierto de Namibia, con las medidas llevadas a cabo a temperatura ambiente de entre 7 y 12 °C. Ya en medidas de laboratorio muy similares a las nuestras, Lange (2002) obtuvo puntos de compensación de luz para el crustáceo *Lecanora muralis* a 15 °C inferiores a 40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. El líquen crecía en un ambiente no expuesto a altas radiaciones. Nuestros resultados están en consonancia con altos puntos de compensación de luz propuestos por otros autores para líquenes adaptados a ambientes de montaña (Sancho et al. 1997a; Reiter et al. 2008).

Los puntos de saturación de luz también son considerablemente elevados si los comparamos con líquenes adaptados a sombra en el mencionado trabajo de Green et al. (1997), entre 61 y 82 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para las especies más protegidas de la radiación. Al igual que vimos anteriormente con la temperatura, los líquenes estudiados han presentado por tanto una elevada tolerancia a la alta radiación característica de la media y la alta montaña. La razón de esta tolerancia debe ser dependiente de cada una de las especies estudiadas, pero las maneras más habituales de protección ante elevadas

radiaciones consisten en modificaciones morfológicas (Gauslaa y Solhaug 2001; Raggio et al. 2011) o en el aumento de la síntesis de sustancias liquénicas, que presentan capacidad de absorber la radiación ultravioleta (Millanes y Vicente 2003; Solhaug et al. 2003). Como una tercera posibilidad de protección, Heber et al. (2000; 2006) y Yamakawa et al. (2012) propusieron la existencia de vías de desactivación que permitían a los organismos poiquilohidros evitar la fotoinhibición tanto en el estado hidratado como en el deshidratado. En el estado hidratado, quenchings no fotoquímicos de la fluorescencia de la clorofila *a* intensos indicaron respuestas sensibles a un exceso de luz incidente que facilitaron la disipación de la energía en forma de calor sin daño para los fotosistemas. Los autores (Heber et al. 2000) mostraron evidencias para argumentar que este mecanismo podía ser más eficaz en organismos poiquilohidros que en plantas vasculares. Estas evidencias, así como nuestros resultados previos obtenidos en las curvas de luz ya comentados nos llevaron a probar si esta forma de disipación de excesos de energía incidente podía darse en las muestras a estudio.

Las medidas de fluorescencia a través de las curvas de inducción de luz a distintas radiaciones nos aportan información en relación con los mecanismos de disipación de energía mencionados, y a su vez nos permite reforzar la información que hemos obtenido con el intercambio gaseoso respecto a la tolerancia a las altas radiaciones de las especies de montaña más expuestas. Los resultados obtenidos parecen confirmar que, en general, existe una adaptación característica a las altas radiaciones en el caso de las especies de montaña de ambientes expuestos. Esta afirmación se basa en varios resultados. En primer lugar, el % de Yield respecto al valor inicial medido a los 4,6' de cada curva de inducción mostró diferencias estadísticas significativas entre el control y todas las especies del estudio excepto *X. elegans*, lo que indica una mayor sensibilidad a la luz por parte de estas dos especies a radiaciones altas. Aunque hay más datos que apuntan en esta dirección, los más significativos son los valores encontrados para el ETR y el NPQ máximos en todas las especies. Dos especies de alta montaña (*L. rupicola* y *O. ventosa*) mostraron sus valores máximos de ETR a la máxima radiación, lo que es un síntoma claro que refuerza la idea de ausencia de fotoinhibición. Los valores absolutos de ETR en el control sombra fueron claramente inferiores al resto de especies, y los valores máximos fueron significativamente más bajos que en el resto de especies. En relación al NPQ, los valores en el control sombra fueron significativamente superiores que en todas las especies de alta montaña. Esto indica que la especie

adaptada a sombra tiene más capacidad para eliminar el excedente de energía radiativa en forma de calor que las demás, protegiendo así sus fotosistemas. Como se puede observar en la tabla 5, los porcentajes de Yield respecto al valor inicial a $1115 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en *Lepraria sp.* no son significativamente distintos respecto a algunas especies de montaña y alta montaña (*X. elegans*, *O. ventosa*, *P. corallina*), por lo que sus fotosistemas no quedaron especialmente dañados tras la exposición a las máximas radiaciones a pesar de su ecología en sombra continua. En relación al trabajo de Heber et al. (2000) mencionado anteriormente, nuestras especies de montaña no han mostrado un comportamiento compacto respecto a la forma de disipar la energía radiativa en forma de calor (NPQ). Esto parece lógico porque no todas estaban expuestas de igual manera a la radiación solar. *L. rupicola* fue la especie que mostró mayor valor de NPQ tras *Lepraria sp.*, y como todos los resultados obtenidos demuestran, fue una de las especies mejor adaptadas a la alta radiación. Sin embargo, *R. melanophthalma* (otra especie muy bien adaptada a las altas radiaciones, ver gráficas 12H, 13H y tablas 5 y 6) mostró uno de los valores más bajos y significativamente distintos a *L. rupicola* (tabla 6). Por lo tanto, altos valores de NPQ no son una característica común a los líquenes de alta montaña como estrategia defensiva ante la alta radiación. A pesar de que nuestras especies han mostrado una tendencia a tolerar mejor que el control de sombra las altas radiaciones, las diferencias observadas en muchos de los parámetros estudiados (tablas 5 y 6) dentro del supuesto grupo de especies de líquenes de montaña nos invita a pensar que la última palabra la tendrían una mezcla de microhábitat y características particulares de cada especie.

El segundo objetivo de este capítulo era buscar una posible relación entre la fotosíntesis y las distintas formas de crecimiento estudiadas. Como se puede observar en la figura 11C existe un claro gradiente de fotosíntesis bruta a 15°C para todas las especies. Las muestras crustáceas del primer grupo son las que obtuvieron menos tasas de fotosíntesis bruta por unidad de superficie, seguidas por las especies crustáceas intermedias y, finalmente, aparecen las especies foliáceas estudiadas como las más productivas. La compactación estadística dentro de los dos primeros grupos de líquenes crustáceos respecto a los niveles de fotosíntesis y clorofila nos invita a pensar que realmente hay diferencias significativas en la productividad entre ambos grupos. Las diferencias estadísticas observadas en las tasas de respiración en cada especie de los dos grupos indica mayores diferencias entre especies en la forma de usar la energía que en la forma

de generarla a través de la fotosíntesis. Las diferencias observadas en todos los parámetros fisiológicos estudiados entre las dos especies foliáceas nos invita a no incluirlas dentro de un mismo grupo funcional, a pesar de que ambas son claramente distintas que el resto de especies crustáceas.

Los resultados invitan a pensar que la distinta morfología de los tres grupos establecidos puede ser fundamental para determinar la tasa de fotosíntesis. De alguna forma se podría pensar que los líquenes logran separarse del sustrato gracias a mayores tasas de productividad fotosintética por unidad de superficie, pero este planteamiento podría resultar engañoso, ya que varias especies de líquenes foliáceos adaptados a ambientes de alta montaña mediterránea del género *Lasallia* y *Umbilicaria* han mostrado tasas de fotosíntesis neta por unidad de superficie entre 0,4 y 2,4 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Vivas 2012), valores que cubren únicamente las tasas obtenidas para los crustáceos del primer grupo en este estudio. En un trabajo anterior, Valladares et al. (1996) recopilaron datos globales en distintas especies del género *Umbilicaria* y aportaron un rango más amplio, entre 0,2 y 3,5 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, lo que cubriría todas las especies de este estudio excepto *L. concolor*, *X. elegans* y *R. melanophthalma*. Más recientemente, Picotto y Tretiach (2010) han reportado valores de fotosíntesis bruta en condiciones óptimas para distintos líquenes foliáceos comprendidos entre 2,78 y 7,72 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, por lo que los rangos son bastantes similares a los mostrados aquí para distintos tipos de líquenes. Aunque *X. elegans* cumple bien el gradiente propuesto que vincula morfología y metabolismo el análisis de sus datos de fotosíntesis, respiración y contenido en clorofila la aproximan más al grupo de crustáceos intermedios que a *R. melanophthalma*. Mientras *X. elegans* es una especie de amplia plasticidad ecológica con características nitrófilas (McCarthy 1997), *R. melanophthalma* presenta una clara preferencia por posaderos de aves muy expuestos con una elevada disponibilidad de nitrógeno (Barreno y Pérez-Ortega 2003; Wirth et al. 2004). Esta alta disponibilidad de nitrógeno parece adecuada para generar una mayor síntesis de clorofila que finalmente puede generar mayores tasas de fotosíntesis (Green et al. 1997; Palmqvist et al. 2002), por lo que parece que el rasgo diferencial de esas tasas metabólicas tan elevadas poco tiene que ver con la forma de crecimiento del talo. Estas preferencias ecológicas explicarían con claridad las diferencias observadas entre las dos especies foliáceas incluidas en el estudio.

Aunque no existe una relación causal entre clorofila y fotosíntesis, es habitual que mayores cantidades de clorofila impliquen mayores tasas fotosintéticas (Green y Lange 1994). Las cantidades de clorofila representadas en la figura 11A pueden ser responsables por sí mismas del gradiente fotosintético observado, ya que la relación entre fotosíntesis y clorofila es casi perfecta en las especies estudiadas. El aprovechamiento que cada especie hace de la clorofila disponible aparece reflejada en la figura 11B. Aquí se puede observar de nuevo una tendencia a agruparse entre las distintas formas de crecimiento. Todas las especies crustáceas del primer grupo obtienen mucho rendimiento de sus moléculas de clorofila, sustancialmente más que las especies foliáceas. Las especies crustáceas más desarrolladas están a caballo entre ambos grupos, con *L. concolor* más parecida a las crustáceas menos desarrolladas y *O. ventosa* agrupada junto a las especies foliáceas. No deja de ser curioso que las tres especies que más clorofila presentan sean las tres que peor la aprovechan. Fenómenos de auto-sombreado entre moléculas de clorofila han sido estudiados previamente (Valladares et al. 1996; Sojo et al. 1997) y esta característica puede estar también detrás de nuestros resultados.

Los resultados obtenidos en la relación forma de crecimiento y metabolismo estudiada nos invita a proponer el cumplimiento del gradiente ya mencionado entre las seis especies crustáceas medidas, de tal manera que una mayor cantidad de masa por unidad de superficie en *L. concolor* y *O. ventosa* va acompañada de una mayor productividad fotosintética debida a la una mayor presencia de pigmentos fotosintéticos. A pesar de los buenos resultados obtenidos dentro de las especies foliáceas que completan el gradiente, esta relación productividad-forma de crecimiento no puede extenderse a las especies de este biotipo, que presentarán mayores o menores tasas de fotosíntesis por unidad de superficie en función de las características individuales de cada especie estudiada.

**CAPITULO II. RELACIÓN ENTRE FOTOSÍNTESIS Y TAMAÑO
EN ESPECIES DEL GÉNERO *RHIZOCARPON* SUBGÉNERO
RHIZOCARPON. IMPLICACIONES EN LIQUENOMETRÍA**

1. INTRODUCCIÓN

1.1 GENERALIDADES ZONA DE ESTUDIO

Ver descripción de la Sierra de Gredos en el Sistema Central del capítulo I.

1.2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Los líquenes de biotipo crustáceo son normalmente los más abundantes en ambientes polares y alpinos, presentando formas de crecimiento especialmente adaptadas a ambientes extremos (Armstrong y Bradwell 2010). Estos líquenes son los iniciadores del proceso de colonización de superficies recientemente expuestas. En un estudio comparativo del efecto del frío en alta montaña sobre distintos tipos de líquenes, Benedict (1990) expuso que los líquenes crustáceos eran especialmente resistentes a los efectos de la congelación, lo cual podía ser una ventaja a la hora de competir considerando el hándicap de crecimiento lento de los crustáceos. Este crecimiento lento puede ser una característica importante para entender su abundancia en ambientes extremos, con condiciones climáticas muy marcadas y, en muchas ocasiones, escasez de nutrientes.

La amplia presencia de este tipo de líquenes en ecosistemas extremos no ha ido acompañada de un estudio adecuado de sus tasas de crecimiento, ya que el conocimiento a este respecto comparado con otros grupos de líquenes es escaso (Armstrong y Bradwell 2010).

La liquenometría, propuesta inicialmente por Beschel (1950), es una técnica que utiliza el tamaño y el crecimiento de los líquenes para datar superficies expuestas en un rango de aproximadamente 500 años (Innes 1985; Armstrong 2004). La mayoría de trabajos de datación se centran en superficies expuestas tras retroceso glaciar (Karlen y Black 2002; Sancho y Pintado 2004; Sancho et al. 2007b), aunque también tras terremotos (Bull y Brandon 1998) y con finalidades arqueológicas (Winchester 1988). El crecimiento lento, y la longevidad de los líquenes crustáceos les hace idóneos para los estudios en liquenometría, siendo los talos verde-amarillentos del género *Rhizocarpon*

los más utilizados para este tipo de estudios (Innes 1988). Estos líquenes son abundantes en ecosistemas de alta montaña y polos (Poelt 1988) y son primocolonizadores tras la exposición de la superficie (Matthews 1994).

La liquenometría presenta dos aproximaciones distintas a la hora de determinar la tasa de elongación de los talos liquénicos. Por un lado, la metodología directa mide tamaños de los talos en intervalos temporales, suficientes para apreciar crecimiento radial. Esta tasa representada frente a tamaño de los talos medidos genera una curva de crecimiento que se puede usar para datar las superficies expuestas. La aproximación indirecta parte del conocimiento de la edad de la superficie expuesta para calcular la tasa de crecimiento del talo a partir de su tamaño. Se generan curvas de calibrado que representan tamaño del talo frente a edad de la superficie y extrapolando estos datos a lugares comparables se puede saber la edad de los sustratos investigados. La técnica es una de las más usadas datando superficies y en la bibliografía hay una mayoría de autores que han trabajado la metodología indirecta, propuesta por Matthews (1994) como la más adecuada.

A pesar de su extendido uso y reconocimiento, algunos autores han cuestionado la liquenometría por distintos motivos (Haines-Young 1983; McCarthy 1999; Loso y Doak 2006) y muchos de los autores que la han aceptado han expresado una preocupación basada en la posible heterogeneidad de la tasa de crecimiento de los talos a lo largo de su ciclo vital por variaciones climáticas estacionales, anuales y, con especial énfasis, microclimáticas (Armstrong y Bradwell 2010; Trenbirth y Matthews 2010; Matthews y Trenbirth 2011). Si las tasas de crecimiento de los talos no son constantes durante su ciclo de vida, la datación liquenométrica corre el riesgo de no ser precisa.

Esta incertidumbre ha llevado a muchos autores a iniciarse en el estudio de la forma de crecimiento del grupo *Rhizocarpon sp.*, en la mayoría de los casos combinando las observaciones en la tasa de crecimiento con trabajos liquenométricos de datación. El centro de dichos estudios ha sido la evolución de la tasa de crecimiento radial de los talos durante su ciclo de vida, tomando como referencia de edad el tamaño de los mismos. Los métodos directos tienen la última palabra a la hora de determinar la tasa de crecimiento de los líquenes usados en liquenometría (Trenbirth y Matthews 2010).

Uno de los autores que ha entrado con más profundidad en esta línea de investigación ha sido Armstrong. En 2007, Bradwell y Armstrong publicaron una revisión donde se recopilaban todos los estudios directos e indirectos de liquenometría que aportaban información que pudiera aclarar la curva de crecimiento del grupo. Dichos autores añadieron nuevos datos experimentales sobre una morrena en Islandia y, uniendo esta información a trabajos anteriores (Armstrong 1983; Innes 1985; Bradwell 2001; Solomina y Calkin 2003) concluyeron que la curva de crecimiento de los miembros del grupo *Rhizocarpon* contaba con tres fases: Una primera en talos entre 10-20 mm de diámetro, de crecimiento ascendente hasta un máximo; una segunda para talos de 20 a 50 mm de diámetro que mantiene el crecimiento radial constante pero en su nivel más alto y por último una tercera de senescencia a partir de los 50 mm de diámetro, donde el crecimiento radial comenzaba a disminuir. Esta teoría de curva de crecimiento parabólico implicaba, según los autores, que algunas de las dataciones liquenométricas que asumían tasas de crecimiento constantes podían ser erróneas.

El modelo parabólico de crecimiento propuesto por Armstrong y colaboradores no ha sido apoyado por otros autores que se han aproximado a la cuestión con metodologías similares. El punto más controvertido de dicho modelo parabólico parece ser la fase de senescencia a partir de los 50 mm. Autores como Matthews (1994), Winchester y Chaujar (2002) y el propio Armstrong (2005) no encontraron evidencias que sugirieran dicha senescencia. Matthews y Tenbrirth han realizado recientemente exhaustivos trabajos que parecen imprescindibles para entender los modelos de crecimiento del género *Rhizocarpon*. (Trenbirth y Matthews 2010; Matthews y Trenbirth 2011). En el primer trabajo los autores trabajaron con medidas directas de 2795 talos en 47 localidades en 18 zonas glaciares al sur de Noruega. Al intentar cuadrar los datos obtenidos con los modelos de crecimiento existentes, vieron que el modelo parabólico cuadraba solo en una minoría de los datos medidos. Modelos en los que la tasa de crecimiento no cambia o aumenta con el tamaño cuadraron con la mayoría de los datos obtenidos. En el siguiente trabajo los autores obtienen un modelo lineal para explicar la relación crecimiento y tamaño y proponen que si la senescencia ocurriera en algún momento de la vida de los talos, sería a tamaños mucho mayores que los propuestos por Armstrong y colaboradores (en algunos modelos hasta 200 mm de diámetro).

Aunque la fase de senescencia propuesta en los modelos parabólicos parece el mayor motivo de polémica, el periodo juvenil de incremento del crecimiento (Armstrong 1983; Porter 1981; Karlen y Black 2002; Laroque y Smith 2004; Bradwell y Armstrong 2007) en talos pequeños también ha sido cuestionado (Loso y Doak 2006). Estos últimos autores defendieron a través de simulaciones en *Rhizocarpon* que la fase de gran crecimiento juvenil era un artificio debido a una alta tasa de mortalidad anual en la especie (2-3% al año), que provocaba que los talos más grandes no tenían porqué tener las edades tan elevadas que mostraban muchos trabajos liquenométricos.

Tanto la polémica reflejada como la abundante literatura actual existente respecto a la liquenometría y al crecimiento de los líquenes crustáceos (Armstrong y Bradwell 2010; Garnett y Bradwell 2010, Golledge et al. 2010; Matthews y Trenbith 2011) justifica una aproximación al problema distinta a la utilizada hasta hoy.

El primer objetivo de este capítulo es, por tanto, chequear la hipótesis de que la productividad está relacionada con el tamaño de los talos, mediante un estudio exhaustivo de distintas variables fisiológicas (fotosíntesis neta, respiración, fotosíntesis bruta, Fv/Fm) respecto al tamaño de distintos talos de *Rhizocarpon sp* recolectados en la misma localidad.

El estudio de la relación entre fotosíntesis y tamaño en los talos del grupo no tiene como único objetivo aportar nueva información a la polémica relacionada con la liquenometría y los distintos modelos de crecimiento. El tamaño de las muestras siempre ha sido un factor importante a tener en cuenta en ecología funcional (Lawton 1999). La alocaión de carbono ha mostrado dependencia del tamaño en plantas vasculares (Shipley y Meziane 2002; McCarthy y Enquist 2007). En líquenes se han llevado a cabo pocos trabajos relacionando tamaño y variables fisiológicas. En algunos de ellos se ha observado que la dependencia del tamaño y distintas variables fisiológicas era específico de especies (Larson 1984; Gauslaa et al. 2009) y en otros se ha observado una fuerte dependencia del tamaño en la capacidad de retener agua y, por tanto, en los periodos de actividad de especies como *Degelia plumbea* y *Lasallia pustulata* (Gauslaa y Solhaug 1998; Hestmark et al. 1997). Algunos de estos trabajos cuestionan medidas fisiológicas hechas hasta la fecha en las que no se haya tenido en cuenta el tamaño de las muestras (Larson 1984), por lo que pensamos que es de interés añadir información al

respecto con líquenes crustáceos areolados en los cuales apenas se conoce los efectos de la relación fisiología y tamaño.

El segundo objetivo que se plantea en este capítulo es estudiar posibles diferencias de actividad metabólica entre el centro y la periferia de los talos de *Rhizocarpon sp.* con el fin de comprender el aspecto espacial en la productividad y finalmente en el crecimiento radial de los talos. Varios autores han abordado el estudio de posibles modelos de crecimiento en líquenes crustáceos (Hooker 1980; Hill 1981; Lange 1990; Clayden 1998; Armstrong y Bradwell 2010). Asta y Letrouit-Galinou (1995) propusieron distintos tipos de crecimiento en *Rhizocarpon geographicum* en función de la formación de las areolas primarias a partir de las hifas del hipotalo, el crecimiento y la división de las areolas, la confluencia de dichas areolas y la posible fusión de los talos. A pesar de los trabajos mencionados, hay una falta de conocimiento en las implicaciones fisiológicas del crecimiento en este tipo de líquenes. Schroeter et al. (1992) estudiaron las diferencias fisiológicas en distintas partes del talo en *Buellia frigida*, un liquen crustáceo endémico de la Antártida y vieron que la distribución del agua por el talo durante un ciclo de deshidratación no era homogénea. De nuevo Schroeter (1994), estudió la distribución de la fotosíntesis en distintas partes del talo en *Placopsis contortuplicata* en la Antártida marítima, pero sus investigaciones no estaban enfocadas al crecimiento de los talos.

Las medidas que hemos llevado a cabo a este respecto en *Rhizocarpon sp.* están basadas en la mayor bibliografía existente en otros tipos de líquenes, principalmente foliáceos. Valladares et al. (1994) y Nybakken y Gauslaa (2007) encontraron distintos contenidos en clorofila en diferentes partes del talo en *Lasallia pustulata* y *Usnea longissima* respectivamente, planteándose distintas consecuencias funcionales. Larson (1983) encontró una distribución parcheada de la fotosíntesis en talos del género *Umbilicaria*. Más recientemente algunos autores se han aproximado a la evolución de la fotosíntesis en distintas zonas del talo de líquenes foliáceos con métodos parecidos a los que se usan en este trabajo (Barták et al. 2000; 2004; 2005).

Entre los escasos trabajos que hasta la fecha recogen información sobre fotosíntesis en el género *Rhizocarpon*, destaca el llevado a cabo por Coxson y Kershaw (1983b). Los autores no encontraron un patrón estacional en la fotosíntesis de *Rhizocarpon*

superficiale en alta montaña. Otros autores han aportado información sobre la fisiología del género, normalmente medidas de fluorescencia de la clorofila *a* que han ayudado a confirmar la gran resistencia a ambientes extremos que presenta el grupo (Heber et al. 2000; Sancho et al. 2007a; De la Torre et al. 2010). Los resultados obtenidos en líquenes foliáceos y fruticulosos, así como la ausencia de literatura sobre parámetros fisiológicos relacionados con tipo de crecimiento en el género *Rhizocarpon*, parece justificación suficiente para abordar el estudio de diferentes parámetros fisiológicos en distintas partes del talo en líquenes del género *Rhizocarpon*.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. DESCRIPCIÓN DEL GRUPO

El hecho de que los trabajos de liquenometría en campo hayan carecido de un estudio taxonómico de las muestras del género *Rhizocarpon* estudiadas ha sido el motivo principal por el que hayamos trabajado con muestras identificadas exclusivamente a nivel de subgénero, usando el concepto de *Rhizocarpon* subgénero *Rhizocarpon* propuesto por Poelt (1988) (Figura 1). Dicho autor describe el subgénero como talos crustáceos, normalmente areolados, rara vez efigurados en el margen. Habitualmente con un protalo negro, con córtex de blanco a gris hasta amarillo profundo. Apotecios lecideinos, normalmente localizados entre las areolas. Himenio normalmente mucilaginoso con paráfisis en forma de red. Ascoclasmas clavados, con ocho esporas de transversalmente septado a fuertemente muriforme. Casi exclusivamente saxícola, predominante en roca no calcárea y con distribución cosmopolita en zonas de montaña y polos. Dentro del subgénero *Rhizocarpon* aparecen cuatro secciones, Superficiale, Alpicola, Viriridiautum y *Rhizocarpon*, donde se encuentra el grupo *geographicum*. Los trabajos publicados hasta la fecha sobre el subgénero en la zona donde se encuentra la localidad de estudio (Sancho 1986), así como un exhaustivo trabajo en preparación (Roca et al. 2012) indican que, con toda probabilidad, la mayoría de nuestros talos pertenezcan al grupo *Rhizocarpon geographicum*.

Poelt asegura que el conocimiento del género es incompleto y que en la fecha de su estudio se estaba muy lejos de tener una taxonomía permanente. Dentro del grupo *Rhizocarpon geographicum*, el autor especifica que probablemente haya más especies de las identificadas, con una alta variabilidad morfológica y posibles procesos de hibridación detrás de dicha confusión. Aunque las dudas taxonómicas sobre el grupo permanecen abiertas hoy día, trabajos que se están desarrollando actualmente (como el mencionado anteriormente) prometen aportar información que ayude a clarificar la situación del subgénero.

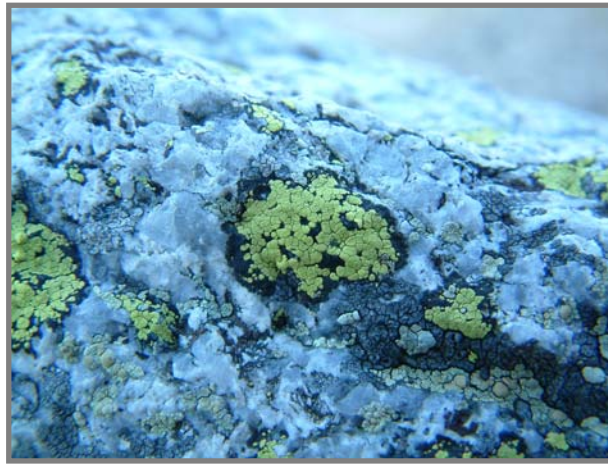


Figura 1. Talo de *Rhizocarpon* sugénero *Rhizocarpon* en una roca de la Sierra de Gredos. Fotografía de Leopoldo García Sancho

2.2. DESCRIPCIÓN DE LA LOCALIDAD Y RECOLECCIÓN MUESTRAS

Las muestras de *Rhizocarpon sp.* fueron recolectadas en la Plataforma de Gredos, Sierra de Gredos, Avila, a 1800 m altitud y con coordenadas N 40° 17' W 5° 14' . La localidad presenta las características litológicas y climáticas características de la Sierra de Gredos y aparece representada en la figura 2. Merece la pena recordar algunas características diferenciales de dicha Sierra respecto a todo su entorno geográfico, como su alta precipitación en forma de nieve y sus bajas temperaturas medias anuales (Santamaría 1995). Todas estas características climáticas conllevan que la vegetación de la zona, y especialmente los líquenes epilíticos, estén expuestos a la nieve durante buena parte del año. La vegetación criptógama, principalmente líquenes y musgos, es dominante en la zona, ya que según va aumentando la altura la proporción entre plantas no vasculares y

vasculares va favoreciendo a la primera. Entre los líquenes epilíticos destacan los talos verde amarillentos del género *Rhizocarpon*, junto a otras especies epilíticas características de ecosistemas de montaña como *Lecanora concolor*, *L. polytropa*, *Umbilicaria deusta*, *U.cylindrica* y especies de los géneros *Lecidea* y *Aspicilia*. Entre las grietas de los roquedos de la localidad aparecen algunas especies de plantas vasculares especialmente adaptadas a las fisuras y a los pedregales como pueden ser *Saxifraga alpigena*, *Valeriana tripteridis*, *Sagina nevadensis*, *Centaurea avilae* o *Saxifraga orogredensis* (Sánchez Mata 1989), muchas de ellas endémicas de la zona o de las regiones alpinas.



Figura 2. Localidad de recolección de las muestras. Los talos de *Rhizocarpon* subgénero *Rhizocarpon* aparecen como grandes manchas de color verde dominado las rocas graníticas. Fotografía de Leopoldo García Sancho

La recolección se llevó a cabo en Octubre de 2010 usando martillo y escoplo, en rocas graníticas sin inclinación. Se recolectaron talos individuales en la medida de lo posible, aunque para recolectar talos de tamaño pequeño fue imprescindible recolectar bloques de piedra con numerosos individuos. Para determinar el diámetro máximo de cada una de las muestras se utilizó un pie de rey, y no se establecieron límites máximos ni mínimos de tamaños durante la recolección. Los trozos de piedra con las muestras secas fueron transportados al laboratorio el mismo día de la recolección.

2.3. SELECCIÓN Y SEPARACIÓN DE LAS MUESTRAS EN LABORATORIO

Una vez en el laboratorio se seleccionaron las muestras adecuadas para llevar a cabo el experimento. La alta densidad de líquenes epilíticos, así como el pequeño tamaño de muchas de las muestras seleccionadas, hizo imposible evitar escoger talos rodeadas de otros. Para reducir posibles efectos negativos de la competencia sobre la relación tamaño-fotosíntesis, no se usaron muestras que tuviesen otros talos de *Rhizocarpon sp.* en contacto directo alrededor de toda su superficie, priorizando de esta manera talos bien delimitados e individualizados. Una vez se llevó a cabo la selección de los talos en los bloques de piedra se transportaron todas las muestras al departamento de Estratigrafía de la facultad de Geología, UCM, donde se procedió al corte individual de cada talo con una hoja de diamante refrigerada en continuo con agua corriente. El grosor de la roca sobre la que estaba cada muestra se redujo al mínimo en todos los casos.

Se cortaron un total de 71 talos que fueron repartidos en distintos grupos de tamaños, talos mayores de 50 mm de diámetro máximo (8 muestras), talos entre 20 y 50 mm de diámetro máximo (28 muestras) y talos menores de 20 mm (35 muestras). La clasificación de los talos en estos tres grupos de tamaños se hizo siguiendo los trabajos de Armstrong. (1983) y Bradwell y Armstrong (2007) en los que se relaciona los tamaños de los talos con sus tasas de crecimiento.

2.4. INTERCAMBIO GASEOSO

Una vez cortados, los talos se congelaron a -20 °C hasta que se llevaron a cabo las medidas de intercambio gaseoso. Las muestras se fueron sacando del congelador en grupos de 15 y se revitalizaron en cámara de refrigeración a 12 °C, ciclos de 12h/12h luz/oscuridad con $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de radiación incidente. Tras dicho periodo se midió, por separado, la fotosíntesis neta a $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 15 °C y óptimo contenido hídrico y la respiración en oscuridad a los 15 minutos a la misma temperatura. La fotosíntesis bruta se calculó como la suma de la fotosíntesis neta y la respiración en oscuridad para todas las muestras.

El sistema de intercambio gaseoso que se usó fue el CMS 400 Walz, Alemania (ver capítulo 1, material y métodos) y la fuente de luz KL 2500 LCD, Schott, Alemania. Se escogieron $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para las medidas de fotosíntesis neta porque es una radiación con la cual se obtiene tasas claras de fotosíntesis neta sin que haya riesgo de fotoinhibición o estrés lumínico en los fotosistemas. La temperatura se escogió porque es óptima para la fotosíntesis en líquenes de alta montaña de este grupo (ver capítulo 1) y permite más margen de trabajo que a $20 \text{ }^\circ\text{C}$, donde la duración del óptimo de hidratación se recorta considerablemente en talos de menor tamaño.

Las medidas de fotosíntesis neta y respiración se llevaron a cabo con las muestras de tamaños comprendidos entre 78 y 20 mm, ya que con los talos de tamaño inferior resultó muy difícil discriminar con precisión la respuesta biológica de posibles oscilaciones en el aparato de medida.

Tanto la fotosíntesis neta, la respiración en oscuridad y la fotosíntesis bruta se calcularon en $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, siguiendo el método explicado en el capítulo I. Las superficies de los talos se calcularon con el programa de análisis de imagen Image J (National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA).

2.5. FLUORESCENCIA DE LA CLOROFILA *a*

Se llevaron a cabo con dos objetivos, primero complementar las medidas de intercambio gaseoso y reforzar así el vínculo entre fotosíntesis y tamaño y en segundo lugar para buscar posibles diferencias en el estado de los fotosistemas en el centro y en la periferia de los talos de tamaño suficiente.

Para cumplir ambos objetivos se llevaron a cabo medidas del parámetro F_v/F_m , que representa un ratio entre la fluorescencia máxima y la fluorescencia variable de muestras previamente adaptadas a 20 minutos de oscuridad. Este parámetro es un indicador fiable del estado fisiológico del fotosistema II (Genty 1989) y representa una medida de máxima potencialidad fotosintética por parte de la muestra. Tanto el aparato utilizado (Mini Pam, Walz, Alemania) como las bases de la técnica de fluorescencia aparecen en detalle en la sección de material y métodos del capítulo I.

Las muestras fueron hidratadas a saturación y tras la mencionada adaptación a oscuridad se midió el Fv/Fm usando una plantilla de plástico que mantenía fija la fibra óptica (figura 3). Dependiendo del tamaño del talo se llevaron a cabo distintas medidas en cada talo:

Talos > 50 mm diámetro: Se llevaron a cabo tres medidas en el centro y tres en la periferia. El centro del talo se determinó en cada caso colocando cada muestra debajo de una marca establecida en la plantilla, haciendo coincidir la fibra con cada uno de los agujeros que rodeaban la zona, teniendo así una medida estimativa de la zona centro. De esta manera se obtuvo un valor de Fv/Fm en el centro, otro de la periferia, y sumando las seis réplicas se obtuvo un valor medio global del talo.

Talos 20 - 50 mm diámetro: En función el tamaño y la forma de cada talo se hicieron distintas medidas de Fv/Fm, estableciéndose un mínimo de una medida para el centro y dos para la periferia.

Talos < 20mm diámetro: En los talos entre 10 y 20 mm se llevó a cabo una única medida, por lo que se obtuvo un valor de Fv/Fm y no se discriminó entre centro y periferia para este grupo. Para medir las muestras < 10 mm se tuvo que cambiar la fibra óptica por una de menor tamaño (0,55 cm frente a 0,2 cm).



Figura 3. El Minipam (Walz) en el laboratorio midiendo fluorescencia de un talo de *Rhizocarpon sp.*

2.6. ANÁLISIS DE PIGMENTOS

Se llevó a cabo siguiendo el método de Barnes et al. (1992) que ha sido explicado con detalle en material y métodos del capítulo I. Se tomaron tres muestras de medio centímetro cuadrado cada una tanto del centro como de la periferia en 7 talos del grupo de mayor tamaño.

2.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para buscar diferencias estadísticas entre los tres grupos de tamaños y entre los valores de Fv/Fm y contenido en clorofila entre el centro de los talos y la periferia se llevaron a cabo ANOVAS simples con un nivel de significancia de $p \leq 0,05$, añadiendo un test de Duncan de análisis múltiple de rango en los casos necesarios. Se usó el programa Statsgraphic versión 5.1. Para los ajustes de las nubes de puntos se usó sigmaplot 10.0.

3. RESULTADOS

3.1. RELACIÓN ENTRE FOTOSÍNTESIS Y TAMAÑO DEL TALO

La tabla 1 y las figuras 4A-4C representan respectivamente los valores medidos por talo de fotosíntesis neta, respiración en oscuridad y fotosíntesis bruta frente al diámetro máximo de los talos expresado en mm. Los talos representados en las figuras son todos aquellos de diámetro superior o igual a 20 mm (36 talos representados), ya que los de tamaño inferior no mostraron tasas de intercambio gaseoso fácilmente identificables. En la figura 4A aparece representada la fotosíntesis neta frente al tamaño para todos los talos mencionados. Se puede observar una amplia dispersión de puntos, oscilando los valores de fotosíntesis neta entre 0,22 (talo 22, 30 mm) y 1,77 (talo 13, 41 mm) $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Los 5 talos menos productivos oscilaron entre 0,22 y 0,44 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y correspondieron a los tamaños de 24 mm, 30 mm (2), 42 mm y 46 mm (talos 31, 22, 17, 15 y 10 respectivamente). Los 5 talos más productivos presentaron valores entre 1,53 (talo 6, 74 mm) y 1,77 (talo 13, 41 mm) $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Entre estos dos valores encontramos, por orden de tasa fotosintética a los talos 1, 36 y 35 con tamaños de 68, 20

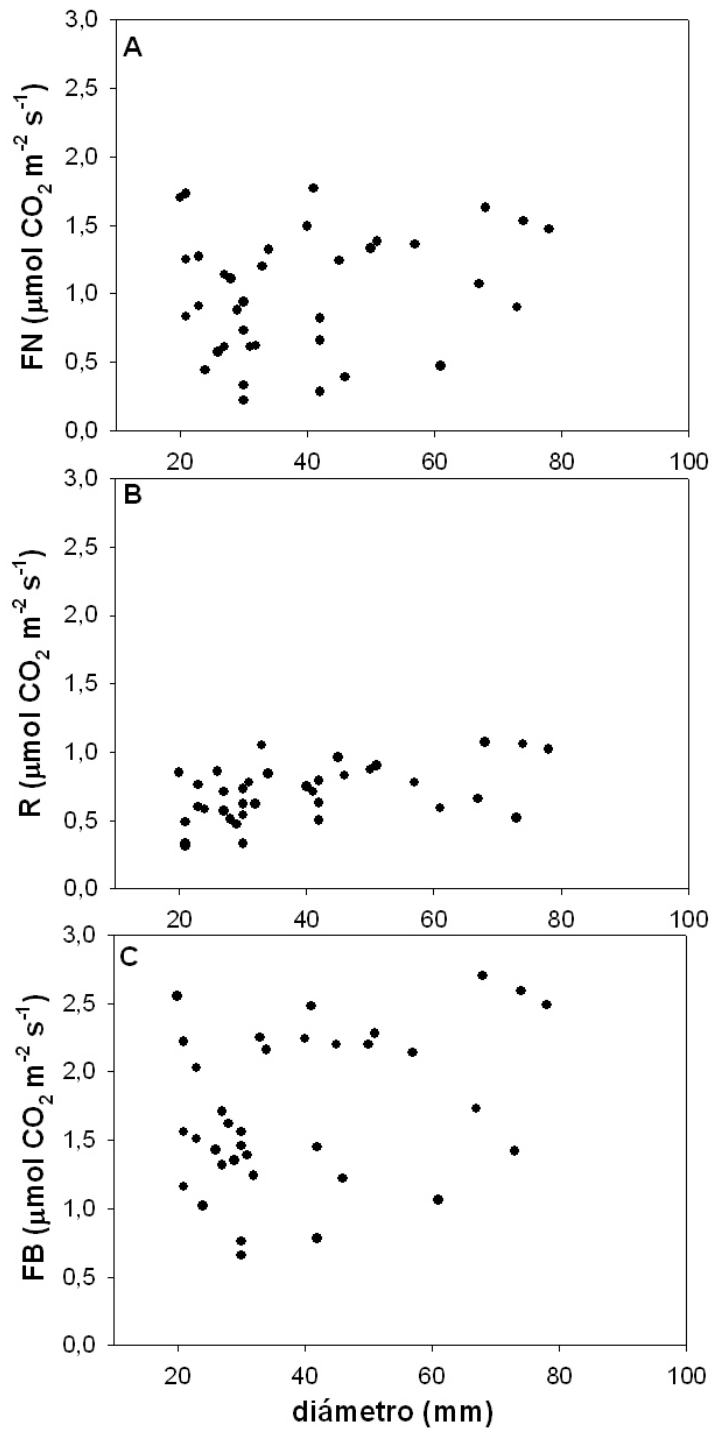
y 21 mm respectivamente y tasas fotosintéticas muy parecidas entre sí. La gráfica 4A no mostró ninguna tendencia definida entre fotosíntesis neta y tamaño de los talos.

	Fv/Fm	FN	FB	R
< 20 mm (35)	528±85,4	-	-	-
≥20 mm ≤ 50 mm (28)	461,2±89,4	0,96±0,48	1,62± 0,56	0,66±0,19
> 50 mm (8)	511,6±59	1,23±0,39	2,05±0,59	0,82±0,22

Tabla 1. Valores medios de Fv/Fm, fotosíntesis neta (FN), fotosíntesis bruta (FB) y respiración en oscuridad (RO) y número de réplicas para cada grupo en todos los talos medidos de *Rhizocarpon sp.* Las desviaciones estándar aparecen representadas

La figura 4B muestra la relación entre la respiración en oscuridad y el tamaño de los talos. Aunque a simple vista se observa de nuevo la misma tendencia que en la gráfica 4A, en esta ocasión hay una mayor homeogeneidad en las tasas, con una oscilación menor entre el máximo ($1,07 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, talo 1, 68 mm) y el mínimo ($0,31 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ talo 17, 30 mm). El ajuste de la nube de puntos a una relación lineal deparó significancia estadística, pero con un índice de correlación muy bajo ($r^2= 0,22$, $p= 0,003$). Los valores de los 5 talos con menor respiración oscilaron entre 0,31 y 0,59, con tamaños de 21, 30, 21, 29 y 21 mm (talos 32, 17, 34, 19, 35 respectivamente). Los 5 talos con mayor tasa respiratoria oscilaron entre 0,96 y 1,07, y correspondieron a tamaños de 45, 78, 33, 74, 68 mm (talos 4, 5, 21, 6, 1). La gráfica 4B parece indicar por tanto una leve tendencia a mayores tasas de respiración según va aumentando el tamaño de los talos en el grupo de muestras estudiado.

La figura 4C muestra la misma información que en las dos gráficas anteriores pero esta vez con la fotosíntesis bruta. La nube de puntos se ajustó, al igual que la respiración, a una relación lineal, pero con un índice de correlación aún más bajo y una significancia menor ($r^2= 0,12$ $p= 0,04$). La adición de los valores de fotosíntesis neta (sin relación entre fotosíntesis y tamaño) a los de respiración (con una relación lineal leve) tuvo como consecuencia una relación lineal muy baja para la fotosíntesis bruta. La nube de puntos ocupa valores de fotosíntesis más amplios, con oscilación entre valor máximo y mínimo de $0,66$ y $2,7 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, para tamaños de 30 y 68 mm (talos 17 y 1).



Figuras 4A-4C. Fotosíntesis neta a 15 °C y 400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (4A), Respiración en oscuridad a 15 °C (4B) y Fotosíntesis bruta a 15 °C y 400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (4C) en $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ frente a diámetro máximo de los talos (mm)

Estos talos también fueron el máximo y el mínimo para la respiración, aunque esto no se cumplió en la fotosíntesis neta. Los valores de fotosíntesis bruta de los 5 talos menos productivos oscilaron entre 0,66 y 1,06 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y correspondieron a tamaños

de 30, 30, 42, 24 y 61 mm (talos 17, 22, 15, 31, 3). Los 5 más productivos ocuparon un rango entre 2,48 y 2,7 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, correspondientes a los tamaños de 41, 78, 20, 74 y 68 mm (talos 13, 5, 36, 6, 1).

Se llevaron a cabo análisis de varianza (ANOVA) en los dos grupos de tamaños y no se observaron diferencias estadísticas significativas para la fotosíntesis neta ni para la fotosíntesis bruta, aunque si que se vio una diferencia al límite de la significancia en el caso de la respiración ($p= 0,048$). Se llevaron a cabo también ajustes de distintos tipos de funciones a las nubes de puntos con el fin de buscar alguna tendencia que tuviera sentido biológico en comparación con los modelos de crecimiento propuestos. Los modelos parabólicos, hiperbólicos y sigmoidales no tuvieron significación estadística. La relación lineal sí obtuvo significancia en los dos casos ya mencionados.

La figura 5 muestra los valores de F_v/F_m en función del tamaño del talo. Los valores representados son medias de un mínimo de tres y un máximo de seis medidas por cada talo en función de su tamaño. Los puntos sin error estándar corresponden a talos donde sólo se llevó a cabo una medida de F_v/F_m por restricciones de tamaño, y corresponden a los talos menores a 20 mm. De esta manera podemos obtener información sobre el estado de salud de los fotosistemas en el caso de los talos que quedaron fuera de las medidas de intercambio gaseoso.

La relación lineal entre F_v/F_m y tamaño de los talos no mostró ningún tipo de significación estadística. Algunos ajustes a curvas polinómicas que muestran tendencias a mayores valores de F_v/F_m en el grupo de menor tamaño seguidas de una estabilización en los otros dos grupos si que dio significación estadística, pero de nuevo con valores de r^2 muy bajos (curva polinómica inversa de primer orden, $r^2= 0,1$, $p= 0,008$; curva polinómica inversa de segundo orden, $r^2= 0,1$ $p= 0,03$). Otros ajustes a curvas polinómicas sin sentido biológico (inverso de tercer orden, donde una campana de Gauss en el grupo de menor tamaño era continuada por una tendencia a la estabilidad ó cuadrática donde los valores de F_v/F_m seguían una forma de bañera siendo máximos al principio y al final de la curva) mostraron mayores índices de correlación ($r^2= 0,15$ y $p= 0,01$ para la primera y $r^2= 0,17$ $p= 0,002$ para la segunda), por lo que de nuevo pensamos que establecer algún tipo de vínculo concreto entre ambas variables es altamente impreciso.

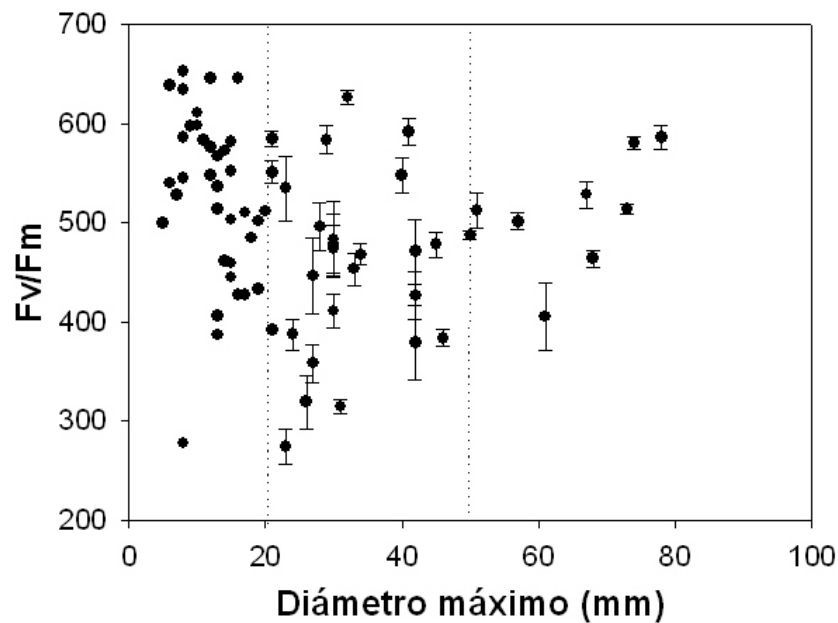


Figura 5. Fv/Fm con error estándar (en aquellos talos donde se hizo más de una medida) representado frente a tamaño del talo en mm en 71 muestras de *Rhizocarpon sp.*

El menor valor de Fv/Fm encontrado fue de 274 para un talo de 23 mm de diámetro máximo (talo 33) y el valor máximo fue de 653 para un talo de 8 mm. Dentro del grupo de muestras entre 0 y 20 mm, el valor de Fv/Fm medio fue de $528 \pm 85,4$ (desviación estándar). Para el grupo intermedio entre 20 y 50 mm se obtuvo $461,2 \pm 89,4$ y para el grupo de talos por encima de los 50 mm $511,6 \pm 59$ (Tabla 1). Se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) entre los tres grupos de tamaños que mostró significancia estadística ($p = 0,01$), por lo que hizo un análisis por contraste múltiple de rango (test de Duncan) que mostró similitud estadística entre los grupos < 20 mm y > 50 mm y > 50 mm y los talos de tamaños intermedio. Estos últimos fueron distintos significativamente respecto a los más pequeños.

Los cinco talos con valores más bajos de Fv/Fm oscilaron entre 274 y 258,3 y fueron de los siguientes tamaños -por orden de menor a mayor Fv/Fm- 23, 8, 31, 26 y 27 mm (correspondientes a los talos 33, 65, 26, 29, 27). Los 5 talos con mayor Fv/Fm oscilaron entre 634,5 y 653, y pertenecieron a tamaños de 8, 6, 16, 12, 8 mm respectivamente (talos 68, 70, 53, 58, 72). En la figura 5 se observa un grupo elevado de talos de tamaño pequeño (< 20 mm) con altos niveles de Fv/Fm, pero esos niveles altos no son

exclusivos del grupo, ya que abarca un rango desde los valores más altos de Fv/Fm hasta algunos de los más bajos, con numerosos valores intermedios (Fv/Fm entre 400 y 500). El grupo de talos intermedio ($\geq 20 \leq 50$ mm) presenta un rango muy similar en la amplitud de los valores de Fv/Fm, mientras que el grupo de talos más grandes (> 50 mm) presenta la mayoría de sus muestras entre valores altos de Fv/Fm (entre 500 y 600), teniendo su valor más bajo en 405,3 (talo 3, 61 mm). Todos los datos medios de Fv/Fm y el número de réplicas llevadas a cabo en cada talo aparecen detallados en la tabla 1.

3.2. FV/FM Y CLOROFILA EN CENTRO Y PERIFERIA DE LOS TALOS

La figura 6 muestra los contenidos en clorofila en mg/m^2 para los siete talos del grupo > 50 mm donde se llevó a cabo la extracción de pigmentos junto con sus valores de Fv/Fm el centro y en la periferia de los talos. El valor medio de clorofila para la zona centro del talo fue de $218,3 \pm 67,9 \text{ mg/m}^2$, con un valor ligeramente inferior de $176,8 \pm 95,2 \text{ mg/m}^2$ para la periferia. Si consideramos el parámetro Fv/Fm se ve la misma tendencia, con valores ligeramente superiores para la zona centro ($532,5 \pm 47,3$ y $513,9 \pm 47,5$).

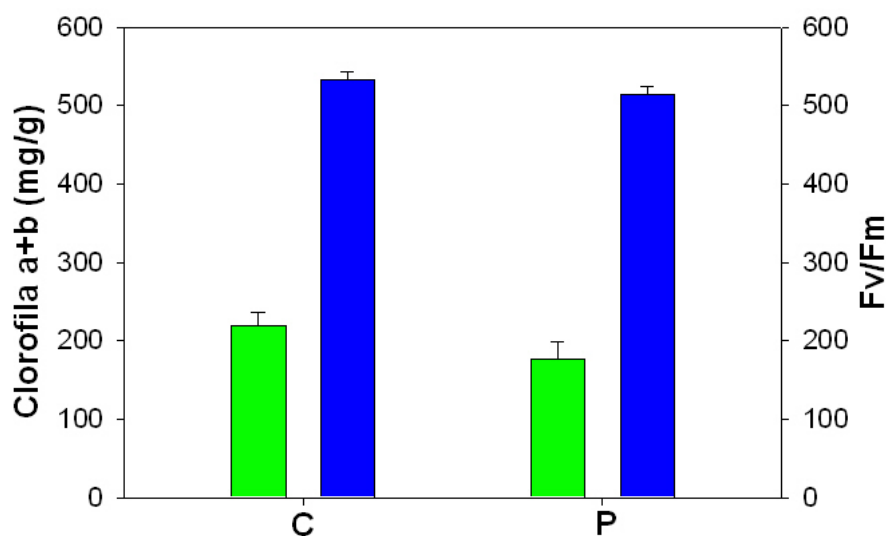


Figura 6. Cantidad de clorofila en mg/m^2 (verde) y Fv/Fm (azúl) con error estándar en centro y periferia en 7 de los talos mayores de *Rhizocarpon sp.*

El análisis de varianza (ANOVA) no mostró diferencias estadísticas significativas tanto para clorofila como para Fv/Fm al comparar centro y periferia de los talos más grandes.

La tabla 2 representa los valores medios de Fv/Fm de todos los talos en los que se discriminó centro y periferia. La representación amplía los datos mostrados en la figura 6 a un total de 34 talos. El Fv/Fm medio de la zona centro fue de $480,9 \pm 83,9$, y el de la periferia fue ligeramente inferior una vez más, con $462,9 \pm 87,2$. El análisis de la varianza (ANOVA) no mostró diferencias estadísticas significativas entre periferia y centro.

	Fv/Fm_{clorofilas}/ Fv/Fm_{total}	Clorofila (mg/m²)
CENTRO	532,5±47,33/480,9±83,9	218,3 ±67,93
PERIFERIA	513,9±47,51/462,9±87,2	176,8±95,19

Tabla 2. Valores medios y desviación estándar de Fv/Fm y clorofilas en distintas partes del talo. Fv/Fm clorofilas corresponde a los valores obtenidos en los talos donde se midieron clorofilas (n=7), mientras que Fv/Fm total representa los valores medios de todos los talos donde se discriminó centro y periferia (n= 34)

4. DISCUSIÓN

Los resultados más llamativos obtenidos en este capítulo están relacionados con la elevada dispersión obtenida entre el tamaño y las variables fisiológicas medidas en los tres grupos seleccionados en *Rhizocarpon sp.* Esto indica que no hay una relación definida entre tamaño de los talos y fotosíntesis. También es de interés la ausencia de diferencias estadísticas significativas tanto en la clorofila como en el estado fisiológico del fotosistema II (medidas de Fv/Fm) entre el centro y la periferia de los talos más grandes del estudio.

Como se observa en la gráfica 4A la elevada dispersión de puntos sin una tendencia clara es la mejor manera de explicar la relación entre fotosíntesis neta y diámetro máximo del talo en los grupos de $\geq 20 \leq 50$ mm y > 50 mm. Esto queda reforzado por la ausencia de diferencias estadísticas significativas entre los dos grupos mayores, subrayando la idea de que la fotosíntesis neta no responde a ningún patrón claro al ser

representada frente al diámetro máximo de los talos entre 20 y 78 mm. La gráfica 4B muestra un mayor grado de compactación en la distribución de los puntos. El ajuste de la nube de puntos a una relación lineal entre respiración y diámetro máximo de los talos deparó significación estadística, pero con un índice de correlación muy bajo ($r^2 = 0,22$, $p = 0,003$). Además, el análisis de la varianza entre los dos grupos de tamaño mostró una significancia estadística cerca del límite ($p = 0,048$). Esto nos indica que la variabilidad de todos los puntos individuales medidos para la respiración sigue siendo alta, pero a pesar del bajo índice de correlación no podemos omitir la tendencia debido a su significancia estadística. Debido a esto, no se puede descartar que haya una ligera tendencia a que aumente la respiración al ir aumentando el tamaño de los talos, que se podría explicar argumentando que al ir aumentando el tamaño, aumente la proporción respecto al total de una zona central menos involucrada fisiológicamente en el crecimiento marginal. De esta manera el carbono fijado en esa región central o interna se podría invertir más en la creación de estructuras reproductoras o de protección (Bench et al. 2001), mientras que las areolas de la periferia podrían usar mayor porcentaje del carbono fijado para aumentar su superficie y crecer. El patrón para la fotosíntesis bruta fue similar que el de la respiración, con una significancia estadística claramente menor acompañada de un índice de correlación aún más bajo, pero esta vez sin significancia estadística respecto al análisis de la varianza entre grupos. Parece evidente que al sumar los valores de respiración a los de fotosíntesis neta para obtener la fotosíntesis bruta, esta última ha adquirido parte de la baja tendencia lineal que apareció en la respiración. En cualquier caso, el índice de correlación es aún más bajo en la fotosíntesis bruta ($r^2 = 0,1$), y el análisis de la varianza no deparó diferencias significativas, por lo que pensamos que la baja linealidad entre fotosíntesis bruta y tamaño no es representativa.

