

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Biología Vegetal I (Botánica y fisiología vegetal)



TESIS DOCTORAL

**Alteraciones de los pigmentos fotosintéticos, de la
fluorescencia de las clorofilas y de la ultraestructura de
líquenes expuestos a dióxido de azufre y nitrato**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Luis Balaguer Núñez

DIRECTOR:

Esteban Manrique Reol

Madrid, 2015



T E P. 2
BAL
ut

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Alteraciones de los pigmentos fotosintéticos, de la fluorescencia de las clorofilas y de la ultraestructura de líquenes expuestos a dióxido de azufre y nitrato.

Memoria presentada por el licenciado D. Luis BALAGUER NUÑEZ para aspirar al Grado de Doctor en Ciencias Biológicas.

Trabajo realizado bajo la dirección del Dr. D. Esteban MANRIQUE REOL.



R- 22.013

A Francisca y a Inmaculada

**Con mis propias palabras, te amaré;
con las mismas que digo, cuando espero,
con las mismas que digo, a cada paso,**

(de la luz a la sombra)

Luis Balaguer Rey

"Todas las sustancias son tóxicas; no existe ninguna que no sea venenosa. Sólo la dosis diferencia a un veneno de un remedio"

Paracelso

(1493 - 1541)

Agradecimientos

Esta Tesis Doctoral es el resultado de una conjunción de circunstancias y personas. Mi agradecimiento, en unas líneas, no puede ser ni justo, ni exhaustivo. Tan sólo, los recuerdos que, ahora que estoy terminando de escribirla, vienen a mi memoria.

La labor investigadora se ha desarrollado al amparo de las becas de Formación de Personal Investigador de la Universidad Complutense y del Ministerio de Educación y Ciencia. Dicha labor, se vió enriquecida por las estancias breves en centros de investigación extranjeros, que se llevaron a cabo gracias al apoyo económico de la Comunidad de Madrid y del Programa de Acciones Integradas Hispano-Británicas del Ministerio de Educación y Ciencia. En este sentido, deseo manifestar mi más profundo reconocimiento al Dr. Alan W. Davison, al Dr. Jeremy D. Barnes, a la Dra. Christine J. Renner y a la Dra. Sarah Willburg del Department of Agricultural and Environmental Science de la Universidad de Newcastle (Reino Unido).

Esta Tesis Doctoral se ha realizado en el Departamento de Biología Vegetal II de la Facultad de Farmacia. En primer lugar, quiero agradecer al Prof. Salvador Rivas Martínez, Director de este Departamento, su apoyo y sus enseñanzas durante estos años. Deseo destacar la eficaz labor como Secretario del Departamento del Dr. Daniel Sánchez Mata que sin duda facilitó el desarrollo de este proyecto. La experiencia y el tiempo que me han dedicado todos mis compañeros de este Departamento fueron tan fundamentales como generosos.

Debo en buena medida mi formación al Departamento de Biología Vegetal I de la Facultad de Ciencias Biológicas, dirigido por la Dra. Esther Fuertes Lasala. Quiero agradecer a la Dra. Ana Rosa Burgaz haber aceptado la tutoría en el Departamento de Biología Vegetal I, y a todos los compañeros su comprensión y apoyo.

Quiero recordar especialmente a mis colegas y amigos que desarrollaron el "*Seguimiento de la Calidad Atmosférica de la Comarca del Bajo Maestrazgo y Puertos de Morella*", Estela Serriñá, Leopoldo G. Sancho, Victor J. Rico, Fernando Valladares, a los que debo gran parte de lo que yo pueda saber sobre líquenes. Quiero expresar mi agradecimiento a los que colaboraron en el desarrollo del Seguimiento, cuyos principales resultados forman una parte importante de esta Memoria Doctoral, a Susana Elvira, Raquel Martín, Javier Castro, Amparo Sánchez, Francisca Sojo, Ana Pintado y Pascale van Knippenberg.

Esta Tesis no habría sido posible sin las horas de trabajo invertidas por Susana Elvira en el Invernadero Experimental de la Central Térmica Teruel de la Empresa Nacional de Electricidad (ENDESA). Dichas instalaciones, esenciales para el desarrollo del tema propuesto, fueron facilitadas por M^a Antonia Abad. Quiero agradecer a mi amigo Hernán Cortés, no sólo los buenos momentos en las diferentes campañas, sino la valiosa información y su crítica de los informes. Quiero agradecer a ENDESA el que haya permitido incluir los resultados del Convenio con el Departamento de Biología Vegetal II, en esta Memoria Doctoral.

Quiero manifestar mi agradecimiento al Dr. Francisco Cano y al Dr. Pedro Cuesta por su generosidad al dedicar su tiempo y su sabiduría a la supervisión del tratamiento estadístico de los datos. Al Dr. Federico Fernández González y a Francisco Ponce por su paciencia conmigo en mis muchas consultas sobre el uso de los ordenadores y de los programas. A la Dra. Rosalía Fernández Patier que nos facilitó los datos registrados en la estación de San Pablo de los Montes (Toledo) por el Centro Nacional de Sanidad Ambiental del Instituto Carlos III, el Instituto Nacional de Meteorología y el Ministerio de Obras Públicas y Urbanismo. A Benjamín Sánchez Gimeno por su labor en las Acciones Integradas, y especialmente, por sus sugerencias que fueron extraordinariamente importantes. Al Dr. William Sander cuyos comentarios y correcciones han enriquecido este

trabajo. A mi amiga Charo Gavilán, por los buenos momentos.