Como se ha explicado anteriormente, el parámetro F_v/F_m nos informa sobre el estado de salud del PSII. La evaluación de este parámetro ha añadido información adicional al estudio, ya que ha permitido comparar todos los tamaños muestreados en función de un indicador de posible actividad fotosintética. Por otro lado parece reforzar la información obtenida con la fotosíntesis, ya que se observa la misma falta de tendencia definida, a pesar de que se observa un ligero aumento del F_v/F_m en el grupo < 20 mm que inicialmente podría apoyar un mejor estado fisiológico de los talos más pequeños. Las ecuaciones polinómicas que cumplían esta tendencia y que presentaron

significación estadística obtuvieron índices de correlación muy bajos, ligeramente inferiores a 0,1. Otros ajustes sin sentido biológico mostraron correlaciones algo superiores, por lo que pensamos que la mejor opción con los datos que se muestran es descartar cualquier tendencia definida. El hecho de haber obtenido diferencias estadísticas significativas en el test de Duncan no debe enmascarar este patrón. La ausencia de diferencias significativas entre el grupo de menor tamaño (< 20 mm) y el de mayor tamaño (> 50 mm) nos parece suficiente prueba, a pesar de que el análisis de la varianza del grupo de talos intermedios sí mostró diferencias significativas respecto a los más pequeños.

Los resultados muestran que tanto la fotosíntesis neta y el Fv/Fm tienden a ser uniformes a lo largo de la vida de los talos de *Rhizocarpon sp.* dentro del rango de tamaños estudiado para cada variable. El hecho de que la fotosíntesis neta no responda de manera definida al aumento de tamaño, y por tanto de edad, nos indica que los talos de *Rhizocarpon sp.* fijan la misma cantidad de carbono por unidad de superficie durante el período estudiado. Aunque la tasa de fotosíntesis no tiene por qué verse influida por la competencia entre distintos talos, la alocaación de carbono o el uso que cada individuo hace del carbono fijado sí podría verse afectado por la competencia entre talos. Haines-Young (1988) reconoce que la competencia entre talos es un factor importante a la hora de controlar la estructura de las poblaciones de *Rhizocarpon sp.*, admitiendo a la vez que el efecto de la competencia va disminuyendo según los talos van aumentando de tamaño. Este hecho, confirmado con observaciones de campo, nos hizo temer sobre un efecto negativo de la competencia sobre la relación tamaño y fotosíntesis en los talos más pequeños. Si la competencia condiciona el aprovechamiento del carbono fijado en fotosíntesis para crecer en superficie, una posibilidad alternativa es que los talos más pequeños aumenten su grosor por unidad de superficie. Este supuesto aumento en grosor llevaría asociado un aumento de la tasa de respiración debido al aumento de masa fúngica metabólicamente activa por unidad de superficie. La tendencia lineal (aunque muy débil) de la respiración nos invita a descartar esta hipótesis, ya que si algún grupo de tamaños tuviera tasas de respiración por unidad de superficie mayores que los otros, esos serían los mayores.

Como ya se ha comentado en alguna ocasión, los talos verde-amarillentos del género *Rhizocarpon* subgrupo *Rhizocarpon* han sido los más usados mayoritariamente en trabajos de liquenometría (Innes 1988). Uno de los problemas principales a la hora de aceptar el uso de la técnica ha sido la evolución de la tasa de crecimiento del talo a lo largo de su ciclo de vida. Nuestros datos de fotosíntesis neta y fotosíntesis bruta por unidad de superficie han sido representados frente al diámetro máximo de los talos estudiados con el fin de comparar nuestros resultados con aquellos obtenidos por Armstrong (Armstrong 1983; Bradwell y Armstrong 2007) donde se compara tasa de crecimiento anual medida de forma directa y diámetro de los talos. Uno de los objetivos principales de este trabajo era buscar si la etapa de senescencia mencionada por Armstrong y otros autores (Haworth et al. 1986; Bull y Brandon 1998; O'Neal y Schoenenberger 2003) quedaba reflejada en una disminución de la tasa de fotosíntesis en el grupo de mayor tamaño o en las proximidades del mismo. Los resultados de intercambio gaseoso representados en las figuras 4A-4C no muestran en ningún caso que esta fase de senescencia se produzca considerando la fotosíntesis neta y la fotosíntesis bruta de los talos estudiados. Esto queda corroborado con los datos de Fv/Fm. Algunos autores hablan de una fase acelerada de crecimiento en los talos de menor tamaño que correspondería mayoritariamente con el primer grupo < 20 mm de diámetro máximo (Porter 1981; Armstrong 1983; Karlen y Black 2002; Laroque y Smith 2004). Esta teoría podría verse inicialmente apoyada con un aumento aparente de Fv/Fm en los talos más pequeños, lo que podría indicarnos un estado más saludable de los fotosistemas dentro de este grupo. En cualquier caso, la ausencia de diferencias significativas entre el Fv/Fm de los talos < 20 mm y los talos >50 mm, así como la forma de la nube de puntos del gráfico 5 nos hacen descartar esta posibilidad.

Aunque la fotosíntesis no tiene por qué ser un indicador preciso de crecimiento radial, es evidente que es un factor fundamental a la hora de evaluar el crecimiento (Hill 1981; Palmqvist 2000; Green 2009). La falta de relación clara entre productividad fotosintética neta y Fv/Fm con el tamaño de los talos refuerza todos los trabajos que no reportan diferencias significativas en las tasas de crecimiento de los talos a lo largo de su ciclo de vida, en particular aquellos que no detectan el mencionado periodo de senescencia (Matthews 1994; Winchester y Chaujar 2002; Armstrong 2005). Los resultados obtenidos cuestionan a su vez los modelos de crecimiento parabólico propuestos por Armstrong (Armstrong 1983; Armstrong 2004; Bradwell y Armstrong

2007). Los modelos más probables propuestos por Trenbith and Mathews (2010) y Matthews y Trenbith (2011) (ya comentados en la introducción) cuadrarían mejor con los datos de fotosíntesis obtenidos. La alta variabilidad de las tasas de fotosíntesis observadas coincide con las diversas tasas de crecimiento individual dentro del grupo *Rhizocarpon sp.* propuestas por muchos autores (Matthews 1994; Armstrong y Bradwell 2010; Matthews y Trenbith 2011).

El estudio de la relación tamaño fotosíntesis en el grupo *Rhizocarpon sp.* arroja resultados más allá de la implicación en las tasas de crecimiento y en su aplicación en liquenometría. A pesar de la ligera tendencia lineal observada en la respiración, la falta de relación clara entre tamaño de los talos y fotosíntesis neta, fotosíntesis bruta y Fv/Fm refuerza la literatura que indica que la dependencia puede ser característica de cada especie más que un fenómeno generalizado (Larson 1984; Gauslaa et al. 2009). Aunque algunos trabajos sí que muestran un efecto significativo del tamaño (Larson 1984; Hestmark et al. 1997; Gauslaa y Solhaug 1998), los efectos de este sobre la fisiología en líquenes debería ser estudiado a nivel individual en cada especie si se pretende obtener información precisa al respecto. Como demuestran estos resultados, también sería conveniente hacer un estudio exhaustivo dentro de cada especie entre el tamaño de las muestras y cada una de las variables metabólicas relacionadas con el crecimiento.

El segundo objetivo que planteamos a la hora de diseñar este experimento fue tratar de entender mejor el crecimiento en el grupo de *Rhizocarpon sp.* utilizando datos fisiológicos. El hecho de no haber encontrado diferencias significativas entre el Fv/Fm en el centro y en la periferia de todos los talos en los que se pudo discriminar con claridad ambas partes nos indica que el estado de los fotosistemas no es mejor en ninguna de las dos zonas respecto a la otra. Con el objetivo de reforzar esta información se midió el contenido en clorofila discriminando centro y periferia en los siete talos mayores. Los resultados indicaron que no había una zona con más clorofila que la otra, ya que la diferencia a favor de la zona centro no fue estadísticamente significativa. Nuestros resultados no son consistentes con algunos trabajos anteriores que han analizado indicadores fotosintéticos en distintos líquenes (Máguas et al. 1997; Barták et al. 2000; 2004; 2005). En dos de estos trabajos, el Fv/Fm mostraba diferencias en distintas partes de los talos, distribuyéndose de manera heterogénea. Los autores atribuyen estas diferencias al patrón de crecimiento de cada especie y a la variabilidad

anatómica en el interior de cada talo. Valladares et al. (1994) encontraron también resultados diferentes en el líquen foliáceo *Lasallia pustulata*, ya que obtuvieron mayor clorofila y mayor grosor en el centro del talo que en la periferia.

Hill (1981) propuso dos modelos de crecimiento para líquenes radiales en función de la presumible distribución de las tasas de fotosíntesis. En primer lugar planteó tasas de fotosíntesis homogéneas por todo el talo, ya que mientras la periferia crecía en superficie el centro debería mantener un aumento en grosor con distintos intereses funcionales (como el desarrollo de estructuras reproductoras). En segundo lugar propuso que algunos líquenes (como el género *Caloplaca sp.*) que se descomponían por el centro al ir creciendo, debían tener mayores tasas de fotosíntesis en la periferia que el centro, aunque asume que el crecimiento en el centro debe ser siempre necesario para favorecer el intercambio celular. Nuestros resultados apoyan mejor el primer modelo.

Bench et al. (2001) llevaron a cabo un intento de estimación de la edad en talos de *Rhizocarpon geographicum* usando ^{14}C . En el trabajo encontraron datos consistentes con un patrón de crecimiento relacionado con la fusión y el reciclado de areolas, lo que hizo imposible estimar la edad de los talos con este método. En un trabajo similar, Clark et al. (2000) si que encontraron un patrón de crecimiento radial constante para el líquen crustáceo *Caloplaca trachyphylla*. En el trabajo mencionado de Bench y colaboradores, los autores proponen una elevada actividad metabólica en el interior del talo que podría estar relacionada con el aumento de procesos como síntesis de estructuras reproductoras, de protección o reciclaje del carbono. Esto implicaría la imposibilidad de datar correctamente unas areolas en constante estado de cambio. Aparte de encajar con la ausencia de diferencias significativas entre Fv/Fm y clorofila en centro y la periferia de los talos (que indicarían similitud en la actividad fotosintética entre ambas partes como indica la figura 4A), esta mayor actividad en el centro de los talos encajaría con la ligera tendencia lineal observada entre respiración y tamaño.

Todo lo anteriormente expuesto parece consistente con distintas formas de crecimiento en los líquenes mencionados (líquenes foliáceos y crustáceos del género *Caloplaca*) y los líquenes crustáceos del género *Rhizocarpon sp.*, donde la presencia del hipotalo y su talo areolado pueden ser factores fundamentales para entender su crecimiento y sus diferencias con otros tipos de líquenes (Armstrong y Bradwell 2010). Nuestra propuesta

parece encajar con un modelo según el cual se podrían diferenciar dos zonas dentro de los talos areolados del género *Rhizocarpon*, una central y otra periférica. Aunque la tasa de fotosíntesis sea igual en todas las zonas del talo, la diferencia principal entre esas dos zonas podría ser el porcentaje de carbono derivado al crecimiento en cada una. Las observaciones de Bench et al. (2001) sugieren que en la zona central habría un proceso activo de consumo de energía para funciones distintas al crecimiento, mientras que en las areolas exteriores el porcentaje de carbono fijado derivado al crecimiento sería mayor. Aplin y Hill (1979) propusieron un modelo de crecimiento para líquenes según el cual el crecimiento radial de los talos aumentaba con el tamaño en talos pequeños para estabilizarse posteriormente en tamaños mayores. Armstrong y Bradwell (2010) proponen que el modelo puede ser adecuado para líquenes foliáceos y placoides. Los líquenes crustáceos placoides podrían diferenciarse de aquellos con morfología similar a los del género *Rhizocarpon* en que el aporte de carbono de las partes centrales del talo para el crecimiento periférico fuera mucho mayor. Esto demostraría tanto la frecuente descomposición por el centro de muchas especies de líquenes crustáceos placoides (Hill, 1981, Sancho et al. 2011), como la lenta tasa de crecimiento de los talos de *Rhizocarpon* comparada con otras especies de líquenes crustáceos (Benedict 2008) Nuestros datos y la bibliografía seleccionada sugieren que la morfología de las especies *Rhizocarpon sp.* condiciona un crecimiento distinto basado en un reciclaje activo de las areolas del talo.

CAPITULO III. COMPARACIÓN ECOFISIOLÓGICA ENTRE TRES ESPECIES DEL GÉNERO *PLACOPSIS*, LÍQUENES PIONEROS EN MORRENAS GLACIARES RECIENTEMENTE EXPUESTAS EN UN ENTORNO SUBANTÁRTICO

Raggio J, Green TGA, Crittenden PD, Pintado A, Vivas M, Pérez-Ortega S, De los Ríos A y Sancho LG (2012) Comparative ecophysiology of three *Placopsis* species, pioneer lichens in recently exposed Chilean glacial forelands. *Symbiosis* 56: 55-66

De los Ríos A, **Raggio J**, Pérez-Ortega S, Vivas M, Pintado A, Green TGA, Ascaso C y Sancho LG (2011) Anatomical, morphological and ecophysiological strategies in *Placopsis pycnotheca* (lichenized fungi, Ascomycota) allowing rapid colonization of recently deglaciated soils. *Flora* 206: 857-864

1. INTRODUCCIÓN

1.1. GENERALIDADES DE LA ZONA DE ESTUDIO

El archipiélago de Tierra de Fuego comprende la región más austral del continente americano y se sitúa entre las latitudes 52° y 56° S, rodeado de el océano Pacífico al Oeste y el Atlántico al Este (Figura 1). Está formado principalmente por la Isla Grande de Tierra de Fuego y otras islas adyacentes, entre las que destacan Isla Gordon, Isla Navarino e Isla Hoste, todas situadas al sur de la Isla Grande y separadas de esta por el Canal de Beagle. Más al sur se encuentran las Islas Wollaston e inmediatamente después el Cabo de Hornos, a partir del cual se abre el Mar de Drake, que separa Tierra de Fuego de la Península Antártica en una franja de aproximadamente mil kilómetros.

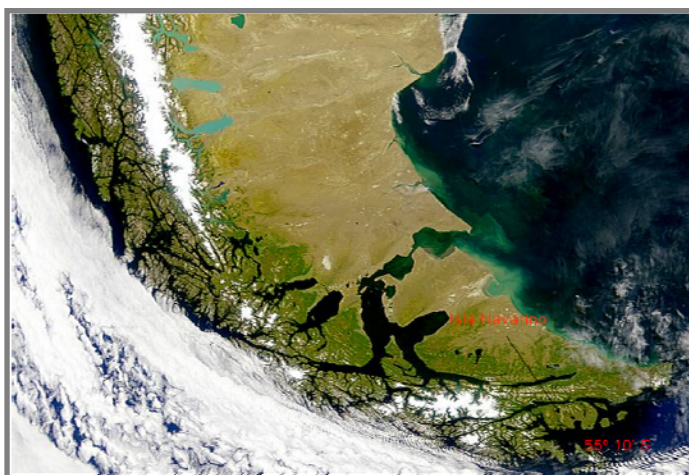


Figura 1. Archipiélago de Tierra de Fuego, Isla Grande, Canal de Beagle e Islas Navarino y Hoste

Siguiendo el estudio de la zona llevado a cabo por Tuhkanen (1992), el relieve de la región es muy variable en las distintas zonas que la forman, ya que si bien la parte oeste es muy montañosa, la parte noreste está formada por tierras bajas características de la región patagónica. En el suroeste de la Isla Grande aparece la Cordillera Darwin como la parte más meridional y final de la gran Cordillera de Los Andes. En ella se alcanzan las cotas más altas de la región, con picos de más de 2.000 m de altitud (Monte Darwin, 2.488 m).

Esta dualidad en el relieve aparece reflejada también en el origen geológico. La Cordillera de Los Andes, en primer lugar, aparece dividida en la zona costera, la central y la marginal. La parte costera está formada principalmente por andesita, diorita y granodiorita. La parte central está constituida por roca metamórfica penetrada por granito y granodiorita, que integran la parte central de la Cordillera Darwin. La parte marginal de la Cordillera andina en su sector más meridional está formada por rocas sedimentarias de origen cretácico. En segundo lugar, las tierras bajas de la región norte de Tierra de Fuego están cubiertas de arena, grava y arcilla, todas depositadas en la zona por los glaciares del cuaternario (Tuhkanen 1992).

Las cumbres de la Cordillera Darwin cuentan con múltiples glaciares que, en algunos casos, descienden hasta el mar. El último episodio glacial de gran intensidad en la región ocurrió entre hace 25.000 y 17.000 años (Kapland et al. 2008), cuando un gran glaciar de 1 km de grosor cubría parte del Sur de Tierra de Fuego (Rabassa et al. 2000) y las masas de hielo sobrepasaron la Isla Gable hacia el Atlántico (Norte de Isla Navarino) en 30 km (Heusser 1989). El proceso de deglaciación masivo en la zona se inicia hace unos 10.300 años, y hace 9.500 años se inició la colonización de los típicos bosques fueguinos de *Nothofagus* (Etayo y Sancho 2008). Tras distintos procesos de avance y retroceso glaciar en distintas épocas, la situación actual de los glaciares fueguinos es heterogénea (Holmund y Fuenzalida 1995; Etayo y Sancho 2008) con algunos retrocediendo (principalmente en la cara Norte de la Cordillera Darwin) y otros estables o incluso avanzando (Strelin et al. 2008).

Según Pisano (1977), Tierra De Fuego se divide en cuatro grandes zonas de vegetación; a grandes rasgos, una región de estepa al norte, bosques caducos de *Nothofagus* más al sur, bosques perennes de *Nothofagus*, llanuras magallánicas y tundra. La tundra andina tiene una presencia importante en todas las zonas de montaña por encima de los bosques. La zona del canal Beagle, donde se localiza con mayor precisión la zona de estudio, suele presentar bosques densos de hayas australes del género *Nothofagus*, que aparecen junto a *Drymis winterii*. Estos bosques presentan una altitud variable en función de la zona del canal de Beagle en la que se encuentran (cercano al nivel del mar en el extremo occidental y entre 500-600m en su zona central y oriental), aunque el límite del bosque siempre aparece a altitudes bajas comparado con otras latitudes más templadas. Moore (1975) definió tres factores fundamentales a la hora de entender la

distribución de la vegetación alpina en Tierra de Fuego, el viento, las características del sustrato y la disponibilidad de agua. Por encima del mencionado límite aparece la característica tundra andina, con arbustos semiesféricos de *Bolax* y *Azorella*, entre los que crecen matas de *Empretrum* y *Pernettya* (Etayo y Sancho 2008). Cuando estos géneros van desapareciendo comienza a destacar la vegetación criptógama, especialmente los líquenes, que se van haciendo más abundantes.

Tuhkanen (1992) propuso que la climatología de la región está condicionada por su alta latitud, por estar situada en zona de pasos de ciclones que se dirigen al este y su proximidad a la masa helada de la Antártida. Estos factores, junto al hecho de estar rodeada de océanos, confieren a la región un clima oceánico frío con fuertes vientos, principalmente del sudoeste. Las temperaturas son relativamente constantes durante todo el año. En la zona del Canal Beagle, las temperaturas medias anuales de los dos mayores núcleos de población, Puerto Williams y Ushuaia son 6,2° C (Santana et al. 2006) y 5,5 °C (Brancaleoni et al. 2003), respectivamente. A lo largo del Beagle se produce un marcado gradiente de precipitación oeste-este (Santana et al. 2006), con valores que oscilan entre los 4000 mm en algunas islas del oeste a los poco más de 400 mm de Puerto Williams al este.

El archipiélago de Tierra de Fuego se encuentra situado en el entorno subantártico (Øvstedal y Smith 2001; Brancaleoni et al. 2003; Rozzi 2008), claramente influido a todos los niveles por la proximidad de la Antártida (Figura 2). La región fueguina cuenta con la presencia de bosque, lo que no ocurre en el resto de islas que conforman el entorno subantártico comprendido entre los 45°S y 55°S (Øvstedal y Smith 2001), donde la vegetación es predominantemente herbácea, arbustiva y de tundra. La conexión florística para criptógamas entre Tierra del Fuego y la Antártida marítima se ha hecho patente en varios trabajos (Longton 1982, Øvstedal y Smith 2001), lo que refuerza el vínculo biogeográfico entre ambas regiones.

Tierra de Fuego cuenta con los bosques situados más al sur del mundo, los últimos glaciares de América antes de la extensión helada de la Antártida y aparece como una frontera meridional en la distribución de centenares de plantas vasculares (Etayo y Sancho 2008). Aparte de lo mencionado, la región ha sido propuesta como una zona de extraordinaria biodiversidad de vegetación no vascular, con ratios de vegetación no

vascular respecto a la vascular alrededor de 1 (Rozzi et al. 2008), lo que ha ayudado considerablemente a que una amplia región que engloba buena parte del Canal Beagle haya sido catalogada como Reserva de la Biosfera de Cabo de Hornos. Todo esto en conjunto coloca a la región en una posición excepcional para llevar a cabo estudios pluridisciplinarios relacionados con la vegetación.

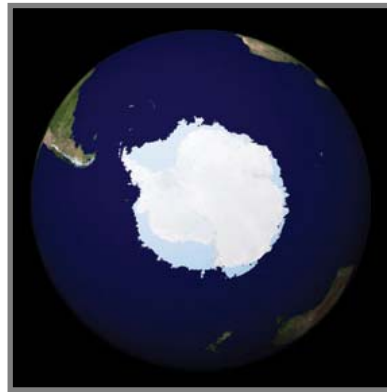


Figura 2. Sur de Sudamérica y la Antártida separados por el Mar de Drake

1.2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Los líquenes, como se ha explicado ya en alguna ocasión anteriormente, son capaces de tolerar condiciones ambientales extremas, lo que les permite colonizar hábitats vedados para otros vegetales. Buena parte de los trabajos existentes que buscan entender la adaptación de los líquenes a dichos ambientes han entendido por “extremo” condiciones límite de temperatura -alta o baja-, disponibilidad de agua o radiación. La riqueza florística no vascular de Tierra del Fuego, en concreto de algunos ambientes de la región del canal Beagle, no parece indicar que la zona sea especialmente hostil para este tipo de organismos. Como se ha explicado en la primera parte de esta introducción, la Cordillera Darwin es un ejemplo excelente de alta actividad glacial, con algunos retrocediendo y otros estables o incluso avanzando (Holmund y Fuenzalida 1995). Esta actividad glacial tiene como consecuencia la aparición frecuente de zonas descubiertas de hielo, recientemente expuestas y deficitarias en nutrientes.

El balance de nutrientes como el nitrógeno y el fósforo, así como su disponibilidad ambiental, ha sido propuesto como un factor que influye en el funcionamiento de la vegetación a todos los niveles, crecimiento, reproducción, interacciones entre

individuos, composición de las comunidades y diversidad botánica (Güsewell 2004). Tierra del Fuego, como otras regiones de alta latitud, es considerada como pobre en nutrientes -al menos en nitrógeno- (Sancho et al. 2011), especialmente si consideramos las regiones expuestas a la erosión glaciaria (Crittenden et al. 1994). El reto de la vegetación que inicie la colonización de estos hábitats parece ser, por tanto, la baja disponibilidad de nitrógeno, pudiendo considerarse esta escasez como el factor más extremo en estos ecosistemas próximos a glaciares de alta latitud.

Los líquenes están considerados como primocolonizadores de hábitats recientemente expuestos debido a su capacidad de sobrevivir en localidades pobres en nutrientes, iniciando el proceso de aporte de carbono y nitrógeno en zonas deficitarias (Kurina y Vitousek 1999). En estas morrenas glaciares del entorno del Canal Beagle son abundantes especies del género *Placopsis*, que presentan la peculiaridad de tener cianobacterias agrupadas en estructuras especiales denominadas cefalodios. Estos cefalodios parecen especializados en la fijación de nitrógeno, ya que el número de heterocistas (células especializadas en fijación de nitrógeno no fotosintetizadoras dentro de la cadena de cianobacterias) es mayor en cefalodios que en líquenes con cianobacteria como fotobionte primario (Hitch y Millbank 1975). Al ser el nitrógeno un factor limitante para la producción primaria (Matzek and Vitousek 2003), la posibilidad de fijarlo confiere a todos los organismos en simbiosis con cianobacterias la capacidad de combatir esa carencia inicial de nutrientes.

La fijación de nitrógeno en líquenes en ambientes deficitarios en nutrientes ha sido especialmente estudiada en el Ártico, donde se considera que las cianobacterias en vida libre o en simbiosis con líquenes y briófitos son responsables de hasta el 80% de la entrada de N en dichos ecosistemas (Solheim et al. 2006). Crittenden (1975) propuso que los líquenes fijadores de nitrógeno podían ser los principales contribuyentes de este nutriente en el ecosistema tras un estudio de campo en una morrena en Islandia y Crittenden y Kershaw (1978) generalizaron de nuevo esta tendencia para el Ártico y el subártico, proponiendo a la vez que el lavado, la descomposición y los incendios eran las principales vías de paso del nitrógeno fijado a los ecosistemas. Kershaw y colaboradores llevaron a cabo más trabajos relacionados con la fijación de nitrógeno en líquenes de altas latitudes (McFarlane y Kershaw 1977; McFarlane y Kershaw 1980; Kershaw y McFarlane 1982), centrándose en la influencia que distintos factores

ambientales como la luz, la temperatura y la cubierta nival podían tener sobre la capacidad de fijación de nitrógeno de los líquenes con cianobacterias. Otros hábitats deficitarios en nitrógeno donde se han llevado a cabo estudios de la relevancia de la fijación de nitrógeno atmosférico por parte de líquenes son las laderas de los volcanes, que quedan arrasadas tras las erupciones y las coladas de lava, que suponen un sustrato adecuado para la colonización de líquenes con cianobacterias. Fritz Sheridan y Coxson (1988), Vitousek (1994) Kurina y Vitousek (1999) destacan la importancia de estos organismos en estos ecosistemas, así como la buena adaptación de su capacidad de fijación de nitrógeno a las condiciones ecológicas concretas de cada ambiente. Según nuestro conocimiento, estos estudios nunca se han realizado en regiones glaciares de Tierra de Fuego, donde la escasez de nutrientes del hábitat puede otorgar a los organismos primocolonizadores fijadores de nitrógeno la misma relevancia que la mencionada en los trabajos anteriores.

Varios trabajos hasta la fecha han relacionado fotosíntesis o fijación de nitrógeno con contenido en nutrientes como fósforo o nitrógeno en líquenes, pero la relación entre todos los parámetros mencionados en un género de líquenes crustáceos con cefalodio representa un enfoque novedoso. Respecto a la fotosíntesis cabe destacar trabajos como los de Valladares y Sancho (2000), que encontraron una relación positiva entre fotosíntesis y contenido en nutrientes en líquenes en la Antártida marítima. A escala más global, Palmqvist et al. (2002) llevaron a cabo un trabajo en el que intentaron relacionar distintas variables fisiológicas con contenido en nutrientes en 75 especies de líquenes con distintos tipos de fotobionte, con y sin cefalodio procedentes de distintos hábitats. Encontraron una relación positiva (aunque en la mayoría de los casos débil) entre contenido en nitrógeno, clorofila y desarrollo fotosintético. En un trabajo similar, Green et al. (1997) encontraron una relación positiva entre clorofila y contenido en nitrógeno en líquenes con cefalodio, mientras que otros tipos de líquenes como aquellos con alga verde y cianobacteria como fotobionte no la presentaron.

Los trabajos que relacionan fijación de nitrógeno con contenido en nutrientes (especialmente nitrógeno) son algo más abundantes. Existe una tendencia clara que refleja que los líquenes fijadores de nitrógeno presentan más cantidad de este nutriente por unidad de peso (Crittenden 1975; Green et al. 1980; Palmqvist 2002). Respecto al fósforo, Reed et al. (2007) propusieron que su disponibilidad podía regular la fijación de

nitrógeno y controlar así la disponibilidad de nitrógeno. Las relaciones entre nitrógeno y fósforo y crecimiento en distintos tipos de líquenes han sido estudiadas también en diversos estudios. Crittenden et al. (1994) propuso la importancia del balance entre nitrógeno y fósforo en líquenes para conseguir un crecimiento óptimo. En el mismo trabajo, el autor propone que en el caso de líquenes con capacidad de fijar nitrógeno, la tasa de fijación vendrá determinada por la obtención de un ratio adecuado entre nitrógeno y fósforo según las condiciones prevalentes. La importancia del equilibrio entre ambos nutrientes y su relación con la tasa de crecimiento está explicada en más extensión en la revisión llevada a cabo por Güsewell (2004). En relación con el mencionado impacto de los nutrientes en el crecimiento, Sundberg et al. (2001) propusieron que el nitrógeno era un factor limitante para el crecimiento en dos especies de líquenes tripartitos con cefalodio (*Nephroma arcticum* y *Peltigera aphtosa*), de tal manera que condicionaba de manera indirecta la ganancia de masa a través de la cantidad de clorofila y que la ganancia de área dependía de un suministro continuo de dicho nutriente. Tanto este trabajo, como otro llevado a cabo por Palmqvist et al. (1998) sugieren una regulación interna de los nutrientes en función de las necesidades particulares requeridas.

Por tanto, algunas variables fisiológicas como la fotosíntesis y la fijación de nitrógeno, así como el contenido y la disponibilidad ambiental de nutrientes como el nitrógeno y el fósforo son fundamentales para entender el crecimiento en este tipo de líquenes. En los dos primeros capítulos de esta memoria doctoral se ha estudiado el efecto de la fotosíntesis sobre el crecimiento de distintas maneras. Los líquenes tripartitos (con cianobacterias en cefalodios) del género *Placopsis* que hemos estudiado en Tierra del Fuego nos ofrecen una oportunidad para entender como la interacción entre estas variables fisiológicas pueden influir en la capacidad de adaptación de estos líquenes a su entorno, así como en sus tasas de crecimiento. Algunas especies del género *Placopsis* han sido utilizadas en trabajos de liquenometría, varios de ellos en la región de la Patagonia y Tierra de Fuego (Harrison y Winchester 2000; Winchester y Harrison 2000; Winchester et al. 2001; Sancho et al. 2011), pero la información fisiológica existente sobre el género es muy escasa. Schroeter (1994) estudió la adaptación fisiológica de *Placopsis contortuplicata* a las condiciones de la Península antártica y concluyó que había un elevado grado de independencia entre el cefalodio y el resto del talo, y que dicha independencia era beneficiosa para una adaptación óptima para las condiciones de

la región. Sus medidas fueron llevadas a cabo usando la fluorescencia de la clorofila *a*, pero no pudieron ser corroboradas al medir el intercambio gaseoso en el cefalodio aislado. La relación entre capacidad para fijar nitrógeno atmosférico y contenido en nutrientes en el género *Placopsis* ha sido estudiada en algunos trabajos, normalmente estudios globales donde aparecen representados varios géneros (Hitch and Stewart 1973; Crittenden 1975; Greenfield 1992; Palmqvist et al. 2002).

El primer objetivo de este capítulo consiste en buscar relaciones entre la capacidad para fijar nitrógeno, la fotosíntesis, la respiración y el contenido en fósforo y nitrógeno en tres especies del género *Placopsis* (*P. perrugosa*, *P. stenophylla* y *P. pycnotheca*) que conviven en la morrena del glaciar Pia, a orillas del canal Beagle. A pesar de la supuesta independencia de las cianobacterias en los cefalodios propuesta por Schroeter (1994), existen múltiples sugerencias para pensar que existe un vínculo fisiológico entre los componentes de la simbiosis tripartita (Kershaw 1985; Green et al. 1997; Rai 2000). El conocimiento de la interacción entre la fijación de carbono, la respiración y la fijación de nitrógeno, así como la relación entre estas y el estatus de nutrientes de los líquenes nos permitirán conocer sus estrategias adaptativas a un hábitat recientemente expuesto deficitario en nutrientes, su importancia como primocolonizadores en el ecosistema, y el posible efecto resultante sobre sus tasas de crecimiento.

En segundo lugar, en el capítulo I se dieron evidencias suficientes para justificar las medidas realizadas en el laboratorio como indicadores fiables del comportamiento ecofisiológico de los líquenes en el campo (Lange y Green 1996; Leisner et al. 1997; Lange et al. 2001; Lange 2002). Teniendo esto en cuenta, las dos contrastadas ecologías entre los tres líquenes recolectados nos hicieron pensar que estaban adaptados a condiciones distintas a pesar de encontrarse en la misma localidad. Por un lado, los saxícolas *P. perrugosa* y *P. stenophylla* crecen sobre rocas en la morrena del glaciar, mientras que *P. pycnotheca* crece sobre arena en el suelo en las proximidades de la zona de deshielo. Los datos fisiológicos obtenidos en el laboratorio son discutidos intentando relacionarlos con las importantes diferencias ecológicas, reforzando así el conocimiento de la adaptación de los líquenes estudiados a su ambiente y a su microhábitat.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. DESCRIPCIÓN DE LA LOCALIDAD Y RECOGIDA DE MUESTRAS

La Bahía Pia presenta tres glaciares y brazos principales, y está situada en la mitad del brazo noroeste del canal Beagle a 54° 45'S y 69° 29'O, ocupando un lugar intermedio en el gradiente de precipitación oeste-este comentado anteriormente. La vegetación en las colinas bajas de la Bahía consiste en bosques densos de *Nothofagus betuloides / antarctica* con un sotobosque formado por *Drymis winteri* y *Pernettya mucronata*. Tras la retirada glaciár, los bosques incipientes se caracterizan por una cubierta densa de *Gunnera magallanica* (Sancho et al. 2011).

Tres especies del género *Placopsis* fueron recolectadas en Diciembre de 2009 en una morrena del glaciár Pia. *P. stenophylla* y *P. perrugosa* fueron recolectadas de rocas usando martillo y escoplo. Ambas especies están presentes en rocas de distinto tamaño alrededor de todo el valle del glaciár. *P. perrugosa* crece principalmente sobre grandes bloques y *P. stenophylla* aparece normalmente sobre rocas más pequeñas o piedras, pero esta distribución no es para nada exclusiva ya que en muchos casos las especies comparten las mismas rocas, con *P. perrugosa* tendiendo a crecer en la parte alta y *P. stenophylla* en la parte inferior, más cercana al suelo. Es probable que los líquenes presentes en las partes bajas de las rocas o sobre las piedras más pequeñas estén expuestos durante más tiempo a la nieve en invierno y a las corrientes de agua de deshielo en verano. *P. pycnotheca* presenta una ecología distinta, crece en un sustrato de arena inestable cercana a las corrientes de agua del deshielo glaciár. Los talos fueron recolectados recogiendo el talo completo unido a su sustrato arenoso en zonas de arena seca. Las tres especies aparecen representadas en su hábitat natural en la figura 3.

El primer grupo de muestras fue recolectado en bolsas de papel, secado al aire a temperatura ambiente y transportado a Madrid via aérea para iniciar inmediatamente las medidas de intercambio gaseoso. El tiempo transcurrido entre la recolección y las medidas fue de 20 días. Una vez finalizados estos experimentos, las muestras fueron mantenidas congeladas -20° C hasta que se llevaron a cabo las medidas de fijación de nitrógeno en la Universidad de Nottingham, UK, donde llegaron congeladas con 10 kg

de hielo seco. Un segundo grupo de muestras fue recolectado, secado al aire de nuevo y transportado congelado a -20° C desde el campo. El tiempo transcurrido desde la recolección hasta el inicio de los experimentos fue de cuatro meses y medio. Las muestras congeladas en el campo fueron utilizadas para evaluar los efectos de los distintos tratamientos de las muestras (almacenamiento y medidas previas en el laboratorio) sobre la capacidad de fijación de nitrógeno, y fueron consideradas por tanto como un grupo de muestras control para las medidas de reducción de acetileno.

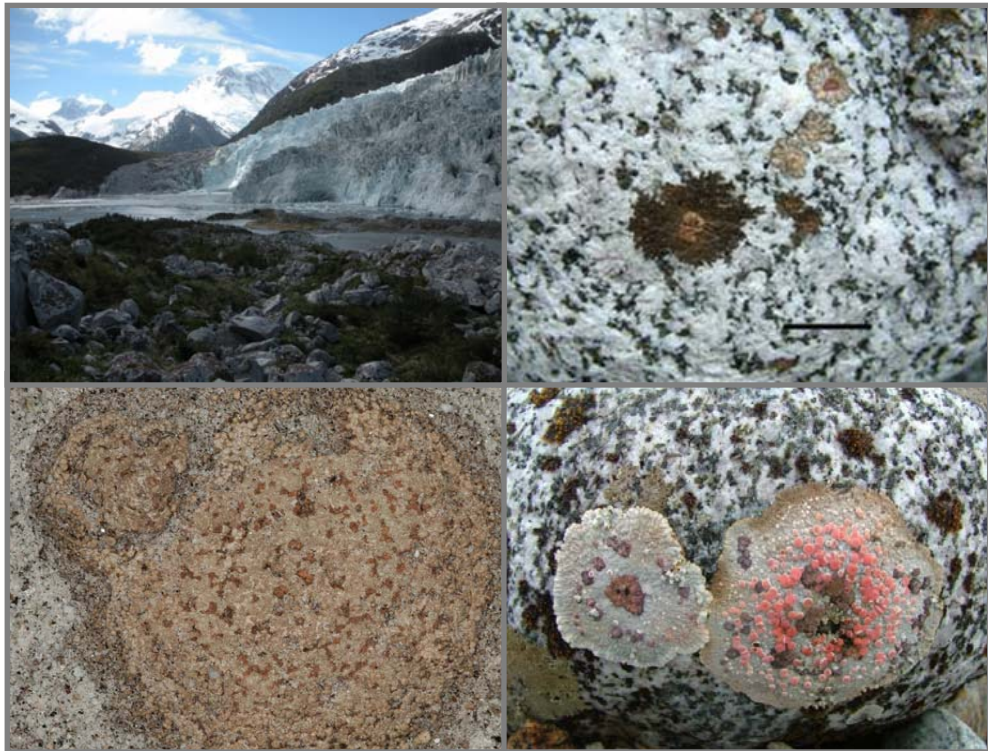


Figura 3. Bahía y glaciar Pia (arriba izquierda), *P. perrugosa* sobre roca (arriba derecha), *P. pycnotheca* sobre suelo arenoso (abajo izquierda) y *P. stenophylla* sobre roca (abajo derecha)

2.2. DESCRIPCIÓN DE LAS ESPECIES

El género *Placopsis* (*Trapeliaceae*, *Ascomycota*) presenta una distribución mundial con una mejor representación en el hemisferio sur, principalmente en zonas de alta precipitación de Nueva Zelanda (40 especies) y el sur de Sudamérica, con 18 especies (Galloway 2002; Galloway 2010). El género se caracteriza por ser talos crustáceos, con cefalodios laminados y apotecios lecanorinos. Aparecen en hábitats oceánicos

temperados y suelen colonizar roca silíceas, zonas costeras, proximidades de ríos, zonas de arena y grava y regiones con actividad glacial y volcánica (Galloway 2007).

P. perrugosa (Nyl.) Nyl., se caracteriza por tener un talo que forma rosetas de nítidas a irregularmente distribuidas formando parches coalescentes, de hasta 30 cm de diámetro; presenta lóbulos marginales discretos, frecuentemente divergentes, planos, con una superficie característica verrucosa-areolada. Superficie superior variable en color, crema, verde-gris, marrón-gris, marrón oscuro. Cefalodios entre 2,5 mm y hasta 5 mm dependiendo de su morfología. Apotecios dispersos, a veces muy abundantes con margen talino prominente. Disco plano, de rosa a marrón oscuro, sin pruina. Epitecio amarillo-marrón, entre 15 y 20 μm de grosor, himenio incoloro entre 100-200 μm alto. Ascósporas uniseriadas en ascos, elipsoidales, entre 15-18 (21,5)x7,9 μm . Picnidios inmersos en verrugas talinas, conidios en forma de hilo, rectos o curvados. Aparece sobre rocas, piedras y cantos rodados, es habitual en los márgenes de los ríos y en morrenas glaciares. La especie está ampliamente distribuida por el hemisferio sur, siendo conocida en el sur de Sudamérica (desde los 37°S a los 55°S), Australia, Papua Nueva Guinea, Nueva Irlanda, Islas Galápagos, Islas Malvinas, Isla Gough, Tristan da Cunha y Nueva Zelanda. (Galloway 2002; 2010).

P. stenophylla (Hue) I.M. Lamb, talo en rosetas, nítidas o coalescentes. Lóbulos en forma de abanico al final entre 1-3 mm de ancho. La superficie superior es pálida olivácea o marrón anaranjada cuando está seco. Pseudocifelas de ampliamente distribuidas a ausentes. Cefalodios claros entre 1 y 5 mm de diámetro. Apotecios variablemente abundantes, centrales o en arcos concéntricos entre centro y margen, entre 0,5 y 2 mm de diámetro. Epitecio pálido amarillo-naranja, 25-30 μm ancho. Himenio sin color entre 120-270 μm alto. Hipotecio opaco pálido, marrón rosáceo. Ascósporas uniseriadas en ascos, sin color, elipsoidales ovaladas, de (-14)16-22(-24)x(7,5-)9-12(-13,5) μm . Picnidios inmersos en verrugas talinas y conidios en forma de hilo, de curvos a rectos. La diferencia fundamental respecto a *P. contortuplicata* reside en la forma de los extremos de los lóbulos, redondeados en esta última y en forma de abanico en *P. stenophylla*. Abundante en los mismos lugares que *P. perrugosa*, común en ambientes glaciares de la Patagonia occidental. Es una especie austral, conocida en Sudamérica a partir de los 40 °S. También presente en la Isla Sur de Nueva Zelanda (Galloway 2002).

P. pycnotheca I.M. Lamb ex V. Räsänen, talos crustáceos entre 2 y 8 cm de diámetro, en ocasiones coalescentes. No presenta hipotalo y en ocasiones aparece unido a pequeños guijarros por rizinas. Superficie superior gris oliva o marronácea. Isidios entre 0,1 y 0,5 mm de diámetro, subglobosos, con forma de dedo. Cefalodios cerebriformes en la superficie e interior del talo. Apotecios distribuidos por toda la superficie, solitarios o agrupados, de redondeados a subirregulares. Disco de plano a subconvexo, oscuro a veces llegando a negro. Epitecio pálido amarillo-marrón, hipotecio incoloro, ascosporas uniseriadas en ascos, elongadas-elipsoidales, de (15-)18-24x(6-)7-9(-10) μm . Picnidios en verrugas y conidios. La diferencia fundamental respecto al similar *P. tuberculifera* consiste en la morfología de los isidios y en la presencia de ácido estítico en *P. pycnotheca*. Además de ácido estítico la especie presenta gyrofórico. *P. pycnotheca* aparece mayormente en zonas arenosas o de cieno de depósitos fluvio-glaciales, en regiones recientemente deglaciadas. Aparece tanto al este como al oeste de la Cordillera de los Andes, desde los 32°S a los 54°S, desde el nivel del mar hasta los 850 m. También ha sido recolectada en suelos glaciales en las Georgias del Sur (Øvstedal y Smith 2001; Galloway 2002).

2.3. REDUCCIÓN DE ACETILENO

Las muestras fueron sacadas del congelador y colocadas en una cámara de crecimiento bajo condiciones estándar de revitalización (ciclos de 12h:12h luz:oscuridad, 12° C de temperatura, y 100 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de radiación). Las muestras permanecieron en estas condiciones durante tres días, siendo hidratadas una vez al día con agua destilada. Posteriormente se procedió a meterlas en una atmósfera saturada de agua durante la noche anterior al experimento para activar el metabolismo de las cianobacterias. Se usaron dos grupos de muestras para medir la fijación de nitrógeno, el set de intercambio gaseoso (n=3) y un set de control (n=4).

Las medidas de reducción de acetileno de las muestras se llevaron a cabo siguiendo el método de Witty (1979) que considera la capacidad de la enzima nitrogenasa de reducir acetileno a etileno es una buena aproximación a la tasa de fijación de nitrógeno atmosférico por parte de las mismas. Los talos epilíticos de *P. perrugosa* y *P. stenophylla*, así como los talos de *P. pycnotheca* fueron incubados en cubetas de 10 o 100 ml (en función del tamaño) con un contenido del 10% de acetileno en el aire. Las

rocas de mayor tamaño fueron cortadas usando una sierra mecánica para que entrasen dentro de las cubetas. El volumen de las cubetas para determinar la cantidad de acetileno a inyectar se calculó por desplazamiento de agua. Las cubetas fueron incubadas bajo condiciones de pretratamiento estándar como las mencionadas al principio durante dos horas. Tras este tiempo, se extrajo una muestra de 0,5 ml de cada una de las cubetas y se inyectó en un cromatógrafo de gases para la determinación de etileno. El cromatógrafo utilizado fue un Pye Unicam PU4500, con Poropak R como separador y un detector de ionización de llama.

2.4. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE N Y P

Antes de llevar a cabo la determinación de la concentración de cada uno de los nutrientes en talo y cefalodio de cada especie se procedió a la digestión química de ambas partes del líquen. Se pesaron 4 mg de cada muestra en una balanza de precisión y se dejaron a 80 °C en el horno durante 24 h para desecarlos completamente. Tras esto se procedió a la digestión química siguiendo el método de Allen (1989), según el cual se añadió a las muestras 0,5 ml de agente digestivo formado por una mezcla 1:1,2 (v/v) de H₂O₂ (100 volúmenes) y H₂SO₄ concentrado con selenio y sulfato de litio y se calentó durante 1 h a 375 °C. Tras enfriarse se diluyó cada muestra hasta los 10 ml usando agua destilada. Paralelamente se llevó a cabo una digestión control carente de muestra.

Para el análisis del fósforo se tomaron 1,2 ml de la solución problema y se añadieron 1,8 ml de la solución control. A la mezcla se le añadieron 0,6 ml del reactivo A de Van Veldhoven y Mannaerts (1987), (1,75 % (p/v) (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O en 4,25 N H₂SO₄) y 0,6 ml del reactivo B (0,035% (p/v) verde de malaquita, 0,35% (p/v) de alcohol polivinílico (PVA) en 1 L de agua destilada) a intervalos de 10 minutos. Tras 30 minutos las muestras fueron analizadas a 610 nm usando un espectrofotómetro visible Pye Unicam SP6-350. El fósforo total fue determinado usando una curva de calibrado con rango de concentración entre 0 y 0,6 µg/ml de fósforo.

Para la determinación del nitrógeno se tomaron 0,15 ml de la muestra digerida y se le añadieron 0,35 ml de la digestión control (0,1ml + 0,4 ml en algunas muestras más concentradas) y se siguió el método descrito por Holmes et al. (1999) para realizar el análisis por fluorimetría. A esta mezcla se le añaden, en un tubo, 10 ml del reactivo de

trabajo (Fl_{WR} , 1 l de búfer borato, 5 ml sulfato sódico 1 Mm, 50 ml de ortoftaldehído, o OPA en etanol) y en otro tubo 10 ml de búfer borato (Fl_{BB} , 40 g tetraborato sódico en 1 L de agua destilada). Ambas mezclas se incubaron en oscuridad durante 2,5 h y se midió la fluorescencia responsable del nitrógeno de la muestra en forma de amonio con un fluorómetro Wallac 1420 Victor², de tal manera que la fluorescencia buscada respondía a la ecuación $Fl_{muestraNH_4} = Fl_{WR} - Fl_{BB}$. Las medidas obtenidas se ajustaron a una curva de calibrado con rango de concentraciones entre 0-4 $\mu\text{g/ml}$ de nitrógeno en forma de amonio.

2.5. INTERCAMBIO GASEOSO

Antes de medir el intercambio gaseoso se revitalizaron las muestras siguiendo el mismo protocolo que se explica en el capítulo I. De la misma manera, los experimentos se llevaron a cabo usando los mismos aparatos y en los mismos rangos de humedad ambiental que se comenta en la sección de material y métodos de dicho capítulo. Se usaron tres réplicas de cada una de las especies para los dos experimentos. En primer lugar se midieron curvas de deshidratación a $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de radiación y $10 \text{ }^\circ\text{C}$ de temperatura. En segundo lugar se midieron curvas de luz para las tres especies a 0, 50, 100, 200, 400, 800 y $1200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y 0, 5, 10, 15, 20 y $25 \text{ }^\circ\text{C}$ de temperatura. Los cálculos de la superficie de los talos y los ajustes de las curvas se hicieron de la misma manera que el capítulo I, ajustándolas a la función de Smith usando el programa sigmaplot 10.0.

2.6. RELACIÓN SUPERFICIE / PESO

Para obtener la relación superficie / peso de las muestras estudiadas se incineraron cuatro réplicas de superficie conocida de cada especie en una mufla a $850 \text{ }^\circ\text{C}$ durante dos horas. La diferencia de peso entre antes y después de la incineración fue asociada a la pérdida de la materia orgánica durante el proceso.

2.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para buscar diferencias estadísticas significativas entre contenidos en nitrógeno y fósforo, así como de los ratios N:P a lo largo del estudio se usó el test de Wilcoxon ($p \leq 0,05$), adecuado para grupos muestrales de pequeño tamaño. Para las regresiones lineales y los ajustes de la curvas se usó el programa sigmaplot 10.0.

3. RESULTADOS

3.1. REDUCCIÓN DE ACETILENO

P. perrugosa fue la especie que mostró menor tasa de reducción de acetileno (análogo a la fijación de nitrógeno) con $0,67 \text{ nmol C}_2\text{H}_2 \text{ cm}^2 \text{ h}^{-1}$. *P. stenophylla* alcanzó más del doble de la tasa anterior con $1,58 \text{ nmol C}_2\text{H}_2 \text{ cm}^2 \text{ h}^{-1}$ y *P. pycnotheca* fue, con diferencia, la especie que más tasa de reducción de acetileno obtuvo con $5,18 \text{ nmol C}_2\text{H}_2 \text{ cm}^2 \text{ h}^{-1}$ (tabla 1).

Los valores medios de reducción de acetileno para el set de control fueron claramente superiores que aquellas obtenidas en las muestras en las que también se midió intercambio gaseoso. En *P. perrugosa* ($n=4$) se obtuvieron $4,08 \text{ nmol C}_2\text{H}_2 \text{ cm}^2 \text{ h}^{-1}$, 6,09 veces más que el set de intercambio gaseoso, *P. stenophylla* ($n=4$) alcanzó $9,03 \text{ nmol C}_2\text{H}_2 \text{ cm}^2 \text{ h}^{-1}$, 5,7 veces más y la única muestra del set control que se pudo medir en *P. pycnotheca* llegó a los $14,55 \text{ nmol C}_2\text{H}_2 \text{ cm}^2 \text{ h}^{-1}$, 8 veces más que el otro set de muestras.

Los resultados parecen mostrar que todo el manejo previo de los talos tuvo un efecto negativo significativo sobre las tasas de reducción de acetileno en las muestras estudiadas

Parámetro	Unidades	<i>P. perrugosa</i>	<i>P. stenophylla</i>	<i>P. pycnotheca</i>
Amax (20°C)	μmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹	1,33±1,10	1,67±1,25	3,94±0,84
RO (20°C)	μmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹	1,44±0,90	2,32±1,26	1,20±0,56
t ₁₀₀	minutos	41,44±10,97	35,66±15,01	295,33±7,23
t _A	minutos	163,00±100,16	130,00±19,29	641,66±103,75
Ganancia C _{desh}	%	6,7	8,7	100
Area específica	cm ² g ⁻¹	123	55	48
P/ A	mg cm ⁻²	8,13±3,32	18,09±4,10	20,78±7,43
RA	nmol C ₂ H ₂ cm ⁻² h ⁻¹	0,67±0,79	1,58±1,30	5,18±3,03
RA (control)	nmol C ₂ H ₂ cm ⁻² h ⁻¹	4,08±2,82	9,03±3,53	14,55
N	mg g ⁻¹			
talo		14,91±1,14	17,26±3,22	25,97±3,16
cefalodio		22,69±3,28	25,48±3,05	27,88±1,73
P	mg g ⁻¹			
talo		1,34±0,47	1,75±0,60	2,99±0,96
cefalodio		2,50±1,02	2,48±0,57	3,72±0,90
N:P	ratio			
talo		11,12	9,86	8,68
cefalodio		9,07	10,27	7,51

Tabla 1 Principales parámetros fisiológicos, morfológicos y contenido en nutrientes para las tres especies de *Placopsis*. Amax representa la máxima tasa fotosintética neta a 20°C, RO es tasa respiración en oscuridad a 20°C, t₁₀₀ es el tiempo necesario para que un talo totalmente hidratado llegue a su óptimo contenido hídrico, t_A es el tiempo para que un talo totalmente hidratado se deshidrate por completo. Ganancia C_{desh} es la ganancia total de C durante la deshidratación en % respecto al valor de *P. pycnotheca*. P/A es el peso por unidad de área. RA es el valor de reducción de acetileno. Los valores medios van seguidos de las desviaciones estandar.

3.2. CONCENTRACIÓN DE N Y P

El análisis estadístico mostró que no había diferencias significativas respecto al contenido en nutrientes en los dos sets de trabajo, por lo que ambos fueron agrupados en uno ($n= 7$). El contenido en nitrógeno del talo de de las tres especies mostró un comportamiento similar al observado para la reducción de acetileno. *P. perrugosa* fue el que menos concentración de nitrógeno mostró ($14,91 \text{ mg g}^{-1}$), *P. stenophylla* mostró un 15% más de tasa ($17,26 \text{ mg g}^{-1}$) y *P. pycnotheca* fue el que más cantidad de nitrógeno presentó con $25,97 \text{ mg g}^{-1}$, un 74% más que *P. perrugosa* (tabla 1). Los cefalodios mostraron en todos los casos tasas superiores que los talos en todas las especies, pero mientras la diferencia entre talo y cefalodio fue aproximadamente del 50% en *P. perrugosa* y *P. stenophylla*, en *P. pycnotheca* fue solo del 7% (ver tabla 1). Un nuevo análisis estadístico (test de Wilcoxon) mostró que, mientras si que había diferencias estadísticas significativas entre talo y cefalodio para *P. perrugosa* y *P. stenophylla* ($p=0,002$), no las hubo en el caso de *P. pycnotheca*.

El contenido de fósforo en los talos mostró una tendencia similar al contenido en nitrógeno y fue más bajo en *P. perrugosa* ($1,34 \text{ mg g}^{-1}$), 30% mayor en *P. stenophylla* ($1,75 \text{ mg g}^{-1}$) y más del doble en *P. pycnotheca* con $2,99 \text{ mg g}^{-1}$ (tabla 1). Los valores en el cefalodio volvieron a ser superiores en las tres especies, con tasas muy similares entre sí para *P. perrugosa* y *P. stenophylla* ($2,50$ y $2,48 \text{ mg g}^{-1}$) y mucho mayores, de nuevo, en *P. pycnotheca* ($3,72 \text{ mg g}^{-1}$). Los ratios N:P fueron, para talo y cefalodio en *P. perrugosa* y *P. stenophylla* ,11,12 y 9,07 respectivamente para el primero y 9,86 y 10,27 para el segundo. En el caso de *P. pycnotheca*, se obtuvo un ratio de 8,68 para el talo y 7,51 para el cefalodio. Un análisis siguiendo el test de Wilcoxon mostró ausencia de diferencias estadísticas significativas en los ratios N:P entre talo y cefalodio en las tres especies. Entre especies sólo aparecieron diferencias estadísticas significativas para los cefalodios entre *P. pycnotheca* y *P. stenophylla*. No se encontró ningún tipo de correlación entre los valores del ratio N:P y los valores de reducción de acetileno al representar las tres especies de las muestras control.

La figura 4 muestra las relaciones entre las tasas de reducción de acetileno y la concentración de nitrógeno en las tres especies del grupo de muestras control, tanto en el talo como en el cefalodio. La correlación fue estadísticamente significativa en el caso del talo, pero no en el cefalodio.

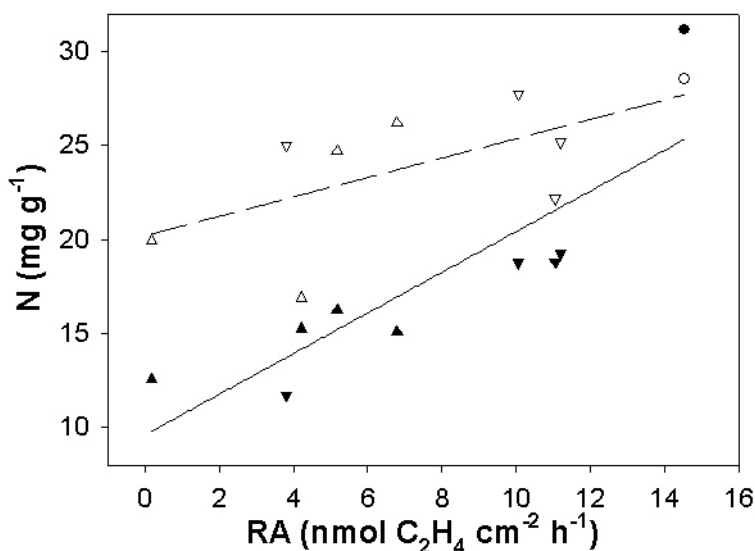


Figura 4. Relación entre reducción de acetileno (RA) y concentración de nitrógeno para las tres especies de *Placopsis* en el set control (*P. perrugosa* triángulo hacia arriba; *P. stenophylla* triángulo invertido; *P. pycnotheca* círculo). La representación incluye talo (símbolos oscuros y línea continua, $r^2= 0,75$ $p= 0,0029$) y cefalodio (símbolos abiertos, línea discontinua, $r^2= 0,48$ $p= 0,058$)

La figura 5 muestra las relaciones entre los valores de reducción de acetileno y las concentraciones de fósforo de las muestras control, de nuevo considerando el talo y el cefalodio en las tres especies. Se puede apreciar en la gráfica que, de nuevo, la relación es positiva y significativa únicamente en el caso del talo.

Las concentraciones de nitrógeno y fósforo mostraron una relación positiva y claramente significativa entre ellas al analizar los contenidos del talo, mientras que en el caso del cefalodio no se vio ninguna tendencia definida (Figura 6).

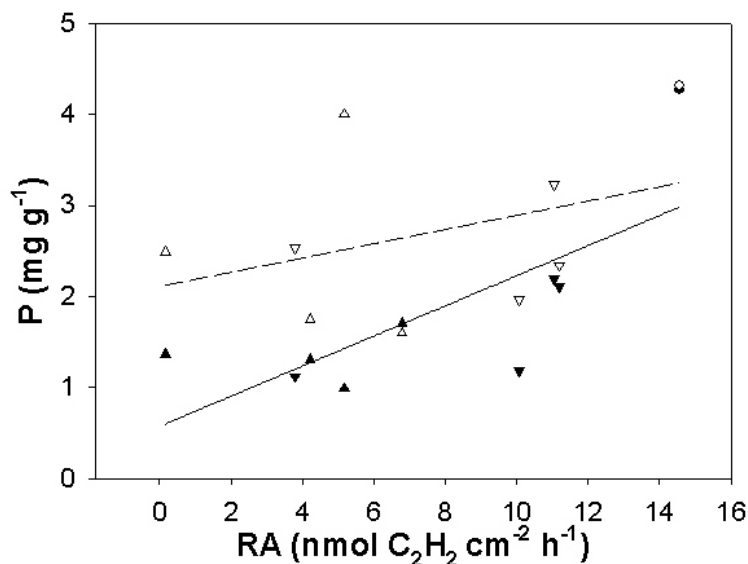


Figura 5. Relación entre reducción de acetileno (RA) y concentración de fósforo para las tres especies de *Placopsis* en el set control (*P. perrugosa* triángulo hacia arriba; *P. stenophylla* triángulo invertido; *P. pycnotheca* círculo). La representación incluye talo (símbolos oscuros y línea continua, $r^2= 0,55$ $p= 0,02$) y cefalodio (símbolos abiertos, línea discontinua, $r^2= 0,14$ $p= 0,32$)

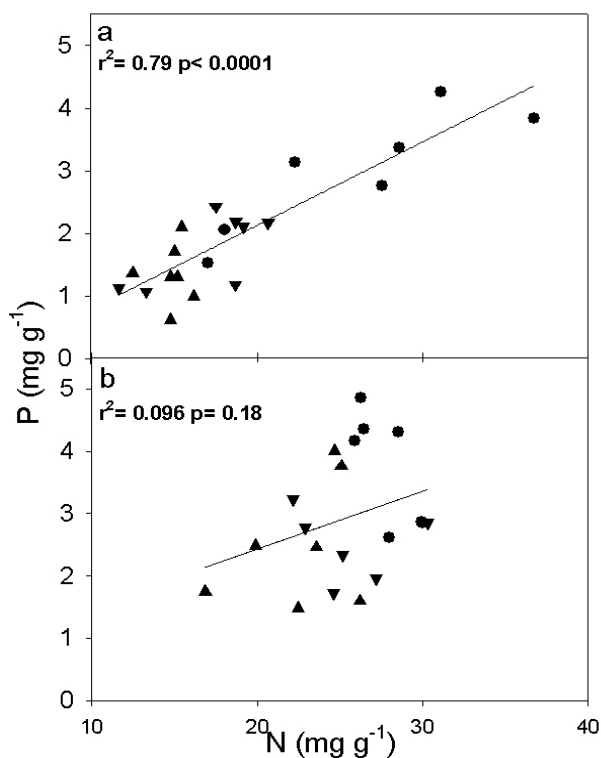


Figura 6. Relación entre el contenido en N y P en las tres especies de *Placopsis* (*P. perrugosa* triángulo hacia arriba; *P. stenophylla* triángulo invertido; *P. pycnotheca* círculo) en ambos sets en (a) talo ($n= 7$) y (b) cefalodio ($n= 7$)

3.3. INTERCAMBIO GASEOSO

La figura 7 muestra las curvas de deshidratación de las tres especies. A elevados contenidos hídricos la fotosíntesis neta mostró una clara depresión variable en función de cada especie, probablemente debida a las resistencias a la difusión de CO₂. Según los talos fueron perdiendo agua la fotosíntesis neta aumentó hasta un máximo para posteriormente disminuir según el aparato fotosintético se fue desactivando por deshidratación. Observamos diferencias claras en el tiempo de deshidratación entre las especies. *P. perrugosa* y *P. stenophylla* se comportaron de una manera similar, ya que tardaron en desecarse completamente 163 y 143 minutos respectivamente y obtuvieron su máxima tasa de fotosíntesis neta a los 41 y 36 minutos (Figura 7A y B, Tabla 1). Por otro lado, *P. pycnotheca* tardó alrededor de 640 minutos en desecarse por completo, en torno a cuatro veces más que las otras dos especies, y no alcanzó su máxima tasa de fotosíntesis neta hasta los 295 minutos, unas siete veces más (Figura 7C, Tabla 1). En el campo, esta especie probablemente tardaría más aún en deshidratarse por el hecho de estar unida al sustrato arenoso y su reserva de agua. Aunque la fotosíntesis neta aparece deprimida a altos contenidos hídricos nunca llega a ser cero, por lo que las tres especies ganarían carbono durante todo el proceso de deshidratación.

La tasa máxima de fotosíntesis neta varió entre las especies, siendo 1,33 μmol CO₂ m⁻² s⁻¹ para *P. perrugosa*, 1,67 μmol CO₂ m⁻² s⁻¹ para *P. stenophylla* y 3,94 μmol CO₂ m⁻² s⁻¹ para *P. pycnotheca*. Los valores de *P. stenophylla* coinciden muy bien con los obtenidos para *P. contortuplicata* en Isla Livingston, Antártida marítima, a 5 °C y 200 μmol m⁻² s⁻¹ de luz (Schroeter 1994). Si consideramos tasas de otros líquenes crustáceos sin cefalodio adaptados a regiones frías, Lange y Kappen (1972) y Kappen et al. (1990) obtuvieron valores que oscilaron entre 0,4 y 1,3 μmol CO₂ m⁻² s⁻¹ para distintas especies de líquenes en la Antártida continental y en la Antártida marítima.

En términos de ganancia de carbono, *P. pycnotheca* parece ser claramente superior a las otras dos especies. Aparte de tener una fotosíntesis neta entre dos y tres veces mayor que las otras especies en términos absolutos, la tasa de dicha fotosíntesis neta fue claramente superior a la tasa de respiración en oscuridad (tres veces mayor). Si tenemos en cuenta la duración del periodo de actividad, *P. perrugosa* y *P. stenophylla* presentaron ganancias de carbono inferiores al 9% respecto a *P. pycnotheca*. La

diferencia sustancial en la duración del periodo de actividad implica que, con toda probabilidad, *P. pycnotheca* está más expuesto a radiaciones altas que las otras dos especies mientras está activo. La respuesta de la fotosíntesis frente a la luz mostró que esta especie tolera mejor las radiaciones altas (Figura 8C). Se puede observar que las especies con mayor tasa de fotosíntesis neta fueron aquellas con mayores tasas de fijación de nitrógeno y mayores contenidos en nitrógeno y fósforo tanto en talo como en cefalodio.

La figura 8 muestra las respuestas a la luz a distintas temperaturas en las tres especies. A bajas temperaturas (especialmente 0 °C) la saturación de las curvas ocurrió a radiaciones bajas, en torno 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A mayores temperaturas se observó una tendencia según la cual aumentó la fotosíntesis neta con la radiación entre 200 y 1200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, especialmente claro en el caso de *P. pycnotheca* (Figura 8C). La respiración en oscuridad (20 °C) fue mayor para *P. stenophylla* con 2,32 $\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, siendo menor para *P. perrugosa* y *P. pycnotheca* con 1,44 y 1,20 $\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ respectivamente (Tabla 1). La máxima tasa de fotosíntesis neta para todas las especies fue a 1200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a 20 °C, que fueron los niveles más altos de temperatura y luz que se utilizaron durante el estudio.

También se han estudiado las relaciones entre fotosíntesis, reducción de acetileno y concentraciones de nitrógeno y fósforo. Se encontró una relación positiva entre los valores medios de máxima fotosíntesis neta y en los de reducción de acetileno considerando las tres especies (Figura 9). La figura 10 muestra las relaciones positivas y significativas encontradas entre máxima fotosíntesis neta y concentración de fósforo, tanto en el caso del talo como en el cefalodio. No se obtuvo el mismo resultado al relacionar nitrógeno y fotosíntesis, donde sólo se obtuvo una correlación leve en el caso del talo al límite de la significancia ($r^2 = 0,44$, $p = 0,05$).

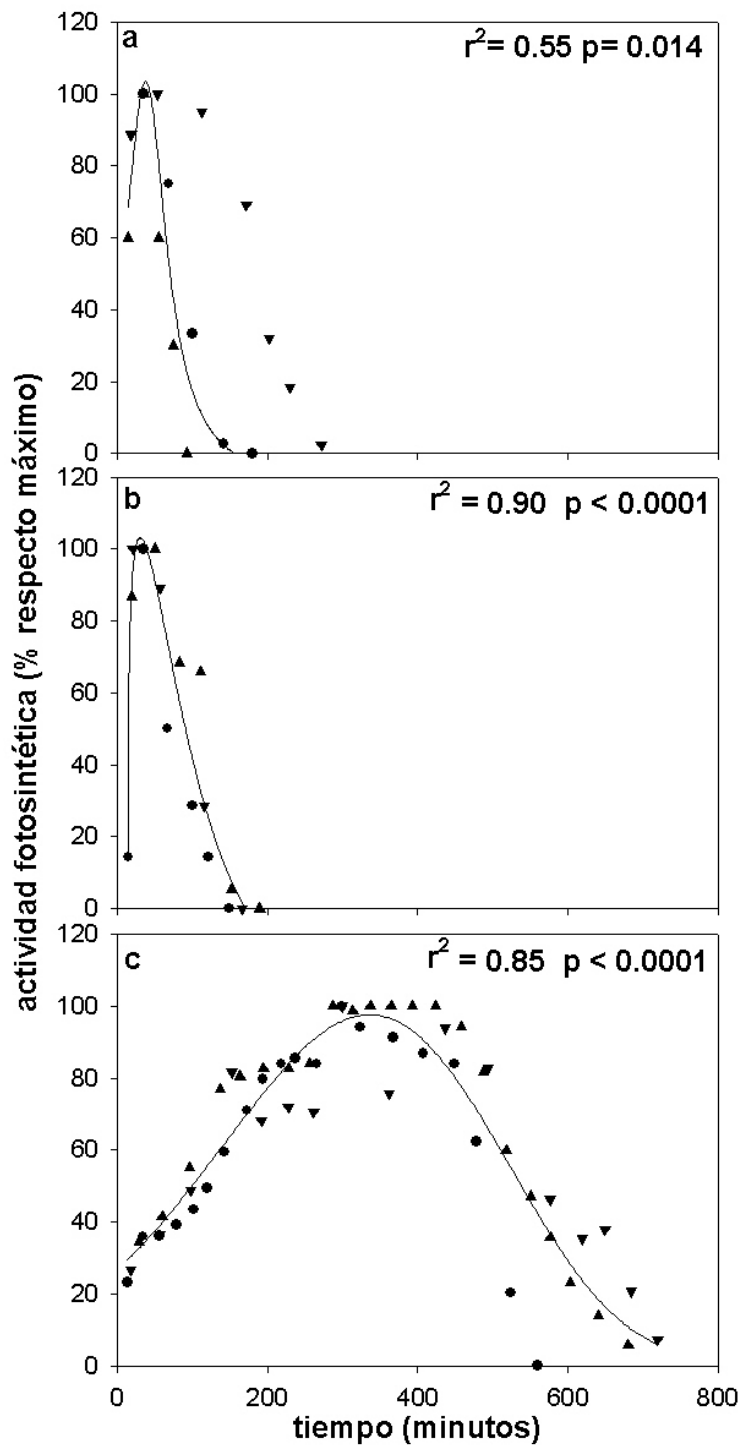


Figura 7. Relación entre tiempo y % de actividad fotosintética respecto al máximo a $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y tras hidratación completa en (a) *P. perrugosa* (b) *P. stenophylla* y (c) *P. pycnotheca*. Cada símbolo representa cada una de las tres réplicas en cada especie.

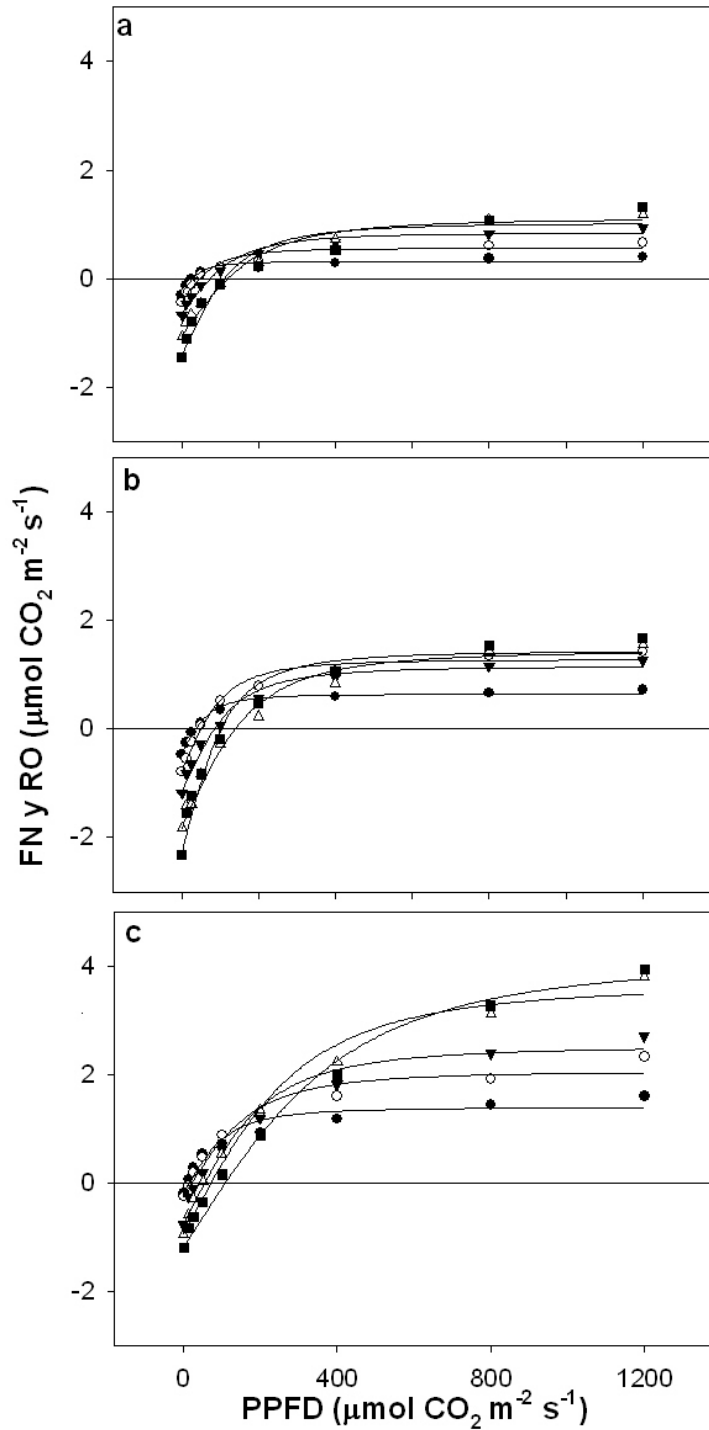


Figura 8. Relación entre radiación fotosintéticamente activa (PPFD) y fotosíntesis neta (valores positivos) y respiración en oscuridad (valores negativos) a distintas temperaturas (0 °C círculo relleno; 5 °C círculo abierto, 10 °C triángulo invertido relleno, 15 °C triángulo recto abierto, 20 °C cuadrado relleno) en (a) *P. perrugosa* (b) *P. stenophylla* y (c) *P. pycnotheca*. Todos los valores de r^2 oscilaron entre 0,94 y 0,98 y todos los valores de $p < 0,0001$. Medidas realizadas a óptimo contenido hídrico, $n = 3$ por especie y temperatura.

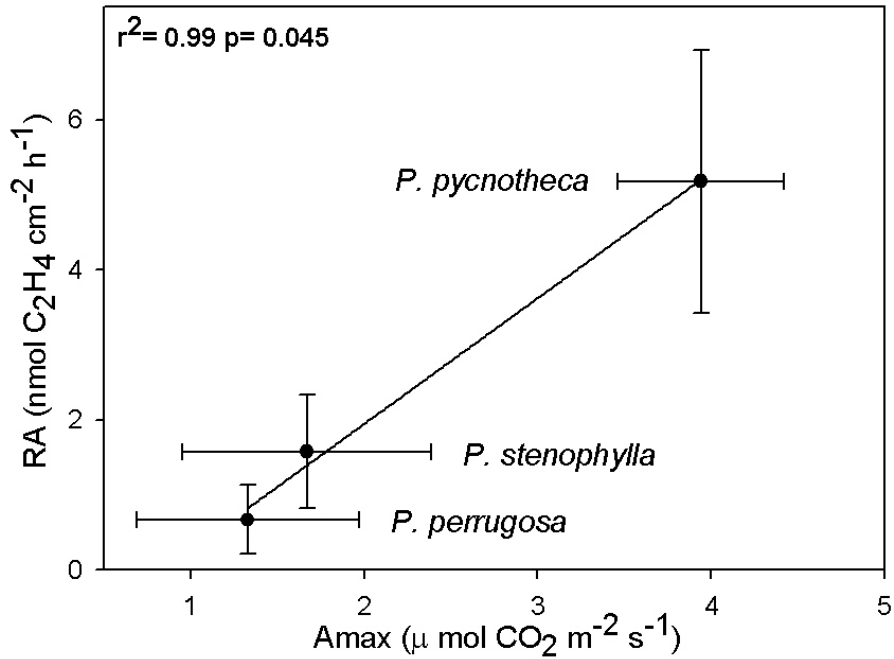


Figura 9. Relación entre máxima tasa de fotosíntesis neta (A_{max}) y reducción de acetileno en las tres especies de *Placopsis*. Los puntos representados son medias de tres medidas con el valor del error estándar.

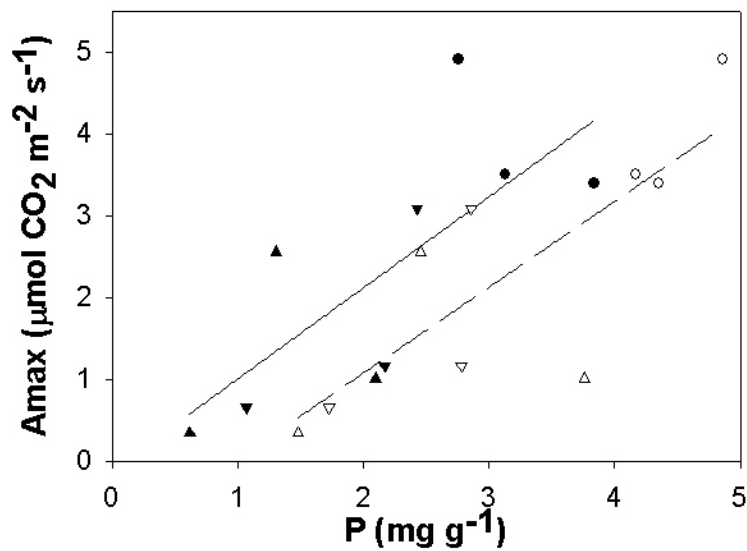


Figura 10. Relación entre contenido en P y máxima tasa de fotosíntesis neta para las tres especies de *Placopsis* (*P. perrugosa* triángulo recto, *P. stenophylla* triángulo invertido y *P. pycnotheca* círculo). Aparecen representados el talo (símbolos rellenos y línea continua, $r^2 = 0,53$ $p = 0,02$) y el cefalodio (símbolos abiertos y línea discontinua, $r^2 = 0,63$ y $p = 0,01$)

3.4. RELACIÓN SUPERFICIE / PESO

P. perrugosa mostró un área específica de $123 \text{ cm}^2 \text{ g}^{-1}$ que fue significativamente mayor que las mostradas por las otras dos especies, con 55 y $48 \text{ cm}^2 \text{ g}^{-1}$ para *P. stenophylla* y *P. pycnotheca* respectivamente, que mostraron valores similares entre si (Tabla 1). El tener el dato del área específica nos permitió calcular fotosíntesis neta, fotosíntesis bruta y respiración de las tres especies por unidad de peso seco (Tabla 2). Como se puede observar, *P. perrugosa* tuvo valores de fotosíntesis neta por unidad de peso seco similares a los de *P. pycnotheca*, así como los valores más altos entre los tres de fotosíntesis bruta y de respiración. Por último, la tabla 2 representa también los ratios entre respiración en oscuridad y fotosíntesis neta y el porcentaje de respiración en oscuridad respecto a la fotosíntesis bruta para las tres especies. *P. pycnotheca* presentó los valores más bajos para ambos parámetros, ya que la baja tasa de respiración se combinó con la mayor tasa de fotosíntesis neta por unidad de peso seco.

	<i>P. perrugosa</i>	<i>P. stenophylla</i>	<i>P. pycnotheca</i>
FN ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	163,6	91,9	189,1
RO ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	177,1	127,6	57,6
FB ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	340,7	219,5	246,7
RO/FN (ratio)	1,08	1,39	0,30
RO/FB (%)	52	58	23

Tabla 2. Comparación de las relaciones entre RO (respiración en oscuridad) FN (fotosíntesis neta) y FB (fotosíntesis bruta) en base a peso seco para las tres especies de *Placopsis* en el óptimo de temperatura.

4. DISCUSIÓN

Los hallazgos más significativos de este capítulo se pueden resumir en dos. En primer lugar, las fuertes correlaciones positivas encontradas entre fotosíntesis neta y reducción de acetileno, entre contenido en nitrógeno en el talo y reducción de acetileno y entre los contenidos en nitrógeno y fósforo. También se obtuvieron relaciones positivas significativas no tan fuertes entre la reducción de acetileno y el fósforo en el talo y entre la máxima tasa fotosintética y fósforo en talo y cefalodio. Estas correlaciones sugieren un vínculo fisiológico entre los componentes de la simbiosis tripartita. En segundo lugar, los datos de intercambio gaseoso medidos sugieren una correlación adecuada entre los datos de fotosíntesis y respiración obtenidos en el laboratorio y la ecología (roca para *P. perrugosa* y *P. stenophylla* y arena para *P. pycnotheca*) de las especies en el campo.

Las tres especies estudiadas parecen tener tasas de crecimiento relativamente rápidas si las comparamos con la mayoría de líquenes crustáceos conocidos. Más concretamente, la tasa de crecimiento de *P. perrugosa* ha sido medida recientemente como una de las más altas conocidas, con hasta 20mm de crecimiento radial anual en la misma localidad que en la que se ha llevado a cabo este estudio (Sancho et al. 2011). Aunque no tenemos las tasas de crecimiento de las otras dos especies del estudio, las características del ambiente donde viven, la alta actividad fisiológica mostrada en este trabajo y observaciones llevadas a cabo durante el trabajo de campo, nos sugieren que las tasas de crecimiento deben ser mayores que las de otros líquenes primocolonizadores de estas morrenas, como puede ser *Rhizocarpon geographicum*. Tasas de crecimiento altas parecen ser convenientes (aunque no imprescindibles) para que las especies primocolonizadoras realicen su trabajo con eficacia. Para estos niveles de crecimiento, las especies implicadas deben mostrar una productividad fotosintética adecuada y un uso eficaz de los nutrientes disponibles. La clave para el éxito de estos líquenes en un ambiente que es muy pobre en disponibilidad de nitrógeno es, con toda seguridad, su capacidad de fijar nitrógeno a través de las cianobacterias agrupadas en los cefalodios. Las tasas de reducción de acetileno de las tres especies están fuertemente relacionadas con las tasas de fotosíntesis neta. Este hecho no debería ser sorprendente si se tiene en cuenta que las cianobacterias fijadoras de nitrógeno dependen en buena manera de las algas verdes para su balance de carbono, lo cual se puede deducir del aumento

significativo del porcentaje de heterocistes presente en líquenes con cefalodios (Rai 2000). La dependencia de la energía procedente de la fotosíntesis de las algas verdes para que las cianobacterias en los cefalodios cumplan sus requisitos energéticos es especialmente pronunciada en líquenes con cefalodios internos o bajo una primera capa superficial no expuestos a la luz (Rai 2000), como es el caso concreto de *P. pycnotheca* (De los Ríos et al. 2011). El comportamiento fisiológico de esta especie destaca especialmente, ya que presenta valores máximos de fotosíntesis por unidad de superficie entre 2,5 y 3 veces superior a las otras dos especies y tasas de fijación de nitrógeno hasta casi 8 veces superiores.

Los análisis de las concentraciones de nitrógeno y fósforo en las tres especies sugieren que la correlación observada en fotosíntesis y fijación de nitrógeno puede extenderse a las concentraciones de estos dos nutrientes. *P. pycnotheca* mostró las mayores concentraciones para ambos, tanto en el talo como en el cefalodio, seguido de *P. stenophylla* y por último *P. perrugosa*. Las últimas dos especies mostraron niveles de nitrógeno significativamente superiores en el cefalodio que en los talos, mientras que *P. pycnotheca* no mostró diferencias estadísticas significativas en el nitrógeno entre ambas localizaciones. Una posible explicación a esta diferencia es la presencia de abundantes cefalodios en el interior del talo en el caso de *P. pycnotheca* (De los Ríos et al. 2011). Parte de estos cefalodios internos podían haber sido considerados como parte del talo, solapando así los contenidos en nitrógeno entre ambos. Otra posibilidad es que la abundancia de cefalodios en esta especie implique una mayor tasa de fijación de nitrógeno, lo que conduciría a un mayor transporte de este nutriente desde los cefalodios al talo, equiparándose así los niveles. Contenidos más altos de nitrógeno en líquenes con cianobacteria (tanto como fotobionte primario o agrupadas en cefalodios) comparados con aquellos con sólo alga verde como fotobionte son bien conocidos en la literatura (Hitch y Stewart 1973; Green et al. 1980; Greenfield 1992; Palmqvist et al. 2002) y nuestros resultados refuerzan esta relación, ya que se ha confirmado que las especies con mayores tasas de reducción de acetileno presentan mayor cantidad de nitrógeno en el talo. Algunos autores han propuesto vínculos entre el nitrógeno y cantidad de clorofila en líquenes con cefalodio (Green et al. 1997; Sundberg et al. 2001) lo que sugiere una posible relación positiva entre este nutriente y la capacidad fotosintética del talo en líquenes tripartitos. Nuestros resultados han mostrado una relación positiva débil entre el nitrógeno de los talos de las tres especies y su máxima capacidad fotosintética.

Algunos autores han propuesto que las concentraciones adecuadas de fósforo son fundamentales para organismos fijadores de nitrógeno (Crittenden et al. 1994; Matzek y Vitousek 2003) y también han sido consideradas importantes para mantener altas tasas de crecimiento (McCune y Caldwell 2009). Los contenidos en fósforo para los tres líquenes se correlacionan positivamente con las tasas de fotosíntesis neta y de reducción de acetileno. Las interacciones entre nitrógeno y fósforo pueden ser complejas. Altas concentraciones de fósforo podrían estimular la fotosíntesis y, a su vez, a la fijación de nitrógeno. Los resultados encontrados en la relación concentración de fósforo y las máximas tasas de fotosíntesis muestran mejores correlaciones que en el caso del nitrógeno. A pesar de no ser muy altas, muestran significancia estadística tanto en el talo como en el cefalodio, por lo que los datos sugieren un mayor impacto del fósforo que del nitrógeno sobre la fotosíntesis. Houlton et al. (2008) propusieron que la disponibilidad de fósforo podía estar condicionada por la fijación de nitrógeno, ya que esta estimula la actividad de las enzimas fosfatasa dependientes de nitrógeno. La relación entre la concentración de fósforo en el talo y la reducción de acetileno fue algo menor que la obtenida con el nitrógeno, pero aún así se mantuvo positiva y estadísticamente significativa, sugiriendo un posible vínculo entre ambos que refuerza los trabajos mencionados y otros recientemente publicados (Benner et al. 2007; Benner y Vitousek 2007). La figura 6 muestra una correlación positiva entre las concentraciones de nitrógeno y fósforo en los talos de las tres especies estudiadas, y esta buena correlación entre ambos se puede encontrar también en la literatura (Crittenden et al. 1994; Hyvarinen y Crittenden 1998). La correlación mencionada en el talo no se repitió en el cefalodio (Figura 6). Sin embargo, la proximidad en los valores de los ratios N:P en los tres líquenes (no hubo diferencias estadísticas significativas entre ellos, test de wilcoxon, excepto en el cefalodio entre *P. pycnotheca* y *P. stenophylla*) sugiere una fuerte regulación en las tres especies estudiadas. Dicha constancia sugiere un control de procesos metabólicos por parte del fósforo (McCune y Caldwell 2009) lo cual se explica a partir del menor ratio N:P obtenido en *P. pycnotheca*, así como por las mejores correlaciones obtenidas entre la concentración de fósforo y las tasas de fotosíntesis neta máxima. Esta especie, a parte de tener la mayor tasa de fijación de nitrógeno de las tres, puede presentar también el mejor suministro de fósforo a través del deshielo glacial que vierte sobre la zona arenosa donde crece. Los N:P ratios obtenidos en las especies estudiadas (entre 7,51 y 11,12 considerando talo y cefalodio) caen dentro del amplio rango entre 4 y 20 que muestra la literatura para distintos tipos

de líquenes en condiciones naturales (Prussia y Killingbeck 1991; Hyvärinen y Crittenden 1998; Makkonen et al. 2007; Hogan et al. 2010). Los valores mencionados de ratio N:P no difieren mucho de los ratios medios para plantas vasculares en su hábitat natural, propuesto entre 12-13 por distintos autores (Güsewell 2004).

Los estudios de intercambio gaseoso llevados a cabo nos han proporcionado información que contribuye a entender mejor la ecología de las tres especies en el campo. Las especies que viven sobre roca, *P. perrugosa* y *P. stenophylla*, se comportan como líquenes típicos. La figura 7 muestra como los líquenes se secan con rapidez, evitando de esta manera problemas derivados de la exposición en estado activo a altas cantidades de luz. Esto encaja bien con la estrategia común de los organismos poiquilohidros para evitar estrés por alta exposición a luz (y las consecuentes altas temperaturas derivadas de esto) a través de la desecación (Kappen y Valladares 2007), la cual inactiva su metabolismo. Un resultado de esta estrategia es que los líquenes operan principalmente a niveles subóptimos de luz y de temperatura (Schroeter et al. 2010). Las dos especies se diferencian en la distinta alocaación del carbono procedente de la fotosíntesis. *P. perrugosa* crece muy rápido, y tiene un área específica mucho mayor que *P. stenophylla* (es decir, cada unidad de superficie pesa mucho menos en la primera), una menor respiración en oscuridad por unidad de superficie, y una mayor tasa de respiración en oscuridad por peso seco, todo consistente con un elevado porcentaje de tejido fúngico metabólicamente activo en el talo. *P. perrugosa* es un liquen de crecimiento rápido, lo que facilita su función como pionero en ambientes pobres en nutrientes, y presenta un talo de poco peso comparado con *P. stenophylla*, que probablemente presenta mayor cantidad de tejido fúngico inactivo debido a una menor respiración en función del peso seco y también una menor área específica. Todo lo mencionado apunta a un tiempo de vida más corto en *P. perrugosa* que en *P. stenophylla*. Esta presunción se puede corroborar con observaciones realizadas en el campo durante la recolección, en las cuales se constató en múltiples ocasiones como talos grandes de *P. perrugosa* descompuestos por la parte central compartían rocas con talos de *P. stenophylla* más pequeños y enteros.

P. pycnotheca parece desarrollar una estrategia completamente distinta, principalmente debido a su hábitat, que es arena húmeda o lodo expuesto a la corriente del deshielo glaciar, con inundaciones frecuentes y alta disponibilidad de agua. La especie presenta

varias adaptaciones para ser capaz de crecer y colonizar exitosamente dicho hábitat. Por un lado presenta la mayor cantidad de fotosíntesis neta tanto por unidad de superficie como por unidad de peso seco. También parece que actúa como un activo consolidador del suelo usando su red de hifas y polisacáridos que actúan como aglutinadores (De los Ríos et al. 2011). Esto, aparte de estabilizar al líquen y proporcionarle resistencia a las inundaciones, le confiere una alta capacidad de retención de agua, lo que le permite mantener los prolongados periodos de actividad presentados en la figura 7C. El bajo valor de respiración en oscuridad obtenido por unidad de área (la mitad aproximadamente del de *P. stenophylla*) supone también una mejora en su ganancia total de carbono, especialmente si se tiene en cuenta que *P. pycnotheca* debe pasar muchas horas activo en oscuridad. Esta baja tasa respiratoria respecto a las otras dos especies minimiza las pérdidas de carbono en ausencia de luz. La baja tasa de respiración en oscuridad en función del peso seco del talo apoya la idea de altas cantidades de tejido no activo en el talo. La combinación de altas tasas de fotosíntesis neta y bajas tasas de respiración en oscuridad parece ser una estrategia óptima para ahorrar carbono, proporcionando la oportunidad de un crecimiento rápido en un sustrato claramente inestable. Por último, la figura 8C muestra una elevada tolerancia a las altas radiaciones, lo que se manifiesta en el claro aumento en las tasas de fotosíntesis neta al trabajar con las radiaciones más altas. Este comportamiento indica que debe haber mecanismos implicados encargados de proteger a los fotosistemas de dicha radiación, utilizando así una estrategia poco común en líquenes de zonas templadas pero habitual en otra regiones como la Antártida Continental (Green et al. 2007).

Los resultados obtenidos sugieren vínculos entre morfología y fisiología, y muestran un papel fundamental del cefalodio para garantizar una colonización rápida y eficaz en hábitats deficitarios en nutrientes en estas zonas de alta latitud recientemente deglaciadas. Esta colonización podría ser importante para enriquecer el ecosistema de nutrientes y favorecer de esta manera la sucesión vegetal. La correlación obtenida entre fotosíntesis, fijación de nitrógeno y contenido en fósforo y nitrógeno sugiere relaciones metabólicas entre todos los componentes del talo con el fin de conseguir un desarrollo fisiológico global óptimo. Las especies estudiadas han demostrado una óptima adaptación al hábitat con claras diferencias entre las distintas ecologías de cada una de ellas. Las masas de hielo patagónicas, y más concretamente las pertenecientes a la Cordillera Darwin situada al sur de Tierra de Fuego, tienen una historia bien

documentada de acusada fluctuación glaciaria durante el Cuaternario (Holmud y Fuenzalida 1995; Strelin e Iturraspe 2007). Las adaptaciones mostradas por las tres especies podrían estar relacionadas con las características inestables de un ambiente expuesto a transformaciones periódicas a lo largo del tiempo.

**CAPITULO IV. ESTUDIO COMPARATIVO A LARGO PLAZO DE
LA ACTIVIDAD METABÓLICA Y EL MICROCLIMA DE
LÍQUENES DE LA ANTÁRTIDA MARÍTIMA Y LA ANTÁRTIDA
CONTINENTAL**

1. INTRODUCCIÓN

1.1. GENERALIDADES DE LA ZONA DE ESTUDIO

A pesar de la creciente actividad humana en la Antártida de las últimas décadas, con bases de investigación científica temporales y permanentes en diversas partes de su geografía, el continente blanco mantiene el bien conseguido honor de ser el menos conocido por el hombre, con algunas zonas aún por explorar. La historia del ser humano en esta región del mundo se remonta a poco más de doscientos años, con las primeras aproximaciones llevadas a cabo por la segunda expedición del Capitán James Cook entre 1772 y 1775 (Rosove 2000). La presencia humana en el continente comienza a finales del siglo XIX y principios del XX, a mediados del cual se comenzaron a instaurar bases científicas debido al impulso investigador generado por el Año Geofísico Internacional en 1957, que sentó las bases del Tratado Antártico. La Antártida queda definida geopolíticamente por las propuestas de dicho Tratado como todo el océano, islas, continente y barreras de hielo adyacentes al sur de los 60° de latitud sur (Heap 1994). Según el mismo Tratado esta inmensa región no pertenece a ningún país, estando suspendidas en estos momentos todas las reclamaciones territoriales sobre el mismo. La extensión territorial del continente antártico es de 14.000.000 de km², de los cuales solamente el 0,3% está libre de hielo en verano (Fox y Cooper 1994). Las masas de hielo antárticas se pueden dividir en las que yacen encima del mar (barreras) y en las continentales que cubren la Tierra propiamente dicha, que en algunas zonas del plató polar pueden superar los 4 km de grosor (Longton 1988).

Una característica importante de la Antártida que marca diferencias significativas respecto al Ártico, es su aislamiento geográfico (Longton 1988). Dicho aislamiento viene definido por su distancia al continente más próximo (aproximadamente 900 km al sur de Sudamérica) y por el hecho de ser una masa de tierra rodeada de océanos, mientras que el Ártico es una masa de mar helado rodeado de tierra. Este aislamiento es importante a la hora de entender los ecosistemas terrestres antárticos.

Respecto al clima, la Antártida es el continente más frío, más seco, más ventoso y con mayor altitud media de la Tierra (Green et al. 2007). Los veranos son mucho más fríos

que en el Ártico, con temperaturas medias que sólo en la parte más septentrional de la Península Antártica superan, aunque levemente, el punto de congelación. Las temperaturas medias anuales varían mucho en función de la región, pudiendo ser entre -3 y -4 °C en las islas al oeste de la Península Antártica y entre -35 y -50 °C en algunas regiones al sur de las Montañas Transantárticas (Øvstedal y Smith 2001). El régimen lumínico presenta las peculiaridades de las regiones polares, con la desaparición total del sol en invierno a partir de los 66°33' S y la ausencia de noche en verano, con duración variable de cada periodo en función de la latitud (Longton 1988). Respecto a la altitud, las Montañas Transantárticas vertebran el continente, surgiendo a partir de ellas el plató polar, que llega al polo sur y confiere una altitud media al continente de hasta 2500 m. La precipitación va disminuyendo según nos desplazamos hacia el sur, con un gradiente significativo dentro de la Península de 400-500 mm al norte hasta los 50-100 mm al sur de la misma y en muchas zonas costeras continentales, cada vez más en forma de nieve (Øvstedal y Smith 2001).

Los mismos autores destacan dos provincias geológicas dentro del continente, la antigua cubierta continental de la Gran Antártida o región este y la Antártida Menor o región oeste. La primera región es más antigua y de composición más sencilla, principalmente rocas basales cristalinas mezcladas con rocas ígneas de la edad precámbrica. Las Montañas Transantárticas contienen un espectro variado de rocas sedimentarias de la época cámbrica a la triásica, y en zonas costeras de la Tierra Victoria aparecen rocas volcánicas basálticas procedentes de los volcanes de la región. La segunda provincia geológica es más joven y más compleja, con similitudes respecto al sur de Sudamérica y Nueva Zelanda. La provincia se divide en cinco regiones con la Península Antártica como zona fundamental. Las rocas metamórficas (esquisto, gneiss) son comunes a las cinco regiones mencionadas.

Desde el punto de vista biogeográfico, Peat et al. (2007) definieron con precisión dos regiones fundamentales: En primer lugar la Antártida marítima, que se divide a su vez en una zona de clima más benigno (región norte) y otra más fría (región sur). La primera comprende el oeste de la Península Antártica al norte de los 68° S (incluyendo islas) y el este de la misma al norte de los 65° S. La segunda es el resto de la Península hacia el sur hasta los 72° de latitud. En segundo lugar encontramos la Antártida continental, que abarca el resto del continente antártico. Los autores aportan

información sobre tipos de grupos funcionales de vegetación y número de especies en cada una de las zonas. El norte de la Antártida marítima presenta unas 350 especies de líquenes, entre 100-115 de musgos, 27 hepáticas y 2 fanerógamas. El sur de esta región presenta a su vez alrededor de 120 especies de líquenes, 40-50 de musgos, 2 hepáticas y 2 fanerógamas. Por último, la Antártida continental tiene unas 90 especies de líquenes, 20-30 de musgos y una hepática. Como se puede observar existe un claro gradiente de disminución de biodiversidad vegetal según se avanza hacia el sur en la Península y hasta llegar a la región continental, pero dicho gradiente no se cumple en el interior del continente (Peat et al. 2007). La biodiversidad en zonas tan importantes de la región continental como la Tierra de Victoria o las Montañas Transantárticas depende más de la existencia de nichos ecológicos adecuados para la vida vegetal que de la latitud (Green et al. 2011a). Estos autores definen una zona donde la biodiversidad viene marcada por factores macroambientales al norte de los 72 °S y otra dependiente de condiciones microambientales al sur de dicha latitud. Green et al. (2011b) y Sancho et al. (2012) reportan un número excepcionalmente alto de especies de líquenes encontrados en sucesivas expediciones a las proximidades del Glaciar Beardmore, Montañas Transantárticas, a 84 °S. Las alrededor de 40 especies citadas para la zona suponen mayor diversidad que en muchas regiones más al norte, lo que confirma la ausencia de gradiente latitudinal de biodiversidad dentro del continente.

Como se puede deducir del trabajo de Peat et al. (2007), la flora de la Antártida está totalmente dominada por criptógamas, con solo dos especies de plantas vasculares presentes en la Península. Este hecho le confiere una característica diferencial entre todas las regiones de la Tierra. Dentro de las criptógamas, el número de especies de líquenes para cada una de las regiones biogeográficas les coloca como el grupo más representativo dentro de los ecosistemas terrestres antárticos (Øvstedal y Smith 2001). Tras las generalidades relacionadas con los ecosistemas vegetales de todo el continente conviene hacer una aproximación a las dos regiones en las que se encuentran las dos localidades que han permitido realizar este estudio.

En primer lugar, la Isla Livingston se encuentra situada en el archipiélago de las Shetland del Sur, al noroeste de la Península Antártica. entre los 61° y 63° de latitud sur. El archipiélago está formado por varias islas, destacando entre ellas por tamaño y presencia de bases científicas la isla Rey Jorge, isla Livingston e isla Decepción. Todo

el conjunto de islas aparece al norte de los 66° 33' de latitud sur, que marca el círculo polar antártico, por lo que a pesar de su alta latitud hay cierta cantidad de luz en invierno y momentos de cierta oscuridad durante el verano. Según la clasificación biogeográfica mencionada anteriormente (Peat et al. 2007), todas las Shetland del Sur pertenecen a la parte norte de la Antártida marítima, con las condiciones climáticas más benignas de todo el continente. La isla Livingston es la segunda en tamaño tras Rey Jorge, y alberga la base científica española Juan Carlos I (en la Península Hurd, Figura 1), el campamento español de la Península Byers y la base búlgara St. Kliment Ohridski.

Sancho et al. (1999) hacen una detallada descripción de diversas características generales de la isla que merece la pena tener en cuenta. Entre ellas, la isla presenta un notable contraste geomorfológico entre la cadena montañosa del sudeste (Montañas Friesland, 1700 m de altitud) y la región plana y libre de hielo situada al noroeste (Península Byers). Ambas regiones están separadas por la Bahía Sur, donde se encuentra la base española y la localidad de estudio, sometida a los vientos húmedos del norte y del oeste pero protegida del frío y de los fuertes vientos del sur. La región libre de hielo de la Península Hurd, donde está localizado nuestro estudio, presenta una zona costera marcada por playas, acantilados, morrenas glaciares y roquedos de pingüinos (López-Martínez et al. 1991; Sancho et al. 1999).

La geología difiere considerablemente de la del resto de la isla y de todas las Shetland del Sur, ya que mientras estas son de origen volcánico, la zona de estudio presenta rocas de origen sedimentario (Sancho et al. 1999).

Øvstedal y Smith (2001) proporcionan una temperatura media para la región de 1 °C durante el verano austral y entre -3 °C y -4 °C para la totalidad del año, y una precipitación de entre 400-500 mm para la zona del norte de la Península Antártica, buena parte en forma de lluvia durante los meses de verano.



Figura 1. Base antártica española Juan Carlos I en Caleta Española, isla Livingston, Shetland del Sur, con el roquedo donde se encuentra la localidad de estudio en la parte derecha de la fotografía, entre la base y la playa. Fotografía diciembre 2008.

La vegetación en la región de las islas Shetland del Sur está dominada por criptógamas, con dos especies de plantas vasculares entremezcladas, *Deschampsia antarctica* y *Colobanthus quitensis*. Los musgos son abundantes en las zonas más húmedas y los líquenes en las zonas más secas y el interior, dando lugar a extensas formaciones. También son frecuentes las hepáticas y las algas en vida libre, algunas de ellas sobre la nieve (Øvstedal y Smith 2001). Kappen (1993) describió la vegetación líquénica de la región de la Antártida marítima destacando, en primer lugar, las comunidades de líquenes crustáceos de costa que comparten la playa y la región intermareal. Una segunda zona iría desde la playa hasta los 300 m de altitud con vegetación líquénica característica de tundra, con grandes extensiones de líquenes fruticulosos y foliáceos mezclados con briófitos. En esta zona destacarían géneros como *Psoroma*, *Stereocaulon*, *Cladonia*, *Sphaerophorus*, *Umbilicaria* o *Usnea*. Más arriba de los 300 m, en zonas más inestables o con grandes acúmulos de nieve durante el año, disminuiría

la alta cobertura mencionada, y aparecerían especies de distintos biotipos como *Placopsis contortuplicata*, *Leptogium puberulum* o *Pannaria hookeri*. A mayores altitudes destacan los líquenes crustáceos y algunos fruticulosos como *Pseudephebe pubescens* e *Himantormia lugubris*. Mención aparte merecen las comunidades características de los posaderos de aves, normalmente cerca de la costa, con altos requerimientos de nitrógeno. Algunas de las especies más representativas son *Ramalina terebrata* y aquéllas de los géneros *Xanthoria* y *Caloplaca*, que confieren una coloración naranja característica. El límite de distribución hacia el sur de algunas de las especies mencionadas como *R. terebrata* e *H. lugubris* marcan los límites biogeográficos de la Antártida marítima (Kappen 1993).

Los Valles Secos de McMurdo (Figura 2) se encuentran al sur de la Tierra Victoria, a 77° de latitud sur. Quedan delimitados por las Montañas Transantárticas, la Bahía de McMurdo al norte y la Barrera de hielo de Ross al oeste. La región está designada como un área antártica de especial gestión o manejo (ASMA, Antarctic Special Managed Area, www.scar.org), es la zona libre de hielo más grande de todo el continente (Pointing et al. 2009) y ha sido descrita como uno de los lugares más fríos y secos de todo el planeta (Fritsen et al. 2000). Los valles más importantes son, de norte a sur, Victoria, Wright y Taylor. Merece la pena destacar también algunos valles más pequeños como Miers, Marshall y Garwood, en los cuales se ha estado realizando investigación activa en el verano austral durante los últimos años (www.lgp.aq). Dentro del paisaje de los Valles Secos hay que incluir, aparte de los mencionados valles de distinto tamaño, los glaciares y las zonas altas (Fell et al. 2006), en las que se acumula nieve por más tiempo que en las zonas bajas, por lo que se genera una flora criptógama algo más desarrollada. Marchant y Denton (1996) separaron tres zonas distintas, la costera, la intermedia y la interior, existiendo fuertes gradientes climáticos, de disponibilidad de humedad, fuentes de carbono y contenido en sales desde la costa al interior y desde el fondo de los Valles a las zonas altas (Campbell et al. 1998).

La temperatura media anual en los Valles Secos es de -20 °C, la precipitación anual es inferior a los 50 mm (Fritsen et al. 2000) y la humedad relativa presenta grandes oscilaciones, con valores que en ocasiones bajan hasta más del 20% (www.mcmlter.org). Según la misma fuente, la humedad relativa media del aire en los últimos diez años en el Valle Taylor (próximo a la localidad de estudio) ronda el 50%. Las

temperaturas medias mensuales se encuentran siempre por debajo del punto de congelación, aunque la oscilación de los valores máximos y mínimos durante el año son muy intensas, siendo positivas en muchas ocasiones durante el verano austral. Las condiciones climáticas mencionadas convierten la zona en un desierto polar hiperárido conocido como el desierto de Ross (Sun et al. 2010).



Figura 2. Valles Secos de McMurdo (Valle Miers), al sur de la Tierra Victoria, Antártida continental. Fotografía enero 2010

Las características geomorfológicas de dicho desierto dependen de tres procesos, los vientos catabáticos, procesos activos de criroturbación en el suelo y la glaciación dependiente de las bajas temperaturas (Marchant y Head 2010). Los vientos catabáticos pueden alcanzar grandes velocidades y pueden traer nieve procedente del plató polar que se acumulará momentáneamente en los valles, ya que al ser la humedad atmosférica tan baja, la nieve acumulada se sublima con rapidez. También provoca un efecto erosivo muy marcado en las rocas, lo que les da formas características. Los suelos de los Valles Secos de McMurdo están considerados como los más antiguos, los más fríos ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ de temperatura media), los más secos, los que menor contenido en carbono presentan y los

de menor actividad biológica de la Tierra (Burkins et al. 2001). Los glaciares presentan frentes muy definidos y estables (Sancho y Pintado 2011), se forman debido al frío (lo que implica que fluyen por deformación interna) y generan una erosión muy leve dentro del Valle comparado con otros tipos de glaciares, formando pequeñas morrenas (Marchant y Head 2010). Los grandes frentes glaciares, las rocas erosionadas por el viento y, en ocasiones, los lagos helados, forman el típico paisaje de los Valles Secos.

Desde el punto de vista geológico la región presenta una mezcla de areniscas de origen devónico-triásico, areniscas finas y un complejo de rocas ígneas y metamórficas de origen paleozoico mezcladas con doloritas jurásicas y rocas volcánicas cenozoicas (Marchant y Denton 1996).

Como se puede deducir de todo lo anteriormente expuesto, el panorama no resulta alentador para la presencia de vida. Robert Falcon Scott, descubridor y primer ser humano que caminó por los Valles Secos junto a los miembros de su expedición de 1903, escribió lo siguiente en su diario de campo: “No hemos visto nada vivo, ni siquiera un musgo o un líquen. Este es ciertamente el Valle de la muerte” (actual Valle Taylor) (Scott 1905). Aunque la opinión del famoso explorador polar británico sin duda refleja la realidad que puede observarse a simple vista, la vida existe y es abundante, si bien solo a nivel microbiano o restringida a algunos rincones con microclima más favorable. Respecto a los suelos, Fell et al. (2006) encontraron una compleja cadena alimentaria de micro-hongos en suelos con humedad inferior al 5%, considerados extremadamente secos. La presencia de componentes fotoautótrofos en el suelo es limitada, con algunas comunidades de cianobacterias colonizando rocas de cuarzo en contacto con el suelo, aparte de otras bacterias y hongos polares (Pointing et al. 2009). A pesar de esto, recientes estudios han demostrado una inesperada riqueza de biodiversidad de bacterias (Barrett et al. 2006), que aparecen ampliamente distribuidas por todos los suelos de los Valles Secos y que en muchas ocasiones son taxonómicamente únicas (Cary et al. 2010), lo que indica un fuerte componente adaptativo a las características concretas del ecosistema.

Las zonas próximas a los lagos o a las corrientes de agua procedentes del deshielo glaciar en verano pueden presentar pequeños invertebrados, principalmente nematodos, tardígrados y rotíferos (Fell et al. 2006), así como artrópodos de vida libre como ácaros

y colémbolos. La vida vegetal se encuentra en las antípodas de lo explicado para las zonas libres de hielo de las Shetland del Sur, pero aún así está presente en uno de los ecosistemas más hostiles de la Tierra. Para entender lo extraordinario de la presencia de ecosistemas vegetales en los Valles Secos merece la pena recordar algunos de los parámetros climáticos y edáficos ya mencionados, como la temperatura media mensual de todos los meses por debajo del punto de congelación, temperaturas en invierno de hasta -50 °C, vientos procedentes del sur que con frecuencia sobrepasan los 100 km/h, sequía con una humedad atmosférica baja, suelos estériles, ausencia total de luz durante el invierno y fuerte incidencia de radiación PAR y ultravioleta durante el verano. Algunas poblaciones de algas se unen a las de cianobacterias en las zonas por donde corre el agua en verano. También son características de estas zonas de escorrentía algunas especies de musgos como *Bryum subrotundifolium* Jaeg., Ver. S.Gall (= *Bryum argentum* Hedw. Seppelt y Green 1998) y *Hennediella heimii* Hedw. (Pannowitz et al. 2003a). Los líquenes toleran algo mejor la desecación del interior de los valles, aunque también aparecen en las proximidades de las corrientes de agua, donde podemos encontrar especies como *Lecanora expectans* Darb., *Caloplaca citrina* (Hoffm.) Th. Fr., *Carbonea capsulata* (Dodge & Baker) Hale y *Sarcogyne* sp. (Green et al. 1992). En las zonas altas de los valles se acumula más la nieve que en el interior y se crean microhábitats más favorables para los líquenes, por lo que su presencia en estos lugares es más importante. En estas zonas podemos encontrar líquenes foliáceos como *Rhizoplaca melanophthalma* (DC.) Leuckert y *Umbilicaria aprina* Nyl., así como especies crustáceas como *Acarospora gwynii* Dodge et Rudolph y *Buellia frigida* Darb., posiblemente el líquen más abundante de todos. Aunque *U. aprina* y *B. frigida* también pueden aparecer dentro de los valles, su presencia es prácticamente residual, sobre todo en el caso de la primera. Un repaso general a la biota de los Valles Secos no quedaría completo sin una mención a una de las comunidades más sorprendentes del planeta, las comunidades microbianas endolíticas. Descubiertas por Friedmann (Friedmann y Ocampo 1976; Friedmann 1982), son comunidades microbianas que viven en las capas superficiales del interior de las rocas, donde encuentran un microhábitat adecuado que las protege de las condiciones ambientales extremas. Su composición es simple, por un lado productores primarios que pueden ser cianobacterias, algas o líquenes, y asociados a ellas aparecen hongos consumidores y bacterias descomponedoras (Sun et al. 2010). Las condiciones de temperatura, disponibilidad de agua y limitada radiación a la que se

enfrentan los organismos fotosintéticos de estas comunidades suponen un auténtico reto para la vida (De Los Ríos et al. 2005a).

1.2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

La construcción de bases de investigación en la Antártida a partir de los años sesenta ha ido permitiendo la presencia de investigadores en el continente, que han trabajado en todos los ámbitos científicos. Desde el punto de vista de los ecosistemas terrestres, los líquenes juegan un papel fundamental. Como se ha visto en el apartado anterior, tanto por biomasa como por número de especies, estos organismos son protagonistas. Kappen (2000) sugiere que el éxito de los líquenes en la Antártida se explica fundamentalmente desde el punto de fisiológico, destacando la elevada resistencia a la congelación, la desecación, y al estrés lumínico como factores clave para entender su dominancia. Las interacciones entre fisiología, ecología, morfología, anatomía y nutrientes son fundamentales para entender en profundidad la naturaleza de esta adaptación. Aunque muchos líquenes de la Antártida han demostrado adaptaciones fisiológicas muy concretas a la temperatura y a la radiación característica de muchas zonas del continente (Longton 1988; Kappen 1993), la principal estrategia adaptativa de estos organismos se basa en la resistencia. Esta resistencia viene condicionada por los matices propios de la simbiosis liquénica y por la poiquilohidria, que les hace permanecer inactivos en estado deshidratado en las situaciones en las que las condiciones climáticas son especialmente duras. De esta manera, buena parte de los líquenes antárticos están activos en condiciones climáticas mucho más atemperadas de lo esperado, pudiendo ser aproximadas a las de los líquenes de otras zonas del planeta (Green et al. 2007).

Los estudios de monitorización a largo plazo juegan un papel fundamental a la hora de entender las estrategias adaptativas de los líquenes a su entorno. La técnica no se empezó a llevar a cabo en el continente hasta principios de la década de los 90, cuando la tecnología adecuada para realizarlo estuvo disponible. El plan de trabajo consiste normalmente en la instalación de un aparato que mide través de sensores las condiciones microclimáticas de temperatura del aire, temperatura del talo liquénico, radiación incidente en el mismo y humedad atmosférica. Añadiendo otro aparato (normalmente medidores de fluorescencia) que de idea de la actividad fotosintética del liquen (o de cualquier otro vegetal) se obtiene información muy valiosa relacionada con

las condiciones en las cuales la muestra está en estado activo, pudiendo entender mejor de esta manera sus estrategias adaptativas al entorno. A partir de aquí se pueden desarrollar modelos de productividad, crecimiento e impacto en el ecosistema.

Los principales inconvenientes de estos sistemas de monitorización son que tengan incorporada la tecnología necesaria para que puedan funcionar de manera automática en condiciones climáticas duras, su alto coste y la dificultad de su instalación en la Antártida. En función de la zona del continente donde se quiera llevar a cabo el estudio hará falta un determinado apoyo logístico, lo que puede llegar a dificultar en alto grado el desarrollo de los experimentos.

Aunque la técnica más usada haya sido la de la fluorescencia de la clorofila *a*, por la comodidad de su uso en el campo y por la posibilidad de dejar los equipos funcionando de manera continua, también se han hecho medidas de campo de intercambio gaseoso. Las medidas llevadas a cabo con esta técnica aportan información muy completa, pero a día de hoy presentan el inconveniente de necesitar un operador que va a estar en el terreno por un periodo limitado de tiempo.

Por todo lo mencionado anteriormente, la mayoría de trabajos de campo relacionados con fisiología de líquenes en la Antártida se han realizado durante cortos periodos de tiempo durante el verano, única época que permite la presencia de investigadores trabajando sobre el terreno. A pesar de no ofrecer una información tan completa como los estudios a largo plazo (entendidos en esta tesis doctoral como aquellas que dejan equipos funcionando de manera automática sin la presencia de investigadores), estos estudios han aportado cantidad de información que han permitido ayudar a entender el funcionamiento de las criptógamas en estos ecosistemas remotos. Schroeter et al. (1991), sentaron las bases de los estudios de monitorización de actividad de líquenes en la Antártida. Durante el estudio se realizaron medidas de microclima y fluorescencia durante 10 días en talos de *Usnea antarctica* en las islas Shetland del Sur combinados con medidas de intercambio gaseoso durante los dos primeros días. En dicho trabajo, los autores restan relevancia ecológica a la fotosíntesis a temperaturas bajo cero en esta región y arrojan los primeros datos sobre mayores tasas de actividad fuera del verano, época en la cual la disponibilidad de agua disminuye respecto a la primavera y el otoño. Siguiendo con medidas puntuales de campo, Sancho et al. (2003), realizaron medidas de

intercambio gaseoso en la Antártida continental en dos poblaciones ecológicamente distintas del líquen foliáceo *Umbilicaria aprina*, una de las especies utilizadas para este estudio comparativo. Las dos poblaciones de distintas ecologías (una más expuesta en lo alto de las rocas y otras más protegidas y bañadas durante el verano por una corriente de agua) mostraron valores similares de contenido hídrico y de fotosíntesis neta, pero presentaron diferencias anatómicas y de contenido en clorofilas. Los autores discuten también sobre el gigantismo, un fenómeno observado tanto en la Antártida marítima como en la continental, que consiste en tamaños de talos liquénicos más grandes de lo normal y plantean posibles explicaciones al fenómeno. La especie mencionada es sin duda una de las más estudiadas en toda la Antártida. Otros trabajos relacionados con la misma han remarcado la ausencia de síntomas de fotoinhibición a pesar de las extremas condiciones de luz y temperatura (Kappen et al. 1998), la fuerte depresión de su fotosíntesis a altos contenidos hídricos, así como su dependencia de la nieve como fuente de hidratación (Schroeter y Scheidegger 1995) y la rápida reactivación de su metabolismo tras la inactividad invernal, lo que indica una fuerte resistencia constitutiva a la desecación (Schlensog et al. 2004). Schroeter et al (1994) detectaron que la especie presentaba pequeñas cantidades de fotosíntesis neta a -17 °C, mientras que el proceso respiratorio se detenía a los -10 °C como estrategia para ahorrar carbono en periodos fríos. Esta capacidad hizo pensar a los autores que había momentos de actividad metabólica fuera del verano austral y que el período de actividad de la especie podía extenderse –de manera discontinua- de octubre a marzo (meses con luz) en la zona costera continental de Granite Harbour.

Dentro de los trabajos de campo realizados a corto plazo merece destacar también el de Kappen et al. (1990) que midieron tasas de intercambio gaseoso en líquenes crustáceos en las Shetland del Sur, aportando mucha información fisiológica del género *Caloplaca sp.*, también utilizado en nuestro estudio comparativo y que mostró las mayores tasas de fijación de carbono entre las tres especies estudiadas; Sancho et al. (1997b) midieron actividad fotosintética en el campo de macrolíquenes cosmopolitas en la Antártida marítima, entre ellos talos de *Umbilicaria nylanderiana*; Bartak et al. (2004) y Harrison et al. (1989) han trabajado con la tercera especie usada en nuestro estudio, *Umbilicaria antarctica*, en las Shetland y en las Orcadas del sur respectivamente, mostrando una rápida recuperación frente a una fotoinhibición inducida, óptimos valores de fotosíntesis a bajas temperaturas y una clara saturación de la fotosíntesis a altos contenidos hídricos.

Toda la información recopilada con estos trabajos llevó a otros que, aún manteniendo un seguimiento continuo por parte del operador en el terreno, prolongó más los periodos de medida con el fin ampliar la información disponible al respecto. Bolter et al. (1989) hicieron uno de los primeros intentos midiendo exclusivamente microclima durante dos meses en talos de *Usnea sphacelata* en la parte continental de Wilks Land. A partir de los datos establecieron un modelo que generó un periodo de actividad menor al esperado inicialmente. Pintado et al. (2001) monitorizaron microclima de nuevo en un gradiente altitudinal durante 43 días en las Shetland del Sur y observaron una interesante relación entre temperatura, que va vinculada a la disponibilidad de agua líquida, y biodiversidad. Considerando ya trabajos que hayan incluido medidas de actividad metabólica aparte de microclima, cabe destacar el llevado a cabo por Pannewitz et al. (2003b), que monitorizó cuatro especies de líquenes bajo una capa de nieve durante un mes en la Antártida continental, concluyendo que dicha capa no proporcionaba un microhábitat adecuado para los líquenes a diferencia de otras regiones con nieve como las regiones alpinas o la Antártida marítima. En un trabajo posterior, Pannewitz et al. (2006) monitorizaron actividad metabólica y microclima en el líquen *Xanthoria mawsonii* en dos localidades de zonas costeras de la Antártida continental durante seis semanas aproximadamente. El trabajo muestra que la especie está bien adaptada a las altas radiaciones y a las bajas temperaturas de la zona y que la actividad metabólica depende del derretimiento de la nieve al principio de la primavera, restando relevancia a la hidratación por humedad ambiental, que parece exclusiva a periodos en los que los líquenes están cubiertos de nieve.

Los primeros trabajos de monitorización a largo plazo fueron llevado a cabo por Schroeter et al. (1995; 1997) en las Shetland del Sur, midiendo microclima durante doce y catorce meses en los líquenes *Usnea antarctica* e *Usnea aurantiaco-atra* respectivamente. Estos autores establecen modelos de productividad de las especies mencionadas, algo que hasta la fecha solo se había hecho en los Valles Secos de McMurdo (Antártida continental) en comunidades de líquenes endolíticos tras monitorizar el microclima durante tres años (Friedmann et al. 1987; 1993), e infiriendo a partir de estos datos la actividad metabólica. Los primeros trabajos a largo plazo de Schroeter y colaboradores han sido mejorados con lo años al añadir medidas de actividad metabólica a través de la fluorescencia de la clorofila *a* y la recopilación de datos durante varios años. Estos resultados han sido publicados recientemente

(Schroeter et al. 2010; 2011), aportando una comparativa durante casi dos años de actividad y microclima de líquenes en la Antártida marítima (Isla Livingston, Shetland del Sur) y en la Antártida continental (Botany Bay), así como un exhaustivo estudio del comportamiento de *Umbilicaria aprina* durante 3 años consecutivos en Botany Bay. Ambos trabajos suponen los estudios de monitorización más completos realizados, ya que abarcan el mayor periodo que se haya medido nunca uniendo metabolismo y microclima y comparan los dos hábitats más extremos que se hayan medido en la Antártida hasta la fecha (Schroeter et al. 2010).

El desarrollo de un nuevo sistema autónomo de monitorización de metabolismo vegetal y microclima (Moni-DA, Walz, Alemania), con claras mejoras tecnológicas respecto a los sistemas anteriores, nos ha permitido plantear un nuevo estudio comparativo a largo plazo en distintas localidades en la Antártida. La primera localidad escogida -Isla Livingston en las Shetland del Sur, Antártida marítima- continúa una larga monitorización iniciada hace años por nuestro grupo de investigación perfeccionado con un sistema más moderno y completo. Además, Isla Livingston representa una de las zonas con mayor biodiversidad de líquenes de toda la Antártida, albergando más de la mitad de todas las especies presentes en el continente en poco más de 3 km² de territorio libre de hielo (Søchting et al. 2004). La segunda localidad escogida -Valles Secos de McMurdo, Tierra Victoria, Antártida Continental- representa uno de los ecosistemas de la Tierra más hostiles para la vida, pero a pesar de esto encontramos poblaciones de líquenes adaptadas a microhábitats muy concretos.

El objetivo principal de este capítulo es, por tanto, comparar ambas localidades con el fin de entender las estrategias adaptativas que siguen los líquenes para poder habitar ambientes tan contrastados. El conocimiento de estos patrones nos permitirá establecer relaciones entre fotosíntesis y crecimiento entre regiones que han demostrado tasas de crecimiento en líquenes que difieren en hasta dos órdenes de magnitud (Sancho et al. 2007b) y que muestran un contraste aún más extremo que el planteado por Schroeter y colaboradores (Schroeter et al. 2010).

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. LOCALIDADES Y DESCRIPCIÓN DE LAS ESPECIES

Como se ha comentado en la introducción, la primera localidad de nuestro estudio comparativo se encuentra en la Antártida marítima, más concretamente en isla Livingston, perteneciente al archipiélago de las Shetland del Sur. La estación de medida se instaló en las proximidades de la base de investigación española Juan Carlos I, que se localiza en Caleta Española, una de las playas que conforman la zona costera en la pequeña región libre de hielo de la isla. Las características geológicas de la localidad aparecen bien reflejadas en la descripción que se llevó a cabo en la sección de generalidades de la zona de la introducción.

La climatología de la localidad está muy bien estudiada a través de estaciones microclimáticas. Como ejemplo, los datos medios más significativos de un año consecutivo de medidas en el año 2008 arrojaron una temperatura media del aire de $-0,4$ °C, una radiación media incidente de $145 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y una humedad relativa del aire del 79,9%.

Respecto a la vegetación concreta de la localidad, Sancho et al. (1999) describen la vegetación costera de la isla, lo que encaja perfectamente con la zona donde se instaló la estación. Cerca de la costa aparecen pequeñas piedras y guijarros cubiertos de líquenes crustáceos, entre los que destaca *Caloplaca coralligera*. En terrazas intermedias de la playa, normalmente húmedas, aparecen múltiples especies de musgos, especialmente las especies *Sanionia uncinata*, *Brachythecium austro-salebrosum* y *Bryum pseudotriquetum*. A una altura superior, dentro de la misma playa, aparecen las primeras extensiones de *Usnea aurantiaco-atra* en suelo rocoso, mientras que sobre la arena crecen fundamentalmente el musgo *Polytrichum piliferum* y el líquen *Peltigera didactyla* de manera frecuente. Las poblaciones costeras ornitocóprófilas de líquenes ya mencionadas en la introducción aparecen también en roquedos que tocan el mar. A lo largo de la playa se pueden observar también las dos especies de plantas vasculares presentes en la región.

El roquedo sobre el que se instaló la estación está al principio de la playa, a escasos metros del módulo de laboratorio de la base, con coordenadas 62° 39' 46'' S 60° 23' 20'' O (Figura 3). La orientación del roquedo es norte, y las especies de líquenes más abundantes, aparte de múltiples especies crustáceas, son *Usnea aurantiaco-atra*, *Usnea antarctica* y *Umbilicaria antarctica*. Tanto la primera como la última fueron escogidas para realizar la investigación, aunque en esta tesis solo se aporta información sobre *Umbilicaria antarctica*, ya que al ser un estudio comparativo entre dos localidades parece más razonable usar especies del mismo género. La estación fue instalada en diciembre del año 2008, y desde entonces ha estado funcionando intermitentemente hasta principios del otoño de 2011. El problema que interrumpió la toma de datos fue solucionado en el último verano austral (2012) y actualmente se mantiene operativa.



Figura 3. Moni-DA en Caleta Española, isla Livingston, enero 2009

Umbilicaria antarctica Frey & I.M. Lamb (Figura 4) según (Øvstedal y Smith 2001), es una especie con talo irregular de hasta 30 o más cm de diámetro, aunque normalmente entre 5-15 cm. Cara superior de gris a marrón-grisácea, llegando en ocasiones a violeta-pruinosa. La cara inferior es negra y presenta rizinomorfos simples o ramificados de

forma dicotómica y talósporas simples, de entre 5 y 8 μm de diámetro. No se han observado apotecios en los talos estudiados.

Química: Acido girofórico.

Ecología: Ampliamente distribuida, principalmente en la Antártida marítima sobre superficies de rocas protegidas y húmedas, aunque también en rocas más expuestas y morrenas glaciares. Habitual en zonas de costa. Crece habitualmente junto a *Usnea antarctica*, diversas especies de líquenes crustáceos y musgos.

Distribución: Endemismo antártico. Islas Sandwich del Sur, Orcadas del Sur, Shetland del Sur, Península Antártica y en zonas de costa de la Antártida continental.



Figura 4. Talo de *Umbilicaria antarctica* con los sensores de monitorización en isla Livingston, enero 2009

La segunda localidad del estudio se localiza en la Antártida continental, al sur de la Tierra Victoria. Cerca de la Isla de Ross se encuentran los Valles Secos de McMurdo (de características muy concretas ya comentadas anteriormente), y más concretamente el Valle Garwood, que es donde se instaló la segunda estación de medida. El valle avanza en dirección este-oeste desde el glaciar Joyce hasta la costa del mar de Ross en

un recorrido de unos 15 km de longitud libres de hielo. En el interior del valle aparece un lago glaciario congelado casi en su totalidad durante todo el año, que alberga ciertas poblaciones de algas y de cianobacterias del género *Nostoc* en los bordes. Aparte de esto, la vida terrestre es muy escasa, con algunas especies de musgos y de líquenes en las zonas de escorrentía procedente de la parte alta del Valle. Entre las especies de musgos destacan *Bryum argenteum* y *Heinediella heimii*. Respecto a los líquenes, el interior del valle presenta menos especies y abundancia que las partes altas, pero aún así se pueden observar especies de los géneros *Caloplaca* y *Lecidea sp.*, así como talos de las especies *Buellia frigida* y la foliácea *Umbilicaria aprina*. El interior de las rocas forma un hábitat adecuado para la presencia de comunidades microbianas endolíticas, que en ocasiones conforman distintos tipos de líquenes. En relación a la climatología, el valle encaja bien con la descripción general ya aportada para toda la región, pero aún así se añade una gráfica (Figura 5) con un año de medidas de temperatura del aire, del suelo y de humedad relativa con la idea de aportar información aún más concreta.

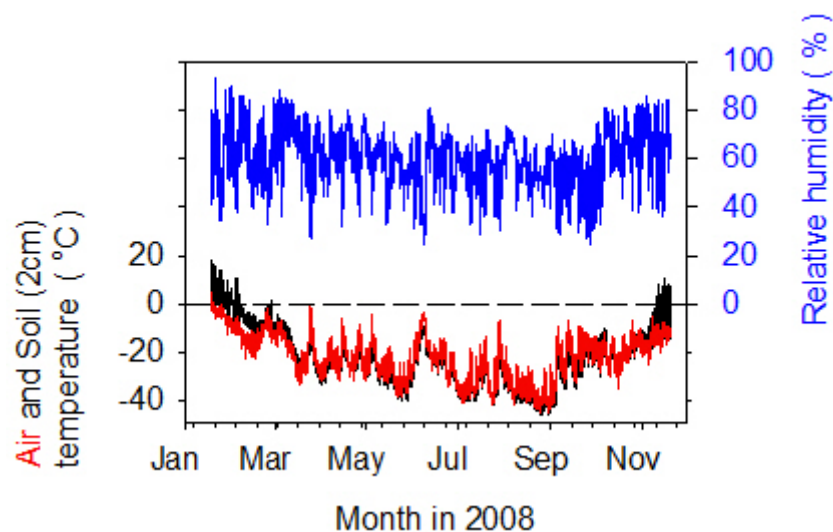


Figura 5. Medidas climáticas durante el año 2008 en el Valle Garwood, Sur de la Tierra Victoria, Antártida continental, T aire en rojo, T del suelo en negro. Datos procedentes de Antarctica New Zealand.

Como se puede observar, la humedad atmosférica presenta importantes oscilaciones, con valores variables que pueden llegar a ser muy bajos. La temperatura del aire nunca alcanza valores positivos, llegando a valores inferiores a los -40 °C durante el invierno.

La estación de medida se encuentra en la parte del Valle más próxima al frente del glaciar Joyce, no muy alejada del lago central, con coordenadas 78° 01' 36.4'' S 163° 53' 51'' O (Figura 6). Una población de la especie *Umbilicaria aprina* (la única encontrada en el interior del Valle tras exhaustivos trabajos de recolección en la zona) aparece en una roca con cierta inclinación escasamente levantada del suelo y rodeada de surcos, que indican una clara escorrentía desde las partes altas hasta el lago central durante el deshielo. A la derecha, una pequeña piedra alberga un talo del género *Caloplaca sp.* en posición horizontal. Tres talos de *Umbilicaria aprina* y el único talo de *Caloplaca sp.* fueron escogidos para llevar a cabo la monitorización. La instalación se realizó el 16 de enero de 2010, y se empezó a monitorizar el 20 de enero. El proceso se mantuvo hasta el 2 de junio de 2010, cuando la estación dejó de transmitir. La única población de *Umbilicaria* y, por tanto, de un líquen foliáceo, representa una gran oportunidad para estudiar como sobreviven en ese entorno donde su presencia es extremadamente escasa y representa probablemente el límite ecológico en su área de distribución, además de para comparar especies del mismo género respecto a la Antártida marítima. El talo de *Caloplaca sp.* ofrece la oportunidad de monitorizar un líquen crustáceo en el mismo entorno extremo, lo que aporta información nueva a todas las medidas de fisiología de líquenes crustáceos adaptados a frío realizadas en el laboratorio durante esta tesis doctoral.



Figura 6. Moni-DA en el Valle Garwood, Valles Secos de McMurdo, Antártida continental, enero 2010

Umbilicaria aprina Nyl. (Figura 7), siguiendo de nuevo a Øvstedal y Smith (2001), presenta talos irregulares, normalmente entre 5 y 15 cm de diámetro. La cara superior es pálida, gris oscura o marrón oscura, pudiendo ser a su vez lisa o rugosa, en ocasiones

presentando crestas. La cara inferior es de gris oscura a negra, con rizinas y taloconidios. Rizinas simples o ramificadas, oscuras en la parte inferior y pálidas en la superior. Talósporas unicelulares entre 4 y 6 μm . Los apotecios nunca se han visto.

Química: Acido gyrofórico

Ecología: Ampliamente distribuida en rocas, normalmente en zonas de escorrentía aunque también aparece en zonas más secas y expuestas. Desde zonas costeras de baja altitud a localidades de mayor altitud en el interior del continente.

Distribución: Norte Europa, Norte de América, montañas en el Este de Africa y Cordillera de los Andes (Crespo y Sancho 1982). En la Antártida aparece en la isla de Ross, Sur de la Península Antártica y ampliamente distribuida en el continente desde los 10 a los 1700 m.

El género *Caloplaca* Th. Fr. (Figura 7, derecha) presenta talos normalmente naranjas (debido a las antraquinonas), raramente blancos o grises, crustáceos, placoides, escuamulosos o incluso parásitos y endolíticos. Trebouxia como fotobionte. Apotecios con o sin excípulo talino. Hipotecio incoloro. Asco del tipo de los Teloschistales, normalmente con 8 esporas. Ascósporas polariloculares. Conidios con forma de elipse. Género amplio y complejo, con alrededor de 30 especies descritas en todo el continente (Øvstedal y Smith 2001).



Figura 7. Talos de *Umbilicaria aprina* y *Caloplaca* sp. monitorizados en el Valle Garwood, Valles Secos de McMurdo, Antártida continental, enero 2010

2.2. MONI-DA, DESCRIPCIÓN DE LA ESTACIÓN DE MEDIDA

La idea para el desarrollo del Moni-DA (Walz, Alemania) parte de todos los intentos conjuntos de monitorización llevados a cabo hasta la fecha que han tenido como finalidad monitorizar metabolismo y microclima en plantas de una manera eficaz y prolongada. Aunque la tecnología ha ido haciendo la técnica cada vez más funcional, los problemas técnicos han sido frecuentes. En primer lugar, los equipos antiguos presentaban por un lado la estación microclimática a través de un data-logger a los que se le añadía a posteriori un medidor de fluorescencia, por lo que el tamaño total del equipo era considerable, sobre todo al añadirse los ordenadores necesarios para la descarga de datos. Esto ha representado siempre otro problema importante, ya que el tener que ir a la localidad a descargar los datos cada cierto periodo de tiempo supone problemas logísticos y económicos, principalmente si la estación se encuentra en lugares remotos. Otras limitaciones en este tipo de experimentos han sido tanto la garantía de un suministro energético adecuado durante el período de medida, como la resistencia de los aparatos a las duras condiciones climatológicas de las zonas donde se suelen llevar a cabo este tipo de trabajos.

El Moni-DA (Figuras 8 y 9) es un aparato manejable comparado con toda la equipación anterior. Consta de una unidad central con un batería interna que ocupa prácticamente todo el volumen del equipo. El aparato está especialmente diseñado para aguantar las condiciones climáticas más extremas de temperatura, humedad y radiación. De la parte trasera del aparato parten cuatro conexiones con placas (Figura 8). Cada placa presenta una fibra de vidrio capaz de emitir una señal lumínica y recibir a su vez una señal de fluorescencia, un sensor de luz incidente, y un sensor de temperatura flexible que se puede adherir al talo liquénico. El método por el cual el aparato obtiene señales de actividad liquénica es el método del pulso de luz saturante, ya comentado detalladamente en el capítulo I, que presenta la ventaja de poder hacer medidas de fluorescencia bajo luz natural. De esta manera, el aparato genera información sobre la energía dirigida hacia la ruta fotosintética (Yield) y sobre el transporte de electrones de la fase lumínica de la fotosíntesis (ETR). El manejo del aparato es sencillo, simplemente hay que mover un puntero magnético de la parte trasera para activarlo y programar los intervalos de medida marcados por cada pulso de saturación. Ambos aparatos se programaron para emitir un pulso de saturación cada hora.



Figura 8. Componentes principales del Moni-DA, la unidad central aparece a la derecha, y al lado se observa un canal de medida de fluorescencia y microclima.



Figuras 9 y 10. Figura 9 (izquierda) visión frontal de la unidad central del Moni-DA en los Valles Secos. Figura 10 Conector de satélite Iridium que permite la transmisión de datos en los Valles Secos, enero 2010

Otra gran ventaja del aparato es su autonomía y sostenibilidad. De la parte trasera salen dos conexiones que permiten conectar el aparato a sendos paneles solares que mantienen el suministro energético necesario para permitir que se lleven a cabo los pulsos de saturación de los cuatro sensores. Debido a la elevada demanda de energía asociada al proceso, el equipo pasa a un estado latente sin consumo energético entre medida y medida. Esto también permite que la batería aguante cargada durante más tiempo en regiones donde el frío tiende a acelerar el proceso de descarga.

La última mejora tecnológica del Moni-DA es la capacidad de transmitir los datos vía satélite (Figura 10) o modem (Figura 8) a una página web (www.pam-monitoring.com) en tiempo prácticamente real (Figura 11). Esto permite hacer un seguimiento por internet de toda la información recibida, así como poder espaciar en el tiempo las visitas a la localidad de estudio al no ser necesario descargar los datos para trabajar con ellos.

Esta monitorización vía satélite en tiempo real no se había realizado nunca anteriormente y supone un paso adelante muy significativo en el estudio de la adaptación de los líquenes a condiciones extremas. Todo en conjunto convierte al aparato en una herramienta muy eficaz a la hora de diseñar estudios de monitorización a largo plazo en organismos vegetales.

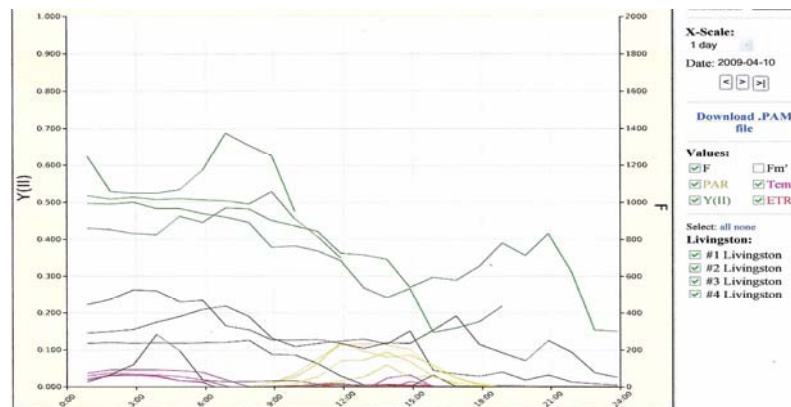


Figura 11. Seguimiento por internet de los datos transmitidos por el Moni-DA vía satélite.

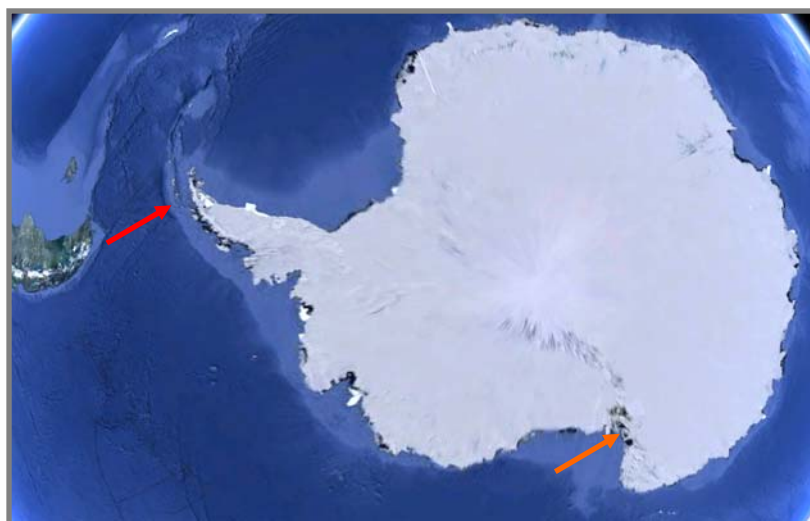


Figura 12. Mapa de la Antártida y extremo sur de Suramérica. Las flechas marcan Isla Livingston en las Shetland del Sur, Antártida marítima (roja) y Valles Secos de McMurdo (naranja), sur de la Tierra Victoria, Antártida continental. Imagen tomada de Google Earth.

El aparato presenta un filtro interno para discriminar señales reales de actividad de posible ruido. El filtro o línea base es de 10 unidades de fluorescencia para la señal de F_t y de 50 para la señal de F_m , de tal manera que si no se llega a estos valores límite no se genera una señal de yield o actividad metabólica, aunque el ratio F_v/F_m sea positivo. La experiencia en el tratamiento de datos nos ha llevado a observar que en condiciones de inactividad (cuando el aparato indica que no hay ningún valor de yield en cada punto de medida) las diferencias entre F_t y F_m son, en ocasiones, mayores a lo deseado. Con el fin de evitar un posible aumento artificial de la actividad hemos diseñado un segundo filtro en el que restamos a los valores de F_m la diferencia entre F_t y F_m en condiciones de inactividad. De esta manera desaparecen ciertos valores de actividad que no procedan de un incremento nítido de las señales de fluorescencia basal y fluorescencia máxima.

3. RESULTADOS

La figura 13 muestra la evolución de la fluorescencia máxima (F_m' en luz y F_m en oscuridad, 13A), la temperatura en las proximidades del talo (13B), la radiación solar incidente sobre el talo (13C) y el yield (F_v/F_m' o F_v/F_m en oscuridad, 13D) en *U. antarctica* en Isla Livingston durante todo el periodo de medida (20 enero - 2 junio de 2010). La fluorescencia máxima muestra de manera clara picos que oscilan a partir de una línea base que implica el estado de inactividad, es decir, cuando los líquenes están secos. Nótese que a lo largo de todo el capítulo, los valores de los ejes Y de las gráficas se ajustan a los valores máximos de cada valor obtenidos en cada uno de los eventos.

La figura 13A se corresponde bien con la 13D, que realmente es la que está indicando la actividad metabólica real, ya que está mostrando la relación entre la fluorescencia basal (F_t y F_0 en oscuridad) y la fluorescencia máxima (F_m' y F_m en situaciones de oscuridad)

En la figura 13D merece la pena destacar un primer periodo en el cual los periodos de actividad son cortos, con valores de yield que nunca alcanzan 0,6. A partir de la última semana de febrero (en concreto a partir del 24 de ese mes) se empiezan a producir

eventos de actividad de mayor duración y ligeramente superiores a los del periodo anterior, esta vez alcanzando el valor de 0,6 o permaneciendo siempre en las proximidades. La actividad se mantiene por tanto de forma continuada y en sus valores máximos hasta el final de la monitorización el día 2 de junio. Otra característica a destacar en esta gráfica es la velocidad con la que se activa y se inactiva el talo, que pasa de 0 a valores máximos de yield, y de estos a 0 de nuevo de una manera brusca, casi sin transiciones.

La figura 13B muestra la evolución de la temperatura en las proximidades del talo de *U. antarctica*. La temperatura muestra una oscilación entre los 15 °C y los -10 °C aproximadamente, pero se puede observar una tendencia que determina que la temperatura en la región es bastante estable durante todos los días de monitorización. Únicamente se percibe un descenso marcado de la temperatura a finales de abril y principios de mayo, con varios días de temperaturas más bajas de lo habitual que llegan a los -10 °C, pero posteriormente vuelve a subir y permanece en los valores habituales. Aunque algunos de los picos de temperatura coinciden con incrementos de actividad, no se puede establecer una relación directa entre ambos, aunque más adelante veremos que la temperatura baja es un factor limitante para la actividad metabólica.

La figura 13C muestra lo mismo que la anterior pero con la radiación solar incidente. Se puede observar que el máximo medido supera ligeramente los 1600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con distintos picos que superan los 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ hasta la primera semana de marzo, que coincide con las últimas fechas del verano austral. A partir de aquí la radiación incidente disminuye considerablemente, con picos aislados que difícilmente superan los 400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, pero nunca llega a desaparecer del todo. Los picos de radiación tienden a coincidir con picos de temperatura debido al efecto calorífico de la radiación solar. También se observan coincidencias entre incrementos de radiación y picos de actividad, aunque al igual que con la temperatura, la alta frecuencia de fenómenos con actividad metabólica hace que esta se produzca en todo tipo de situaciones lumínicas.

El aparato que hemos usado para nuestra monitorización carece de sensores de humedad relativa del aire, que proporcionan información muy útil a la hora de interpretar la naturaleza de los eventos en los que se produce actividad metabólica. Para facilitar la interpretación de dichos eventos hemos aprovechado los datos de un sensor de humedad

relativa conectado a un data-logger que nuestro grupo de investigación instaló en la localidad años antes. Dicho sensor recoge la humedad relativa del aire en las cercanías de un talo del líquen fruticuloso *Usnea aurantiaco-atra* en el mismo roquedo de nuestro estudio.

Un repaso a dichos datos nos ha permitido saber que la humedad relativa media en las proximidades de dicho talo durante todo el periodo de medida fue del 89,6%, un valor considerablemente elevado. Los momentos de precipitación (determinados como aquellos en los que el sensor de humedad relativa aparecía saturado) junto a las situaciones en las que la humedad del aire fue superior al 95% supusieron un 60% del tiempo respecto al total en *U. aurantiaco-atra*.

Las relaciones entre eventos con humedad relativa $\geq 90\%$ o lluvia para este sensor y la actividad del talo de *U. antarctica* fueron evidentes, estableciéndose coincidencias claras en los inicios de ambos procesos.

La distinta morfología de los dos talos condiciona distintas cinéticas de deshidratación, por lo que en muchas ocasiones se mantiene una humedad relativa alta en *U. aurantiaco-atra* y el talo de *U. antarctica* ya aparece sin actividad metabólica (Figura 14). Los porcentajes de humedad altos en el talo de *U. aurantiaco-atra* están indicando fenómenos con disponibilidad de agua líquida o vapor que también estaría disponible para la foliácea vecina *U. antarctica*.

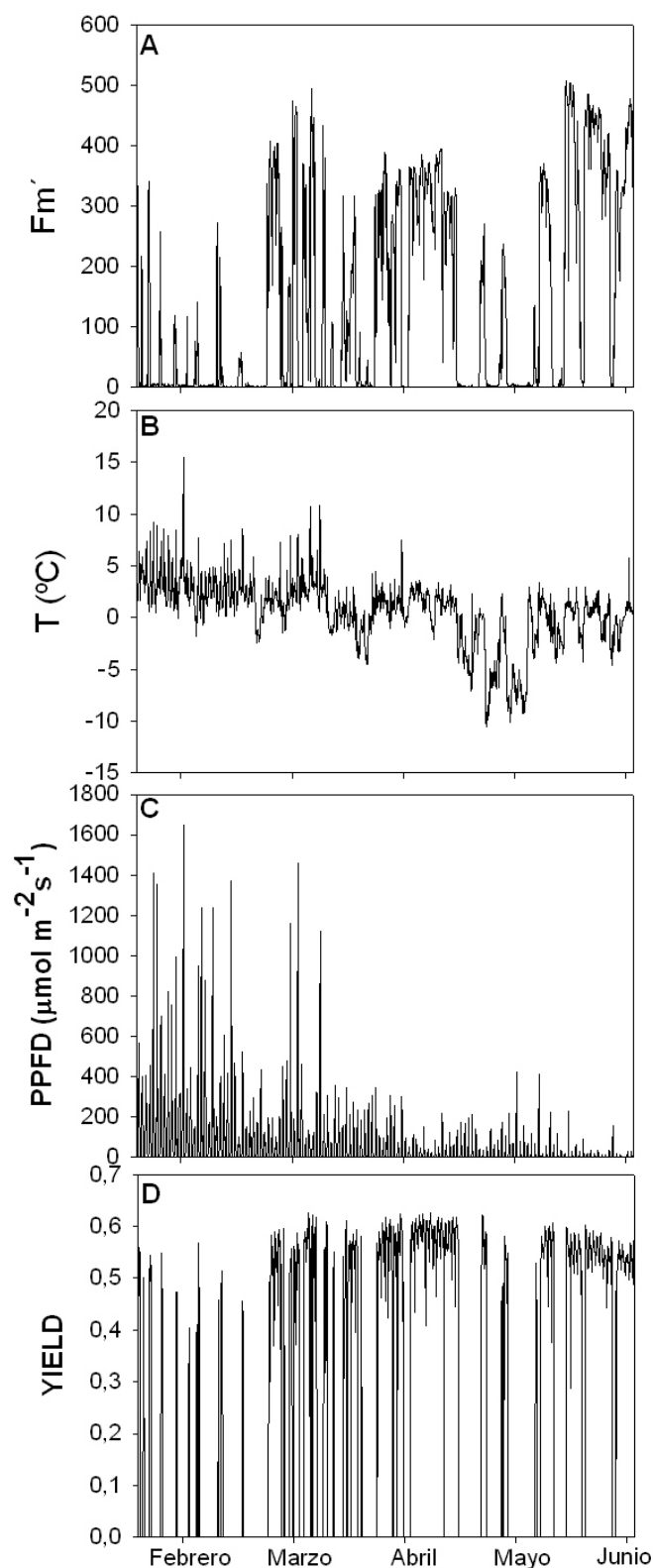


Figura 13A- 13D. Evolución de la fluorescencia máxima (13A), la temperatura (13B), la radiación fotosintéticamente activa incidente (13C) y la actividad metabólica (13D) en el talo de *U. antarctica* en isla Livingston, Antártida marítima, durante todo el periodo de monitorización.

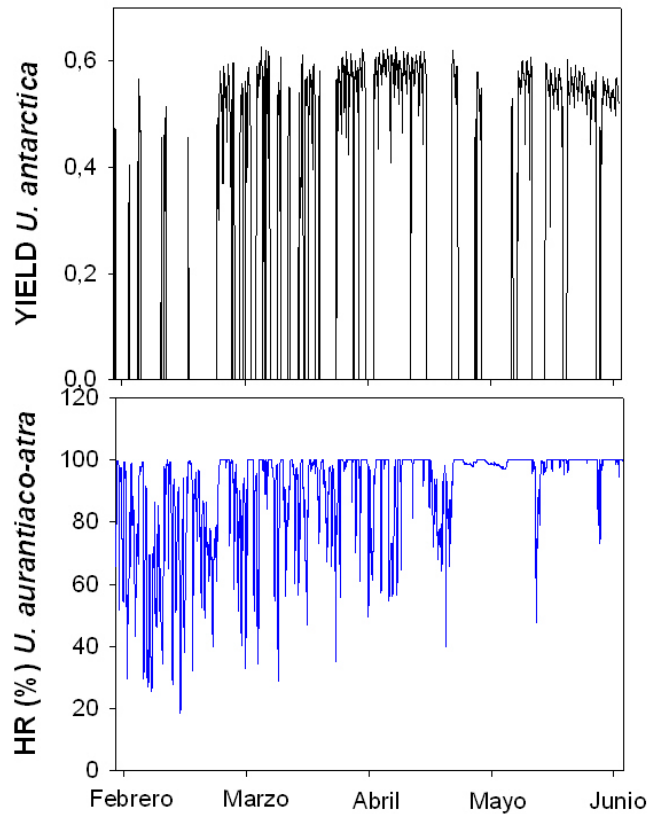


Figura 14. Relación entre la humedad relativa medida en un talo de *U. aurantiaco-atra* y la actividad metabólica en el talo vecino de *U. antarctica*. Las medidas abarcan del 29 de enero al 2 de junio de 2010.

Como se puede observar en la figura anterior (14) durante abril y mayo se producen varios momentos en los que se dan situaciones de saturación o de altos niveles de humedad y el talo permanece inactivo. Estas situaciones parecen coincidir con descensos de temperatura por debajo de los $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para poner de manifiesto este fenómeno hemos ampliado el evento que comprende la última semana de abril y la primera de mayo, donde se producen las temperaturas más bajas de todo el periodo de medida, llegando hasta los $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Figura 15). Aunque durante el evento aparecen diseminados distintos valores de actividad metabólica, estos se producen siempre en los momentos en los que la temperatura asciende por encima de cero o bien a valores bajo cero que rara vez caen más de los $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$ ó $-3,5\text{ }^{\circ}\text{C}$. En los momentos de temperaturas más bajas los valores de Yield bajan claramente a cero indicando un cese de la actividad metabólica. La figura 15B muestra la relación total entre Yield y temperatura.

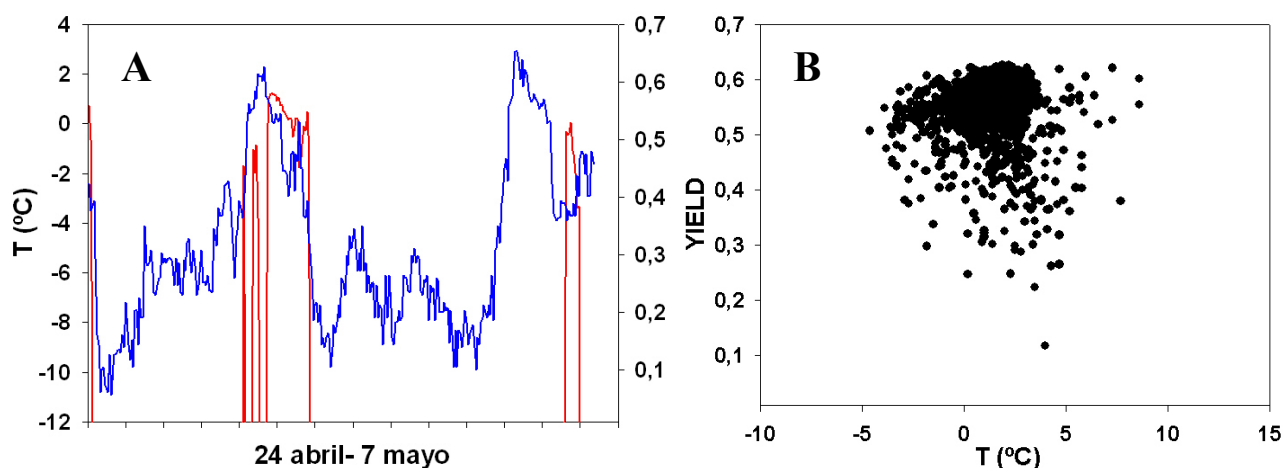


Figura 15. Superposición de la temperatura (azúl) y el Yield (rojo) en *U. antarctica* en isla Livingston durante la última semana de abril y la primera de mayo (15A). Distribución del Yield respecto a la temperatura durante todo el periodo de medida en el mismo talo en Isla Livingston (15B)

La tabla 1 muestra algunos de los parámetros metabólicos y microclimáticos más significativos durante todo el periodo de medida en *U. antarctica*. En negro aparecen representados los valores promedios, máximos y mínimos considerando todos los puntos medidos, mientras que en azul se muestran los valores en condiciones de actividad.

Respecto a los valores promedio se puede apreciar como la fluorescencia basal (F_t), la fluorescencia máxima (F_m') y la temperatura son superiores en situaciones de actividad que en inactividad. El valor promedio de radiación es aproximadamente la mitad en actividad que en inactividad. El promedio respecto al total en la radiación incidente considera todos los puntos de medida de la monitorización, incluyendo aquellos en los que no hay luz. Esto explica los valores tan bajos. A pesar de esto, la clara diferencia entre los valores de actividad e inactividad están transmitiendo información útil sobre la naturaleza de los momentos de actividad fisiológica.

El sumatorio de ETR da una idea de la actividad fotosintética total del talo durante todo el tiempo de monitorización. Aunque no aporta un valor exacto de la actividad fotosintética (es un parámetro que no se puede convertir en fijación real de carbono y el transporte de electrones se puede producir en procesos metabólicos distintos a la

fotosíntesis), si que puede ser usado como referente aproximado de dicha actividad con fines comparativos. La última columna de la tabla representa la diferencia entre actividad e inactividad en el talo durante el estudio, con valores de inactividad ligeramente superiores a la mitad, lo que indica altos niveles de actividad metabólica para la especie en esa localidad en isla Livingston. Algo más de la mitad del tiempo de actividad del talo ocurre en condiciones de oscuridad (51,5%).

Lo más destacable de los valores máximos y mínimos en actividad y en inactividad en la tabla 1 es ver como el talo de *U. antarctica* evita los extremos de temperatura (tanto altos como bajos) y de radiación en condiciones de actividad, donde siempre aparecen condiciones climáticas más moderadas que en inactividad. El valor máximo de yield alcanzado durante la monitorización fue de 0,626.

20 Enero- 2 Junio 2010	F_t F_{tA}	F_m' F_{m'A}	T T_A (°C)	PPFD PPFD_A (μmol m⁻²s⁻¹)	Σ ETR	INAC ACTIV (%)
<i>U. antarctica</i> Livingston	60,8 130	135,8 291,8	0,5 1,1	56 26,3	7359,3	54,4 45,6
MAXIMO	228 228	507 507	15,5 8,6	1649 922	147,2 147,2	
MINIMO	0 23	0 52	-10,5 -4,6	0 0	0 0	

Tabla 1. Valores promedio (primera fila) , máximos y mínimos de fluorescencia basal (F_t), fluorescencia máxima (F_m'), temperatura (T), radiación (PPFD), sumatorio del transporte total de electrones (ΣETR) y porcentajes de actividad en un talo de *U. antarctica* en actividad (A) y en total durante todo el tiempo de monitorización en isla Livingston, Antártida marítima. Los valores en negro representan el promedio de los totales, los valores en azul los promedios de los momentos de actividad.

Las figuras 16A-16D muestran la evolución de los mismos parámetros representados en el caso de Isla Livingston (y durante el mismo periodo de tiempo) con las especies pertenecientes al Valle Garwood, en los Valles Secos de McMurdo, Antártida continental. En total se monitorizaron cuatro talos, tres de *U. aprina* y uno de *Caloplaca sp.* La figura 16 representa los valores de los únicos talos que mostraron actividad metabólica detectable durante la monitorización, uno de los tres de *U. aprina* (valores representados en negro) y el talo del líquen crustáceo *Caloplaca sp.* (en rojo).

El talo de *U. aprina* mostró dos picos claros de fluorescencia al principio del periodo de medida, a finales de enero de 2010 (16A). Este aumento de señal de Fm' se correspondió con dos picos de actividad metabólica en las mismas fechas (16D), por lo que se observa de manera clara que el metabolismo de este talo se puso en funcionamiento de forma breve durante estos eventos. La figura 16A muestra que, pasadas estas fechas concretas, la señal de Fm' (al igual que la de F_t, no mostrado) se mantiene estable en una línea base clara. Esta ausencia de aumento en la señal de fluorescencia se ve corroborada con la ausencia de señales de yield durante el resto del periodo. La línea base correspondiente a la señal de fluorescencia no mostró ninguna correlación definida respecto a la variación de los parámetros de temperatura y luz (16B, 16C), por lo que se puede deducir que las constantes variaciones de estos durante el periodo de medida no afectaron a la señal de fluorescencia. El ligero aumento de la señal de Fm' que se produce a mediados de febrero asociado a una disminución de la temperatura (Figura 16B, marcado con el número 3) apenas llega a las 23 unidades. La escasa intensidad del fenómeno y el hecho de que no vuelve a repetirse a pesar de múltiples cambios de luz y temperatura hasta junio nos lleva a confirmar la mencionada falta de relación entre la señal de fluorescencia y los parámetros microclimáticos estudiados.

En la misma figura 16 aparece representada en rojo la evolución del talo de *Caloplaca sp.* Como se ve en la gráfica 16D, hemos clasificado numéricamente los eventos de yield (del 1 al 4) en *Caloplaca sp.* con el fin de explicar con detalle su existencia. La señal de Fm' muestra picos claros a finales de enero (16A), algunos coincidentes con los aumentos de señal de Fm' en el talo de *U. aprina*, y con la presencia de distintos aumentos en la señal de yield (eventos 1 y 2, figura 16D). La coincidencia de los eventos de actividad en los dos talos de distintas especies refuerza la idea de que realmente se debió producir una situación con disponibilidad de agua en esas fechas que activó el metabolismo de estos dos talos. Ninguno de estos dos eventos aparece asociado a cambios específicos de luz o de temperatura, como se puede observar en las figuras 16B y 16C.

En la figura 16D hemos agrupado bajo el evento de actividad número 3 los escasos picos de yield que se generan en entre finales de febrero y principios de marzo. Justo en esas fechas de produce una subida en la línea base de la señal de Fm', (16A) pero dentro

de ese aumento, los picos de F_m' asociados a los valores de yield no aparecen tan definidos como en los casos de los eventos 1 y 2. También merece la pena destacar que las diferencias entre los valores de F_t (no mostrados) y los de F_m' , son menores que en el caso de los eventos 1 y 2, donde el aumento de la señal de fluorescencia máxima es mayor.

Como se puede apreciar en las figuras 16B y 16C, el evento 3 está asociado a un descenso de la temperatura durante todo el periodo hasta aproximadamente los $-10\text{ }^\circ\text{C}$ y a una disminución de la radiación incidente, con máximos de $500\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ cuando antes del evento sobrepasaban claramente los $1000\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$. Tras la finalización del periodo de actividad metabólica marcado como evento 3, los valores microclimáticos vuelven a subir hasta aproximarse bastante a lo medido antes del mismo.

El evento 4, por último, aparece como una prolongada señal de yield (16D) entre finales de marzo y principios de abril, con temperaturas cercanas a los $-30\text{ }^\circ\text{C}$ y valores de radiación que apenas sobrepasaron los $120\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ (16B y 16C). El evento es el más prolongado de todos, está asociado a un nuevo aumento en los valores de la línea base de F_m' sin picos claros de nuevo (16A), y vuelve a coincidir con un descenso brusco de la temperatura (16B) y con una disminución (esta vez irreversible) de la radiación incidente. Al igual que en el evento 3, las diferencias entre los valores de F_t y F_m' observadas son muy escasas.

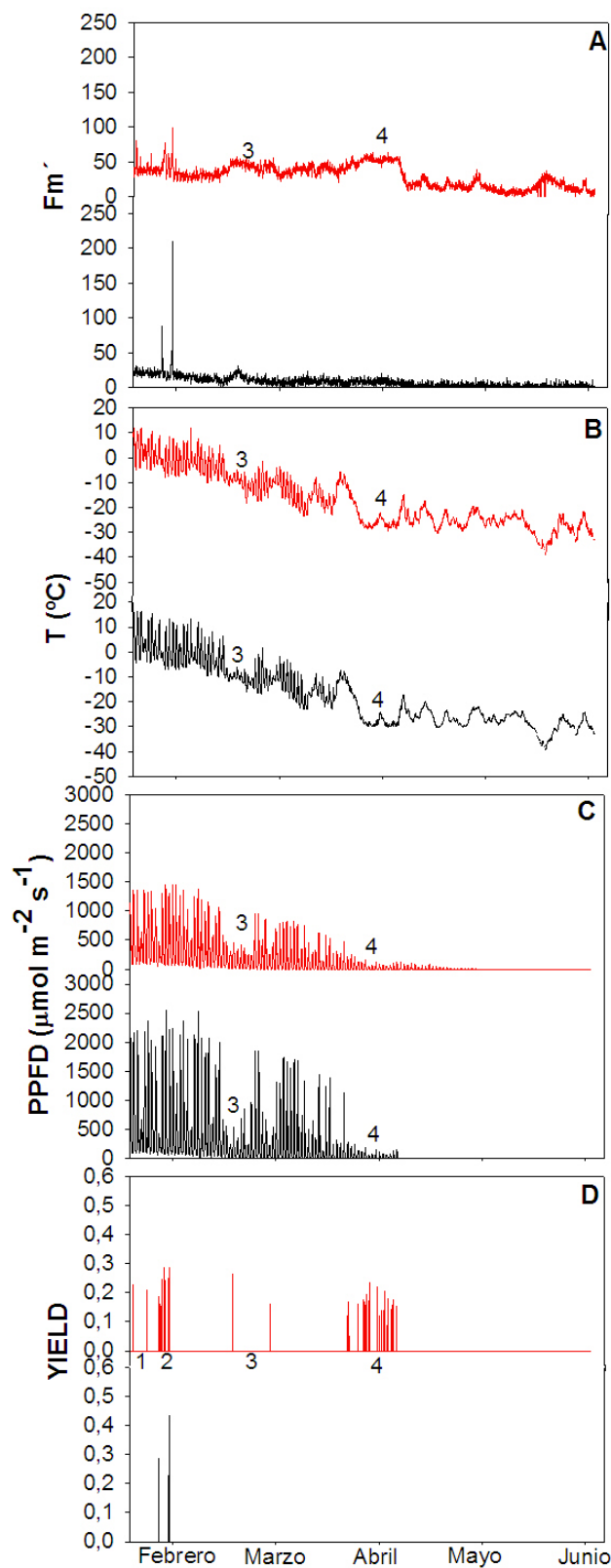


Figura 16A-16D. Evolución de la fluorescencia máxima (16A), la temperatura del talo (16B), la radiación incidente en el talo (16C) y la actividad metabólica (16D) en un talo de *U. aprina* (en negro) y en otro de *Caloplaca sp.* (en rojo) durante todo el periodo de medida en el valle Garwood, Valles Secos de McMurdo, Antártida continental.

Debido a la relevancia de la detección de los eventos de actividad metabólica en un entorno tan extremo como los Valles Secos, hemos decidido representar ampliados los más representativos. De esta manera podremos interpretarlos con mayor precisión.

El evento 1 (17A-17D) se produce exclusivamente en *Caloplaca sp.*, y abarca los días 21, 22, 23, 24 y 25 de enero. El día 21 se pudieron apreciar algunos momentos de actividad, los días 22, 23 y 24 no se detectó ningún valor de yield y el 25 se observa de nuevo una situación con disponibilidad de agua y, por tanto, actividad. Como se puede apreciar en los valores de F_m' (17A) la mayoría de los picos se producen en situaciones de descenso de radiación incidente, es decir, durante la madrugada. Los picos son nítidos y se levantan de una línea base bien definida. Merece la pena destacar que durante este evento todas las situaciones de actividad se inician durante la madrugada, con la temperatura y la radiación en sus momentos más bajos. En el caso del día 21 de enero se produce un pico de yield que cierra el episodio de actividad a primera hora de la mañana, con un aumento claro de la radiación y la temperatura.

El evento 2 (18A-18D) abarca del 28 al 31 de enero, y presenta coincidencias en el yield de las dos especies. Los episodios de actividad en *U. aprina* se producen principalmente durante el día y a radiaciones muy altas en algunas ocasiones, con el talo activo de forma puntual por encima de los $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de radiación y temperaturas sobre cero o no muy por debajo de cero. *Caloplaca sp.* repite mayoritariamente el patrón observado en el evento 1, con inicio de actividad durante la madrugada y picos de actividad normalmente a primera hora de la mañana coincidiendo con un aumento puntual de radiación y temperatura. El primer día del evento se produjo un descenso brusco de la radiación y la temperatura durante las primeras horas del día. Este descenso llama especialmente la atención si se observa la regularidad en la evolución del microclima en el resto de días. Los picos de F_m' vuelven a aparecer definidos y netamente superiores a los valores de F_t .

Los eventos 3 y 4 (19 y 20 A-D) también aparecen representados con detalle con el fin de entender mejor los resultados principales ya comentados en la gráfica general (16A-16D). Los eventos de actividad no se inician mayoritariamente durante la madrugada como anteriormente. Esto es especialmente pronunciado en el evento 4, con actividad a distintas horas del día.

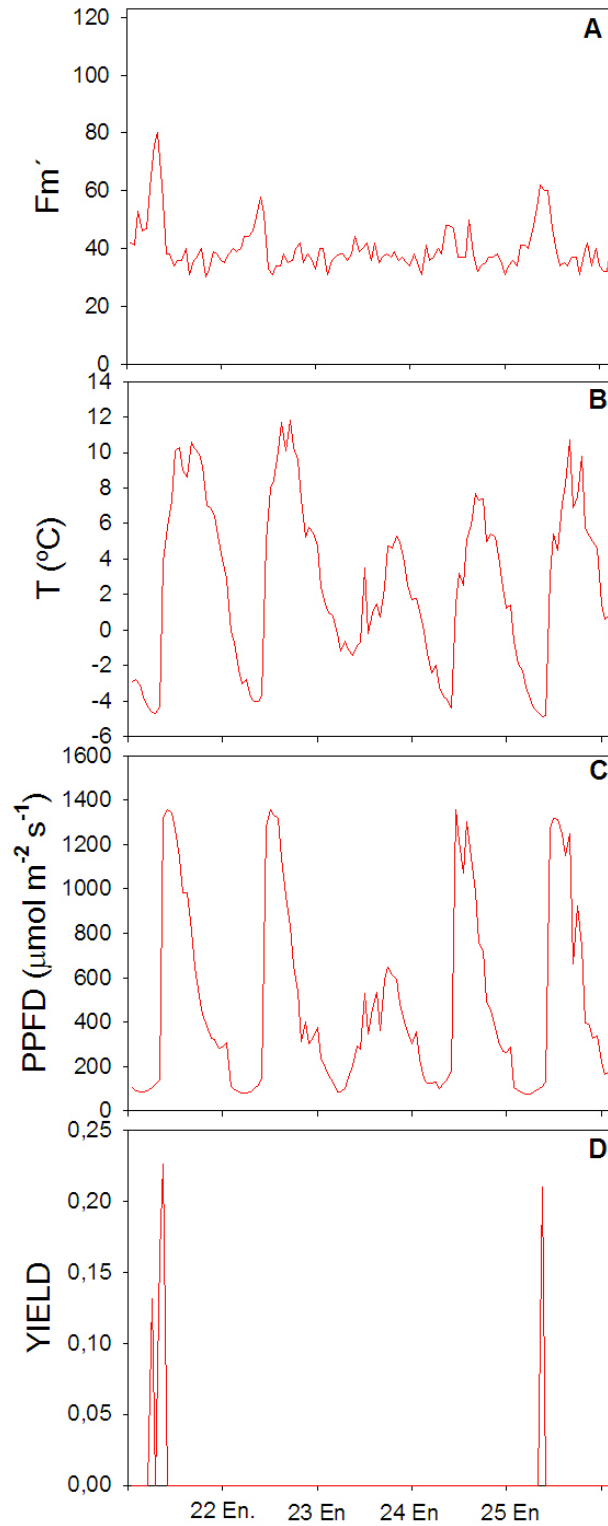


Figura 17A-17D. Evolución de *Caloplaca sp.* durante el evento 1 (21-25 de enero). Los parámetros representados son los mismos y siguen el mismo orden que los mostrados en las gráficas generales.

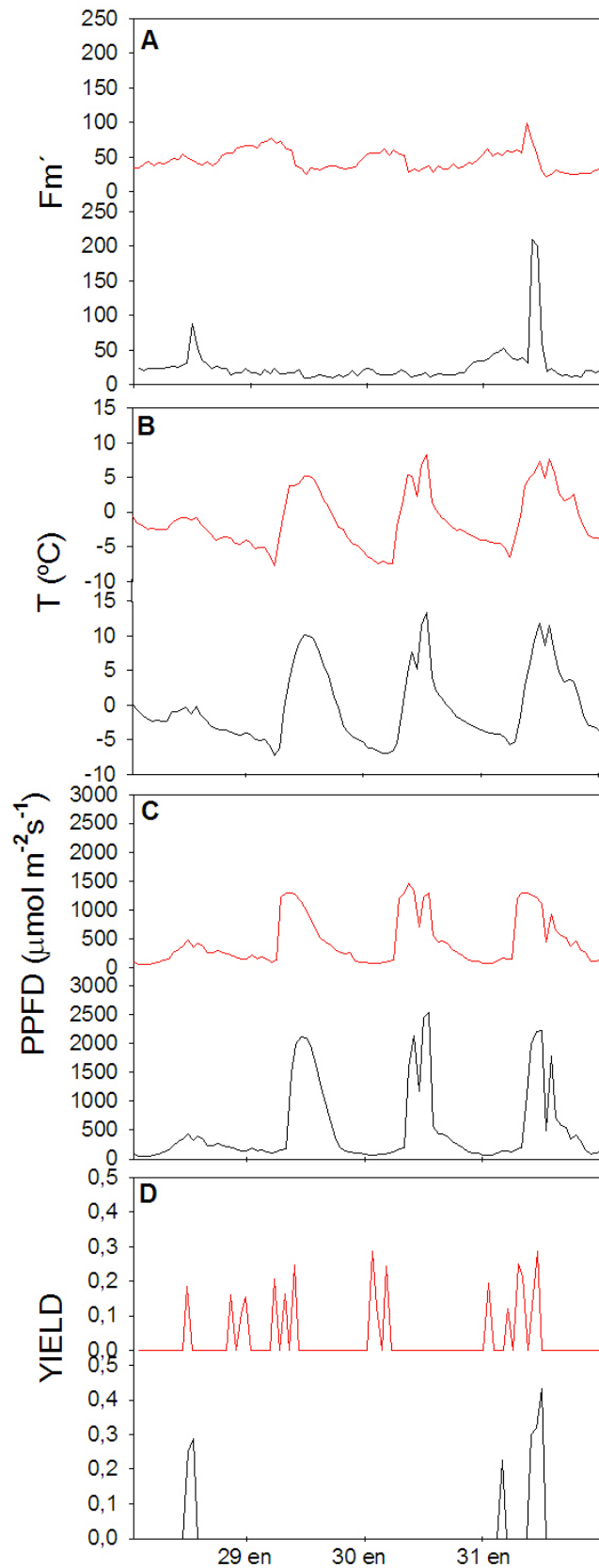


Figura 18A-18D. Evolución de *U. aprina* (negro) y *Caloplaca sp.* (rojo) durante el evento 2 (28 – 31 de enero). Los parámetros representados son los mismos y siguen el mismo orden que los mostrados en las gráficas generales.

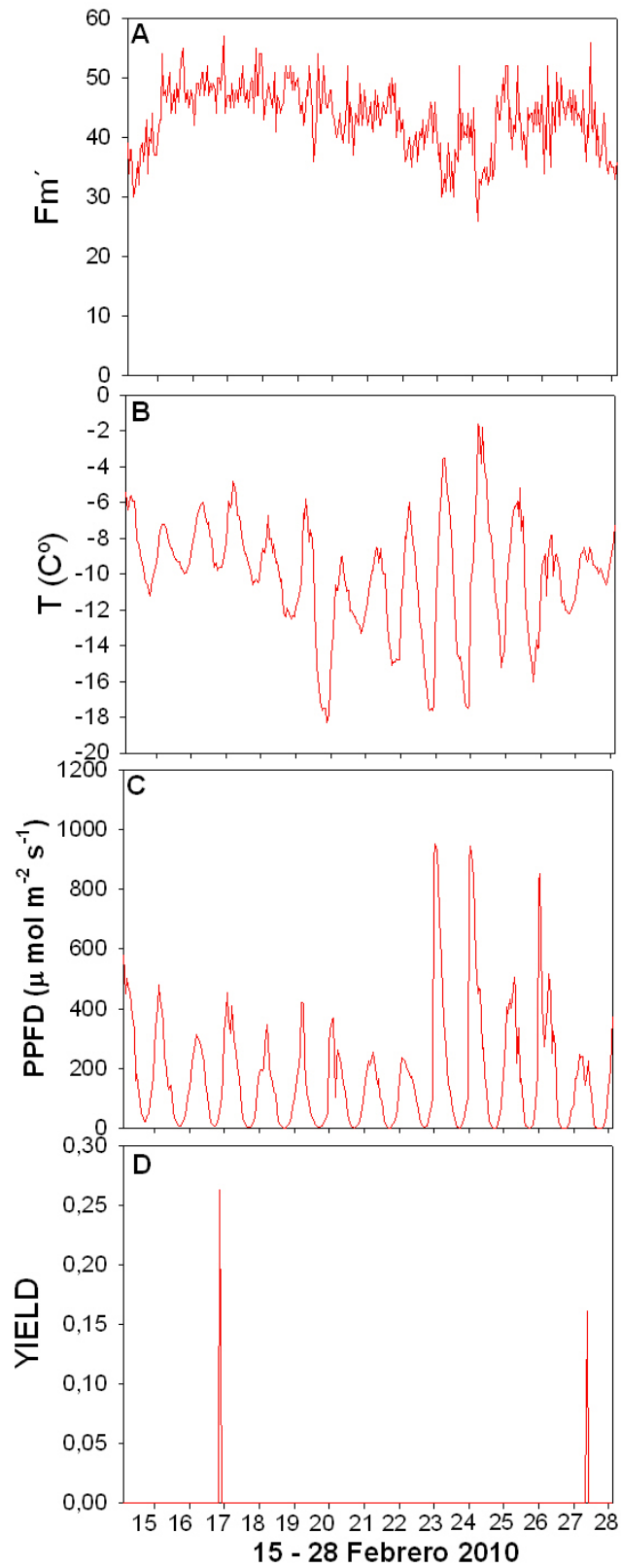


Figura 19A-19D. Evolución de *Caloplaca* sp. durante el evento 3 (15-28 de febrero). Los parámetros representados son los mismos y siguen el mismo orden que los mostrados en las gráficas generales.

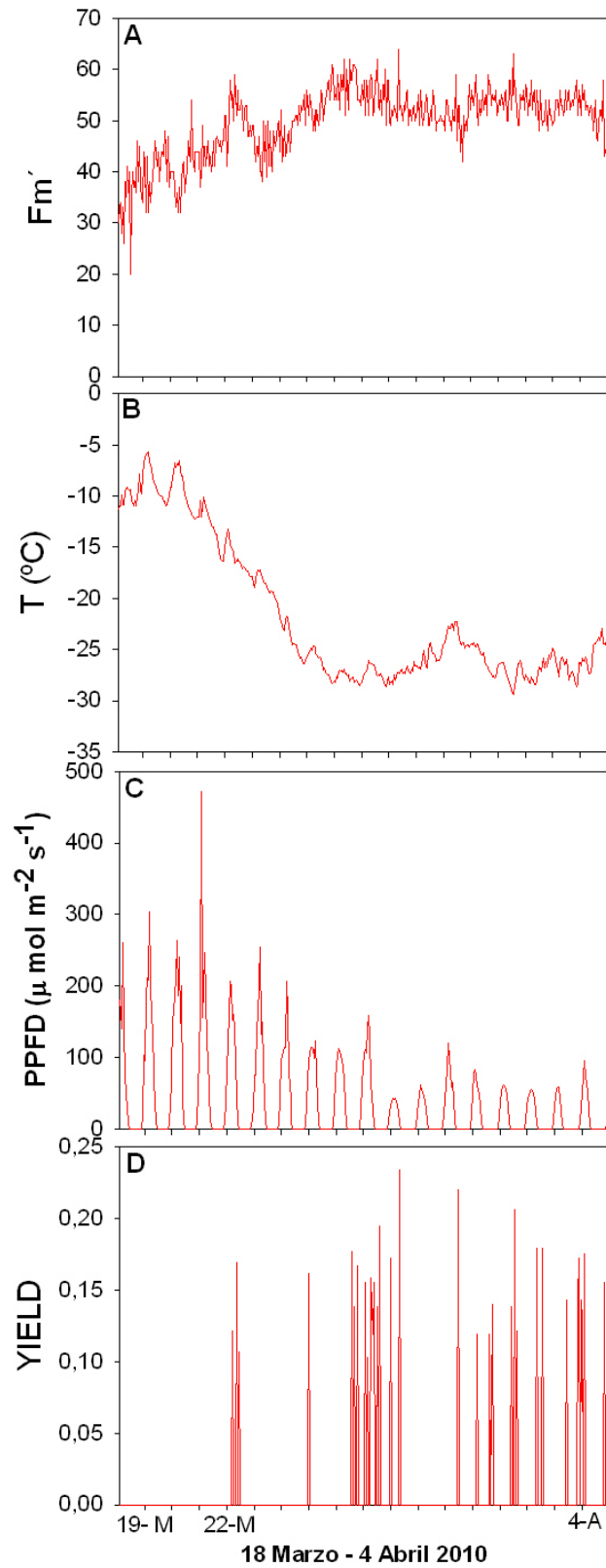


Figura 20A-20D. Evolución de *Caloplaca sp.* durante el evento 4 (22 marzo-4 de abril). Los parámetros representados son los mismos y siguen el mismo orden que los mostrados en las gráficas generales.

Para finalizar con las representaciones gráficas de los meses en los que se ha llevado a cabo el estudio, las figuras 21A-D y 22A-D, muestran la evolución de F_t , F_m' , T y PPFD en los dos talos de *U. aprina* que no presentaron actividad metabólica en ningún momento. Como se aprecia en ambas figuras, los cambios bruscos de temperatura y radiación desde el 20 de enero al 2 de junio (los mismos que los representados en los otros dos talos) no generan ningún cambio reseñable en las líneas base de las señales de F_t y F_m' .

La tabla 2 muestra los valores promedio de los cuatro talos monitorizados en los Valles Secos, los valores del sumatorio total de las tasas de transporte electrónico y los porcentajes de actividad. En el caso de los dos talos que mostraron actividad metabólica, se distinguen los valores promedio totales (en negro) de los valores promedio exclusivamente durante los periodos de actividad (en azul). En los porcentajes de actividad se puede observar la diferencia entre la actividad del único talo de *U. aprina* activo y el talo crustáceo de *Caloplaca sp.* La baja actividad de la foliácea *U. aprina* se corresponde bien con la ausencia de la misma observada en los otros dos talos de esta especie. Mientras *U. aprina* presentó el 100% de su periodo de actividad bajo luz, *Caloplaca sp.* estuvo un 32% del tiempo de actividad en condiciones de oscuridad. Si comparamos los valores de actividad de *U. aprina* en la Antártida continental frente a los mostrados por el talo de *U. antarctica* en la Antártida marítima observamos diferencias de dos órdenes de magnitud.

Los valores del sumatorio del transporte de electrones también aparecen en dicha tabla. Como se puede observar, la tasa de *Caloplaca sp.* es ligeramente inferior a la de *U. aprina* durante el mismo periodo, lo cual es llamativo porque el porcentaje de actividad de la segunda es menor. Si consideramos los valores comentados de sumatorio de ETR para *U. antarctica* en isla Livingston observamos unos valores muy superiores pero con tiempos de actividad mucho mayores. Respecto a los valores promedio de F_t , F_m' , T y PPFD, vemos diferencias sustanciales en los dos últimos. En el caso de *U. aprina*, la temperatura en los escasos momentos de actividad registrados es claramente superior a la temperatura media total. También es significativa la alta radiación promedio que mostró el talo durante dicha actividad, en torno a 6 veces más que el observado en *Caloplaca sp.* para valores totales medios similares entre ambos.

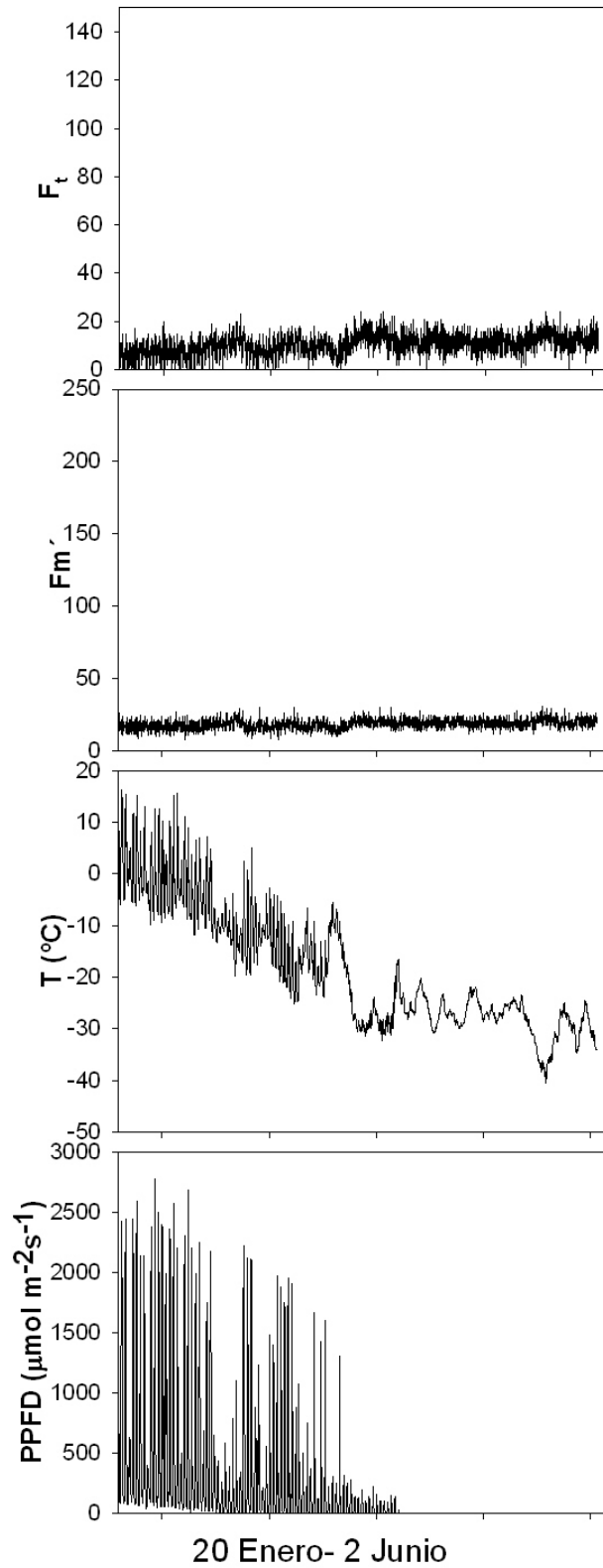


Figura 21 A-D. Evolución de fluorescencia basal (A), fluorescencia máxima (B), temperatura (C) y radiación incidente (D) en el talo número 2 de *U. aprina* monitorizado en el valle Garwood, Valles Secos de McMurdo. Los datos corresponden a todo el periodo de medida

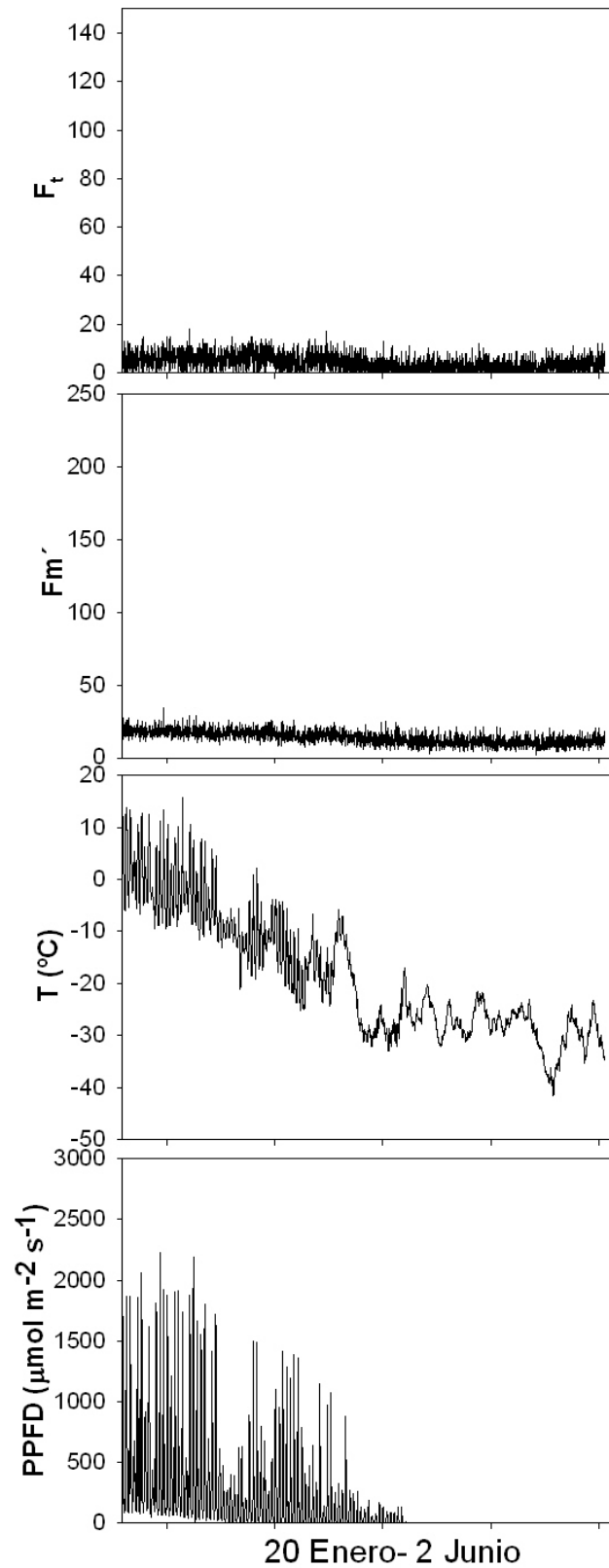


Figura 22 A-D. Evolución de fluorescencia basal (A), fluorescencia máxima (B), temperatura (C) y radiación incidente (D) en el talo número 3 de *U. aprina* monitorizado en el valle Garwood, Valles Secos de McMurdo. Los datos corresponden a todo el periodo de medida

Caloplaca sp. mostró valores mucho más similares en la radiación en actividad respecto al total. En relación a la temperatura, la media en actividad resultó prácticamente igual que la media total, lo que muestra un comportamiento distinto respecto a *U. aprina*.

	F_t F_{tA}	Fm' Fm'_A	T T_A (°C)	PPFD $PPFD_A$ ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	Σ ETR	INACT ACTIV (%)
<i>U. aprina 1</i>	5,7 77	8,4 110,7	-18 3,6	160,1 1214,7	1043,8	99,8 0,2
<i>U. aprina 3</i>	10,4	18,5	- 18,6	187,7	-	100 0
<i>U. aprina 4</i>	3,9	13,7	- 18,8	136,7	-	100 0
<i>Caloplaca sp</i>	24 49,8	29,9 60	- 17,3 -17	129 216,2	977,8	98,3 1,7

Tabla 2. Valores promedio de fluorescencia basal (F_t), fluorescencia máxima, (Fm'), temperatura del talo (T), radiación incidente en las proximidades del talo (PPFD), valores de sumatorio del transporte electrónico total y porcentajes de actividad e inactividad en los cuatro talos medidos en el valle Garwood, Valles Secos de McMurdo. Los valores en negro representan el promedio de los totales, los valores en azul los promedios de los momentos de actividad.

La tabla 3 es similar a la 2 pero representa exclusivamente los valores máximos y mínimos de los dos talos que presentaron actividad durante la monitorización. De nuevo aparecen representados los valores respecto al total y respecto a las situaciones de actividad metabólica. Merece la pena destacar los altos valores máximos de radiación en actividad tanto en *U. aprina* como en *Caloplaca sp.*, especialmente en la primera, que refuerza la sensación ya mostrada de elevada fototolerancia en los Valles Secos. Las temperaturas máximas en actividad sobrepasan claramente los 0 °C en los dos casos, llamando especialmente la atención en el caso de *U. aprina*. Los valores máximos y mínimos totales de temperatura en las dos especies muestran bien la naturaleza de los contrastes climáticos en esta región, con una variación térmica en los dos talos de más de 50 °C.

El valor de temperatura mínima en actividad de *Caloplaca* es sorprendente y merece un análisis en profundidad. La fuerte diferencia respecto al valor de temperatura mínima en actividad obtenido en *U. aprina* indica estrategias adaptativas distintas entre ambas.

	F_t F_{tA}	Fm' Fm'_A	T T_A (°C)	PPFD $PPFD_A$ ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)
<i>U. aprina</i> 1	147	210	16,5	2545
Máximos	147	210	11,9	2220
<i>U. aprina</i> 1	0	0	-39,2	0
Mínimos	34	52	-4,2	145
<i>Caloplaca</i> sp.	95	99	12,1	1458
Máximos	68	80	5,7	1324
<i>Caloplaca</i> sp.	0	0	-39	0
Mínimos	40	54	-29,4	0

Tabla 3. Valores máximos y mínimos de fluorescencia mínima (F_t), fluorescencia máxima, (Fm'), temperatura del talo (T) y radiación incidente en las proximidades del talo (PPFD) en los talos de *U. aprina* y *Caloplaca* sp. que mostraron actividad metabólica durante la monitorización. Los valores en negro representan los valores respecto a los totales, los valores en azul respecto a los momentos de actividad.

Por último, los valores de yield fueron inferiores a los observados en el talo de *U. antarctica* en isla Livingston (el yield medio en actividad fue 0,544). Considerando las dos especies de los Valles Secos juntas, sólo se obtuvo un valor de yield superior a 0,4 en una ocasión, presentando la gran mayoría de sus valores entre 0,1 y 0,3. Los valores medios en actividad fueron de 0,302 para *U. aprina* y 0,170 para *Caloplaca* sp. Ambos están lejos de los valores de yield considerados óptimos para líquenes.

4. DISCUSIÓN

Uno de los resultados más determinantes obtenidos en este capítulo tiene que ver con las claras diferencias en los periodos de actividad apreciados en los distintos líquenes de las dos localidades monitorizadas. Por un lado, el talo de *U. antarctica* en isla Livingston mostró una actividad superior en dos órdenes de magnitud respecto al único talo activo (de tres monitorizados) de *U. aprina* en los Valles Secos durante el mismo periodo. Por otro lado, aunque la característica más destacable en los Valles Secos son los bajos porcentajes generales de actividad, el talo crustáceo de *Caloplaca* mostró un comportamiento distinto respecto al resto de talos de *Umbilicaria* en las dos localidades.

La diferencia respecto a *U. antarctica* en Livingston es más que evidente debido a las contrastadas diferencias climáticas entre ambos lugares de medida. Las diferencias observadas entre *Caloplaca sp.*, y los talos de *U. aprina* en los Valles Secos apuntan más a posibles diferencias microclimáticas y estructurales derivadas de su posición en la roca y de sus distintos biotipos respectivamente.

El elevado periodo de actividad en isla Livingston está íntimamente relacionado con la abundante disponibilidad de agua característica de la Antártida marítima (Schroeter et al. 2010; Green et al. 2011a). Esto se ve reforzado por las coincidencias observadas entre la saturación del sensor de humedad relativa en el talo vecino de *U. aurantiaco-atra* (indicador de precipitación) y la actividad observada en *U. antarctica* durante el periodo de medida. Hasta el día 24 de febrero no se detectó la mencionada saturación de humedad, por lo se que puede deducir que no se produjeron precipitaciones importantes hasta la fecha. El periodo coincide con valores de yield ligeramente más bajos que los obtenidos a partir del día 24 de febrero (0,46 frente a 0,56 de media en ambos periodos) y, principalmente, con menor duración de la actividad una vez iniciada la misma. La explicación más probable para estos eventos es la activación a través de una atmósfera saturada de humedad, un fenómeno de sobra probado en líquenes (Lange et al. 1986; Pintado y Sancho 2002), con varios ejemplos ratificados en la Antártida marítima (Kappen y Redon 1987). Los altos valores medios anuales de humedad relativa del aire en la Antártida marítima (Longton 1988) junto a la capacidad que presentan muchos líquenes de hidratarse a partir de humedad ambiental a potenciales hídricos muy bajos (Green et al. 2011c), parecen indicadores suficientes para aceptar el fenómeno en Livingston. Aunque los líquenes pueden alcanzar contenidos hídricos muy próximos al máximo a través del equilibrio con la humedad atmosférica, es habitual obtener valores de actividad fotosintética inferiores a los obtenidos hidratándolos con agua líquida (Schroeter 1994). Esto podría estar detrás de los valores de yield ligeramente inferiores y de la escasa duración de los fenómenos de actividad hasta esta fecha (probablemente relacionados con contenidos hídricos subóptimos derivados de la forma de hidratación). Otra posibilidad es que los fenómenos de actividad mencionados se produzcan por chubascos débiles y esporádicos, que no lleguen a saturar el sensor de humedad en el talo de *U. aurantiaco-atra*.

A partir del 24 de febrero los valores medios de yield y la duración de los eventos de actividad aumentan. El fenómeno debe estar relacionado con una mayor disponibilidad de formas de hidratación (bien en forma de nieve o en forma de agua líquida, muy habitual durante el verano), lo que se refuerza con una elevada frecuencia de saturación del sensor de humedad en *U. aurantiaco-atra*. Estos eventos parecen garantizar una hidratación intensa del talo, por lo que la actividad se mantiene durante periodos más prolongados con valores de yield más altos. Para entender la mayor duración de los eventos de actividad es imprescindible mencionar también el descenso de la radiación incidente, que empieza a hacerse más patente al final del verano (mediados de marzo, 13C). La disminución de la radiación provoca que la hidratación de los talos se prolongue durante más tiempo, y por tanto duren más los periodos de actividad.

Las gráficas 13, 14 y 15 muestran que hay otro factor importante aparte de la disponibilidad de agua para entender el funcionamiento de *U. antarctica* en Livingston. Este factor es la temperatura. El valor mínimo en actividad (-4,6 °C) indica que por debajo de la misma se produce una suspensión metabólica, al menos en lo que respecta a la actividad fotosintética. Aunque la temperatura mencionada fue el valor límite, es realmente raro encontrar actividad por debajo de los -3 °C ó -3,5 °C. Schroeter et al. (1994) mostraron que la actividad fotosintética de *U. aprina* en la Antártida continental disminuía drásticamente al bajar de los -3 °C, asociando este fenómeno al efecto de la deshidratación causada por la formación de hielo extracelular. Los valores obtenidos aquí para *U. antarctica* parecen indicar intolerancia fisiológica a la congelación, por lo que se puede subrayar que la especie no presenta una adaptación marcada a las bajas temperaturas. La adaptación a un entorno en el que los inviernos no son especialmente fríos parece óptima.

Se puede observar también que la actividad permanece desde el inicio hasta el final de la monitorización. La disminución de la radiación de finales de verano no va acompañada de una bajada suficiente de la temperatura como para detener la actividad metabólica de forma continuada, por lo que esta permanece. Algunos trabajos de investigación anteriores han detectado actividad metabólica de líquenes fruticulosos durante prácticamente todo el año en la Antártida marítima (Schroeter et al. 2000, Schroeter et al. 2010). Esta actividad prolongada durante todo el año puede provocar pérdidas por respiración que podrían generar problemas en el balance anual de carbono

en las especies de la zona. Este fenómeno podría ser especialmente relevante en posibles escenarios de cambio climático en los que aumente la temperatura media anual, sobre todo teniendo en cuenta que la Península Antártica está considerada una de las regiones del mundo con mayor aumento de temperatura durante las últimas décadas (Sancho et al. 2007b).

En los Valles Secos de McMurdo hemos encontrado estrategias adaptativas distintas, tanto si la comparamos con la tendencia observada en la Antártida marítima como si comparamos los dos biotipos distintos monitorizados en el mismo valle. En relación a esto último, de cuatro talos monitorizados (tres de *U. aprina* y uno de *Caloplaca sp.*), dos de ellos no mostraron ningún tipo de actividad durante el periodo de monitorización. Esta ausencia de actividad durante la segunda mitad del verano y el resto del periodo de monitorización no resulta sorprendente, ya que algunos trabajos realizados en la Antártida continental (algunos de ellos con la misma *U. aprina*) apuntan al final de la primavera y al principio del verano como la época del año en la que se acumula la mayor parte de la actividad, coincidiendo con fenómenos de deshielo al aumentar la radiación (Hovenden et al. 1994; Pannewitz et al. 2003a). El escaso porcentaje de actividad encontrado en el talo de *U. aprina* que mostró valores de yield en algún momento dentro del periodo de estudio apoya la idea de escasa actividad a partir de la segunda mitad del verano en muchos líquenes antárticos.

Por tanto, la principal razón por la que esa pequeña (y exclusiva) población de *U. aprina* esté presente en el fondo del valle puede ser el aprovechamiento del derretimiento del hielo y la nieve acumulados durante el invierno en las partes altas del valle. Este fenómeno parece confirmarse por observaciones de campo, que mostraron un surco claro de agua de escorrentía desde las colinas hasta la roca donde se encontraban los talos. La disponibilidad de agua líquida durante algunos días al año, junto a un aumento de la radiación característico de la época, podría ser suficiente para justificar la presencia de estos líquenes foliáceos en un entorno donde sólo existen formas crustáceas mucho más pequeñas y menos desarrolladas. La ganancia de carbono durante este periodo, junto a eventos esporádicos de activación en momentos puntuales y una estrategia de resistencia el resto del año parece ser el método que sigue la población para sobrevivir en el fondo del valle. Estrategias adaptativas similares a esta han sido

mencionadas para la misma especie en zonas costeras de la Antártida continental (Sancho et al. 2003).

A pesar de todo lo mencionado, los talos pueden presentar eventos esporádicos de actividad fuera de la época más productiva. Como ejemplo usamos el talo que mostró actividad a finales del mes de enero, entre el 28 y 31 (figura 18 A-D). Como se aprecia en estas figuras, el día 28 de enero presentó un descenso claro de la radiación y la temperatura. Durante este descenso, y posteriormente al mismo, se producen aumentos claros de F_m' que generan una señal de actividad metabólica, por lo que lo más probable es que se produjera una nevada esporádica en forma de ventisca que activara el talo. La actividad de esta especie bajo la nieve ya ha sido confirmada con anterioridad (Kappen et al. 1998). Tras dos días sin actividad se produce un nuevo evento en *U. aprina*, con valores de yield altos y radiación muy elevada, por lo que lo más probable es que algún resto de nieve derretida activase de nuevo el talo de manera esporádica. La actividad por agua líquida podría explicar el alto valor de yield, y el hecho de que el fenómeno fuera más prolongado en el tiempo. La ausencia de actividad en los otros dos talos de *U. aprina* podría ser debida a meras cuestiones de posición en un evento esporádico y casual. Este evento de finales de enero cierra el periodo activo en los tres talos de la especie, ya que no presenta nuevos episodios de actividad durante toda la monitorización. El hecho de que poco después de finalizar nuestro periodo de estudio se inicie el invierno antártico, con temperaturas inferiores a $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ y ausencia total de luz durante varios meses nos invita a pensar que la población de *U. aprina* monitorizada inició un largo periodo de letargo hasta la primavera siguiente.

El talo de *Caloplaca sp.* mostró también un porcentaje de actividad muy bajo, por lo que su principal estrategia durante el periodo de medida es, al igual que en el caso de las *Umbilicarias*, la resistencia ante las duras condiciones ambientales. A pesar de esto, una observación detallada permite intuir ciertas estrategias adaptativas distintas. Los eventos de actividad 1 y 2 en esta especie (17 y 18 A-D) son, al igual que en *U. aprina*, muy claros, ya que los picos de F_m' que generan los valores de yield parten de líneas base bien definidas y son amplios. Aparte de esto siguen un patrón definido, que implica mayoritariamente inicio de actividad durante la madrugada a temperaturas bajo cero y con niveles de radiación más bajos, para finalmente generar un pico de yield a primeras horas de la mañana coincidente con un incremento de la radiación incidente asociado a

temperaturas superiores a 0 °C. Nuestra interpretación del fenómeno es que altos valores de humedad relativa durante la noche a temperaturas ligeramente inferiores a 0 °C pueden generar un depósito de capas fina de hielo en la superficie del talo que puede generar actividad metabólica. En consonancia con nuestros resultados, Büdel et al. (2008) mostraron la capacidad de comunidades de cianobacterias endolíticas de hidratarse y activar su metabolismo a partir de rocío y escarcha en los mismos Valles Secos. Kieft (1988) propuso a los líquenes como organismos susceptibles de presentar actividad de formación de núcleos de hielo (ice nucleation activity, INA) según la cual estos organismos, a temperaturas bajo cero superiores a -5 °C, podrían estimular la toma de humedad atmosférica favoreciendo la condensación y/o causando que la deposición de hielo del vapor de agua ocurra antes al entrar la temperatura en valores negativos. Estas capas de hielo, aparte de poder activar al talo durante la noche, se pueden convertir en agua líquida al subir la radiación y aumentar la temperatura a primera hora de la mañana, produciéndose así los picos de actividad habituales de estos dos eventos. Para entender este fenómeno es necesario recordar que los líquenes han demostrado capacidad de activar su metabolismo a potenciales hídricos muy bajos (Nash et al. 1990; Green et al. 2008) y que algunos estudios en la Antártida continental han demostrado ejemplos de hidratación y actividad metabólica a partir de vapor de agua tomado directamente de la nieve o del hielo (Schroeter et al. 1994; Scheidegger et al. 1995).

Los eventos 3 y 4 en *Caloplaca sp.* (19 y 20 A-D) tienen en común líneas bases más inestables que dificultan interpretar con claridad los fenómenos de actividad. Mientras el evento 3 es prácticamente insignificante debido a su escasa relevancia, el 4 si que muestra repetidas situaciones de actividad tras pasar los dos filtros aplicados. Ambos coinciden con claras disminuciones de temperatura y radiación (ver figura 16 A-D) por lo que parece que hayan coincidido con grandes nevadas cuya duración se prolongue por varios días. Para confirmar estas suposiciones accedimos a una cámara fotográfica colocada en el valle contiguo (valle Miers). Esta cámara realizaba varias fotografías diarias del fondo del valle, por lo que al final se puede ver en forma de película la evolución del clima durante todo el año. Aunque sean valles distintos, se asume que si bien pequeñas nevadas podían ser características de cada uno de ellos, grandes eventos de nieve debían ser comunes a ambos. El inicio y el final de estos dos eventos en Garwood coinciden de manera concreta con dos fuertes nevadas en Miers. Al producirse a temperaturas más bajas y a radiaciones menos intensas que los eventos 1 y 2, la

presencia de agua líquida parece totalmente descartada, por lo que la única manera de poder hidratarse parece a partir de vapor de agua tomado de nieve o hielo. Volviendo a la teoría de la estimulación de la formación de núcleos de hielo mencionada anteriormente, algunos autores han propuesto que la formación coordinada de hielo extracelular en líquenes puede presentar un efecto protector sobre los mismos, evitando congelaciones en el interior celular que provocarían daños metabólicos (Schroeter et al. 1994; Bjerke 2009).

Nunca hasta ahora, ni en campo ni en laboratorio, se había medido actividad metabólica a una temperatura cercana a -30°C , por lo que este evento tendría un especial significado desde el punto de vista fisiológico. Respecto a la tolerancia de la actividad metabólica de líquenes a bajas temperaturas, existe soporte bibliográfico que puede apoyar estos últimos datos. Schroeter et al (1994) mostraron que los líquenes de la Antártida continental podían ser productivos fuera de la temporada principal de actividad metabólica, midiendo intercambio gaseoso real a -17°C . Los mismos autores afirmaron que probablemente hubo fijación de carbono a temperaturas más bajas, pero que esta no pudo ser registrada por problemas técnicos. Kappen et al. (1995) indicaron que la temperatura más baja a la que se ha medido intercambio gaseoso fue -24°C en un experimento de laboratorio llevado a cabo por Lange y Metzner (1965). La casi total ausencia de especies foliáceas en el fondo del valle Garwood puede indicar que los talos crustáceos de géneros como *Caloplaca*, *Lecidea* o *Buellia* (para nada frecuentes pero si algo más abundantes) pueden presentar habilidades adaptativas extra que les permitan sobrevivir allí. Kappen (1988) propuso que las formas crustáceas pueden aumentar su frecuencia relativa según el clima se va volviendo más árido, ya que su área superficial está reducida al mínimo. Estas estrategias podrían estar relacionadas con la capacidad de activarse a potenciales hídricos bajos y temperaturas muy por debajo del punto de congelación. La presencia de actividad metabólica con luz y valores de ETR nos indica que se dan las bases teóricas para el desarrollo de la fotosíntesis a temperaturas inferiores a -25°C . Estos momentos de fijación de carbono fuera del verano podrían tener como objetivo la reparación de estructuras dañadas por la exposición a la desecación, alta radiación solar y bajas temperaturas. Una alternativa más probable es que en esos momentos tardíos de actividad, el talo de *Caloplaca sp.* ponga en marcha mecanismos de disipación de energía en forma de calor (“quenching” ó atenuación no fotoquímica) con la finalidad de evitar la activación de la ruta fotoquímica en unas

condiciones de temperaturas muy bajas, donde la luz incidente podría generar daños en el aparato fotosintético. Pannewitz et al. (2003a) indicaron que parte de los valores de ETR encontrados en un musgo de los Valles Secos (Valle Taylor) podían deberse a mecanismos de disipación de energía iguales a los mencionados.

Aunque la bibliografía indica que nuestras medidas de actividad a la temperatura mencionada son factibles, la mayor inestabilidad de las líneas bases de fluorescencia en los eventos 3 y 4, la baja señal de fluorescencia generada por el talo de *Caloplaca sp.* y el hecho de tener sólo un talo crustáceo monitorizado, nos hace considerar estos resultados con precaución. Los resultados invitan a llevar a cabo una monitorización extensa de especies crustáceas en el fondo de los valles con el fin de confirmar estos mecanismos de adaptación a condiciones tan extremas.

El análisis de los valores obtenidos respecto al tiempo total de medida y los valores obtenidos exclusivamente en actividad (tablas 1, 2 y 3) nos pueden ayudar a entender mejor las estrategias adaptativas de cada especie y las diferencias entre ellas y entre localidades. Los talos de las dos especies de *Umbilicaria* poseen algunos rasgos morfológicos comunes; el talo monófilo, la presencia de abundantes rizinomorfos y la reproducción de forma asexual mediante taloconidios. En ambos casos y aún viviendo en los extremos climáticos de la Antártida encontramos aspectos ecofisiológicos similares; el promedio de la temperatura en actividad es mayor que el de la temperatura total y la temperatura limitante para la fotosíntesis es de alrededor de $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Esto indica que los talos de las dos especies en ambas localidades aprovechan momentos más templados que los promedios para activarse y suspenden su actividad en los periodos de temperaturas más bajas, siendo esta una estrategia común de líquenes y musgos adaptados a ambientes extremos (Green et al. 2007). Los valores máximos y mínimos en actividad respecto a los totales parecen confirmar esta tendencia. Respecto a la radiación, *U. antarctica* en Livingston muestra una clara tendencia a estar activa a valores más bajos que los promedios, mientras que *U. aprina* en los Valles Secos muestra valores promedio, máximos y mínimos que indican lo contrario, una fotofilia característica. Los datos de adaptación a la luz se acoplan bien a las condiciones lumínicas propias de cada zona de estudio. La fotofilia de *U. aprina* en la Antártida continental ha sido demostrada de manera precisa anteriormente por Kappen et al. (1998).

Los valores de sumatorio de ETR obtenidos por talos de *Umbilicaria* en las distintas localidades están relacionados con la fotofilia mencionada anteriormente. Como ya se ha comentado en alguna ocasión a lo largo de esta tesis doctoral, aunque el ETR no se puede usar como un indicador cuantitativo de fotosíntesis en líquenes, sí que nos puede servir como referencia aproximada de actividad fotosintética. Mientras que en el caso de *U. antarctica* en Livingston este valor supera las 7300 unidades con un tiempo total de actividad cercano a la mitad, en el talo activo de *U. aprina* en los Valles Secos obtenemos un valor superior a las 1000 unidades con un tiempo de actividad ínfimo. Este dato nos indica estrategias totalmente distintas, ya que las *Umbilicarias* de los Valles Secos presentan un patrón de actividad fotosintética breve pero intensa, mientras que las *Umbilicarias* de la Antártida marítima prolongan su actividad de manera más paulatina y con menor intensidad.

Los valores del talo de *Caloplaca sp.*, muestran también muchas de las diferencias comentadas respecto a los valores obtenidos en Livingston, pero también muestran algunas diferencias respecto a *U. aprina* en los mismos Valles Secos. A las diferencias ya comentadas a la hora de analizar los distintos eventos de actividad en esta localidad habría que añadir la diferencia en las temperaturas promedio totales y en actividad. Mientras que en *U. aprina* se observa una temperatura en actividad mucho más atemperada que la media total, en *Caloplaca sp.* se ve que la temperatura en actividad es análoga a la temperatura promedio en el periodo de monitorización. Esta estrategia ya ha sido descrita en líquenes adaptados a desiertos cálidos (Lange et al. 1977; Kappen 1988), y puede indicar una adaptación de las muestras de los Valles Secos a regímenes hídricos muy bajos donde el hielo supone una fuente importante de hidratación. La combinación de esta estrategia de adaptación a la sequía y a las bajas temperaturas puede ser importante para entender la existencia de estos organismos en un desierto polar hiperárido.

Mientras la mayoría de los líquenes adaptados a ambientes extremos toleran las bajas temperaturas evitando estar activos en esas condiciones, los talos crustáceos de los Valles Secos han podido desarrollar una estrategia más tolerante para sobrevivir en esta región.

Para acabar de entender las relaciones entre fotosíntesis y crecimiento en los líquenes de ambas regiones debemos acudir de nuevo a los porcentajes de actividad obtenidos para cada especie en ambas localidades. Los valores de *U. aprina* y *Caloplaca sp* distan mucho en ambos casos del obtenido para *U. antarctica* en la Antártida marítima. Ese valor cercano a la mitad del tiempo total en actividad permite múltiples ocasiones en las que se puede producir ganancia neta de carbono, requisito imprescindible para el crecimiento. La mayor biodiversidad, biomasa, cobertura y, posiblemente, la presencia de fenómenos de gigantismo descritos en la Antártida marítima (Øvstedal y Smith, 2001) pueden estar condicionados por periodos de actividad sustancialmente mayores determinados por la mayor disponibilidad de agua en la Antártida marítima. También es importante tener en cuenta que mientras los talos de los Valles Secos deben derivar considerables cantidades del carbono fijado a la protección frente a los factores estresantes del entorno y a la reparación de los daños sufridos, los líquenes de la Antártida marítima están sometidos a una presión ambiental menor, por lo que el carbono derivado al crecimiento debe ser mayor. Esta afirmación se ve reforzada con los distintos valores de yield encontrados en ambas localidades, con valores mayores en Isla Livingston.

Sancho et al. (2007b), plantearon la existencia de un gradiente de crecimiento dentro del continente Antártico según el cual líquenes crustáceos de la Antártida marítima presentaron elevadas tasas de crecimiento, mientras que líquenes de los Valles Secos de McMurdo mostraron las más bajas nunca registradas, con unas diferencias de dos órdenes de magnitud. Los autores señalaron a la disponibilidad de agua como principal responsable de este marcado gradiente, que también presentaba valores intermedios en zonas costeras de la Antártida continental. Dichas conclusiones han sido recientemente apoyadas (Green et al. 2012). Nuestros valores de actividad refuerzan esta idea desde el punto de vista fisiológico. Los resultados obtenidos muestran que, mientras en la Antártida marítima los líquenes crecen en condiciones óptimas para su desarrollo, en los Valles Secos de McMurdo plantean una estrategia totalmente distinta basada en la supervivencia.

CAPITULO V. RESISTENCIA DEL LIQUEN VAGANTE *Circinaria gyrosa* A CONDICIONES ESPACIALES EXTREMAS: RESULTADOS DE EXPERIMENTOS CON VUELO REAL

Raggio J, Pintado A, Ascaso C, De la Torre R, De los Ríos A, Wierzchos J, Horneck G y Sancho LG (2011) Whole Lichen Thalli Survive Exposure to Space Conditions: Results of the Lithopanspermia Experiment with *Aspicilia fruticulosa*. *Astrobiology* 11: 281-292

1. INTRODUCCIÓN

1.1. GENERALIDADES DE LA ZONA DE ESTUDIO

Las regiones de parameras ibéricas pueden considerarse incluidas en el amplio concepto de estepas. Están formadas por espacios abiertos con vegetación leñosa dispersa y abundancia de pequeñas matas y gramíneas. Las estepas están distribuidas por distintas partes del planeta, por lo que su composición florística y sus características climáticas concretas dependen de la variable localización geográfica. A pesar de esto, las parameras parecen presentar unas características comunes que las definen, como son una considerable altitud combinada con escaso desnivel, fuertes vientos, pocas precipitaciones irregularmente repartidas durante el año y fuertes contrastes de temperatura entre estaciones y entre la noche y el día dentro de las mismas. Estos fuertes contrastes de temperatura provocan que el agua retenida en el suelo se congele durante la noche en buena parte del año, para descongelarse debido a la intensa radiación durante el día. En consecuencia, se generan repetidas contracciones y dilataciones de los suelos, con el consecuente impacto sobre la vegetación, en un fenómeno conocido como crioroturbación. Estas características han sido mencionadas por Pérez (1997) y Crespo y Barreno (1978) para definir el páramo andino a más de 4000 m de altitud en el caso del primer autor y las parameras (pseudo-estepas montañosas según Follman y Crespo 1974) de Castilla la Mancha y Castilla León entre 1200 y 1400 m de altitud en el segundo caso.

Los fenómenos mencionados generan una marcada inestabilidad del suelo que hace que muchos líquenes terrícolas encuentren muchas dificultades para permanecer unidos al mismo, por lo que se favorece la aparición de talos vagantes no unidos al sustrato con formas circulares que favorecen el desplazamiento (Crespo y Barreno 1978). De esta manera, los talos circulares despegados del sustrato ven favorecida su dispersión considerablemente al encontrarse en regiones con amplios espacios libres y con fuerte incidencia de vientos. La mencionada transformación morfológica hacia formas rodantes lleva asociada una disminución de la relación superficie-volumen que implica menor pérdida de agua por evapotranspiración (Rundel 1982), lo que facilita su adaptación a ambientes con escasa disponibilidad hídrica, donde estas comunidades vagantes están especialmente bien desarrolladas (Rogers 1977). La cuestión de si dichas

modificaciones morfológicas son debidas a meras adaptaciones a las características macro y microclimáticas de la zona o llevan implicadas transformaciones genéticas ha sido estudiada por autores como Weber (1967) y Kunkel (1980). Ambos sugirieron un fuerte impacto ambiental en transiciones morfológicas de talos crustáceos a fruticulosos. Rosentreter (1993) abordó de nuevo la cuestión proponiendo la existencia de formas vagantes genéticamente distintas y aceptando a su vez la aparición de formas morfológicas diferentes debidas exclusivamente al factor ambiental. Recientemente se ha abordado desde distintos puntos de vista el estudio de la especie *Cetraria aculeata* (Pérez-Ortega et al. 2012), que presenta en el mismo hábitat de estepa formas unidas al sustrato y formas deformadas vagantes. Los autores no diferenciaron los dos morfotipos como especies distintas, y atribuyeron los cambios morfológicos observados a características concretas del ambiente de estepa. A pesar de esto, dejaron la puerta abierta a un posible proceso de especiación, manteniendo por tanto ciertos aspectos de la línea desarrollada por Rosentreter (1993).

El mismo Rosentreter mencionó en dicho trabajo que el género de líquenes con mayor número de especies vagantes es *Xanthoparmelia*, existiendo otros importantes en su zona de estudio (Norte América) como *Aspicilia* (que actualmente ha pasado a denominarse *Circinaria* para dichas formas vagantes, Sohrabi 2011), con el segundo mayor número de especies vagantes en el mundo, *Masonhalea* y *Rhizoplaca*, todos compartiendo hábitats con las condiciones ya mencionadas. Aparte de Norte América, el autor destacó otras zonas del mundo propicias para albergar vegetación líquénica vagante, incluyendo Asia, Australia, Europa del Este, Oriente Medio y Sudáfrica. Como ya se ha mencionado anteriormente, las estepas altas del centro de la Península Ibérica, reúnen también las condiciones adecuadas para este tipo de líquenes. La vegetación que aparece en estas regiones debe estar bien adaptada a las duras características climáticas de la zona. Desde el punto de vista bioclimático la vegetación de parameras está definida como supramediterránea calcícola seca o semiárida por Rivas-Martínez et al. (2002). Dicha vegetación está constituida principalmente por la sabina albar o *Juniperus thurifera* acompañada de un sotobosque formado por *Juniperus communis* (enebro), *Thymus vulgaris* (tomillo), *Lavandula latifolia* (espliego), *Genista scorpius* y múltiples gramíneas. También hay parameras en la región con una composición distinta, dominadas por la encina y un sotobosque formado por *Juniperus communis* y por *Acotostaphylus uvaursi* (gayuba). Una de las especies adaptadas a este tipo de

ambientes y a esta forma de vida, *Circinaria gyrosa* Sohrabi, Sipman, V. John & V.J. Rico sp. nov. provis., es la escogida para realizar los estudios que se plantean en este capítulo.



Figura 1. Región de estepa en Guadalajara, fotografía de Leopoldo García Sancho

1.2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

El desarrollo de la tecnología espacial ha abierto las puertas a múltiples experimentos en el campo de la astrobiología, un campo de investigación pluridisciplinar que pretende conseguir una mejor comprensión de los procesos que condujeron al origen, evolución y distribución de la vida en la Tierra o en cualquier otra parte del Universo (Horneck 1995). Richter (1865) y Arrhenius (1903) propusieron por primera vez la teoría de la Panspermia, que especula acerca de la posibilidad de transferencia de vida entre distintos planetas. Aunque la teoría sigue siendo poco más que una hipótesis y no existe evidencia alguna de que haya ocurrido, los pasos requeridos para la transferencia de organismos de un planeta hacia otro se han convertido en reproducibles para las condiciones experimentales actuales (Cockell 2008). Esta capacidad tecnológica ha conducido tanto a estudios realizados bajo condiciones de simulación espacial (Buecker y Horneck 1970; Mancinelli y Klovstad 2000; De la Torre et al. 2003), como a estudios llevados a cabo en condiciones de vuelo espacial real (Horneck 1993; Fajardo-Cavalzos et al. 2005; Sancho et al. 2007a; De los Ríos et al. 2010; Horneck et al. 2010). Uno de los objetivos principales de estos trabajos ha sido probar si distintos tipos de organismos pueden sobrevivir en las condiciones extremas para la vida del espacio interplanetario,

entre las que destaca el vacío espacial, la radiación cósmica y la radiación ultravioleta. El vacío genera una fuerte deshidratación celular en las muestras expuestas, la radiación ultravioleta genera mutaciones en las moléculas de ADN, y la radiación cósmica tiene un poder de penetración en la materia superior al de la radiación ultravioleta (Cockell 2008). La capacidad de supervivencia de los organismos expuestos es, por tanto, una característica importante que indirectamente puede ayudar a apoyar o denegar la antigua teoría de la Panspermia y recientes revisiones (Fajardo-Cavalzos et al. 2005; Stöffler et al. 2007).

Teniendo en cuenta las duras condiciones del espacio, la elección de organismos adecuados para este tipo de experimentos es de especial importancia. Algunos autores como Horneck (1993), Horneck et al. (1994, 2001) han trabajado con esporas bacterianas y otros como Mancinelli et al. (1998) con microorganismos adaptados a condiciones de alta salinidad, ambos debido a su conocida resistencia a condiciones extremas en sus hábitats naturales en el planeta Tierra. En los últimos años, los líquenes han sido utilizados también en este tipo de experimentos (Sancho et al. 2007a; 2008; De la Torre et al. 2010; De Vera et al. 2010; Raggio et al. 2011). Su capacidad de vivir en ambientes extremos ha sido ya debidamente comentada, siendo capaces de colonizar todo tipo de hábitats alrededor del mundo (Kappen 1988), incluyendo desiertos (Lange et al. 1994; Pintado et al. 2005), alta montaña (Sancho y Kappen 1989; Reiter et al. 2008) y las regiones polares (Green et al. 1998; Pannewitz et al. 2003a, b). En la Antártida son la vegetación dominante en buena parte de los ecosistemas terrestres, y su presencia ha sido documentada hasta los 86° de latitud sur (Siple 1938; Øvstedal y Smith 2001). En condiciones particularmente duras, como en los desiertos helados de la Antártida continental, los líquenes llegan a sobrevivir en el interior de las rocas, donde forman comunidades endolíticas protegidas del exterior (Kappen y Friedmann 1983; De los Ríos et al. 2005a,b). Como organismos poiquilohidros que son, los líquenes están activos exclusivamente cuando están hidratados; cuando se deshidratan pasan a un estado inactivo en el cual son muy resistentes a factores estresantes como puede ser la sequía, la temperatura y la luz (Kappen y Valladares 2007). Debido a todas las características mencionadas, los líquenes han sido usados con éxito en experimentos de simulación espacial (De la Torre et al. 2003; De Vera et al., 2003; 2008; 2010) y han sido lanzados al espacio en el experimento LICHENS (Sancho et al. 2007a) y en el experimento LITHOPANSPERMIA (De la Torre et al. 2010; Raggio et al. 2011).

Ambos experimentos han aportado información novedosa sobre los efectos de la exposición espacial en organismos pluricelulares eucariotas.

El experimento LITHOPANSPERMIA incluyó por primera el líquen fruticuloso y vagante *C. gyrosa* (Figura 2), bien adaptado a las características climáticas concretas de las parameras altas de la provincia de Guadalajara. La especie fue elegida para este experimento por varios motivos. En primer lugar, es un buen ejemplo de adaptación morfológica a las duras condiciones climáticas que se dan en las parameras (Sancho et al. 2000). Además de esto la especie presenta un tamaño lo suficientemente pequeño (6,2 mm de diámetro medio) para poder ocupar el soporte de las muestras que se iban a exponer, que al ser parte de varios experimentos, presentaba considerables limitaciones de espacio. Este pequeño tamaño nos permitió, por primera vez, exponer un talo líquénico completo al espacio exterior, ya que en experimentos anteriores solo se expusieron fragmentos. La alta relación masa/superficie de *C. gyrosa* (debido a su alto grado de compactación) permitió que un organismos tan pequeño se pudiese usar individualmente, ya que sus tasas de intercambio gaseoso son detectables.

Algunos autores han intentado abordar el estudio de los parámetros fisiológicos implicados en la variación morfológica en líquenes. A los ya mencionados trabajos de Weber (1967) y Kunkel (1980), habría que añadir el realizado por Sancho et al. (2000). Los autores propusieron una explicación ecofisiológica para el crecimiento globular de *A. fruticulosa* (actualmente *C. gyrosa*, ver Sohrabi 2011) como una estrategia para disminuir las pérdidas de agua debido a la fuerte evaporación que se da en su hábitat, con fuertes contrastes de temperatura, fuerte radiación y periodos prolongados de sequedad. En el trabajo aparecen fotografías de microscopía electrónica de barrido a baja temperatura de la anatomía del talo, y en ellas destaca un córtex grueso que puede sobrepasar las 200 μm de grosor.

En el experimento LICHENS, dos líquenes saxícolas (las especies alpinas *Rhizocarpon geographicum* (L.) DC. y *Xanthoria elegans* (Link) Th. Fr.) fueron estudiadas usando la fluorescencia de la clorofila *a* y técnicas de microscopía para evaluar su estado tras la exposición espacial. El objetivo principal de este estudio es repetir dicha evaluación tras el vuelo con talos enteros del líquen fruticuloso *C. gyrosa*, pero añadiendo por primera vez técnicas de intercambio gaseoso. La introducción de esta técnica va a proporcionar

información más precisa sobre el estado de los fotosistemas, ya que se va a evaluar el proceso fotosintético *in situ* de manera global, y a su vez se va a poder conocer el estado fisiológico de los hongos, anteriormente desconocido. Pensamos que la combinación de fluorescencia de la clorofila *a*, ultraestructura de alga y hongo a través de microscopía y medidas de intercambio gaseoso va a proporcionar información novedosa sobre los límites de la resistencia de la simbiosis líquénica en el espacio.



Figura 2. *Circinaria gyrosa* en la localidad de recolección. Fotografía de Leopoldo García Sancho

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE Y CARACTERÍSTICAS DE LA LOCALIDAD DE RECOLECCIÓN

Como se ha mencionado anteriormente, el reciente trabajo de Sohrabi (2011), clasifica a todas las formas vagantes de *Aspicilia* dentro del género *Circinaria*, además de sinonimizar a este último género los conocidos anteriormente como *Agrestia*, *Chlorangium* y *Sphaerotallia*. El autor comenta detalladamente las diferencias más significativas entre los géneros *Aspicilia* y *Circinaria*, entre las que merece la pena

destacar los distintos biotipos (siempre crustáceos en *Aspicilia*), el tamaño de las esporas (mayor en *Circinaria*), las pseudocifelas (siempre ausentes en *Aspicilia*, presentes en algunas especies de *Circinaria*) y la distinta composición química respecto a la aspicilina y el ácido subestíctico.

Para la descripción de la especie seguimos por tanto el actual trabajo de Sohrabi (2011), pero de manera más resumida: *C. gyrosa* presenta un talo vagante más o menos globoso entre 0,5 y 2 cm de alto y 0,5 y 3 cm de ancho, con lóbulos coraloides fuertemente divididos, con forma de cerebro. Superficie de marrón a gris con distintas tonalidades posibles, presentando pseudocifelas de manera habitual. El córtex puede llegar a medir hasta 110 μm de ancho, presenta la parte externa paraplectenquemática y la interna poco definida, mezclada con tejido prosoplectenquemático de la capa medular. La médula es blanca, I-, entre 0,3 y 4 mm de grosor, pudiendo llegar hasta 6. El fotobionte pertenece a los chlorococcales, con células entre 5 y 22 μm de diámetro. Los apotecios son raros, con disco de negro a marrón oscuro. Ascosporas clavadas, y ascósporas hialinas, simples, de globosas a subglobosas, con máximos medidos de 26x25 μm . Picnidios y conidios presentes. Respecto a la química, todos los reactivos dieron negativo, y no se detectaron sustancias liquénicas ni por TLC ni por HPLC.

En relación con la ecología y distribución, los talos aparecen repartidos en suelos calcáreos de distintos hábitats, como en praderas de clima mediterráneo, abiertas y poco densas formadas por matorral y árboles de los géneros *Juniperus* y *Artemisia* (como es el caso de las especies presentes en la Península Ibérica) y en bosques submontanos de la provincia de Golestán en Irán. Normalmente entre los 1000 y los 2000 m de altitud.

La especie se puede confundir con facilidad con *C. fruticulosa* y *C. vagans*. La principal diferencia respecto a la primera reside en la forma y ramificación de los lóbulos, irregular en *C. gyrosa* y habitualmente dicotómica en *C. fruticulosa*. Otras diferencia entre ambas es el tamaño y la localización de las pseudocifelas, más pequeñas en *C. fruticulosa* y situadas en las puntas de las ramificaciones. *C. vagans* presenta conidios mayores que *C. gyrosa* y aparece siempre a altitudes inferiores a los 1000 m.

Los talos de *C. gyrosa* fueron recolectados en Zaorejas, Guadalajara (40°45'14''N 02°11'51''O) a 1260 m de altitud, sobre suelo arcilloso (Figura 3). Fueron recolectados

en una zona de poca densidad de vegetación, en un bosque abierto de *Juniperus thurifera*. La especie no era fácil de distinguir debido a su color similar al de la arcilla rojiza del suelo y crecía junto a otras especies de líquenes terrícolas y vagantes, como *Xanthoparmelia vagans*, *Diploschistes bryophillus*, *Cornicularia steppae*, *Cladonia convoluta* y *Collema tenax*. La zona tiene un clima de tendencia continental, con bajas temperaturas en invierno (la media del mes más frío es de 2°C) y veranos cálidos (la media del mes más cálido es de 20°C). La precipitación media anual es de 500 mm, pero como se ha comentado en la introducción, la distribución es heterogénea, con picos en invierno y primavera y una considerable sequía estival. La localidad comparte los fuertes vientos característicos de la región.



Figura 3. Bosque abierto de *Juniperus thurifera* en Zaorejas, Guadalajara, localidad de recolección de *C. gyrosa*. Fotografía de Leopoldo García Sancho

2.2. CONDICIONES EXPERIMENTALES DEL VUELO ESPACIAL

El experimento LITHOPANSPERMIA/BIOPAN, al cual pertenecen estas investigaciones relacionadas con la resistencia de *C. gyrosa*, se encuadra dentro de la logística de la agencia espacial europea (ESA), y fue lanzado desde Baikonur, Kazajistán, el 14 de septiembre de 2007. La cápsula BIOPAN (Figuras 4 y 5) y donde se encontraban las muestras (entre otros experimentos) estaba unida al satélite FOTON M3, medía 38 cm de diámetro y estaba equipada con sensores de temperatura, radiación

ultravioleta y visible y presión. Ambas estructuras entraron en órbita terrestre a unos 300 km de altura, momento en el cual la cápsula BIOPAN quedó abierta con las muestras expuestas e las condiciones del espacio exterior durante 10 días, en las cuales se completaron 190 vueltas a la Tierra. Dentro de la cápsula BIOPAN se encontraba el soporte espacial sobre el cual se colocaron las muestras expuestas, que consistía en una mezcla de aluminio y silicio y estaba formado por un nivel superior (L1) y otro inferior (L2), con dimensiones de 146 mm x 129 mm x 23 mm.

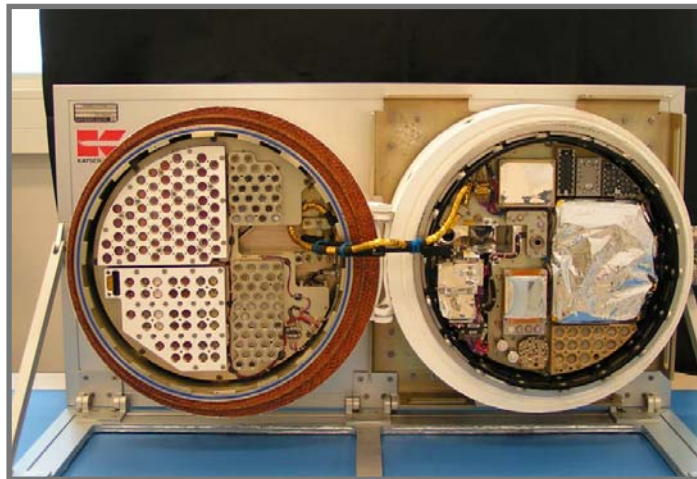


Figura 4. Cápsula BIOPAN 6 abierta mostrando los soportes con las muestras. Fotografía tomada de De la Torre et al (2010)

Cada nivel albergaba 36 perforaciones cilíndricas de 13 mm de diámetro y 9 mm de altura donde se situaban las muestras (Figura 6), adheridas a la superficie del soporte por un adhesivo de silicona. Las muestras situadas en el nivel superior (muestras de vuelo expuestas) estaban protegidas por distintos filtros de radiación ultravioleta, por lo que cada muestra de *C. gyrosa* del nivel superior estuvo expuesta a distintas dosis de radiación. Cada filtro presentaba las siguientes características: (i) Un filtro de MgF_2 que era transparente a toda la radiación solar, dejando pasar radiaciones de $\lambda \geq 110\text{nm}$. (ii) Filtro de cuarzo sintético SQO, que permitía el paso de radiaciones de $\lambda \geq 200\text{ nm}$, simulando así las condiciones de radiación de la superficie de Marte. (iii) Filtro de $\lambda \geq 290\text{ nm}$ que simulan la radiación de la superficie terrestre y (iv) filtro de $\lambda \geq 400\text{ nm}$ que excluía la radiación ultravioleta sobre la muestra. Todas las muestras de este nivel estuvieron expuestas también a un rango de temperatura entre $-23\text{ }^\circ\text{C}$ y $27\text{ }^\circ\text{C}$ en distintos momentos del vuelo, 100 mGy de radiación cósmica ionizante y 10^{-6} Pa de vacío espacial. Las muestras del nivel inferior (muestras control vuelo) no recibieron

radiación solar alguna al estar protegidas por el nivel superior. La radiación cósmica si que consiguió penetrar el soporte y alcanzó los 4 mGy en el nivel inferior. La perforación del soporte permitió que las muestras estuvieran expuestas a las mismas condiciones de vacío y temperatura que las del nivel superior, consiguiéndose mantener cada celda estanca debido a un sistema de membranas tubulares porosas (GmbH&Co, Eningen, Alemania). Al finalizar el proceso de exposición, la cápsula se cerró y se inició el proceso de vuelta a la Tierra. La cápsula aterrizó en Kostanay, Kazajistán, el 27 de septiembre de 2007. La descripción del vuelo, la cápsula BIOPAN, el soporte de las muestras y las condiciones espaciales se han tomado de De la Torre et al. (2010).



Figuras 5 y 6. Figura 5 (izquierda) simulación de la cápsula BIOPAN orbitando la Tierra y Figura 6 (derecha) soporte espacial donde se situaron las muestras durante el vuelo

Las limitaciones de espacio impuestas por la necesidad de albergar varios experimentos dentro de la cápsula generó que el número de réplicas para cada tratamiento lumínico en las muestras de vuelo expuestas fuera de $n=1$, aunque el número total de muestras de dicho nivel superior fuese $n=4$, al igual que las muestras situadas en el nivel inferior. Un tercer grupo de ocho muestras (control Tierra) se mantuvo seco y en oscuridad en la Tierra mientras duró todo el proceso de exposición espacial. El diseño experimental, que se llevó a cabo con la intención de conseguir resultados útiles inmediatos, así como información suficiente para planificar investigaciones futuras, pasó diferentes revisiones antes de ser aprobado y seleccionado por la ESA para el vuelo.

2.3. MEDIDAS DE FLUORESCENCIA DE LA CLOROFILA *a*

Las muestras fueron reactivadas en cámara refrigerada siguiendo el protocolo descrito en los capítulos I y II. Tanto el aparato utilizado para medir la fluorescencia (Mini-PAM, Walz, Alemania) como el parámetro utilizado para evaluar el estado de los fotosistemas (Fv/Fm) y su significado fisiológico han sido explicados también en el capítulo I con detalle. El Fv/Fm se midió en todas las muestras antes del vuelo espacial, y se consideró este rendimiento de fluorescencia como un valor óptimo previo al estrés. Tras ser recogidas y de vuelta en nuestro laboratorio, se midió de nuevo el Fv/Fm a las 3h, 24h, 48h, y 72h, con el fin de monitorizar la evolución del parámetro.

2.4. MEDIDAS DE INTERCAMBIO GASEOSO

Tras un nuevo ciclo de revitalización, se midió el intercambio de CO₂ de todas muestras a 20°C y a 0, 400, 800, 1200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de radiación. Se usó un aparato de intercambio gaseoso (GFS-3000, Walz, Alemania) de flujo abierto diferencial con un detector de infrarrojo para determinar las concentraciones de CO₂ en el aire. El aparato presenta un funcionamiento muy parecido al CMS 400, ya descrito en el capítulo I. En el caso del GFS-3000, la cubeta es mucho más pequeña (3 cm de longitud y 4 cm de ancho, Figura 7), por lo que permite medidas rápidas y precisas ($\pm 0,1\%$) de muestras individuales de baja biomasa.

El procedimiento utilizado para las medidas fue el estándar mencionado en el capítulo I, con las medidas de respiración realizadas en oscuridad al principio de cada curva tras inmersión en agua mineral de composición conocida durante 20 minutos. Tras esta medida, y siempre a óptimo contenido hídrico, se fue aumentando la radiación con una lámpara (LED tipo 3040-L) hasta alcanzar la máxima tasa de fotosíntesis neta a los 1200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Las medidas realizaron en un periodo de 5 días. La temperatura dentro de la cubeta y la humedad ambiental se mantuvieron controladas durante el experimento. Los datos finales de intercambio gaseoso se expresaron en función del peso seco de cada una de las muestras.



Figura 7. Cubeta del GFS-3000 con fuente de luz en la parte superior midiendo un talo de *C. gyrosa* en el laboratorio

2.5. ANÁLISIS DE MICROSCOPIA

2.5.1. Microscopía electrónica de barrido a baja temperatura: Las muestras de *C. gyrosa* fueron examinadas en un microscopio SEM DSM 960 Zeiss, al que está asociada una unidad de criomicroscopía Oxford CT 1500A. Las pruebas de microscopía se realizaron tras los experimentos de intercambio gaseoso. Se tomaron pequeños fragmentos de líquen y se fijaron al porta-muestras de forma mecánica. De ahí se pasaron al sistema de frío-transferencia, se criofijaron por inmersión en nitrógeno líquido subenfriado y por último fueron transferidos a la unidad de preparación mediante un dispositivo de transferencia en vacío siguiendo De los Ríos et al. (2005b). Las muestras congeladas se fracturaron en la unidad de preparación y fueron transferidas a la cámara del microscopio (-135 °C), donde se mantuvieron 2 minutos a -90 °C para sublimar el hielo superficial. Tras la sublimación del hielo, las muestras son trasladadas a la unidad de preparación donde fueron recubiertas (sputtering) con partículas de oro. Posteriormente la muestra vuelve a la cámara del microscopio para su observación (-135 °C). Se observaron a un potencial de aceleración 2 Kv y 300 Pa.

2.5.2. Microscopía electrónica de transmisión: De nuevo tras las medidas de intercambio gaseoso, pequeños fragmentos de *C. gyrosa* fueron fijados en soluciones de glutaraldehído al 3% en tampón fosfato 0,1M, ph 7,1 y tetraóxido de osmio al 1% en tampón fosfato 50Mm y ph 7,1. Dichos fragmentos se deshidrataron en series crecientes

de etanol y se incluyeron en una resina Spurr siguiendo el protocolo descrito por Ascaso (1978) y De los Ríos y Ascaso (2002). Las secciones ultrafinas fueron teñidas posteriormente con citrato de plomo (Reynolds 1963) y observadas en un microscopio electrónico de transmisión LEO 910 operado a 80 kV.

2.6. CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA

Se tomaron fragmentos de talos de *C. gyrosa* con el fin de realizar ensayos de cromatografía en capa fina que permitieran detectar sustancias liquénicas presentes en dicha especie. La extracción se llevó con acetona siguiendo a Huneck y Yoshimura (1996), y las muestras se pincharon en placas de cromatografía de cristal Merck 60 F254 recubiertas de gel de sílice (grosor de la capa 0,25 mm, tamaño placa 20x20cm). El solvente utilizado para desarrollar la cromatografía fue el C (170 ml tolueno/ 30 ml ácido acético) y el revelado se llevó a cabo con ácido sulfúrico diluido.

2.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

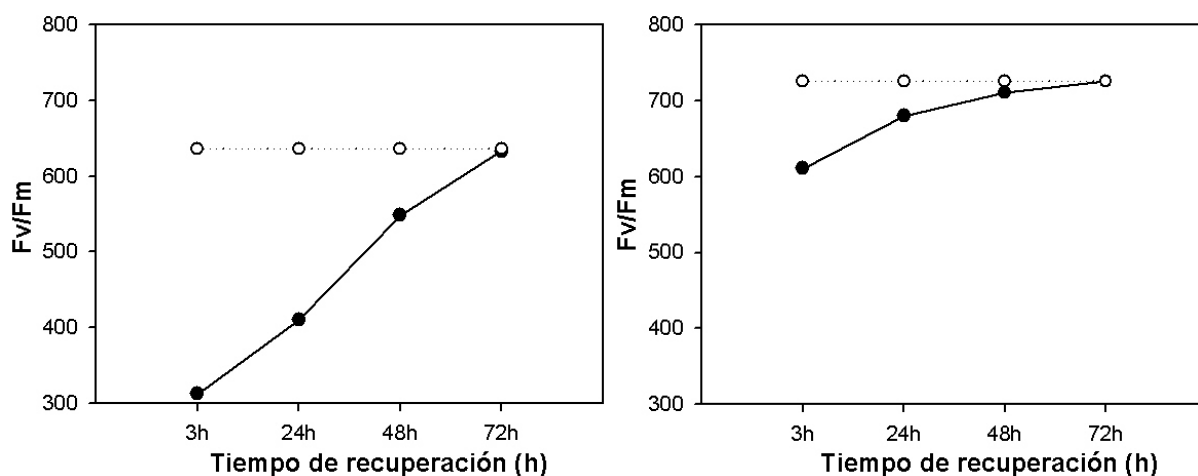
Las comparaciones de las medias de los distintos grupos de muestras se llevaron a cabo a través de un análisis simple de la varianza con un nivel de significancia de $p \leq 0,05$. La comparación de los datos de control vuelo y control Tierra se realizaron con un test de Duncan de rango múltiple ($p \leq 0,05$). Se utilizó la versión 5.1 del programa Statsgraphics.

3. RESULTADOS

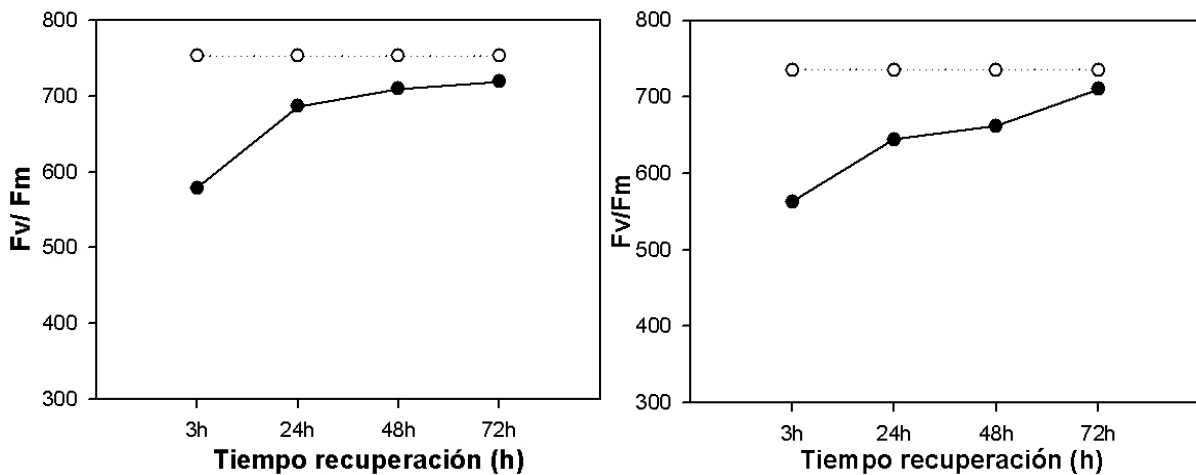
3.1. FLUORESCENCIA DE LA CLOROFILA *a*

Los valores de F_v/F_m previos al vuelo de todas las muestras medidas (expuestas vuelo, control vuelo y control Tierra) oscilaron entre 636 y 756 (Figuras 8-12, Tabla 1). Estos valores fueron tomados como un nivel de referencia para determinar un estado saludable de los fotosistemas (Demmig-Adams et al. 1990). Tras el vuelo espacial, los valores de F_v/F_m de todas las muestras expuestas al vuelo que fueron medidas tras 3h de

reactivación se redujeron significativamente en comparación a los valores previos al vuelo. El valor más bajo (49% del valor pre-vuelo) apareció en la muestra que estaba expuesta al mayor rango de radiación ultravioleta y visible ($\lambda \geq 110$ nm, Figura 8). El resto de muestras presentaron una disminución menos pronunciada de Fv/Fm a las 3h de la reactivación (84% para las muestras expuestas a $\lambda \geq 200$ nm; 77% para las expuestas a $\lambda \geq 290$ nm y $\lambda \geq 400$ nm, Tabla 1, Figuras 9-11). Los valores de Fv/Fm se incrementaron gradualmente al ir aumentando el tiempo de reactivación hasta llegar al máximo de 72h, donde se alcanzaron valores muy próximos al Fv/Fm pre-vuelo y en algunos casos prácticamente idénticos. Como ejemplo, la muestra más afectada, que fue la expuesta a $\lambda \geq 110$ nm, alcanzó el 99,5% respecto al valor de pre-vuelo. Esta elevada capacidad de recuperación es un buen indicador de reversibilidad respecto al daño que la exposición espacial pudo generar en la muestra, detectado por el bajo Fv/Fm medido a las 3h.



Figuras 8 y 9. Figura 8 (izquierda) valores de Fv/Fm a lo largo del periodo de recuperación metabólica en *C. gyrosa* expuesta a radiaciones de $\lambda \geq 110$ nm durante el vuelo espacial (círculos negros) respecto al valor prevuelo (círculos blancos), y Figura 9 (derecha), que representa lo mismo en la muestra de vuelo expuesta a $\lambda \geq 200$ nm



Figuras 10 y 11. Figura 10 (izquierda) valores de Fv/Fm a lo largo del periodo de recuperación metabólica en *C. gyrosa* expuesta a radiaciones de $\lambda \geq 290$ nm durante el vuelo espacial respecto al valor pre-vuelo, y Figura 11 (derecha), que representa lo mismo en la muestra de vuelo expuesta a $\lambda \geq 400$ nm

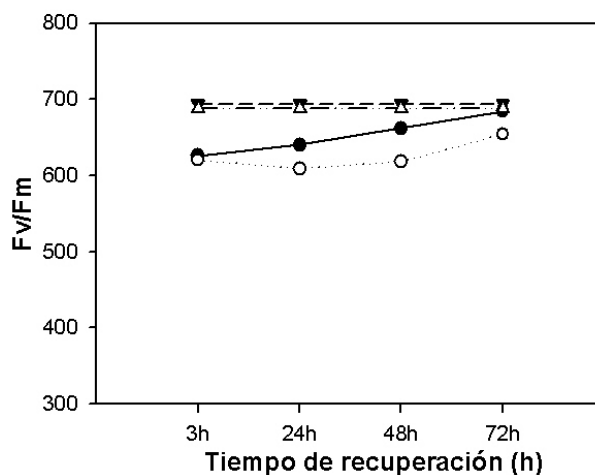


Figura 12. Valores de Fv/Fm durante el periodo de recuperación de *C. gyrosa* para los controles vuelo (círculos negros y línea continua) y Tierra (círculos blancos y línea de puntos) frente a los valores pre-vuelo para muestras control vuelo (triángulo invertido negro y línea discontinua) y control Tierra (triángulo recto blanco y línea discontinua)

	Vuelo $\lambda \geq 110\text{nm}$ n=1	Vuelo $\lambda \geq 200\text{nm}$ n=1	Vuelo $\lambda \geq 290\text{ nm}$ n=1	Vuelo $\lambda \geq 400\text{nm}$ n=1	Control vuelo n=4	Control Tierra n=8
Pre-vuelo	636	726	753	735	694,0 \pm 38,0 ^a	688,0 \pm 44,1 ^a
3h	312	611	579	563	625,8 \pm 81,2 ^c	620,4 \pm 71,4 ^b
24h	410	680	687	644	640,0 \pm 42,2 ^{bc}	609,6 \pm 65,6 ^b
48h	548	711	710	662	661,8 \pm 32,7 ^{abc}	618,8 \pm 58,5 ^b
72h	633	726	719	710	683,8 \pm 25,3 ^{ab}	654,3 \pm 55,6 ^{ab}

Tabla 1. Valores de Fv/Fm obtenidos en los distintos tratamientos de *C. gyrosa* durante el periodo de recuperación. Los valores de desviación estándar aparecen representados siempre que n > 1. Diferentes letras dentro de una misma columna implican diferencias estadísticas significativas siguiendo el test múltiple de rango de Duncan ($p \leq 0,05$)

Las muestras de control vuelo alcanzaron un 90% respecto al Fv/Fm pre-vuelo a las 3h de recuperación. A las 48h alcanzaron el 95%, y a las 72h llegó hasta el 98% (los porcentajes son medias de cuatro réplicas). Los controles de Tierra mostraron una ligera reducción de su Fv/Fm a las 3h (el 90% del inicial) de recuperación, bajó al 89% a las 24h, subió 90% a las 48h y finalmente alcanzó el 95% del valor inicial al final de la recuperación (Figura 12, Tabla 1). No se encontraron diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0,05$) entre las muestras de control vuelo y control Tierra durante los distintos tiempos del periodo de recuperación. Tampoco se encontraron diferencias estadísticas significativas para ambos grupos de muestras entre los valores de Fv/Fm medidos antes del vuelo y aquellos obtenidos tras 72h de recuperación

3.2. INTERCAMBIO GASEOSO

Los valores de intercambio de CO₂ para las muestras expuestas al vuelo aparecen representados en la Figura 13. En ella se observan los valores de la respiración en oscuridad (valores negativos) y de la fotosíntesis neta (positivos) al ir incrementando la radiación. Las barras horizontales representan las medias de los valores de control vuelo y control Tierra, que no mostraron diferencias estadísticas significativas para

respiración en oscuridad y fotosíntesis neta. Por lo tanto, estos valores fueron seleccionados como controles respecto a las muestras que si estuvieron expuestas totalmente a las condiciones del vuelo. A pesar de la similitud estadística encontrada, merece la pena recordar que las muestras de control vuelo habían recibido cierto grado de radiación cósmica, y las fluctuaciones de temperatura y el vacío característicos del espacio, cosa que no ocurrió con las muestras control Tierra. La línea discontinua representa el valor medio control de la máxima fotosíntesis neta y la línea sólida es el mismo valor para la respiración en oscuridad.

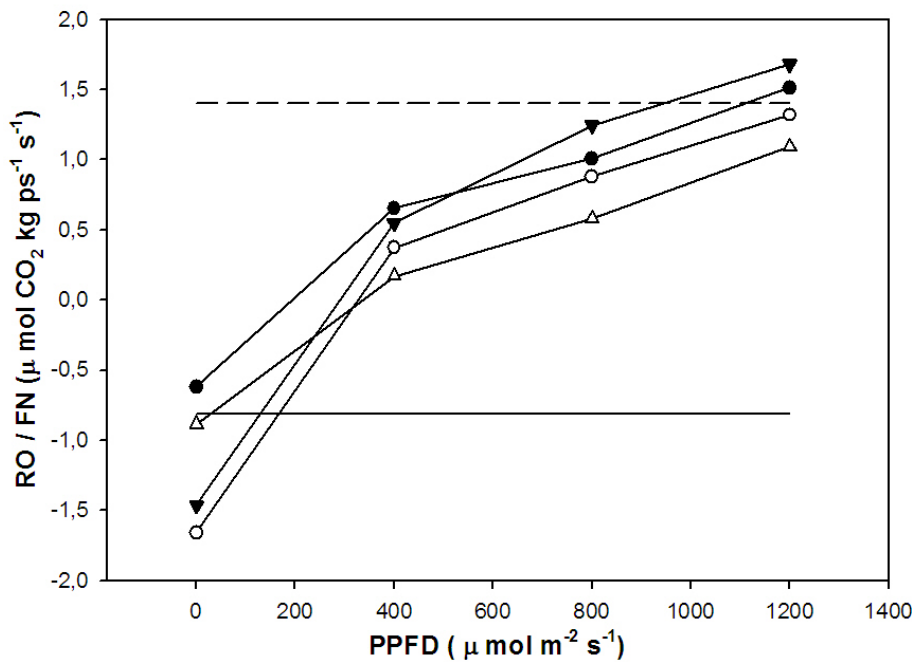


Figura 13. Curvas de luz fotosintéticamente activa (PPFD) de las cuatro muestras expuestas al vuelo representadas frente a los valores medios de máxima fotosíntesis neta o A_{max} (valores positivos, línea horizontal discontinua, $n=8$) y respiración en oscuridad (valores negativos, línea horizontal continua $n=8$) de los controles, que no mostraron diferencias estadísticas entre ellos. En las curvas de luz encontramos muestra vuelo ≥ 110 nm (círculos negros), vuelo ≥ 200 nm (círculos blancos), vuelo ≥ 290 nm (triángulo negro invertido) y vuelo ≥ 400 nm (triángulo blanco recto).

La Tabla 2 muestra los valores numéricos obtenidos en las medidas de intercambio de CO_2 para todas las muestras estudiadas. Las máximas tasas de asimilación fotosintética para las muestras expuestas al vuelo y las muestras control vuelo oscilaron entre 1,1 y $1,7 \mu \text{ mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, y estuvieron próximos al valor medio de fotosíntesis neta máxima

obtenido en los controles Tierra (Tabla 2). Si consideramos el valor medio de todas las muestras expuestas al vuelo (a pesar de haber sufrido tratamientos de radiación distintos), la media obtenida de $1,4 \pm 0,2 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$, de nuevo muy próximo a los valores promedio obtenidos en los controles de Tierra, lo que sugiere poco efecto de las distintos tipos de radiación sobre el rendimiento fotosintético. La respiración en oscuridad de las muestras control vuelo y las control Tierra resultaron iguales estadísticamente, y fueron muy parecidas a los valores obtenidos para las muestras expuestas al vuelo de $\lambda \geq 110 \text{ nm}$ y $\lambda \geq 400 \text{ nm}$. Sin embargo, las muestras expuestas de vuelo de $\lambda \geq 200 \text{ nm}$ y $\lambda \geq 290 \text{ nm}$, mostraron tasas de respiración superiores al resto (Tabla 2). Excepto para estos dos datos de respiración, el resto de muestras expuestas al vuelo mostró una actividad metabólica similar a la de los controles de Tierra.

	Vuelo $\lambda \geq 110 \text{ nm}$ n=1	Vuelo $\lambda \geq 200 \text{ nm}$ n=1	Vuelo $\lambda \geq 290 \text{ nm}$ n=1	Vuelo $\lambda \geq 400 \text{ nm}$ n=1	Control vuelo n=4	Control Tierra n=4
A_{max}	1.5	1.4	1.7	1.1	1.2±0.4	1.6±0,6
RO	0.6	1.7	1.5	0.9	0.9±0.4	0.7±0.2

Tabla 2. Valores de intercambio de CO₂ en todas las muestras expuestas, control vuelo y control Tierra. La desviación estándar aparece representada siempre que n > 1

3.3. ANÁLISIS DE MICROSCOPIA

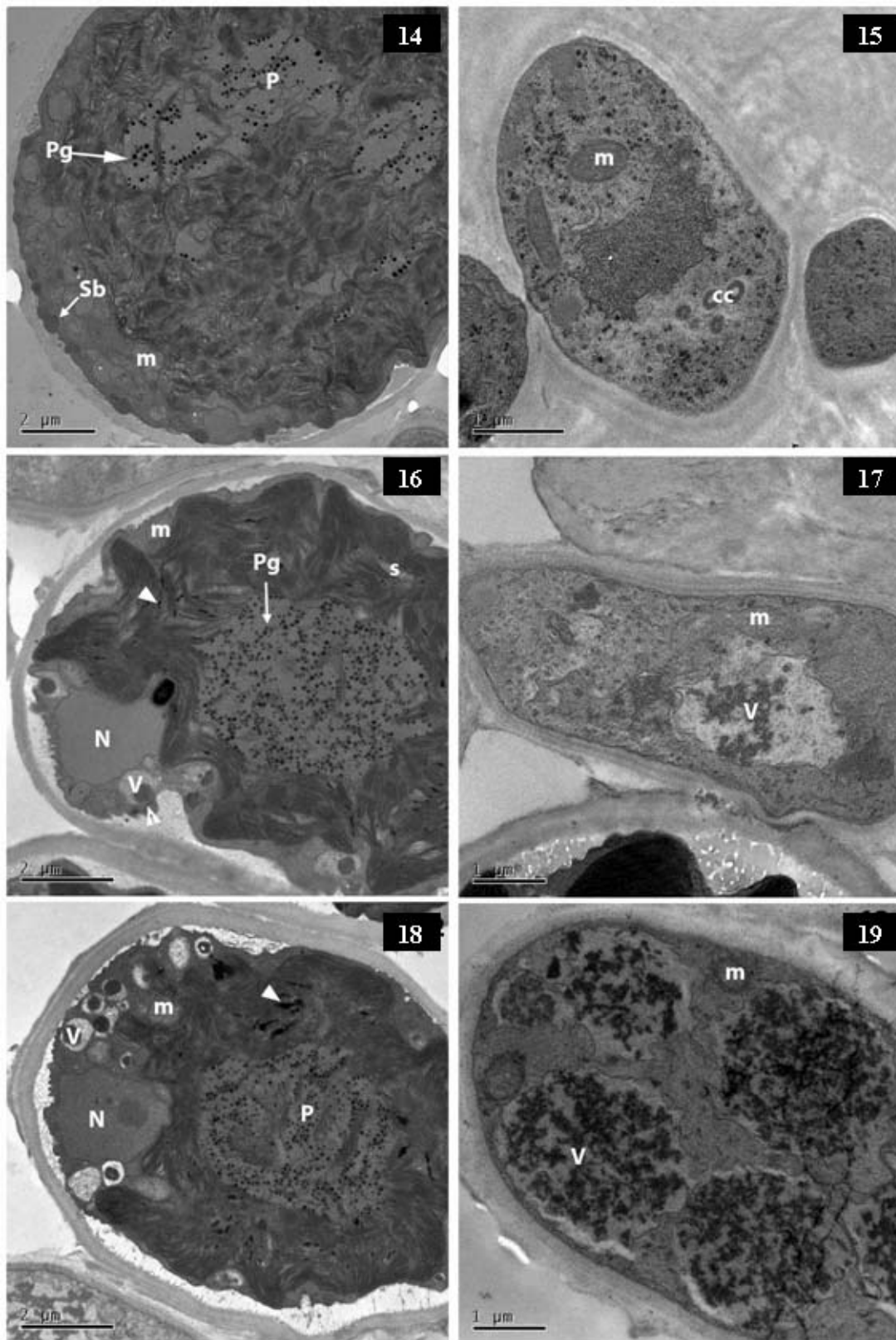
Las Figuras 14 y 15 muestran el aspecto de las células del fotobionte y el micobionte en muestras control Tierra. Las membranas tilacoidales del cloroplasto del fotobionte presentaron un aspecto normal, pero los pirenoides (P) aparecieron con distinta densidad de pirenoglóbulos (Pg). El aspecto de los globulos lipídicos citoplásmicos (Sb) fue bueno, igual que el de las mitocondrias (m) (Figura 14). No se observaron vacuolas en las células del fotobionte. Las células del micobionte (Figura 15) presentaron tanto mitocondrias (m) como cuerpos concéntricos (cc) bien conservados

Los pirenoides de las células del fotobionte del control vuelo (Figura 16) presentaron mayor cantidad de pirenoglóbulos que en los controles de Tierra. Aparece material electrodenso en las vacuolas (V) y complejos membranosos electrodensos entre los tilacoides (flecha). También se observaron gránulos de almidón (s) entre los tilacoides. Las células del micobionte mostraron vacuolas (Figura 17) con acumulaciones irregulares de material electrodenso.

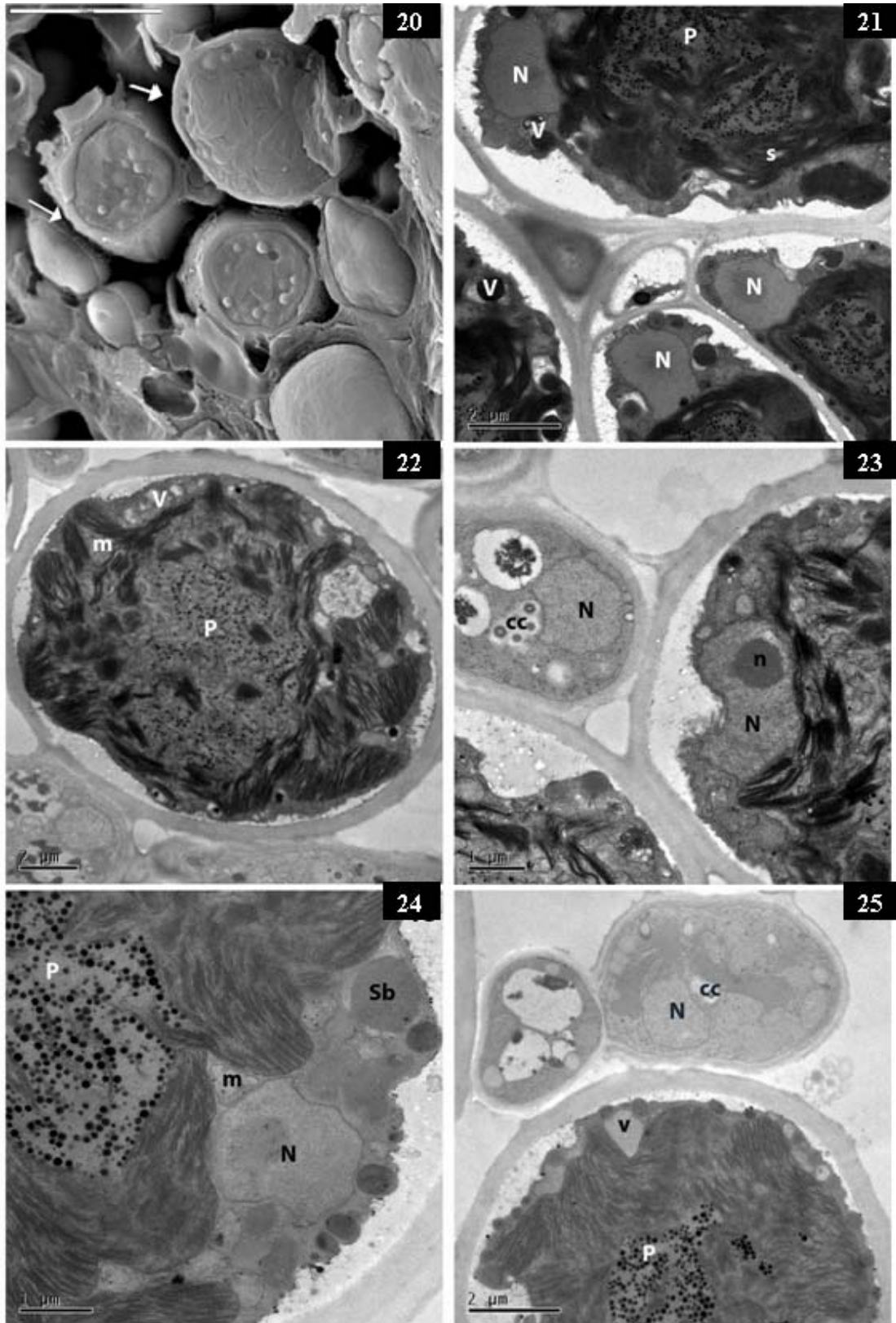
Los pirenoides de las algas de la muestra expuesta a $\lambda \geq 110$ nm (Figura 18) mostraron matrices densas y numerosas membranas tilacoidales. Se observaron frecuentemente complejos membranosos electrodensos en el interior del cloroplasto (flecha). Se observaron también vacuolas en el citoplasma de las algas (V), tanto vacías como con presencia de material electrodenso (indicando estrés) y mitocondrias poco definidas estructuralmente. En las células del micobionte (Figura 19) no se detectaron cuerpos concéntricos, y las mitocondrias aparecieron en buen estado. Todas las vacuolas (V) presentaron depósitos electrodensos. La figura 20, obtenida por microscopía electrónica de barrido a baja temperatura, muestra la integridad de la pared celular de las algas de las muestras más expuestas a la radiación ($\lambda \geq 110$ nm).

Las células de alga de las muestras expuestas al vuelo de $\lambda \geq 200$ nm (Figura 21) mostraron pirenoides con matrices densas y muchas membranas tilacoidales, así como cloroplastos con almidón en su interior. Aparecieron vacuolas (V) con material electrodenso en el citoplasma de las células del fotobionte, indicando de nuevo posible estrés

Respecto a la muestra expuesta al vuelo de $\lambda \geq 290$ nm (Figura 22), las células de alga mostraron membranas tilacoidales apiladas en el interior del pirenoide y menor presencia de almidón que el control vuelo y las muestras expuestas de $\lambda \geq 290$ nm. El citoplasma de estas células presentó vacuolas y la mitocondrias desorganizadas desde el punto de vista ultraestructural. Dichas células algales (Figura 23) mostraron nucleolos compactos (n), lo que podría indicar menor actividad celular. El hongo (Figura 23) presentó cuerpos concéntricos bien desarrollados y vacuolas con menor números de cuerpos electrodensos.



Figuras 14-19. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión para células de fotobionte y micobionte en muestras de control Tierra, control vuelo y $\lambda \geq 110$ nm. Para más información ver el texto



Figuras 20-25. Imágenes de microscopía electrónica de barrido a bajas temperaturas (20) y de microscopía electrónica de transmisión (resto) de células de fotobionte y micobionte en muestras expuestas a $\lambda \geq 110$ nm; 200nm; 290 nm y 400 nm. Para más información ver el texto

Por último, las células de alga expuestas al vuelo con $\lambda \geq 400$ nm (Figuras 24 y 25) mostraron pirenoides y pirenoglóbulos con aspecto similar a aquellos encontrados en el control de vuelo. En esta ocasión no aparecieron complejos membranosos electrodensos entre las membranas de los tilacoides. El aspecto de los cuerpos lipídicos citoplásmicos fue similar al observado en células del tratamiento control Tierra. Las células del hongo del tratamiento $\lambda \geq 400$ nm presentaron vacuolas y cuerpos concéntricos de aspecto normal (Figura 25).

3.4. CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA

Dos talos individuales de *C. gyrosa* recolectados en la misma localidad fueron analizados por cromatografía de capa fina. Los resultados mostraron la ausencia de sustancias liquénicas, como ha sido documentado con anterioridad por Hafellner et al. (2004) y Sohrabi (2011) para otros líquenes vagantes del mismo género.

4. DISCUSIÓN

En el espacio exterior, los organismos están expuestos a un complejo conjunto de condiciones ambientales extremas, que consisten principalmente en vacío espacial, radiación solar ultravioleta extraterrestre y un amplio rango de temperaturas (Nicholson et al. 2005). El vacío espacial genera una deshidratación extrema, lo que ha sido considerado como uno de los factores más letales para los organismos vivos expuestos a un vuelo espacial (Sancho et al. 2007a). Mientras la mayoría de los organismos sufren daños ante dicha deshidratación, las muestras de *C. gyrosa* del control vuelo expuestas al vacío durante 10 días, no sufrieron ningún daño metabólico aparente. Esto se deduce de sus valores inalterados de fluorescencia de la clorofila *a*, fotosíntesis neta y respiración en oscuridad. Otros autores han encontrado una resistencia similar a la desecación generada por el vacío en vuelos espaciales previos, tanto para los líquenes *Rhizocarpon geographicum* y *Xanthoria elegans* (Sancho et al. 2007a; 2008), tardígrados (Jönsson et al. 2008) y esporas de la bacteria *Bacillus subtilis* (Horneck et al. 2010).

Aunque el estado fisiológico de las muestras del control vuelo no fue distinto al encontrado en los controles de Tierra, si que mostraron algunas diferencias ultraestructurales. Entre estas cabe destacar la presencia de cuerpos densos en el citoplasma de las células del fotobionte y en las vacuolas de las células del micobionte, ambas debidas posiblemente a la exposición al vacío espacial. También se observaron más pirenoglóbulos en las muestras de control vuelo que en las muestras de control Tierra. La disminución de los pirenoglóbulos puede ser debida tanto por la deshidratación (Ascaso et al. 1986) como por la exposición a oscuridad (Brown et al. 1988). Aunque lo esperado a priori debería ser menor número de pirenoglóbulos en las muestras expuestas al vacío (control vuelo) que en las control tierra, el almacenamiento en condiciones de deshidratación y oscuridad de estas últimas puede ser responsable del mencionado descenso.

La microscopía electrónica de transmisión muestra más consecuencias de la fuerte deshidratación. Entre estas destaca una posición periférica de los pirenoglóbulos en el interior del pirenoide (Ascaso y Galván 1976; Ascaso 1978), un descenso del número de pirenoglóbulos por área de pirenoide (Ascaso et al. 1986), o una tinción débil de algunas partes de la matriz proteica del pirenoide (Ascaso 1978; Brown et al. 1987). La tolerancia a la desecación en líquenes ha sido pertinentemente estudiada y debatida por Kappen y Valladares (2007), así como por otros autores (Lange et al. 1997b, Pintado et al. 2005; Del Prado y Sancho 2007). Los polialcoholes liquénicos han sido considerados por Sancho et al. (2007a) como importantes a la hora de entender la resistencia a la desecación en líquenes expuestos a la deshidratación que ocurre en el espacio.

Aparte del mencionado efecto del vacío, los organismos vivos en el espacio deben resistir la exposición a la radiación cósmica y a la radiación solar ultravioleta. De los datos obtenidos en las medidas de fluorescencia de la clorofila *a* durante el periodo de recuperación (Figuras 8-12) podemos concluir lo siguiente: (i) el intervalo de radiación ultravioleta solar comprendido entre los 100 y los 200 nm fue con toda probabilidad la parte más dañina del espectro solar para las muestras, y (ii) la actividad del fotosistema II de todas las muestras expuestas a distintos rangos de radiación ultravioleta y visible mostró una capacidad clara de reversibilidad durante el periodo de recuperación. Esto demuestra que los posibles daños fisiológicos generados por las distintas exposiciones no fueron permanentes en ningún caso. La ausencia de daño metabólico en los controles

de vuelo (Figura 12) confirmó también que la radiación solar extraterrestre ultravioleta fue el parámetro espacial más dañino comparado con el vacío, la radiación cósmica o los contrastes de temperaturas experimentados por las muestras.

Tres días de reactivación han sido demostrados como suficientes para la recuperación total de las muestras expuestas a las condiciones espaciales, y mostraron a su vez que estos parámetros estresantes no fueron suficientes para comprometer la actividad fotosintética de *C. gyrosa* tras 10 días de exposición al espacio. Esta observación fue confirmada a través de las medidas de intercambio de CO₂. Tras 72h de reactivación, las muestras de vuelo expuestas presentaron valores muy parecidos a los obtenidos en las muestras control Tierra.

Varios autores (Millanes y Vicente 2003; Solhaug et al. 2003) han sugerido que las sustancias líquénicas son una fuente de protección eficaz frente a la radiación ultravioleta. La ausencia de estas sustancias se confirmó a través de la cromatografía en capa fina, por lo que la resistencia a la radiación debe ser debida a otro mecanismo diferente. Este podría ser la estructura del cortex superior. El papel de un cortex fúngico grueso y con alto grado de compactación de hifas como protector frente a excesiva radiación ultravioleta incidente ha sido demostrado en trabajos de campo por De la Torre et al. (2002). Parece que las poblaciones de algas fotosintéticas están muy bien protegidas por esta capa que actúa como una pantalla protectora. Aunque hemos podido observar algunos daños ultraestructurales en células de los fotobiontes, los fotosistemas han permanecido bien protegidos como una de las estructuras más importantes de las algas.

Las vacuolas con material electrodensito han sido observadas con frecuencia en los citoplasmas de las células de los fotobiontes de talos expuestos a longitudes de onda de $\lambda \geq 110, 200$ y 290 nm, pero no en aquellas expuestas a $\lambda \geq 400$ nm. Estos cuerpos electrónicos densos podrían representar una acumulación de lípidos como consecuencia de la pérdida de los mismos de las membranas celulares, lo que estaría relacionado con un cierto grado de senescencia celular (Ascaso et al. 1986). La integridad de la pared celular de las algas de las muestras expuestas a radiaciones de $\lambda \geq 110$ nm, puede ser considerado un hecho positivo a la hora de valorar la resistencia a las condiciones espaciales. La relación entre los datos metabólicos obtenidos y el análisis de

ultraestructura muestra características interesantes que deben ser evaluadas con detenimiento. En respuesta a las condiciones de vuelo, se observó una desorganización de las lamelas del tilacoide dentro de los pirenoides, que podría ser el resultado de una pérdida de lípidos desde la membrana tilacoidal. La mayoría de los túbulos del tilacoide colapsaron y en consecuencia se produjo una distribución desorganizada de los pirenoglóbulos. El colapso de los túbulos pudo ser debido tanto por una retirada de agua del lumen de los túbulos, o bien por un cambio en la configuración de la estructura proteica del pirenoide deshidratado. Los pirenoides más afectados aparecieron en las células del control vuelo y de la muestra expuesta al vuelo que recibió mayor rango de radiación ultravioleta ($\lambda \geq 110$). También aparecieron afectadas las muestras de vuelo expuestas que recibieron radiaciones de $\lambda \geq 200$ y 290 nm, ya que las membranas del tilacoide perdieron su integridad. La presencia de cuerpos densos entre las membranas del tilacoide podría ser debida a una pérdida de lípidos en la misma. En todos los casos el siguiente paso podría haber sido la desorganización total del pirenoide. Todas estas observaciones implican una desorganización de los cloroplastos de las muestras expuestas a las condiciones de vuelo en los tratamientos $\lambda \geq 110$, 200 y 290 nm. De los Ríos et al. (2010) observaron los mismos depósitos electrodensos mencionados anteriormente en células de *Rhizocarpon geographicum* tras la exposición espacial en el experimento LICHENS. En las muestras de control Tierra y en aquellas expuestas al vuelo con radiaciones superiores a los 400 nm, el aspecto del tilacoide fue normal, con pirenoglobulos unidos a las membranas tilacoidales.

Se puede deducir por tanto que a nivel de ultraestructura, las células más dañadas aparecieron en los tratamientos $\lambda \geq 110$, 200 y 290 nm, con cloroplastos desorganizados, y algunas mitocondrias desestructuradas, lo que ha sido asociado anteriormente a exposición a radiación ultravioleta (Poppe et al. 2002) y a exposición espacial en algas (Popova 2003). También se debe destacar la presencia de material electrodenso en el interior de las vacuolas de células de fotobionte y micobionte, lo que normalmente es un indicador de secuestro vacuolar de componentes celulares. Esto último se puede traducir como una respuesta al estrés.

Estas muestras estaban expuestas a distintos grados de radiación ultravioleta y al vacío, por lo que parecen responder a dicha exposición. El siguiente grupo de muestras más dañadas fue el control vuelo, solo expuesto a las condiciones estresantes del vacío espacial. La discriminación entre los efectos de la radiación ultravioleta y del vacío es compleja. La respuesta de los orgánulos celulares a las situaciones de estrés es inespecífica, es decir, responde a una situación general de estrés más que a un factor aislado (Tarhanen 1998). A pesar de la irregularidad del menor número de pirenoesporos por pirenoide en las muestras de control Tierra respecto al control vuelo, el estado de las células de este tratamiento es más próximo a la normalidad. Las células del tratamiento vuelo expuesto a $\lambda \geq 400$ nm mostraron un aspecto muy parecido a las de control Tierra a pesar de la exposición al vacío.

Parece que los cambios ultraestructurales observados pudieron ser reversibles o, que al menos, la integridad celular fue lo suficientemente alta para mantener el metabolismo de los líquenes funcionando de una manera adecuada. Sancho et al. (2007a) y De los Ríos et al. (2010), demostraron que daños ultraestructurales en células de los líquenes alpinos *Rhizocarpon geographium* y *Xanthoria elegans* expuestos a las mismas condiciones espaciales, no implicaron necesariamente un fallo metabólico.

A pesar de que las imágenes de microscopía proporcionan varios ejemplos de los distintos tipos de tratamientos, es muy difícil saber cuál es el porcentaje exacto de células afectadas, ya que no se puede estudiar toda la población. El análisis de los daños ultraestructurales observados por microscopía y sus consecuencias sobre el metabolismo de los líquenes, revela, como se mencionaba anteriormente, varias respuestas relacionadas con los efectos derivados de la exposición espacial. Estos resultados suponen una aproximación a un campo que debería ser estudiado en profundidad.

La ventaja principal que presenta *C. gyrosa* respecto a otros líquenes usados anteriormente en experimentos de astrobiología es su morfología compacta separada del sustrato. Esto permite el estudio de talos enteros individuales, que genera información más completa que la proporcionada por fragmentos de talos unidos a un sustrato rocoso.

El hecho de haber podido medir únicamente una réplica en los distintos tratamientos de las muestras expuestas al vuelo, abre una línea para futuras investigaciones relacionadas que corroboren estos resultados prometedores. La misma especie ha mostrado una resistencia muy similar a la demostrada aquí en experimentos de simulación de atmósfera marciana (Sánchez et al. 2012), lo que confirma la especie como un excelente candidato para experimentos de astrobiología.

La cuestión de si la panspermia aparece como una posibilidad real o se queda en meras especulaciones parece seguir siendo objeto de debate. La disponibilidad actual de buenos diseños experimentales a través del desarrollo de tecnología adecuada abre nuevas puertas a científicos de varias disciplinas interesados en esta línea de investigación. Los líquenes han demostrado ser organismos adecuados para este tipo de experimentos, ya que las tres especies estudiadas hasta la fecha han demostrado su resistencia fisiológica a experimentos con vuelo real. La resistencia de distintos tipos de líquenes adaptados a hábitats distintos, la posibilidad de estudiar propágulos liquénicos que pudieran sobrevivir a una posible entrada en la atmósfera y experimentos de exposición espacial de larga duración son nuevos retos pendientes para estos organismos. De esta manera se podrán responder algunas de las preguntas pendientes en experimentos de astrobiología con líquenes.

CONCLUSIONES GENERALES / GENERAL CONCLUSIONS

1. Relación entre fotosíntesis y crecimiento en líquenes adaptados a regiones polares y alpinas

1.1. Los talos crustáceos de alta montaña del género *Rhizocarpon* subgénero *Rhizocarpon* no mostraron ningún vínculo significativo entre fotosíntesis y tamaño del talo, por lo que el uso de la liquenometría queda reforzado desde el punto de vista fisiológico a lo largo del ciclo de vida de estas especies, independientemente de la edad de los talos.

1.2. Los talos crustáceos de ambientes de montaña mostraron una relación entre morfología y fisiología, según la cual los talos más desarrollados presentaron mayor fotosíntesis bruta por superficie que el resto. Esta mayor fotosíntesis bruta es debida a mayores cantidades de clorofila por unidad de superficie.

1.3. Los vínculos fisiológicos encontrados entre fotosíntesis neta, fijación de nitrógeno y contenido en nutrientes en las tres especies crustáceas del género *Placopsis* en Tierra de Fuego apuntan a los cefalodios y a la fijación de nitrógeno como claves para entender una colonización pionera rápida y eficaz.

1.4. Los porcentajes de actividad de líquenes comparados en extremos climáticos de la Antártida permiten una mejor interpretación de las grandes diferencias en cobertura vegetal, biomasa y tasas de crecimiento entre ambas localidades.

2. Mecanismos de resistencia a ambientes extremos y límites de dicha resistencia

2.1. Las especies de montaña presentaron una adecuada adaptación a las condiciones de su hábitat a través de rendimiento fisiológicos óptimos a bajas temperaturas y a una mayor tolerancia a la radiación incidente. Los mecanismos de disipación de calor no mostraron una respuesta homogénea.

2.2. Las muestras tripartitas del género *Placopsis* procedentes de morrenas glaciares en Tierra de Fuego demostraron rendimientos fisiológicos óptimos en un hábitat deficitario en nitrógeno.

2.3. Los resultados obtenidos tras la monitorización realizada en los Valles Secos de McMurdo indican que la estrategia adaptativa fundamental durante el periodo de medida es la resistencia a través de la inactividad metabólica. Teniendo esto en cuenta, el talo crustáceo de *Caloplaca sp.* mostró mayor capacidad para activar su metabolismo que las tres *Umbilicarias* monitorizadas.

2.4. Nuestros primeros datos sobre la resistencia fisiológica del género *Umbilicaria* en la Antártida apuntan hacia una temperatura de -4 °C como límite común para la actividad metabólica en especies del genero que habitan en los extremos del continente.

2.5. La especie fruticulosa *C. gyrosa* ha mostrado la capacidad de revertir el estrés fisiológico generado tras diez días expuesta al espacio exterior en estado deshidratado. Los límites de la resistencia de los líquenes a ambientes extremos permanecen abiertos.

GENERAL CONCLUSIONS

1. Relationships between growth and photosynthesis in lichens from alpine and polar environments.

1.1. The crustose samples belonging to the alpine genus *Rhizocarpon* subgenus *Rhizocarpon* did not show any significant link between photosynthesis and thallus size, which provides physiological support for their use in lichenometry during the life cycle of these species independently of thallus age.

1.2. The crustose lichens from mountain environments showed a relationship between morphology and physiology, with the most developed thalli showing higher gross photosynthesis due to higher values of chlorophyll in a surface basis.

1.3. The physiological links found between net photosynthesis, nitrogen fixation and nutrients content in the three crustose species of the genus *Placopsis* in Tierra de Fuego points to cephalodia and nitrogen fixation as the key to understanding the species fast and efficient pioneer colonization of the moraine.

1.4. The considerable differences in the percentages of activity found in lichens in very different regions with strong contrasts in Antarctica are related to differences in vegetation cover, biomass and growth rates between both localities.

2. Resistance mechanisms to extreme environments and limits of the resistance.

2.1. The alpine species showed a correct adaptation to the environment through optimal physiological activity at low temperatures and a higher tolerance to incident radiation. Heat dissipation mechanisms did not show a consistent behaviour within the group of samples.

2.2. Tripartite species belonging to *Placopsis* genus from glacial moraines in Tierra de Fuego showed an optimal physiological performance despite being in a nitrogen deficient environment.

2.3. The results obtained after the monitoring period in the McMurdo Dry Valleys showed that the resistance mechanism there is mainly based on avoidance through inactivity. Despite this, the crustose *Caloplaca* showed a better ability to activate its metabolism compared with the *Umbilicaria* samples.

2.4. Our first data about physiological resistance of the genus *Umbilicaria* in Antarctica points to a temperature of -4 °C as a common limit for activity, even considering that the two species live in the extremes of the continent.

2.5. The fruticose lichen *C. gyrosa* showed the physiological ability to withstand 10 days of space exposition in dry conditions. The limits of lichens resistance to extreme environments have still not been reached.

**RESUMEN EXTENSO Y PLANTEAMIENTOS FUTUROS / LONG
SUMMARY AND FUTURE POSSIBILITIES**

Los dos objetivos fundamentales propuestos en esta tesis doctoral han sido abordados desde distintos puntos de vista a lo largo de los cinco capítulos presentados, pero siempre manteniendo un hilo conductor que sostuviera las relaciones entre fotosíntesis y crecimiento en líquenes de regiones polares y alpinas y/o mecanismos de resistencia a estos hábitats extremos. Las relaciones entre fotosíntesis y crecimiento se plantean fundamentalmente (incidiendo más en los líquenes crustáceos) en los capítulos I, II, III y IV, mientras que la resistencia a ambientes extremos, a pesar de estar presente a lo largo de casi toda la memoria doctoral, se hace más patente en los capítulos IV y V.

En el capítulo I se aporta un grueso de información ecofisiológica sobre líquenes crustáceos y foliáceos de ambientes de montaña que cubre el vacío existente anteriormente, con escasos trabajos al respecto (sobre todo respecto a los crustáceos, grandes desconocidos desde el punto de vista fisiológico). Aparte de la información propuesta sobre relaciones hídricas, curvas de luz, curvas de temperatura, contenidos en clorofila y curvas de inducción de fluorescencia a distintas radiaciones, se ha detectado una relación positiva entre fotosíntesis bruta y grado de desarrollo del talo en todas las especies crustáceas. De esta manera, las formas crustáceas con una morfología más desarrollada (es decir, lobulada y bulada) mostraron diferencias significativas en los principales parámetros ecofisiológicos respecto a las formas crustáceas más sencillas. El crecimiento en grosor de los líquenes crustáceos estudiados parece estar relacionado por tanto con las tasas de fotosíntesis bruta por unidad de superficie a través de una mayor cantidad de clorofila por unidad de superficie. La relación entre ganancia de peso por unidad de superficie y fijación de carbono ya ha sido sugerida en líquenes anteriormente (Sundberg et al. 2001). Aunque las especies foliáceas estudiadas cumplieron el gradiente mencionado, parece más razonable atribuir sus mayores tasas metabólicas a mayores cantidades de clorofila favorecidas por hábitats fuertemente nitrogenados.

Por otro lado, el conjunto de parámetros fisiológicos estudiados muestran tendencias adaptativas a las características predominantes de la alta montaña, aunque en todo momento se ha destacado que las diferencias microclimáticas pueden ser más determinantes a la hora de evaluar una respuesta fisiológica. Las tendencias adaptativas mencionadas en líquenes de montaña ya han sido sugeridas anteriormente (Kappen 1988; Heber et al. 2000), y en este trabajo se deducen de mayores puntos de compensación y saturación de luz, óptimos de temperatura ligeramente desplazados a

temperaturas más frías y mayor tolerancia a la luz en las curvas de inducción de fluorescencia en buena parte de las especies respecto al control de sombra. Las especies estudiadas no se comportaron de forma homogénea respecto a la capacidad de eliminar energía radiativa incidente en forma de calor.

Las tendencias adaptativas a las condiciones ambientales de su entorno pueden convertir a los líquenes de zonas de montaña especialmente vulnerables a posibles cambios ambientales. El impacto del cambio global en plantas se espera especialmente pronunciado en regiones árticas y alpinas, ya que las plantas en estas regiones están limitadas por bajas temperaturas y escasa disponibilidad de nutrientes (Jagerbrand et al. 2006). El IPCC (Intergovernmental Panel of Climate Change) considera las regiones polares y alpinas como vulnerables y en riesgo ecológico de daño irreversible (McCarthy et al. 2001). Algunos estudios de simulación de cambio climático en regiones alpinas han mostrado efectos negativos sobre la flora líquénica (Ellis et al. 2007; Britton et al. 2009) aunque otros han mostrado divergencia en sus resultados, en los cuales los líquenes de regiones ártico-alpinas disminuían, aumentaban, o no se veían afectados en función del tipo de tratamiento de simulación utilizado o en función de la zona de estudio (Cornelisen et al. 2001; Jagerbrand et al. 2009). Otro factor importante a tener en cuenta es, más que el efecto del cambio ambiental en sí, el posible efecto de un aumento de la presencia de plantas vasculares en estas comunidades criptogámicas poco habituadas a la competencia (Cornelisen et al. 2001). Estudios específicos sobre el comportamiento fisiológico de líquenes de estos ecosistemas sometidos a mayores concentraciones de CO₂, a mayores temperaturas y a una mayor disponibilidad de nutrientes ayudarían a clarificar los efectos de las posibles modificaciones ambientales en un escenario de cambio.

En el capítulo II se continúa con el estudio de las relaciones entre fotosíntesis y crecimiento en líquenes crustáceos habituales en ambientes de montaña. El objeto de estudio en este caso, líquenes verde-amarillentos del género *Rhizocarpon*, presenta la peculiaridad de ser el objetivo principal de la mayoría de trabajos de datación de superficies a través de la liquenometría. La controversia asociada a esta técnica (ya explicada anteriormente) y la fuerte presencia de este tipo de líquenes en muchas regiones frías (mayormente regiones de media y alta montaña y regiones de alta latitud), ha dado lugar a un exhaustivo estudio del grupo en los últimos años (Bradwell y

Armstrong 2007; Matthews y Trenbirth 2011). Aparte de los trabajos estrictamente liquenométricos, se han realizado varios estudios que han pretendido aclarar la biología del grupo con la finalidad de responder a los interrogantes que permanecían abiertos en el uso de la liquenometría (Loso y Doak 2006; Armstrong y Bradwell 2010; Armstrong 2011). Una de estas aclaraciones biológicas que se ha intentado llevar a cabo ha sido el estudio del crecimiento de este tipo de líquenes, predominantemente marcado por la presencia de un hipotalo fúngico que sostiene un talo liquénico areolado. Aunque la información al respecto es abundante (Armstrong y Smith 1987; Asta y Letrouit-Galinou 1995; Armstrong y Smith 2009), ningún trabajo hasta la fecha ha considerado la fotosíntesis como parámetro fundamental para entender el crecimiento del grupo.

Siguiendo a Palmqvist et al. (2008), el crecimiento y la supervivencia de organismos autótrofos fotosintéticos (como los líquenes) están limitados principalmente por su asimilación fotosintética de carbono menos las pérdidas de CO₂ relacionadas con el crecimiento y el mantenimiento de la respiración. Teniendo esto en consideración, el aporte de datos que relacionen la fotosíntesis de los talos del género *Rhizocarpon* subgénero *Rhizocarpon* con el tamaño de los mismos ayuda a entender mejor la biología y el crecimiento del grupo.

En este capítulo hemos comprobado como la fotosíntesis neta de todos los talos estudiados no mostró ninguna relación definida respecto al tamaño, lo que podría entenderse como una no dependencia de la fotosíntesis con respecto a la edad de los individuos. El grupo de talos medidos mayor de 50 mm no mostró en ningún caso un descenso de la fotosíntesis, por lo que la fase de senescencia mencionada por algunos autores no se ve apoyada a nivel fisiológico (Bradwell y Armstrong 2007). El parámetro Fv/Fm (indicador del estado de salud del fotosistema II) se midió también frente al tamaño de los talos, en esta ocasión añadiendo todas las muestras inferiores a 20 mm. Aunque se observa una cierta tendencia a mayores valores de Fv/Fm en los talos pequeños, las tendencias son difíciles de confirmar y no aparecen claras. El conjunto de datos recopilado respecto a fotosíntesis frente a tamaño invita a pensar en una ausencia de relación definida entre ambos, lo cual apoya la validez de la liquenometría desde el punto de vista fisiológico.

En los datos de respiración se observó una relación lineal (muy débil) entre la misma y el tamaño de los talos estudiados. Si esta relación se confirmase se debería pensar que a mayor tamaño de los talos, mayor tasa de respiración por unidad de superficie. Esta información podría apoyar la presencia de un anillo de crecimiento formado por las areolas más cercanas al hipotalo que derivase más carbono al crecimiento marginal, mientras que la zona central (más grande según aumenta el tamaño del talo) derivaría recursos fotosintéticos a reproducción y protección frente al estrés, sin apenas contribuir al crecimiento marginal. Armstrong (2011) defiende que la presencia del hipotalo (entre otros factores) condiciona el crecimiento lento de este tipo de líquenes, ya que para desarrollarse necesita aporte de nutrientes por parte de las areolas. El autor sostiene que una posibilidad es que las areolas más cercanas al hipotalo sean las encargadas de la transferencia de carbono al mismo, apoyando de esta manera nuestra teoría de una posible zona periférica sosteniendo el crecimiento marginal.

Aunque se postule aquí la existencia de esta zona periférica, nuestros datos de clorofila y fluorescencia medidos en el centro y en la periferia de los talos más grandes del estudio han mostrado que no tiene porqué haber diferencias en la fijación de carbono entre ambas zonas (aunque no se haya medido fijación de carbono real tenemos información potencial del proceso fotosintético, se puede afirmar que no tendría porqué haber diferencias fotosintéticas entre ambas zonas del talo). Esto se sostiene con los valores de fotosíntesis neta real medidos en los talos intermedios y grandes, que no mostraron diferencias entre ellos. La conclusión refuerza el hecho ya mencionado de que no debería haber diferencias de fijación entre centro y periferia, sino una distinta alocaación de los productos de la fotosíntesis.

Aunque los datos aportados son novedosos y deberían ser considerados en futuros estudios liquenométricos, las diferencias de tamaño entre los grupos muestrales hacen que consideremos necesario más trabajo experimental en esta dirección. El mayor problema reside en la diferencia de número de muestras entre los grupos pequeño ($n=35$) e intermedio ($n=28$) y el grande ($n=8$). Aunque la fotosíntesis y parámetros asociados a la misma sean fundamentales para entender la biología del crecimiento de cualquier organismo fotosintético autótrofo, hay un vacío de la relación entre ambos en la literatura. Considerando que hablamos de uno de los grupos de líquenes más estudiados, la ausencia de esta valiosa información solo se entiende desde la

problemática metodológica asociada a la misma. Los talos mayores de 50 mm son poco abundantes en el campo, y tanto su recolección en su hábitat con martillo y escoplo, como los cortes en el laboratorio para adecuar su tamaño a el de la cubeta donde se mide la fotosíntesis son sumamente dificultosos. La pérdida de muestras fue muy habitual, y al final se aceptó trabajar con grupos muestrales distintos con el fin de abordar un experimento que, a nuestro entender, es imprescindible para profundizar en el crecimiento de este tipo de líquenes.

Como planteamiento para el futuro, se podría planificar un trabajo que permita aportar a la base de datos obtenida más información sobre la fisiología de los talos de los grupos de mayor y menor tamaño (recolectados en el mismo lugar y en la misma época del año). Esto ayudaría a confirmar las tendencias encontradas.

En el capítulo III se produce una transición de las regiones de alta montaña a las regiones polares, en concreto al sur de Tierra de Fuego, territorio subantártico a las puertas de la península Antártica. Los líquenes crustáceos tripartitos han sido muy poco estudiados desde el punto de vista fisiológico, por lo que este capítulo aporta información considerable a un grupo de líquenes poco conocido. Recientemente se ha puesto de manifiesto la importancia de las cubiertas vegetales de criptógamas en los balances globales de fijación de carbono y nitrógeno, siendo estas responsables de hasta un 7% y casi un 50% de la fijación global de carbono y nitrógeno respectivamente que lleva a cabo toda la vegetación terrestre del planeta (Elbert et al. 2012). Este trabajo contextualiza la relevancia de nuestro estudio sobre el impacto del metabolismo de estos líquenes en un ecosistema con limitación de nutrientes como las morrenas glaciares de Tierra de Fuego. La fotosíntesis, la fijación de nitrógeno, el contenido y la disponibilidad de nutrientes fundamentales como son el nitrógeno y el fósforo son imprescindibles para entender el crecimiento en líquenes de estas características. El vínculo encontrado entre estos componentes en las tres especies refuerza esta última idea, y pone de manifiesto las interacciones entre los distintos miembros de la simbiosis líquénica. A pesar de la contrastada relevancia de de una relación adecuada entre nitrógeno y fósforo para el desarrollo de este tipo de líquenes (Crittenden et al. 1994), el fósforo ha mostrado tener un papel fundamental en la regulación del metabolismo, con mayor relevancia incluso que el nitrógeno. También merece la pena destacar el comportamiento ecofisiológico compacto encontrado entre las dos especies de roca y

los rasgos diferenciales observados en la especie de suelo, todas compartiendo la morrena de una glaciación subantártica. *P. pycnotheca* parece tener unas capacidades fisiológicas excelentes (Raggio et al. 2012), que le permiten consolidar el suelo y favorecer la sucesión vegetal (De los Ríos et al. 2011) fomentando la entrada de nutrientes en una región con un claro déficit en aporte de nitrógeno.

Las tasas de crecimiento de *P. perrugosa*, las más altas medidas a día de hoy, se han explicado a través de una mezcla entre su actividad fisiológica y su morfología, que condiciona tiempos de vida cortos. Nuestra hipótesis cuadraría con tasas de crecimiento también altas para el terrícola *P. pycnotheca* condicionadas por su intensa actividad fisiológica y tasas algo más bajas para el otro líquen saxícola, *P. stenophylla*, explicadas por el mayor peso por unidad de superficie de este último. La confirmación de estas predicciones podría profundizar en la comprensión de las bases fisiológicas del crecimiento en líquenes crustáceos frecuentemente utilizados en trabajos liquenométricos (Winchester y Harrison 2000; Winchester et al. 2001).

El capítulo IV compara cuatro meses y medio de medidas de metabolismo y microclima en líquenes antárticos de dos ambientes con fuertes contrastes. El gradiente entre Isla Livingston y los Valles Secos es el más marcado que se haya monitorizado en el continente hasta la fecha. Los resultados obtenidos van en consonancia con los fuertes contrastes entre las dos regiones, ya que las diferencias observadas en los porcentajes de actividad entre especie del mismo género que aparecen en ambos lugares es tan fuerte como las diferencias encontradas en las tasas de crecimiento en líquenes crustáceos entre ambas localidades (Sancho et al. 2007b). El capítulo entra de lleno en los objetivos principales de esta memoria. Por un lado pone de manifiesto la importancia de la relación entre actividad metabólica y crecimiento, con talos grandes asociados a periodos de actividad altos en Livingston y el fenómeno contrario en los Valles Secos. Por otro lado plantea un ejemplo claro de adaptación a un ambiente extremo, proporcionando posibles estrategias de adaptación que permitan aprovechar los escasos momentos con disponibilidad de agua en el Valle Garwood en McMurdo. La principal estrategia de protección frente al ambiente durante el periodo de medida parece ser la resistencia a través de la inactividad metabólica. La mayor actividad encontrada en el talo monitorizado de *Caloplaca sp.* en esta localidad ha servido para entender que el biotipo crustáceo se puede comportar de manera distinta que los talos foliáceos en el

fondo del valle, y que a partir de aquí se pueda explicar su mayor abundancia en esta zona tan pobre en vida terrestre. La inestabilidad de los valores de fluorescencia en *Caloplaca sp.* en los eventos de actividad más extremos nos invitan a plantear más trabajo para el futuro para confirmar los valores de actividad obtenidos hasta -29,4 °C. Por último, las dos especies de *Umbilicaria* que habitan extremos de la Antártida han mostrado un límite de temperatura muy parecido para la actividad metabólica. Este patrón abre la puerta para estudiar adaptaciones fisiológicas a la temperatura a nivel de género.

La comprensión de los mecanismos por los cuales los líquenes sobreviven en un ambiente tan extremo como los Valles Secos de McMurdo invita a pensar que las características que marcan los límites de la resistencia de estos organismos a condiciones extremas se pueden encontrar fuera de los límites de nuestro planeta. Con esta idea surgieron los experimentos de astrobiología en líquenes, que han ido demostrando con éxito que en estado inactivo pueden resistir de manera adecuada las condiciones estresantes del espacio exterior. El capítulo V se enmarca dentro de este contexto, y aporta a la literatura existente los primeros experimentos de intercambio gaseoso real tras un vuelo espacial. Si bien trabajos anteriores ya demostraron que los fotosistemas y la ultraestructura del talo resistían con éxito las condiciones espaciales, el poder analizar al completo todo el proceso fotosintético con resultados positivos supone una prueba importante para confirmar la mencionada resistencia. También se ha podido evaluar la respuesta fisiológica de los hongos a través de las medidas de respiración en oscuridad, que presentó valores normales, y se ha medido por primera vez la respuesta a la exposición espacial de una especie fruticulosa vagante distinta al modelo típico de líquen saxícola crustáceo o foliáceo usado en los experimentos anteriores.

Al finalizar la discusión del capítulo V se comentaron algunas posibles cuestiones interesantes para continuar con la línea de investigación de resistencia de líquenes a las condiciones extraterrestres. En este contexto se encuadra el experimento BIOMEX, coordinado por el DLR en Alemania, donde distintos tipos de líquenes (incluyendo *C. gyrosa*) van a ser expuestos a condiciones de vuelo real de larga duración (más de un año) y a distintos experimentos de simulación. A la espera de los resultados de dicha exposición, la resistencia de los líquenes inactivos a condiciones espaciales o marcianas parece de sobra contrastada.

Las líneas de investigación en astrobiología en el futuro deberían ir enfocadas hacia la posible supervivencia de organismos a entradas y salidas de atmósferas planetarias y a la posibilidad de que los líquenes puedan sobrevivir en estado de actividad metabólica a las condiciones extraterrestres. El primer aspecto debe ser comprendido en profundidad para permitir nuevas especulaciones sobre la teoría de la panspermia. La segunda cuestión es fundamental para ampliar el conocimiento actual sobre la viabilidad de los líquenes como candidatos reales a sobrevivir bajo condiciones extraterrestres. Experimentos como el llevado a cabo por De Vera et al. (2010), en el que se mide actividad del fotosistema II en condiciones de baja disponibilidad de agua y bajo una atmósfera rica en CO₂ con la misma composición de gases que hay en Marte, pueden ayudar a profundizar en un aspecto que parece el siguiente paso experimental en astrobiología con líquenes. En este sentido, Cockell y Raven (2004), propusieron que sobre la superficie de Marte podían darse condiciones de disponibilidad de luz fotosintéticamente activa y protección suficiente ante la radiación ultravioleta como para que la fotosíntesis fuera algo teóricamente viable. Trabajos que profundicen sobre estas ideas considerando de manera global todos los parámetros ambientales involucrados serán fundamentales para ampliar el conocimiento sobre todo lo que los líquenes puedan aportar en la búsqueda de rastros de vida extraterrestre.

SUMMARY AND FUTURE POSSIBILITIES

The two main themes developed in this work have been approached from different perspectives, but always keeping in mind the relationship between growth and photosynthesis in lichens from polar and alpine regions and/or the adaptation mechanisms to those environments. The links between growth and photosynthesis have been dealt with mainly in the chapters I, II, III and IV. The resistance to extreme environments, although has been present in almost the whole text, is specifically studied in chapters IV and V.

Chapter I contains considerable ecophysiological information of different types of lichens (mainly crustose) from alpine environments. This fills an important gap in the literature, mainly if we consider crustose species, which remain the big unknowns from a physiological point of view. In addition to the information related with water curves, temperature and light curves, chlorophyll contents and induction curves through fluorescence at different light levels, a positive link has been found between gross photosynthesis and degree of development in the crustose species. In addition, the lobulate and lobate crustose samples showed significant differences with respect to the main ecophysiological parameters compared to the strictly crustose samples. The growth in thickness for the studied crustose lichens seems to be linked with gross photosynthesis per surface unit with higher amounts of chlorophyll on a surface basis. The relationship between weight on a surface area basis and carbon fixation has already been suggested for lichens before (Sundberg et al. 2001). Although the foliose species studied here fitted with this morphological gradient, they not only have higher photosynthetic rates but also higher chlorophyll contents, probably because of their preference for habitats with high amounts of nitrogen.

All the ecophysiological information obtained points to trends showing adaptations to alpine environments, but always keeping in mind that microclimatic differences normally have the final determination in relation with the physiological status of the lichens. The adaptation trends suggested have been proposed before (Kappen 1988; Heber et al. 2000). In this work we interpret these adaptative trends from the higher light compensation and saturation points, temperature optima displaced to colder values and higher tolerance to light in the induction curves in most of the species compared

with the shadow control used. The species studied did not show a consistent behaviour in dissipating incident light energy as heat (NPQ), which suggests that this ability is not a common protection strategy in alpine cryptogams against light damage.

If lichens are well adapted to these mountain environments, they can be vulnerable to environmental changes. The impact of global change in plants is expected to be especially harmful in polar and alpine regions, because plants in these regions are nutrients and temperature limited (Jagerbrand et al. 2006). The IPCC (Intergovernmental Panel of Climate Change) considers the regions mentioned as vulnerable and in ecological risk of irreversible damage. Some simulation studies of global change in alpine regions have shown negative effects over the lichen flora (Ellis et al. 2007; Britton et al. 2009) but others have shown quite different responses depending on the simulation treatment used and the study zone chosen to perform them (Cornelisen et al. 2001; Jagerbrand et al. 2009). Another important factor to consider in addition to the global change effect itself is the competition effect due to a raise in the presence of vascular plants (Cornelisen et al. 2001). More studies related with responses of alpine lichens to enhanced CO₂, temperatures and nutrients would help in order to understand possible consequences of environmental changes.

The study of the relationships between photosynthesis and growth continues in chapter II. This time the studies are on yellow-green alpine species of the crustose genus *Rhizocarpon sp.*, which are the most commonly used lichens in the dating technique known as lichenometry. The controversy linked to the technique (see chapter II) and the abundance of this lichens in cold regions has resulted in an exhaustive study of the group in recent years (Bradwell and Armstrong 2007; Matthews and Trenbirth 2011). Besides of the works strictly lichenometrical, some studies have been done in order to clarify the biology of these species, trying to answer some questions still open in the use of lichenometry (Loso and Doak 2006; Armstrong and Bradwell 2010; Armstrong 2011). One of these biological questions is related with the type of growth in these lichens, which normally show a fungal hypothallus with an aerolate lichen thallus. Although it is easy to find information about this in the literature (Armstrong and Smith 1987; Asta and Letrouit Galinou 1995; Armstrong and Smith 2009), no other work was found using experimentally measured photosynthesis as a driver for growth.

Following Palmqvist et al. (2008), the growth and survival of photosynthetic autotroph organisms (as lichens) is suggested to be mainly limited by their photosynthetic carbon assimilation minus carbon dioxide losses related to growth and maintenance respiration. This underlines the importance of measuring photosynthesis, respiration and samples size in the genus *Rhizocarpon sp.* in order to understand the biology and growth of this widespread group of lichens.

In this chapter, net photosynthetic rate in all the samples did not show any clear relationship with thallus size. The largest thalli, those bigger than 50 mm, did not show any decrease in photosynthesis in a surface basis. These results do not support the presence of a senescence phase in growth found by some authors (Bradwell and Armstrong 2007). The chlorophyll *a* fluorescence parameter F_v/F_m (health indicator in photosystem II) was also measured at different thallus size, this time including samples lower than 20 mm that could not be measured in the gas exchange experiment. Although some trends for higher F_v/F_m values were observed in the smaller samples, they are not clear and are difficult to confirm. The data relating photosynthesis and thallus size points to a lack of relationship between both. This would support lichenometry from a physiological point of view.

The respiration data showed a linear (but really weak) relationship with thallus size. If this is so then respiration in a surface basis would increase with thallus size. This information could support the existence of a marginal ring consisting of the areolates closer to the hypothallus. The ring could support marginal growth and the central part could use photosynthesis products for reproduction and protection strategies. Armstrong (2011) supports that the fact of having hypothallus determines the slow growth of these lichens due to the need of nutrient demand from thallus to hypothallus. The author argues that the areolates closer to the hypothallus are the responsible for carbon transfer to it, supporting the theory of a peripheral ring standing marginal growth.

The data shown here are new and are relevant to future lichenometric studies, but we recognize that the difference number of samples in each of the three size groups invites to more research. One problem could be the difference in number of samples between the small ($n= 35$) and medium ($n= 28$) group and the large one ($n= 8$). Taking into account that *Rhizocarpon sp.* is one of the more studied lichen genus, the lack of

physiological data to explain growth rates can be best understood when the methodological problems involved are considered. Samples bigger than 50 mm diameter are difficult to find in the field. Their collection and later cutting using the diamond razor was difficult, and the loss of samples was normal during the procedure. The different number of samples in each size group is a consequence of all these methodological problems.

Considering future research, it would be interesting to continue working in this direction, getting gas exchange for samples belonging to the smallest group and more physiological data from samples belonging to the biggest one. A bigger and connected data base would definitely better help clarify everything related to the links between photosynthesis and growth in the genus.

In chapter III there is a transition from alpine to Polar Regions, specifically to the south of Tierra de Fuego, a subantarctic environment at the gates of the Antarctic Peninsula. Tripartite crustose lichens have been poorly studied from a physiological point of view, and this chapter tries to fill this gap. The importance of cryptogamic covers in the global balances of nutrients has been addressed recently, being responsible of a 7% and 50% of the total carbon and nitrogen fixed in the Earth (Elbert et al. 2012). The work in this thesis shows the relevance of the impact of the metabolism of these lichens in the glacial moraines of Tierra de Fuego, a nitrogen deficient environment. Photosynthesis, nitrogen fixation and nutrients availability are important to understand the growth of this type of lichens. The physiological link found in the three species reinforces this idea and reveals the interactions between the members of the symbiosis. Despite of the importance of a good balance between nitrogen and phosphorus for the development of tripartite lichens (Crittenden et al. 1994), phosphorus is shown to play a key role in the regulation of metabolism, even more important than nitrogen. It is worthwhile to also highlight the similar ecophysiological behaviour found in the two rock species compared with the totally different behaviour seen in the soil species. The latter species, *P. pycnotheca*, seems to have great physiological abilities (Raggio et al. 2012), which help the species consolidate soil and enhance future plant succession in the moraine (De los Ríos et al. 2011). All this have a special ecological relevance in a region with continual geomorphological changes.

The growth rates of *P. perrugosa* – the fastest crustose lichen ever measured- have been explained through a mix between physiological performance and morphology, which implies short life spans. From the physiological and morphological data obtained it would be reasonable to expect very high growth rates in *P. pycnotheca* and lower growth values in *P. stenophylla*. The confirmation of these predictions could be interesting for lichenometric users, in particular because the genus has often been used for this purpose (Winchester and Harrison 2000; Winchester et al. 2001).

Chapter IV compares four and a half months of metabolic and microclimatic activity in antarctic lichens from contrasting habitats. The differences in length of activity of the lichens between Livingston Island in maritime Antarctica and The McMurdo Dry Valleys are the strongest ever monitored to date. The results obtained agree with the differences between both regions. The differences in percentages of activity between the localities fit very well with the growth rates measured in the same places (Sancho et al. 2007b). The chapter is linked with the two main themes proposed at the beginning of this thesis. It highlights the importance of the link between photosynthesis and growth, with bigger thalli, higher growth rates and higher vegetation cover in Livingston Island. On the other hand, it represents a good example of adaptation to extreme environments, showing strategies to profit from scarce water availability in the Dry Valleys. Although the main adaptation strategy in these polar deserts is the avoidance through metabolic inactivity, we have found different patterns in the two species studied. The higher activity found in *Caloplaca sp* has been useful to get a better understanding of the performance of the crustose lichens inside the Valleys, where others type of lichens are absent. The instability of the fluorescence signal in the more extreme activity events during the Antarctic autumn, support further monitoring of crustose lichens inside the Valleys to confirm the activity values found until -29,4 °C. Finally, the two *Umbilicaria* species monitored in the extremes of Antarctica have shown a similar behaviour in relation with the temperature limit for metabolic activity. This opens interesting gates for research in physiological adaptations to temperature at genus level.

The adaptation mechanisms to such an extreme habitat as the Dry Valleys invite us to guess about the possibility of finding the limits of the resistance outside the Earth. This idea initiated the research in astrobiology with lichens. Chapter number V contributes to this line of research with the first gas exchange measurements after a real space flight

with lichens. The resistance of the fruticose lichen *Circinaria gyrosa* has been proved in terms of gas exchange (measuring algae and fungi metabolism), fluorescence and ultrastructure. For the first time a complete fruticose lichen has been exposed successfully to space conditions.

The good results obtained in this work have encouraged more research related with this species exposed to extraterrestrial conditions. Mars simulation experiments have been successfully developed (Sánchez et al. 2012). The German DLR is currently coordinating the BIOMEX experiment, where different types of lichens (including *C. gyrosa*) are going to be exposed to long term exposition (more than one year) to real space and simulation conditions. Meanwhile, the resistance of dry lichens under extraterrestrial conditions has been totally corroborated.

The research efforts related with lichens and astrobiology in the future should be focussed on two main points. First, the capacity of lichens fragments to survive atmospheric transits should be checked. That is the only way to have something more than pure speculation in relation with the panspermia theory. The second should be survival possibilities of active lichens exposed to space conditions. De Vera et al. (2010) have measured the activity of photosystem II in low water availability conditions under a Martian atmosphere rich in CO₂. This seems to be an interesting line to follow. In relation with this, Cockell and Raven (2004) proposed that Mars surface could have light and protection conditions enough for, theoretically, photosynthesis to appear. Future work considering all the environmental parameters involved under these conditions is needed to improve the knowledge about what lichens can do for us in order to follow the track of extraterrestrial life.

BIBLIOGRAFIA

- Allen SE (1989) Chemical Analysis of ecological materials. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK
- Aplin DS y Hill DJ (1979) Growth Analyses of Circular Lichen Thalli. *Journal of Theoretical Biology* 78: 347-363
- Armstrong RA (1983) Growth curve of the lichen *Rhizocarpon geographicum*. *New Phytologist* 94: 619-622
- Armstrong RA y Smith SN (1987) Development and Growth of the Lichen *Rhizocarpon geographicum*. *Symbiosis* 3: 287-300
- Armstrong R (2004) Lichens, lichenometry and global warming. *Microbiologist* 5: 32-35
- Armstrong RA (2005) Radial Growth of *Rhizocarpon* Section *Rhizocarpon* Lichen Thalli over Six Years at Snoqualmie Pass in the Cascade Range, Washington State. *Arctic, Antarctic and Alpine Research* 37: 411-415
- Armstrong RA y Smith SN (2009) Carbohydrates in the hypothallus and areolae of the crustose lichen *Rhizocarpon geographicum* (L.) DC. *Symbiosis* 49: 95-100
- Armstrong RA y Bradwell T (2010) Growth of crustose lichens: A review. *Geografiska Annaler* 92 A: 3-17
- Armstrong RA (2011) The biology of the crustose lichen *Rhizocarpon geographicum*. *Symbiosis* 55: 53-57
- Arrhenius S (1903). Die Verbreitung des Lebens im Weltenraum. *Umschau* 7: 481-485
- Arup U y Grube M (2000) Is *Rhizoplaca* (Lecanorales, lichenized Ascomycota) a monophyletic genus? *Canadian Journal of Botany* 78: 318-327
- Ascaso C y Galván J (1976). The ultrastructure of the symbionts of *Rhizocarpon geographicum*, *Parmelia conspersa* and *Umbilicaria pustulata* growing under dryness conditions. *Protoplasma* 87: 409-418
- Ascaso C (1978). Ultrastructural modifications in lichens induced by environmental humidity. *The Lichenologist* 10: 209-219
- Ascaso C, Brown DH y Rapsch S (1986) The ultrastructure of the phycobiont of desiccated and hydrated lichens. *The Lichenologist* 18: 37-46
- Aspizua R, Bonet FJ, Zamora R, Sánchez FJ, Cano-Manuel FJ y Henares I (2010) El observatorio de cambio global de Sierra Nevada: hacia la gestión adaptativa de los espacios naturales. *Ecosistemas* 19: 56-68

- Asta J y Letrouit-Galinou MA (1995) Observation on the early growth of *Rhizocarpon geographicum* thalii. *Herzogia* 11: 239-252
- Aubert S, Juge C, Boisson AM, Gout E y Bligny R (2007) Metabolic processes sustaining the reviviscence of lichen *Xanthoria elegans* (Link) in high mountain environments. *Planta* 226: 1287-1297
- Baker NR (2008) Chlorophyll Fluorescence: A Probe of Photosynthesis in vivo. *The Annual Review of Plant Biology* 59: 89-113
- Balaguer L y Manrique E (1991) Interaction between sulfur dioxide and nitrate in some lichens. *Environmental and Experimental Botany* 31: 223-227
- Barceló Coll J, Nicolás Rodrigo G, Sabater García B y Sánchez Tamés R (1980) Fisiología Vegetal. Editorial Pirámide, Madrid, España
- Barnes JD, Balaguer L, Manrique E, Elvira S y Davidson AW (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: 85-100
- Barreno E y Rico VJ (1984) Sobre la biología de los líquenes. I. Anatomía, morfología y estructuras vegetativas. *Anales de Biología*, Murcia 1: 161-195
- Barreno E y Pérez-Ortega S (2003) Líquenes de la Reserva Natural Integral de Muniellos, Asturias. KRK Ediciones, Asturias, España
- Barret JE, Virginia RA, Wall DH, Cary SC, Adams BJ, Hacker AL y JM Aislabie (2006) Covariation in soil biodiversity and biogeochemistry in northern and southern Victoria Land, Antarctica. *Antarctic Science* 18: 535-548
- Barták M, Hájek J y Gloser J (2000) Heterogeneity of chlorophyll fluorescence over thalli of several foliose macrolichens exposed to adverse environmental factors: Interspecific differences as related to thallus hydration and high irradiance. *Photosynthetica* 38: 531-537
- Barták M, Hájek J, Vráblíková H y Dubová J (2004) High Light Stress and Photoprotection in *Umbilicaria antarctica* Monitored by Chlorophyll Fluorescence Imaging and Changes in Zeaxanthin and Glutathione. *Plant Biology* 6: 333-341
- Barták M, Gloser J, y Hájek J (2005) Visualized photosynthetic characteristics of the lichen *Xanthoria elegans* related to daily courses of light, temperature and hydration: a field study from Galíndez Island, maritime Antarctica. *The Lichenologist* 37:433-443

- Bench G, Clark BM, Mangelson NF, St Clair LL, Rees LB, Grant PG y Southon JR (2001) Accurate lifespan estimates cannot be obtained from ^{14}C profiles in the crustose lichen *Rhizocarpon geographicum* L. (DC). *The Lichenologist* 33: 539-542
- Benedict JB (1990) Winter Frost Injury to Lichens: Colorado Front Range. *The Bryologist* 93: 423-426
- Benedict JB (2008) Experiments of lichen growth III. The shape of the age-size curve. *Arctic, Antarctic and Alpine Research* 40: 15-26
- Benner JW, Conroy S, Lunch CK, Toyoda N y Vitousek PM (2007) Phosphorus Fertilization Increases the Abundance and Nitrogenase Activity of the Cyanolichen *Pseudocyphellaria crocata* in Hawaiian Montane Forest. *Biotropica* 39: 400-405
- Benner J y Vitousek P (2007) Development of a diverse epiphyte community in response to phosphorus fertilization. *Ecology letters* 10:628-636
- Beschel RE (1950) Lichens as a measure of the age of recent moraines. *Arctic Alpine Research* 5: 303-309
- Bjerke JW (2009) Ice encapsulation protects rather than disturbs the freezing lichen. *Plant Biology* 11: 227-235
- Blaha J, Baloch E y Grube M (2006) High photobiont diversity associated with euryoecious lichen-forming ascomycete *Lecanora rupicola* (Lecanoraceae, Ascomycota). *Biological Journal of the Linnean Society* 88: 283-293
- Bölter M, Kappen L y Meyer M (1989) The influence in Microclimatic Conditions on Potential Photosynthesis of *Usnea sphacelata*: a Model. *Ecological Research* 4: 297-307
- Borde J (1966) Les Andes de Santiago et leur avant-pays. Union française d'impression. Bordeaux, France
- Bradwell T (2001) A new lichenometric dating curve for southeast Iceland. *Geografiska Annaler* 93. 91-101
- Bradwell T y Armstrong RA (2007) Growth rates of *Rhizocarpon geographicum* lichens: a review with new data from Iceland. *Journal of Quaternary Science* 22: 311-320
- Brancaleoni L, Strelin J y Gerdol R (2003) Relationships between geomorphology and vegetation patterns in subantarctic Andean tundra of Tierra del Fuego. *Polar Biology* 26: 404-410
- Britton AJ, Beale CM, Towers W y Hewison RL (2009) Biodiversity gains and losses: Evidences of homogenisation of Scottish alpine vegetation. *Biological Conservation* 142: 1728-1739

- Brown DH y Hooker TN (1977) The significance of acidic lichen substances in the estimation of chlorophyll and phaeophytin in lichens. *New Phytologist* 78: 617-624
- Brown DH, Ascaso C y Rapsch, S (1987) Ultrastructural changes in the pyrenoid of the lichen *Parmelia sulcata* stored under controlled conditions. *Peotoplasma* 136: 136-144
- Brown DH, Ascaso C y Rapsch S (1988) Effects of light and dark on the ultrastructure of lichen algae. *Annals of Botany* 62: 625-632
- Büdel B y Scheidegger C (2008) Thallus morphology and anatomy. En TH Nash III (ed), *Lichen Biology*, segunda edición. Cambridge University Press, New York, USA, pp 40-68
- Büdel B, Bendix J, Bicker FR y Green TGA (2008) Dewfall as a water source frequently activates the endolithic cyanobacterial communities in the Granites of Taylor Valley, Antarctica. *Journal of Phycology* 44: 1415-1424
- Buecker H y Horneck G (1970). The survival of microorganisms under simulated space conditions. *Life Sciences and Space Research* 8: 33-38
- Bull WB y Brandon MT (1998) Lichen dating of earthquake-generated regional rockfall events, Southern Alps, New Zealand. *The Geological Society of America Bulletin* 110: 60-84
- Burkins MB, Virginia MA y Wall DH (2001) Organic carbon cycling in Taylor Valley, Antarctica: quantifying soil reservoirs and soil respiration. *Global Change Biology* 7: 113-125
- Calatayud V y Rico VJ (1999) Chemotypes of *Dimelaena oreina* (Ascomycotina, Physciaceae) in the Iberian Peninsula. *The Bryologist* 102: 39-44
- Campbell IB, Claridge GGC, Campbell DI y MR Balks (1998) The soil environment. En JC Priscu (ed) *Ecosystems dynamics in a Polar Desert: the McMurdo Dry Valleys, Antarctica*. Antarctic Research Series 72. American Geophysical Union, Washington DC, USA, pp: 297-322
- Cary SC, McDonald IR, Barret JE y Cowan DA (2010) On the rocks: the microbiology of Antarctic Dry Valleys soils. *Nature Reviews Microbiology* 8: 129-138
- Casares M y Llimona X (1984) Líquenes de los Peñones de San Francisco (Sierra Nevada, Sur de España). *Acta Botánica Malacitana* 7: 5-10
- Clark BM, Mangelson NF, St Clair LL, Rees LB, Bench GS y Southon JR (2000) Measurement of Age and Growth Rate in the Crustose Saxicolous Lichen *Caloplaca trachyphylla* Using ¹⁴C Accelerator Mass Spectrometry. *The Lichenologist* 32: 399-403

- Clayden SR (1998) Thallus initiation and development in the lichen *Rhizocarpon lecanorinum*. *New Phytologist* 139: 685-695
- Cockell CS y Raven JA (2004) Zones of photosynthetic potential on Mars and the Early Earth. *Icarus* 169: 300-310
- Cockell CS (2008). The interplanetary exchange of photosynthesis. *Origins of Life Evolution and Biospheres* 38: 87-104
- Cornelissen JHC, Callaghan TV, Alatalo JM, Michelsen A, Graglia E, Hartley AE, Hik DS, Hobbie SE, Press MC, Robinson DH, Henry GHR, Shaver GR, Phoenix GK, Gwynn Jones D, Jonasson S, Chapin FS III, Molau U, Neill C, Lee JA, Melillo JM, Sveinbjörnsson B y Aerts R (2001) Global Change and arctic Ecosystems: is lichen decline a function of increases in vascular plants biomass?. *Journal of Ecology* 89: 984-994
- Cowan IR, Lange OL y Green TGA (1992) Carbon-dioxide Exchange in lichens: determination of transport and carboxylation characteristics. *Planta* 187: 282-294
- Coxson DS y Kershaw KA (1983a) Low temperature acclimation of net photosynthesis in the crustaceous lichen *Caloplaca trachyphylla*. *Canadian Journal of Botany* 62: 86-95
- Coxson DS y Kershaw KA (1983b) The ecology of *Rhizocarpon superficiale*. II. The seasonal response of net photosynthesis and respiration to temperature, moisture and light. *Canadian Journal of Botany* 61: 3019-3030
- Crabtree D y Ellis CJ (2010) Species interaction and response to wind speed alter the impact of projected temperature change in a montane ecosystem. *Journal of Vegetation Science* 21: 744-760
- Crespo A y Barreno E (1978) Sobre las comunidades terrícolas de líquenes vagantes (Sphaerothallio-Xanthioparmelion vagantis al.nova): *Acta Botánica Malacitana* 4: 55-62
- Crespo A y Sancho LG (1982) *Umbilicaria aprina* Nyl. en el Hemisferio Sur (Andes peruanos) *Lazaroa* 4: 357-360
- Crittenden PD (1975) Nitrogen fixation by lichens on glacial drift in Iceland. *New Phytologist* 74:41-49
- Crittenden PD y Kershaw KA (1978) Discovering the Role of Lichens in the Nitrogen Cycle in Boreal-Arctic Ecosystems. *The Bryologist*. 81: 258-267
- Crittenden PD, Kalucka I y Oliver E (1994) Does nitrogen supply limit the growth of lichens? *Cryptogamic Botany* 4: 143-155

- De la Torre R, Horneck G, Sancho LG, Scherer K, Facius R, Urlings T, Rettberg P, Reina M, y Pintado A (2002) Photoecological characterization of an epilithic ecosystem at high mountain locality (central Spain). En H Lacoste (ed) Proceedings of the Second European Workshop on Exo/Astrobiology. ESA Publications Division, Noordwijk, The Netherlands, pp 443-444.
- De la Torre R, Horneck G, Sancho LG, Pintado A, Scherer K, Facius R, Deutschmann U, Reina M, Baglioni P y Demets R (2003). Studies of lichens from high mountain regions in outer space: The Biopan experiment. En Harris RA y Ouwervhand R (eds) Proceedings of the third European Workshop on Exo-Astrobiology. Mars: the Search forLife. ESA Publications Division, Noordwijk, The Netherlands, pp 193-194
- De la Torre R, Sancho LG, Horneck G, De los Ríos A, Wierzchos J, Olsson-Francis K, Cockell CS, Rettberg P, Berger t, de Vera JP, Ott S, Martínez Frías J, Melendi González P, Lucas MM, Reina M, Pintado A y Demets R (2010) Survival of lichen and bacteria exposed to outer space conditions-Results of the *Lithopanspermia* experiment. *Icarus* 208: 735-748
- De los Ríos A y Ascaso C (2002) Preparative techniques for transmission electron microscopy and confocal laser scanning of lichens. En Kranner I, Beckett RP y Varma AK (eds) *Protocols in Lichenology*, Springer, Berlin, Alemania pp.87-151
- De los Ríos A, Sancho LG, Grube M, Wierzchos J y Ascaso C (2005a) Endolithic growth of two *Lecidea* lichens in granite from continental Antarctica detected by molecular and microscopy techniques. *New Phytologist* 165: 181-190
- De los Ríos A. Wierzchos J, Sancho LG, Green TGA. y Ascaso C (2005b) Ecology of endolithic lichens colonizing granite in continental Antarctica. *The Lichenologist* 37: 383-395
- De los Ríos A, Ascaso C, Wierzchos J, Sancho LG y Green TGA. (2010) Space flight effects on lichen ultrastructure and physiology. En J Seckbach y M. Grube (eds) Symbiosis and Stress: Joints Ventures in Biology, Cellular Origin, Life in Extreme habitats and Astrobiology, Vol. 17 parte 5. Springer, Heidelberg, Alemania, pp 577-593
- De los Ríos A, Raggio J, Pérez-Ortega S, Vivas M, Pintado A, Green TGA, Ascaso C y Sancho LG (2011). Anatomical, morphological and ecophysiological strategies in *Placopsis pycnotheca* (lichenized fungi, Ascomycota) allowing rapid colonization of recently deglaciated soils. *Flora* 206:857-864
- Del Prado R (2001) Estrategias de adaptación de líquenes a ambientes áridos. Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid

- Del Prado R y Sancho LG (2007) Dew as a key factor for the distribution pattern of the lichen species *Teloschistes lacunosus* in the Tabernas Desert (Spain). *Flora* 202: 417-428
- Demmig-Adams B, Maguas C, Adams III WW, Meyer A, Kilian E y Lange OL (1990) Effect on high light on the efficiency of photochemical energy conversion in a variety of lichen species with green and blue-green phycobionts. *Planta* 180: 400-409
- Dentener DH, Stevenson D, Ellingsen K, Van Noije T, Schultz M, Amman M, Atherton C, Bell N, Bergmann D, Bey I, Bowman L, Butler T, Cofala J, Collins B, Drevet J, Dogherty R, Eickhout B, Eskes H, Fiore A, Gauss M, Hauglustaine D, Horowitz L, Isaksen ISA, Josse B, Lawrence M, Krol M, Lamarque JF, Montanaro V, Müller F, Peuch VH, Pitari G, Pyle J, Rast S, Rodríguez J, Sanderson M, DH Savage, Shindell D, Strahan S, Szopa S, Sudo K, Van Dingenen R, Wild O y Zeng G (2006) The Global Atmospheric Environment for the Next Generation. *Environmental Sciences and Technology* 40: 3586-3594
- De Vera JP, Horneck G, Rettberg P y Ott S (2003). The potential of the lichen symbiosis to cope with the extreme conditions of outer space. I. Influence of UV radiation and space vacuum on the vitality of lichen symbiosis and germination capacity. *International Journal of Astrobiology* 1: 285-293
- De Vera JP, Rettberg P y Ott S (2008) Life at the Limits: Capacities of Isolated and Cultured Lichen Symbionts to Resist Extreme Environmental Stresses. *Origins of Life and Evolution of Biospheres* 38: 457-468
- De Vera JP, Möhlmann D, Butina F, Lorek A, Wernecke R y Ott S (2010) Survival Potential and Photosynthetic Activity of Lichens Under Mars-Like Conditions: A Laboratory Study. *Astrobiology* 10: 215-227
- Elbert W, Weber B, Burrows S, Steinkamp J, Büdel B, Andreae MO y Pöschl U (2012) Contribution of cryptogamic covers to the global cycles of carbon and nitrogen. *Nature Geoscience* 5: 459-462
- Ellis CJ, Coppins BJ, Dawson TP y MRD Seaward (2007) Response of British lichens to climate change scenarios: Trends and uncertainties in the projected impact for contrasting biogeographic groups. *Biological Conservation* 40: 217-235
- Etayo J y Sancho LG (2008) Hongos liquenícolas del Sur de Sudamérica, especialmente de Isla Navarino (Chile). *Bibliotheca Lichenologica* 98. J Cramer (ed) in der Gebrüder Borntraeger Verlagsbuchhandlung Berlin- Stuttgart, Alemania

- Fajardo-Cavalzos P, Link L, Melosh HJ y Nicholson WL (2005). *Bacillus subtilis* spores in simulated meteorite survive hypervelocity atmospheric entry, implications for lithopanspermia. *Astrobiology* 5: 726-736
- Fell JW, Scorzetti G, Connell L y Craig S (2006) Biodiversity of micro-eukaryotes in Antarctic Dry Valley soils with < 5% soil moisture. *Soil Biology and Biochemistry* 38: 3107-3119
- Follmann G y Crespo A (1974) Observaciones acerca de la distribución de líquenes españoles II. *Sphaerothallia fruticulosa* (Eversm.) Follm. y Crespo. *Anales Instituto Botánico Cavanilles* 31. 325:333
- Fox AJ y Cooper APR (1994) Measured properties of the Antarctic ice sheet derived from the SCAR Antarctic digital database. *Polar Record* 30: 201-206
- Fracheboud Y (2003) Using Chlorophyll Fluorescence to Study Photosynthesis. Disponible en: www.ab.ipw.agrl.ethy.ch
- Friedmann EI y Ocampo R (1976) Endolithic blue-green algae in the Dry Valleys: primary producers in the Antarctic desert ecosystem. *Science* 193: 1247-1249
- Friedmann (1982) Endolithic microorganisms in the Antarctic cold desert. *Science*: 215: 1045-1053
- Friedmann EI, McKay CP y Nienow JA (1987) The Cryptoendolithic Microbial Environment in the Ross Desert of Antarctica: Satellite-Transmitted Continuous Nanoclimate Data, 1984 to 1986. *Polar Biology* 7: 273-287
- Friedmann EI, Kappen L, Meyer MA y Nienow JA (1993) Long-term Productivity in the Cryptoendolithic Microbial Community of the Ross Desert, Antarctica. *Microbial Ecology* 25: 51-69
- Fritz-Sheridan RP y Coxson DS (1988) Nitrogen fixation on the tropical volcano La Soufrière (Guadeloupe): Nitrogen fixation, photosynthesis and respiration during the prevailing cloud / shroud climate by *Stereocaulom virgatum*. *The Lichenologist* 20: 41-61
- Fritsen CH, Grue AM y Priscu JC (2000) Distribution of organic carbon and nitrogen in surface soils in the McMurdo Dry Valleys, Antarctica. *Polar Biology* 23: 121-128
- Galloway DJ (2002) Taxonomic notes on the lichen genus *Placopsis* (Agyriaceae: Ascomycota) in southern South America, with a key to species. *Mittlungen aus dem Institut für Allgemeine Botanik Hamburg* 30-32:79-107
- Galloway DJ (2007) Flora of New Zealand lichens, revised second edition including lichen forming and lichenicolous-fungi. Manaaki Whenua Press, Lincoln, New Zealand

- Galloway DJ (2010) Additions to the *Placopsis* mycobiota (Trapeliaceae, Ascomycota) of southern South America, with notes on new records (including *Aspiciliopsis macroptahlama*), and a revised regional key to the species. *The Lichenologist* 42: 727-737
- Garnett MH y Bradwell T (2010) Use of bomb- ^{14}C to investigate the growth and carbon turnover rates of a crustose lichen. *Geografiska Annaler* 92A: 53-63
- Gauslaa Y y Solhaug KA (1998) The significance of thallus size for the water economy of the cyanobacterial old-forest lichen *Degelia plumbea*. *Oecologia* 116: 76-84
- Gauslaa Y y Solhaug KA (2001) Fungal melanins as a sun screen for symbiotic green algae in the lichen *Lobaria pulmonaria*. *Oecologia* 126: 462-471
- Gauslaa Y, Palmqvist K, Solhaug KA, Hilmo O, Holien H, Nybakken L y Ohlson M (2009) Size-dependent growth of two old-growth associated macrolichen species. *New Phytologist* 181: 683-692
- Gavilán R (1994) Estudio de las relaciones entre la vegetación y el clima en el Sistema Central español. Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid
- Genty B, Briantais JM y Baker NR (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta* 990: 87-92
- Golledge NR, Everest JD, Bradwell T y Johnson JS (2010) Lichenometry on Adelaide Island, Antarctic Peninsula: size-frequency studies, growth rates and snowpatches. *Geografiska Annaler* 92A: 111-124
- Gómez A, Palacios D, Ramos M, Tanarro LM, Schulte L y Salvador F (2001) Location of permafrost in marginal regions: Corral de la Veleta, Sierra Nevada, Spain. *Permafrost and periglacial processes* 12: 93-110
- González FB (1950) Geologic cross-section of the Cordillera de los Andes at about parallel 33° L.S. (Argentina-Chile). *Bulletin of the Geological Society of America* 61: 17-26
- Green TGA, Hortsman J, Bonnet H, Wilkins A, Silvester WB (1980) Nitrogen fixation by members of the Stictaceae (Lichenes) of New Zealand. *New Phytologist* 84:339-348
- Green TGA, Seppelt RD y Schwarz AMJ. (1992) Epilithic lichens on the floor of the Taylor Valley, Ross Dependency, Antarctica. *The Lichenologist* 24: 57-61
- Green TGA y Lange OL (1994) Photosynthesis in poikilohydric plants. A comparison between lichens and bryophytes. En ED Schulze y MM Caldwell (eds) *Ecophysiology of photosynthesis*. Berlin, Alemania. Springer –Verlag, pp 319-341

- Green TGA, Lange OL y Cowan IR (1994) Ecophysiology of lichen photosynthesis: the role of water status and thallus diffusion resistances. *Cryptogamic Botany* 4: 166-178
- Green TGA, Büdel B, Meyer A, Zellner H y Lange OL (1997) Temperate rainforest lichens in New Zealand: light response of photosynthesis. *New Zealand Journal of Botany* 35: 493-504
- Green TGA, Schroeter B, Kappen L, Seppelt RD y Maseyk K (1998) An assesment of the relationship between chlorophyll a fluorescence and CO₂ gas exchange from field measurements on a moss and a lichen. *Planta* 206: 611-618
- Green TGA, Schroeter B y Sancho LG (2007) Plant Life in Antarctica. En FI Pugnaire y F Valladares (eds) *Functional Plant Ecology*, segunda edición. CRC press, Boca Ratón, USA, pp 389-434
- Green TGA, Nash III TH y Lange OL (2008) Physiological ecology of carbon dioxide exchange. En TH Nash III (ed) *Lichen Biology*, segunda edición. Cambridge University Press, New York, USA pp 152-181
- Green TGA (2009) Lichens in arctic, antarctic and alpine ecosystems. *Ökologische Rolle der Flechten*, pp 45-65. Verlag Dr. Friedrich Pfeil, München, Alemania.
- Green TGA, Sancho LG, Pintado A y Schroeter B (2011a) Functional and spatial pressures on terrestrial vegetation in Antarctica forced by global warming. *Polar Biology* 34: 1643-1656
- Green TGA, Sancho LG, Türk R, Seppelt RD y Hogg ID (2011b) High diversity of lichens at 84°S, Queen Maud Mountains, suggest preglacial survival of species in the Ross Sea region, Antarctica. *Polar Biology* 34: 1211-1220
- Green TGA, Sancho LG y Pintado A (2011c) Ecophysiology of Desiccation/Rehydration Cycles in Mosses and Lichens. En U Lüttge ,E Beck y D Bartels (eds) *Plant Dessication Tolerance*, Ecological Studies 215. Springer Verlag Berlin Heidelberg, pp 89-120
- Green TGA, Brabyn L, Beard C y Sancho LG (2012) Extremely low lichen growth rates in Taylor Valley, Dry Valleys, Continental Antarctica. *Polar Biology* 35: 535-541
- Greenfield LG (1992) Nitrogen analyses of New Zealand and Antarctic lichens. *The Lichenologist* 24: 377-381
- Grube M, Cardinale M, Vieira de Castro J, Müller H and Berg G (2009) Species-specific structural and functional diversity of bacterial communities in lichen symbiosis. *The International Society for Microbial Ecology Journal* 3: 1105-1115.
- Güsewell S (2004) N:P ratios in terrestrial plants: variation and functional significance. *New Phytologist* 164: 243-266

- Hafellner J, Nimis PL y Tretiach M (2004) New records of *Aspicilia hispida* from Italy and Greece. *Herzogia* 17: 95-102
- Haines- Young RH (1983) Size variation of *Rhizocarpon* on moraine slopes in southern Norway. *Arctic and Alpine Research* 15: 295-305
- Haines-Young RH (1988) Size-frequency and size-density relationships in populations from the *Rhizocarpon* sub-genus Cern. on moraines slopes in southern Norway. *Journal of Biogeography* 15: 863-878
- Harrison PM, Walton DWH y Rothery P (1989) The effects of temperature and moisture on CO₂ uptake and total resistance to water loss in the antarctic foliose lichen *Umbilicaria antarctica*. *New Phytologist* 111: 673-682
- Harrison S y Winchester V (2000) Nineteenth- and Twentieth-Century Glacier Fluctuations and Climatic Implications in the Arco and Colonia Valleys, Hielo Patagónico Norte, Chile. *Arctic, Antarctic and Alpine Research* 32: 55-63
- Haworth LA, Calkin PE y Ellis JM (1986) Direct measurement of lichen growth in the central Brooks Range, Alaska, USA, and its application to lichenometric dating. *Arctic and Alpine Research* 18: 289-296
- Heap J (1994) The Antarctic Treaty System: introduction. En Handbook of the Antarctic Treaty System, Part 1, General Measures. Washington DC, US Department of State, pp 8-19
- Heber U, Bilger W, Bligny R y Lange OL (2000) Phototolerance of lichens, mosses and higher plants in an alpine environment: analyses of photoreactions. *Planta* 211: 770-780
- Heber U, Lange OL y Shuvalov A (2006) Conservation and dissipation of light energy as complementary processes: homoiohydric and poikilohydric autotrophs. *Journal of Experimental Botany* 57: 1211-1223
- Hestmark G, Schroeter B y 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
- Heusser CJ (1989) Late Quaternary Vegetation and Climate of Southern Tierra del Fuego. *Quaternary Research* 31: 396-406
- Hill DJ (1981) The growth of lichens with special reference to the modelling of circular thalli. *The Lichenologist* 13: 265-287
- Hitch CJB y Stewart WDP (1973) Nitrogen fixation of lichens in Scotland. *New Phytologist* 72: 509-524

- Hitch CJB y Millbank JW (1975) Nitrogen metabolism in lichens. VII. Nitrogenase activity and heterocyst frequency in lichens with blue-green phycobionts. *New Phytologist* 75: 239-244
- Hogan EJ, Minnullina G, Sepphard LJ, Leith ID y Crittenden PD (2010) Response of phosphomonoesterase activity in the lichen *Cladonia portentosa* to nitrogen and phosphorus enrichment in a field manipulation experiment. *New Phytologist* 186: 926-933
- Holmes RM, Aminot A, K erouel R, Hooker BA y Peterson BJ (1999) A simple and precise method for measuring ammonium in marine and freshwater ecosystems. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 56: 1801-1808
- Holmund P y Fuenzalida H (1995). Anomalous glacier responses to 20th century climatic changes in Darwin Cordillera, southern Chile. *Journal of Glaciology* 41: 465-473
- Hooker TN (1980) Factors affecting the growth of antarctic crustose lichens. *British Antarctic Survey Bulletin* 50: 1-19
- Horneck G (1993) Responses of *Bacillus subtilis* spores to the space environment: results from experiments in space. *Origins of Life and Evolution of Biospheres* 23: 37-52
- Horneck G, Bucker H. y Reitz G (1994) Long-term survival of bacterial spores in space. *Advances in Space Research* 14: 41-45
- Horneck G (1995) Exobiology, the study of the origin, evolution and distribution of life within the context of cosmic evolution: a review. *Planet Space Science*. 43: 189-217
- Horneck G, Rettberg P, Reitz G, Wehner J, Eschweiler U, Strauch K, Panitz C, Starke V y Baumstrak-Khan C (2001). Protection of bacterial spores in space, a contribution to the discussion of Panspermia. *Origins of Life and Evolution of Biospheres* 31: 527-547
- Horneck G, Klaus DL y Mancinelli RM (2010) Space microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 74: 121-156
- Houlton BZ, Wang Y-P, Vitousek PM y Field CB (2008) A unifying framework for dinitrogen fixation in the terrestrial biosphere. *Nature* 454: 327-330
- Hovenden MJ, Jackson AE y Seppelt RD (1994) Field photosynthetic activity of lichens in the Windmill Islands oasis, Wilkes Land, continental Antarctica. *Physiologia Plantarum* 90: 567-576
- Hyv arinen M y Crittenden PD (1998) Relationships between atmospheric nitrogen inputs and the vertical nitrogen and phosphorus concentration gradients in the lichen *Cladonia portentosa*. *New Phytologist* 140: 519-530
- Innes JL (1985) Lichenometry. *Progress in Physical Geography* 9: 187-254

- Innes JL (1988) The use of lichens in dating. En M Galun (ed) Handbook of Lichenology Vol. III. CRC press, Boca Ratón, USA, pp 75-92
- Jägerbrand AK, Lindblad KEM, Björk RG, Alatalo JM y Molau U (2006) Bryophyte and Lichen Diversity Under Simulated Environmental Change Compared with Observed Variation in Unmanipulated Alpine Tundra. *Biodiversity and Conservation* 15: 4453-4475
- Jägerbrand AK, Alatalo JM, Chrimes D, Molau U (2009) Plant community responses to 5 years of simulated climate change in meadow and heath ecosystems at a subarctic-alpine site. *Oecologia* 161: 601-610
- Jönsson KI, Rabbow E, Schill RO, Harms-Ringdahl M y Rettberg P (2008). Tardigrades survive exposure to space in low Earth orbit. *Current Biology* 18: 729-731
- Kaplan MR, Fogwill CJ, Sugden DE, Hulton NRJ, Kubik PW y Freeman SPHT (2008) Southern Patagonian glacial chronology for the Last Glacial period and implications for Southern Ocean climate. *Quaternary Science Reviews* 27: 284-294
- Kappen L y Lange OL (1970) The cold resistance of phycobionts from macrolichens of different habitats. *The Lichenologist* 4: 289-293
- Kappen L (1983). Ecology and Physiology of the Antarctic Lichen *Usnea sulphurea* (Koenig) Th. Fries. *Polar Biology* 1: 249-255
- Kappen L y Friedmann EI (1983) Ecophysiology of Lichens in the Dry Valleys of Southern Victoria Land, Antarctica. *Polar Biology* 1: 227-232
- Kappen L y Redon J (1987) Photosynthesis and Water Relations of Three Maritime Antarctic Lichen Species. *Flora* 179: 215-229
- Kappen L (1988) Ecophysiological relationships in different climatic regions. En M Galun (ed) Handbook of Lichenology, Vol II. CRC Press, Boca Ratón, USA, pp 37-100
- Kappen L, Schroeter B y Sancho LG (1990) Carbon dioxide exchange of Antarctic crustose lichens in situ measured with a CO₂/H₂O porometer. *Oecologia* 82: 311-316
- Kappen L (1993) Lichens in the Antarctic region. En EI Friedmann (ed) Antarctic Microbiology, New York, Wiley-Liss, USA, pp: 433-490
- Kappen L, Sommerkorn M y Schroeter B (1995) Carbon acquisition and water relations in lichens in polar regions: potentials and limitations. *The Lichenologist* 27: 531-545
- Kappen L, Schroeter B, Green TGA y Seppelt RD (1998) Chlorophyll *a* fluorescence and CO₂ exchange of *Umbilicaria aprina* under extreme light stressing the cold. *Oecologia* 113: 325-331

- Kappen L (2000) Some aspects of the great success of lichens in Antarctica. *Antarctic Science* 12: 314-324
- Kappen L y Valladares F (2007) Opportunistic growth and desiccation tolerance: the ecological success of poikilohydrous autotrophs. En: FI Pugnaire y F Valladares (eds) *Functional Plant Ecology*, segunda edición, CRC Press, Boca Ratón, Florida, USA, pp 7-67
- Karlén W y Black JL (2002) Estimates of lichen growth-rate in northern Sweden. *Geografiska Annaler* 84A: 225-232
- Kautsky H, Appel W y Amann H (1960) Chlorophyllfluorescenz und kohlenstoffsassimilation. *Biochemische Zeitschrift* 322: 277-292
- Kershaw KA y McFarlane JD (1980) Physiological-environmental interactions in lichens. X. Light as an ecological factor. *New Phytologist* 84: 687-702
- Kershaw KA y McFarlane JD (1982) Physiological-environmental interactions in lichens. XIII. Seasonal constancy on nitrogenase activity, net photosynthesis and respiration, in *Collema furfuraceum* (AM.) DR. *New Phytologist* 90: 723-734
- Kershaw KA (1985) *Physiological ecology of lichens*. Cambridge University Press, Cambridge, UK
- Kieft TL (1988) Ice Nucleation Activity in Lichens. *Applied and Environmental Microbiology* 54: 1678-1681
- Klanderud K (2008) Species-specific responses of an alpine plant community under simulated environmental change. *Journal of Vegetation Science* 19: 363-372
- Körner C (1995) Alpine plant diversity: a global survey and functional interpretations. En FS Chapin Jr. y C Körner (eds) *Arctic and Alpine Biodiversity*, Ecological Studies 113. Springer Verlag Berlin Heidelberg, Alemania pp 45-60
- Körner C (1999) *Alpine plant life*. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, USA
- Kunkel G (1980) Microhabitat and structural variation in the *Aspicilia desertorum* group (Lichenized Ascomycetes). *American Journal of Botany* 67: 1137-1144
- Kurina, LM y Vitousek PM (1999) Control over the accumulation and decline of a nitrogen fixing lichen, *Stereocaulon vulcani*, on young Hawaiian lava flows. *Journal of Ecology* 87: 784-799
- Lange OL y Metzner H (1965) Lichtabhängiger Kohlenstoff-Einbau in Flechten bei tiefen Temperaturen. *Naturwissenschaften* 52, 191
- Lange OL y Kappen L (1972) Photosynthesis of lichens from Antarctica. En GA Llano (ed) *Antarctic terrestrial Biology*. American Geophysical Union, Washington, USA, pp: 83-95

- Lange OL, Geiger IL y Schulze E-D (1977) Ecophysiological Investigations of Lichens in the Negev Desert. V. A Model to Simulate Net Photosynthesis and Respiration of *Ramalina maciformis*. *Oecologia* 28: 247-259
- Lange OL, Kilian E y 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 OL (1990) Twenty-three years of growth measurements on the crustose lichen *Caloplaca aurantia* in the central Negev Desert. *Israel Journal of Botany* 39: 383-394
- Lange OL, Meyer A, Zellner H y Heber U (1994) Photosynthesis and water relations of lichen soil crusts: field measurements in the coastal fog zone of the Namib Desert. *Functional Ecology* 8: 253-264
- Lange OL, Reichenberger H y Meyer A (1995). High thallus water content and photosynthetic CO₂ exchange of lichens. Laboratory experiments with soil crust species from local xerothermic steppe formations in Franconia, Germany. En F Daniels ,M Schulz y J Peine (eds) Flechten Follmann: Contributions to lichenology in honour of Gerhard Follmann. Geobotanical and Phytotaxonomical Study Group, Universitat Koln, pp 139-153
- Lange OL y Green TGA (1996) High thallus water content severely limits photosynthetic carbon gain of central European epilithic lichens under natural conditions. *Oecologia* 108: 13-20
- Lange OL y Green TGA (1997) High thallus water content can limit photosynthetic productivity of crustose lichens in the field. *Bibliotheca Lichenologica* 68: 81-99
- Lange OL, Reichenberger H y Walz H (1997a) Continuous monitoring of CO₂ exchange of lichens in the field: short-term enclosure with an automatically operating cuvette. *The Lichenologist* 29: 259-274
- Lange OL, Belnap J, Reichenberger H y Meyer A (1997b) Photosynthesis of green algal soil crust lichens from arid lands in southern Utah, USA: role of water content on light and temperature responses of CO₂ exchange. *Flora* 192: 1-15
- Lange OL, Leisner JMR y 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 OL, Green TGA y Heber U (2001) Hydration-dependent photosynthetic production of lichens: what do laboratory studies tell us about field performance? *Journal of Experimental Botany* 52: 2033-2042
- Lange OL (2002) Photosynthetic productivity of the epilithic lichen *Lecanora muralis*: Long term field monitoring of CO₂ exchange and its physiological interpretation. I. Dependence of photosynthesis on water content, light, temperature, and CO₂ concentration from laboratory measurements. *Flora* 197: 233-249
- Lange OL (2003a) Photosynthetic productivity of the epilithic lichen *Lecanora muralis*: Long term field monitoring of CO₂ exchange and its physiological interpretation. II. Diel and seasonal patterns of net photosynthesis and respiration. *Flora* 198: 55-70
- Lange OL (2003b) Photosynthetic productivity of the epilithic lichen *Lecanora muralis*: Long term field monitoring of CO₂ exchange and its physiological interpretation. III. Diel, seasonal and annual carbon budgets. *Flora* 198: 277-292
- Lange OL y Green TGA (2005) Lichens show that fungi can acclimate their respiration to seasonal changes in temperature. *Oecologia* 142: 11-19
- Larcher W (1995) *Physiological Plant Ecology*, tercera edición, Springer-Verlag Berlín Heidelberg, Alemania
- Laroque SJ y Smith DJ (2004) Calibrated *Rhizocarpon spp.* Growth Curve for the Mount Waddington Area, British Columbia Coast Mountains, Canada. *Arctic, Antarctic and Alpine Research* 36: 407-418
- Larson DW (1983) The pattern of production within individual *Umbilicaria* lichen thalli. *New Phytologist* 94: 409-419
- Larson DW (1984) Thallus size as a complicating factor in the physiological ecology of lichens. *New Phytologist* 97: 87-97
- Larson DW (1987) The absorption and release of water by lichens. *Bibliotheca Lichenologica* 25: 351-360
- Lawton J (1999) Size matters. *Oikos* 85: 19-21
- Leavitt SD, Frankhauser JD, Leavitt DH, Porter LD, Johnson LA y St. Clair LL (2011) Complex pattern of speciation in cosmopolitan “rocky posy” lichens - Discovering and delimiting cryptal fungal species in the lichen-forming *Rhizoplaca melanophthalma* species-complex (Lecanoraceae Ascomycota). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 59: 587-602
- Lechowicz MJ (1982) Ecological Trends in Lichen Photosynthesis. *Oecologia* 53: 330-336

- Leisner JMR, Green TGA y Lange O (1997) Photobiont Activity of a Temperate Crustose Lichen: Long-Term Chlorophyll Fluorescence and CO₂ Exchange Measurements in the Field. *Symbiosis* 23: 165-182
- Longton RE (1982) Bryophyte vegetation in polar regions. En Smith AJF (ed) *Bryophyte Ecology*. Chapman and Hall, London, UK, pp 123-166
- Longton RE (1988) *Biology of polar bryophytes and lichens*. Cambridge University Press, Cambridge, UK
- López-Martínez J, Martínez de Pisón E y Arche A (1991) Pulsaciones glaciares y terrazas marítimas escalonadas en los alrededores de la Base Antártica Española, Isla Livingston, Shetland del Sur. *Geogaceta* 9: 44-47
- Loso MG y Doak DF (2006) The biology behind lichenometric dating curves. *Oecologia* 147: 223-229
- Máguas C, Valladares F y Brugnoli E (1997) Effects of Thallus Size on Morphology and Physiology of Foliose Lichens: New Findings with a New Approach. *Symbiosis* 23: 149-164
- Mancinelli RL, White MR y Rotschild LJ (1998) Biopan survival I: exposure to the osmophiles *Synechococcus sp.* (Nageli) and *Haloarcula sp.* to the space environment. *Advances in Space Research* 22: 327-334
- Mancinelli RL y Klovstad M (2000). Martial soil and UV radiation: microbial viability assessment on space-craft surfaces. *Planetary and Space Science* 48: 1093-1097
- Makkonen S, Hurri RSK y Hyvärinen M (2007) Differential responses of lichen symbionts to enhanced nitrogen and phosphorus availability: an experiment with *Cladina stellaris*. *Annals of Botany-London* 99: 877-884
- Marchant DR y Denton GH (1996) Miocene and Pliocene paleoclimate of the Dry Valleys region, Southern Victoria Land: a geomorphological approach. *Marine Micropaleontology* 27: 253-271
- Marchant DR y Head JW III (2007) Antarctic Dry Valleys: Microclimate zonation, variable geomorphic processes, and implications for assessing climate change on Mars. *Icarus* 192: 187-222
- Marchant DR y Head JW III (2010) Geologic analogies between the surface of Mars and the McMurdo Dry Valleys: microclimate-related geomorphic features and evidence for climate change. En PT Doran, W Berry Lyons y DM McKnight (eds), *Life in Antarctic Deserts and other Cold Dry Environments*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp 9-77

- Matthews JA (1994) Lichenometric dating: A review with particular reference to 'Little Ice Age' moraines in southern Norway. En C Beck (ed) Dating in Exposed and Surface Context. University of New Mexico press, Albuquerque, pp 185-212
- Matthews JA y Trenbirth HE (2011) Growth rate of a very large crustose lichen (*Rhizocarpon* subgenus) and its implications for lichenometry. *Geografiska annaler* 93: 27-39
- Matzek V y Vitousek P (2003) Nitrogen Fixation in Bryophytes, Lichens, and Decaying Wood along a Soil-age Gradient in Hawaiian Montane Rain Forest. *Biotropica* 35: 12-19
- Maxwell K y Johnson GN (2000) Chlorophyll fluorescence-a practical guide. *Journal of Experimental Botany* 51 (345): 659-668
- McCarthy DP (1997) Habitat selection and ecology of *Xanthoria elegans* (Link) Th. Fr. in glacier forefields. Implications in lichenometry. *Journal of Biogeography* 24: 363-373
- McCarthy DP (1999) A biological basis for lichenometry? *Journal of Biogeography* 26: 379-386
- McCarthy MC y Enquist BJ (2007) Consistency between an allometric approach and optimal partitioning theory in global patterns of plant biomass allocation. *Functional Ecology* 21: 713-720
- McCarthy JJ, Canziani OF, Leary NA, Dokken DJ y White KS (2001) Climate change 2001: impacts, adaptation and vulnerability. Contribution of working group II to the third assessment report of the intergovernmental panel of climate change, IPCC. Cambridge University Press, Cambridge, UK
- McCune B y Caldwell BA (2009) A single phosphorus treatment doubles growth of cyanobacterial lichens transplants. *Ecology* 90: 567-570
- McFarlane JD y Kershaw KA (1977) Physiological-environmental interactions in lichens. IV. Seasonal changes in the nitrogenase activity of *Peltigera canina* (L.) Willd var. *praetextata* (Floerke in Somm.) hue, and *P. canina* (L.) Willd var. *rufescens* (Weiss) Mudd. *New Phytologist* 79: 403-408
- McFarlane JD y Kershaw KA (1980) Physiological-environmental interactions in lichens. IX. Thermal stress and lichen ecology. *New Phytologist* 84: 669-685
- Millanes AM y Vicente C (2003) Photoprotective strategies in lichens: an experimental approach using *Evernia prunastrii*. *Journal of Hattori Botanical Laboratory* 94: 293-302
- Mooney HA (1991) Biological response to climate change: An agenda for research. *Ecological Applications* 1: 112-117

- Moore DM (1975) The Alpine Flora of Tierra del Fuego. *Anales del Instituto Botánico Cavanilles* 32: 419-440
- Nash III TH, Reiner A, Demmig-Adams B, Kilian E, Kaiser WM y Lange OL (1990) The effect of atmospheric desiccation and osmotic water stress on photosynthesis and dark respiration of lichens. *New Phytologist* 116: 269-276
- Nash III TH (2008) Introduction. En TH Nash III (ed) *Lichen Biology*, segunda edición. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp 1-8
- Nicholson WL, Schuergler AC y Setlow P (2005) The solar UV environment and bacterial spore UV resistance: considerations for Earth-to-Mars transport by natural processes and human spaceflight. *Mutation Research* 571: 249-264
- Nybakken L, Solhaug KA, Bilger W y Gauslaa Y (2004) The lichens *Xanthoria elegans* and *Cetraria islandica* maintain a high protection against UV-B radiation in Arctic habitats. *Oecologia* 140: 211-216
- Nybakken L y Gauslaa Y (2007) Difference in secondary compounds and chlorophylls between fibrils and main stems in the lichen *Usnea longissima* suggest different functional roles. *The Lichenologist* 39: 491-494
- O'Neal MA y Schoenenberger KR (2003) A *Rhizocarpon geographicum* growth curve for the Cascade Range of Washington and northern Oregon, USA. *Quaternary Research* 60: 233-241
- Øvstedal DO y Lewis Smith RI (2001). *Lichens of Antarctica and South Georgia. A Guide to their identification and Ecology*. Cambridge University press, Cambridge, UK
- Palmqvist K, Campbell D, Ekblad A y Johansson H (1998) Photosynthetic capacity in relation with nitrogen content and its partitioning in lichens with different photobionts. *Plant, Cell and Environment* 21: 361-372
- Palmqvist K (2000) Carbon economy in lichens. *New Phytologist* 148: 11-36
- Palmqvist K, Dahlman L, Valladares F, Tehler A, Sancho LG y Mattsson JE (2002) CO₂ exchange and thallus nitrogen across 75 contrasting lichen associations from different climate zones. *Oecologia* 133: 295-306
- Palmqvist K, Dahlman L, Jonsson A and Nash TH III (2008). The carbon economy of lichens. En TH Nash III (ed) *Lichen Biology*, segunda edición. Cambridge University Press, New York, USA, pp183-215
- Pannowitz S, Green TGA, Scheidegger C, Schlenzog M y Schroeter B (2003a) Activity pattern of the moss *Hennediella heimii* (Hedw.) Zand. in the Dry Valleys, Southern Victoria Land, Antarctica during the mid-austral summer. *Polar Biology* 26: 545-551

- Pannewitz S, Schlenzog M, Green TGA, Sancho LG y Schroeter B (2003b) Are lichens active under snow in continental Antarctica? *Oecologia* 135: 30-38
- Pannewitz S, Green TGA, Schlenzog M, Seppelt R, Sancho LG, y Schroeter B (2006) Photosynthetic performance of *Xanthoria mawsonii* C. W. Dodge in coastal habitats, Ross Sea region, continental Antarctica. *The Lichenologist* 38(1): 67-81
- Peat HJ, Clarke A y Convey P (2007) Diversity and biogeography of the Antarctic flora. *Journal of Biogeography* 34: 132-146
- Pedraza (1994) Sistema Central. En Mateo Gutiérrez Elorza (ed) Geomorfología de España Editorial Rueda, Madrid, pp 63-100
- Pérez FL (1997) Microbiotic crusts in the high equatorial Andes, and their influence on páramo soils. *Catena* 31: 173-198
- Pérez-Ortega S, Fernández-Mendoza F, Raggio J, Vivas M, Ascaso C, Sancho LG, Printzen C y De los Ríos A (2012) Extreme phenotypic variation in *Cetraria aculeata* (lichenized Ascomycota): adaptation or incidental modification?. *Annals of Botany* 109: 1113-1148
- Picotto M y Tretiach M (2010) Photosynthesis in chlorolichens: the influence of habitat light regime. *Journal of Plant Research* 123: 763-775
- Pintado A (1996) Estudio ecofisiológico del grupo *Ramalina polymorpha* en la Sierra de Guadarrama. Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid
- Pintado A, Sancho LG y 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 y Sancho LG (2002) Ecological significance of net photosynthesis activation by water vapour uptake in *Ramalina capitata* from rain-protected habitats in central Spain. *The Lichenologist* 34: 403-413
- Pintado A, Sancho LG, Green TGA, Blanquer JM y Lázaro R (2005) Functional ecology of the biological soil crust in semiarid SE Spain: sun and shade populations of *Diploschistes diacapsis* (Ach.) Lumbsch. *The Lichenologist* 37: 425-432
- Pisano E (1977) Fitogeografía de Fuego-Patagonia Chilena I. Comunidades vegetales entre las latitudes 52° y 56° S. *Anales del Instituto de la Patagonia* 5: 59-104
- Poelt J (1988) *Rhizocarpon* Ram. Em. Th. Fr. Subgen. *Rhizocarpon* in Europe. *Arctic and Alpine Research* 20: 292-298
- Pointing SB, Chan Y, Lacap DC, Lau MCY, Jurgens JA y RL Farrell (2009) Highly specialized microbial diversity in hyper-arid polar desert. *Proceedings of the National Academy of Science, USA* 106: 19964-19969

- Popova AF (2003) Comparative characteristics of mitochondria ultrastructural organization in *Chlorella* cells under altered gravity conditions. *Advances in Space Research* 31: 2253-2529
- Poppe F, Hanelt D y Wienke C (2002) Changes in Ultrastructure, photosynthesis activity and pigments in the Antarctic Red Alga *Palmaria decipiens* during acclimation to UV radiation. *Botanica Marina* 45: 253-261
- Porter SC (1981) Lichenometric Studies in the Cascade Range of Washington: Establishment of *Rhizocarpon geographicum* growth curves at Mount Rainier. *Arctic, Antarctic and Alpine Research* 13: 11-23
- Prussia CM y Killingbeck KT (1991) Concentrations of ten elements in two common foliose lichens: leachability, seasonality, and the influence of rock and tree bark substrates. *The Bryologist* 94: 135-145
- Puga E, Díaz de Federico A, y Fontbote JM (1974) Sobre la individualización y sistematización de las unidades profundas de la zona Bética. *Estudios Geológicos* 30: 543-548
- Rabassa J, Coronato A, Bujalesky G, Salemme M, Roig C, Meglioli A, Heusser C, Gordillo S, Roig F, Borromei A y Quattrocchio M (2000) Quaternary of Tierra del Fuego, Southernmost South America: an updated review. *Quaternary International* 68-71: 217-240
- Raggio J, Pintado A, Ascaso C, De la Torre R, De los Ríos A, Wierzchos J, Horneck G y Sancho LG (2011) Whole Lichen Thalli Survive Exposure to Space Conditions: Results of the Lithopanspermia Experiment with *Aspicilia fruticulosa*. *Astrobiology* 11: 281-292
- Raggio J, Green TGA, Crittenden PD, Pintado A, Vivas M, Pérez-Ortega S, De los Ríos A y Sancho LG (2012) Comparative ecophysiology of three *Placopsis* species, pioneer lichens in recently exposed Chilean glacial forelands. *Symbiosis* 56: 55-66
- Rai AN, Söderbäck E y Bergman B (2000) Cyanobacterium-plant symbioses. *New Phytologist* 147: 449-481
- Reed SC, Seastedt TR, Mann CM, Suding KN, Twonsend AR, Cherwin KL (2007) Phosphorus fertilization stimulates nitrogen fixation and increase inorganic nitrogen concentrations in a restored prairie. *Applied Soil Ecology* 36:238-242
- Reiter R, Green TGA, Schroeter B y Türk R (2006) Photosynthesis of three lichens *Umbilicaria* species from lichen-dominated communities in the alpine/nival belt of the Alps measured under controlled conditions. *Phyton* 46: 247-258

- Reiter R, Höftberger M, Green TGA y Türk R (2008) Photosynthesis of lichens from lichen-dominated communities in the alpine/nival belt of the Alps-II: Laboratory and field measurements of CO₂ exchange and water relations. *Flora* 203: 34-46
- Reynolds ES (1963) The use of lead citrate at high ph as an electron opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* 17: 208-212
- Richter H (1865) Zur Darwinschen Lehre. *Schmidts Jahrb. Ges. Med.* 126: 243-249
- Rico VJ (1983) Líquenes de los pisos oro y crioromediterráneo del Pico del Lobo (Sierra de Ayllón, Segovia). Memoria de licenciatura, Universidad Autónoma de Madrid
- Rivas-Martínez S (1983) Pisos bioclimáticos de España. *Lazaroa* 5: 33-43
- Rivas-Martínez S, Díaz TE, Fernández-González F, Izco J, Loidi J, Fernades M y Penas A (2002) Vascular plant communities of Spain and Portugal. Addenda to the syntaxonomical checklist of 2001. *Itinera Geobotanica* 15: 5-922
- Rivas Martínez S (2005) Avances en Geobotánica. Discurso leído en la solemne sesión inaugural del curso celebrada el 20 de enero de 2005. Instituto de España. Real Academia Nacional de Farmacia
- Rivas-Martínez S (2010) Sinopsis climática de la Tierra y mapas bioclimáticos de Sudamérica. Lecturas singulares 10. Real Academia Nacional de Farmacia, Instituto de España. Madrid
- Roca B, Pérez-Ortega S, Sancho LG y Crespo A (2012) How many species are there in *Rhizocarpon geographicum* group? A phylogenetic study of the complex. En Lichens: from genome to ecosystems in a changing world. Book of abstracts 7th IAL Symposium, Bangkok, Tailandia, 9-13 enero 2012. Ramkhamhaeng University Press, Bangkok, Thailand, pp 163
- Rogers RW (1977) Lichens in hot arid and semi-arid lands. En MRD Seaward (ed) Lichen Ecology, Academic Press, London, UK, pp 211-252
- Ronen R y Galun M (1984) Pigment extraction from lichens with dimetil sulfoxide (DMSO) and estimation of chlorophyll degradation. *Environmental and Experimental Botany* 24: 239-245
- Rosentreter R (1993) Vagrant lichens in North America. *The Bryologist* 96: 333-338
- Rosove MH (2000) Let heroes speak, Antarctic explorers, 1772-1922. Berkeley Publishing Group (Penguin Putnam Inc.), New York, USA

- Rozzi R, Armesto JJ, Goffinet B, Buck W, Massardo F, Silander J, Arroyo MTK, Rusell S, Anderson CB, Cavieres LA y Callicott JB (2008) Changing lenses to assess biodiversity: patterns of species richness in sub-Antarctic plants and implications for global conservation. *Frontiers in Ecology and the Environment* 6: 131-137
- Rundel PW (1982) The role of morphology in the water relations of desert lichens. *Journal of the Hattori Botanical Laboratory* 53: 315-320
- Sánchez FJ, Mateo-Martí E, Raggio J, Meeben J, Martínez-Frías J, Sancho LG, Ott S y De la Torre R (2012) The resistance of the lichen *Circinaria gyrosa* (nom. provis.) towards simulated Mars conditions: a model test to the survival capacity of an eukaryotic extremophile. *Planetary and Space Science* 72: 102-110
- Sánchez-Mata D (1989) Flora y Vegetación del macizo oriental de la Sierra de Gredos. Diputación Provincial de Avila. Institución Gran Duque de Alba
- Sancho LG (1986) Flora y vegetación liquénica saxícola de los pisos oro- y criomediterráneos del Sistema Central español. Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid
- Sancho LG y Kappen L (1989) Photosynthesis and water relations and the role of anatomy in Umbilicariaceae (lichens) from Central Spain. *Oecologia* 81: 473-480
- Sancho LG, Schroeter B y Valladares F (1997a) Photosynthetic performance of two closely related *Umbilicaria* species in Central Spain. Temperature as a key factor. *The Lichenologist* 29: 67-82
- Sancho LG, Valladares F, Pintado A, Schlenzog M y Schroeter B (1997b) Photosynthetic performance of cosmopolitan lichens in the maritime Antarctica. *Boletín de la Real Sociedad Española de Historia Natural. Sección Biología* 93: 113-118
- Sancho LG, Schulz F, Schroeter B y Kappen L (1999) Bryophyte and lichen flora of South Bay (Livingston Island, South Shetland Islands, Antarctica). *Nova Hedwigia* 68: 301-337
- Sancho LG, Schroeter B y Del Prado R (2000) Ecophysiology and morphology of the globular erratic lichen *Aspicilia fruticulosa* (EVERSM.) FLAG. from Central Spain. *Bibliotheca Lichenologica* 75: 137-147
- Sancho LG, Pintado A, Green TGA, Pannewitz S y Schroeter B (2003) Photosynthetic and morphological variation within and among populations of the antarctic lichen *Umbilicaria aprina*: implications of thallus size. *Bibliotheca lichenologica* 86: 299-311
- Sancho LG y Pintado A (2004) Evidence of high annual growth rate for lichens in the maritime Antarctic. *Polar Biology* 27: 312-319

- Sancho LG, De la Torre R, Horneck G, Ascaso C, De los Ríos A, Pintado A, Wierzchos J, y Schuster M (2007a) Lichens Survive in space. Results from the 2005 LICHENS Experiment. *Astrobiology* 7: 443-454
- Sancho LG, Green TGA y Pintado A (2007b) Slowest to fastest: Extreme range in lichen growth rate supports their use as an indicator of global change in Antarctica. *Flora* 202: 667-673
- Sancho LG, De La Torre R y Pintado A (2008): Lichens, new and promising material from experiments in exobiology. *Fungal Biology Reviews* 22: 103-109
- Sancho LG, Palacios D, Green TGA, Vivas M y Pintado A (2011) Extreme high lichens growth rates detected in recently deglaciated areas in Tierra del Fuego. *Polar Biology* 34: 813-822
- Sancho LG y Pintado A (2011) Ecología Vegetal en la Antártida. *Ecosistemas* 20: 42-53
- Sancho LG, Pérez-Ortega S, Green TGA, De los Ríos A, Vivas M y Hogg I (2012) Biodiversity of lichens along the Transantarctic Mountains: A Survey to 87°S. En Antarctic Science and Policy Advice in a Changing World. Book of abstracts XXXII SCAR and Open Science Conference, Portland, USA, 13-25 Julio 2012
- Santamaría T, Acebes JL, Gazapo B, García F, Caballero JA y Reguero A (1995) Gredos roca viva. Proatur s.a
- Santana A, Porter C, Butorovic N y Olave C (2006) Primeros antecedentes climatológicos de estaciones automáticas (AWS) en el canal Beagle, Magallanes. Chile. *Anales Instituto Patagonia (Chile)* 34: 5-20
- Scheidegger C, Schoreter B y Frey B (1995) Structural and functional processes during water vapour uptake and desiccation in selected lichens with green alga photobionts. *Planta* 197: 399-409
- Schlenzog M, Pannewitz S, Green TGA y Schroeter B (2004) Metabolic recovery of continental antarctic cryptogams after winter. *Polar Biology* 27: 399-408
- Schreiber U, Bilger W, y Neubauer C (1994) Chlorophyll fluorescence as a non intrusive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis. En ED Schulze y MM Cadwell (eds) *Ecophysiology of Photosynthesis*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, Vol.1, pp 49-70
- Schroeter B, Kappen L, y Moldaenke C (1991) Continuous in situ recording of the photosynthetic activity of Antarctic lichens. Established methods and a new approach. *The Lichenologist* 23: 253-265

- Schroeter B, Green TGA, Seppelt RD, y Kappen L (1992) Monitoring photosynthetic activity of crustose lichens using a PAM-2000 fluorescence system. *Oecologia* 92: 457-462
- Schroeter B (1994) In situ photosynthetic differentiation of the green algal and the cyanobacterial photobiont in the crustose lichen *Placopsis contortuplicata*. *Oecologia* 98: 212-220
- Schroeter B, Green TGA, Kappen L y Seppelt RD (1994) Carbon dioxide exchange at subzero temperatures. Field measurements on *Umbilicaria aprina* in Antarctica. *Cryptogamic Botany* 4: 233-241
- Schroeter B y Scheidegger C (1995) Water relations in lichens at subzero temperatures: structural changes and carbon dioxide exchange in the lichen *Umbilicaria aprina* from continental Antarctica. *New Phytologist* 131: 273-285
- Schroeter B, Olech M, Kappen L y Heitland W (1995) Ecophysiological investigations of *Usnea antarctica* in maritime Antarctic. I Annual microclimatic conditions and potential primary production. *Antarctic Science* 7:251-260
- Schroeter B, Kappen L y Schulz F (1997) Long-term measurements of microclimatic conditions in the fruticose lichen *Usnea aurantiaco-atra* in the maritime Antarctic. Actas del V Simposio de Estudios Antárticos, Barcelona, pp 63-69
- Schroeter B, Kappen L, Schulz F y Sancho LG (2000) Seasonal variation in the carbon balance of lichens in the maritime Antarctic: long term measurements of photosynthetic activity in *Usnea aurantiaco-atra*. En W Davidson, C Howard-Williams y P Broady (eds) Antarctic ecosystems: model for wider ecological understanding. Caxton Press, Christchurch pp: 220-224
- Schroeter B, Green TGA, Pannewitz S, Schlenzog M y Sancho LG (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 TGA, Pannewitz S, Schlenzog M y Sancho LG (2011) Summer variability, winter dormancy: lichen activity over 3 years at Botany Bay 77°S latitude, continental Antarctica. *Polar Biology* 34: 13-22
- Schmitt I y Lumbsch HT (2004) Molecular phylogeny of the Pertusariaceae supports secondary chemistry as an important systematic character set in lichen-forming ascomycetes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 33: 43-55
- Scott RF (1905) The Voyage of Discovery. McMillan, London, UK
- Seaward MRD (1988) Contribution of Lichens to Ecosystems. En M Galun (ed) Handbook of Lichenology, Vol II. CRC Press, Boca Ratón, USA pp 107-129

- Seppelt RD y Green TGA (1998) A bryophyte flora for Southern Victoria Land, Antarctica. *New Zealand Journal of Botany* 36: 615-632
- Shipley B y Meziane D (2002) The balanced-growth hypothesis and the allometry of leaf and root biomass allocation. *Functional Ecology* 16: 326-331
- Siple PA (1938). The Second Byrd Antarctic expedition-Botany. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 25: 467-517
- Søchting U, Øvstedal DO y Sancho LG (2004) The lichens of Hurd Peninsula, Livingston Island, South Shetlands, Antarctica. *Bibliotheca Lichenologica* 88: 607-658
- Sohrabi M (2011) Taxonomy and phylogeny of the 'manna lichens' and allied species (Megasporeaceae). Tesis doctoral, Universidad de Helsinki, Finlandia
- Solhaug KA, Gauslaa Y, Nybakken L y Bilger W (2003) UV induction of sun-screening pigments in lichens. *New Phytologist* 158: 91-100
- Solheim B, Zielke M, Bjerke, JW y Rozema J (2006) Effects of enhanced UV-B radiation on nitrogen fixation in Arctic ecosystems. *Plant Ecology* 182:109-118
- Sojo F, Valladares F y Sancho LG (1997) Structural and Physiological Plasticity of the Lichen *Catillaria corymbosa* in Different Microhabitats of the Maritime Antarctica. *The Bryologist* 100: 171-179
- Solomina O y Calkin PE (2003) Lichenometry as applied to Moraines in Alaska, USA, and Kamchatka, Russia. *Arctic, Antarctic and Alpine Research* 35: 129-143
- Stöffler D, Horneck G, Ott S, Hornemann U, Cockell CS, Moeller R, Meyer C, De Vera JP, Fritz J y Artemieva NA (2007) Experimental evidence for the potential impact ejection of viable microorganisms from Mars and Mars-like planets. *Icarus* 186: 585-588
- Strelin J e Iturraspe R (2007) Recent evolution and mass balance of Cordón Martial glaciers. Cordillera Fueguina Oriental. *Global Planetary Change* 59: 17-26
- Strelin J, Casassa G, Rosqvist G y Holmlund P (2008) Holocene glaciations in the Ema glacier Valley, Monte Sarmiento massif, Tierra del Fuego. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 260: 299-314
- Sun HJ, Nienow JA y CP McKay (2010) The antarctic cryptoendolithic microbial ecosystem. En PT Doran, W Berry Lyons y DM McKnight (eds), *Life in Antarctic Deserts and other Cold Dry Environments*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp 110-138
- Sundberg B, Näsholm T y 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

- Tarhanen S (1998) Ultrastructural responses of the lichen *Bryoria furescens* to simulated acid rain and heavy metal deposition. *Annals of Botany* 82: 735-746
- Trenbith HE y Matthews JA (2010) Lichen growth rates on glacier forelands in southern Norway: Preliminary results from a 25-year monitoring programme. *Geografiska Annaler* 92A: 19-39
- Tretiach M y Pecchiari M (1995) Gas exchange rates and chlorophyll content of epi- and endolithic lichens from the Trieste Karst (NE Italy). *New Phytologist* 130: 585-592
- Tretiach M y Geletti A (1997) CO₂ exchange of the endolithic lichen *Verrucaria baldensis* from karst habitats in northern Italy. *Oecologia* 111: 515-522
- Tuhkanen S (1992) The climate of Tierra del Fuego from a vegetation geographical point of view and its ecoclimatic counterparts elsewhere. *Acta Botanica Fennica* 145: 1-64
- Valladares F, Ascaso C y Sancho LG (1994) Intrathalline variability of some structural and physical parameters in the lichen genus *Lasallia*. *Canadian Journal of Botany* 72: 415-428
- Valladares F, Sancho LG y Ascaso C (1996) Functional Analyses of Intrathalline and Intracellular Chlorophyll Concentrations in the Lichen Family Umbilicariaceae. *Annals of Botany* 78: 471-477
- Valladares F y Sancho LG (2000) The relevance of nutrient availability for lichen productivity in the Maritime Antarctic. *Bibliotheca Lichenologica* 75: 189-199
- Van Veldhoven PP y Mannaerts GP (1987) Inorganic and phosphate measurements in the nanomolar range. *Analytical Biochemistry* 161: 45-48
- Vitousek PM (1994) Potential Nitrogen Fixation During Primary Succession in Hawai'i Volcanoes National Park. *Biotropica* 26: 234-240
- Vivas M (2012) Adaptación y tolerancia de los líquenes a condiciones adversas a través de gradientes ambientales. Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid
- Weber WA (1967) Environmental modification in crustose lichens II. Fruticose growth forms in *Aspicilia*. *Aquilo, Ser Botanica* 6: 43-51
- Wessels D y Kappen L (1993) Photosynthetic performance of rock-colonising lichens in the Mountain Zebra National Park, South Africa. *Koedoe* 36: 27-48
- Winchester V (1988) An assessment of lichenometry as a method for dating recent stone movements in two stone circles in Cumbria and Oxfordshire. *Botanical Journal of the Linnean Society* 96: 57-68

- Winchester V y Harrison S (2000) Dendrochronology and lichenometry: colonization, growth rates and dating of geomorphological events on the east side of the North Patagonian Icefield, Chile. *Geomorphology* 34: 181-194
- Winchester V, Harrison S y Warren CS (2001) Recent Retreat Glaciar Nef, Chilean Patagonia, Dated by Lichenometry and Dendrochronology. *Arctic, Antarctic and Alpine Research* 33: 266-273
- Winchester V y Chaujar RK (2002) Lichenometric dating of slope movements, Nant Ffrancon, North Wales. *Geomorphology* 47: 61-74
- Wirth V, Düll R, Llimona X, Ros RM y Werner O (2004) Guía de campo de los líquenes, musgos y hepáticas. Ediciones Omega, Barcelona, España
- Witty JF (1979) Algal nitrogen fixation on temperate arable fields. Algal inoculations experiments. *Plant Soil* 52: 165-183
- Yamakawa H, Fukushima Y, Itoh S y Heber U (2012) Three different mechanisms of energy dissipation of a desiccation tolerant moss serve one common purpose: to protect reaction centers against photo-oxidation. *Journal of Experimental Botany* 63: 3765-3775