Debo a la Dra. Carmen Ascaso y a su equipo, el haber podido abordar el estudio de la simbiosis líquénica desde otra perspectiva, cuyos resultados fueron esenciales para esbozar la sintomatología atribuible a la exposición al dióxido de azufre y al nitrato. No me es posible agradecer suficientemente su dedicación y su consideración a lo largo del desarrollo de esta Tesis Doctoral.

Son tantas las sugerencias, recomendaciones, críticas, enseñanzas, también las cosas que aprendimos juntos, todas ellas constituyen el alma de esta Tesis, y por eso no sé si tiene sentido que dedique tan sólo unas líneas de agradecimiento al Dr. Esteban Manrique Reol.

Con anterioridad al inicio de esta Tesis, se constituyó un equipo entre Esteban, Fernando y yo, en el seno del cual se han resuelto muchos de los problemas que planteaban los experimentos que se resumen en esta Memoria Doctoral, y al que debo muchos de los momentos inolvidables durante este tiempo.

También quiero agradecer el amable apoyo de los miembros de la familia Casas y Flecha.

A mi Madre, a mi Padre, a Lola, a Quico, a Asun, les debo todo y todo el tiempo compartido.

A Inma, cada instante.

Indice

1. Introducción	11
<hr/>	
1.1. Sensibilidad diferencial de determinados organismos a la exposición a contaminantes atmosféricos	11
1.2. Interés del uso de organismos como biomonitores	13
1.3. Interés del uso de organismos como bioindicadores	14
1.4. Variables de respuesta	16
1.5. La fluorescencia temprana de clorofilas <u>in vivo</u>	18
1.6. La degradación de clorofila a feofitina como variable indicadora de daño inducido por contaminantes ácidos	20
1.7. Cartografía de la calidad del aire mediante bioindicadores	22
1.8. Alteraciones de la estructura celular del fotobionte liquénico inducidas por la exposición a contaminantes atmosféricos	26
2. Justificación del estudio	30
<hr/>	
3. Objetivos	33
<hr/>	
4. Materiales y métodos	38
<hr/>	
4.1. Selección del material	38
4.2. Características del área de estudio	41

4.3. Método de transplante de líquenes en cámaras de fumigación y en el área de estudio	50
4.4. Fumigaciones controladas con dióxido de azufre. Aporte simultáneo de nitrato	52
4.5. Variables de respuesta	55
4.6. Extracción y determinación de pigmentos clorofílicos en dimetil sulfóxido (DMSO).....	56
4.7. Análisis de la fluorescencia temprana de clorofilas <u>in vivo</u>	62
4.8. Análisis de la ultraestructura del fotobionte liquénico	65
4.9. Tratamiento estadístico de los datos	65
4.10. Cartografía y representación tridimensional de funciones	66
5. Resultados y Discusión	68
<hr/>	
5.1. Revisión metodológica	68
5.1.1. Optimización del método de extracción de clorofila <u>a</u> y <u>b</u> en dimetil sulfóxido (DMSO) y ajuste de nuevas ecuaciones para su cuantificación	68
5.1.2. Adecuación del método de medida de la fluorescencia temprana <u>in vivo</u> en líquenes. Efecto de la irradiación y del estado de hidratación del talo	84
5.2. Caracterización de la respuesta al dióxido de azufre	95
5.2.1. Variación del contenido en clorofilas totales y degradación de la clorofila <u>a</u> a feofitina <u>a</u>	95

5.2.1.1. Efecto inducido por exposiciones agudas a dióxido de azufre	95
5.2.1.2. Efecto inducido por exposiciones crónicas a dióxido de azufre	97
5.2.2. Cambios en la cinética de la fluorescencia temprana de las clorofilas <u>in vivo</u>	111
5.2.3. Alteraciones de la ultraestructura del fotobionte liquénico	115
5.2.4. Influencia del aporte de nitrato en la respuesta al dióxido de azufre	121
5.3. Seguimiento <u>in situ</u> de la evolución de <u>Anaptychia ciliaris</u>	128
5.3.1. Análisis de la respuesta liquénica por estaciones de muestreo	128
5.3.2. Análisis de la evolución temporal	146
5.3.3. Análisis de la variación espacial de los trasplantes: Áreas de Riesgo	156
5.3.4. Elaboración de un modelo de respuesta: Posibles causas del decaimiento del PQa	157
6. Discusión general	162
<hr/>	
7. Bibliografía	174
<hr/>	

INTRODUCCION

1. Introducción

La contaminación del aire es un mal social, causado principalmente por la actividad humana, como consecuencia del desarrollo industrial. Se trata de un problema creado por las naciones más prósperas y que preocupa más a sus habitantes que a los de zonas más deprimidas, más ocupados en cubrir sus necesidades inmediatas (Gillette 1984). Es, sin embargo, un problema global que trasciende fronteras políticas y naturales. Su impacto y sus efectos adversos en la biosfera son de una gran magnitud. Sin embargo, los síntomas son difíciles de detectar durante los primeros estados de la afección, al tiempo que las consecuencias son difíciles de valorar cuando el daño es irreversible. La diversidad de los sistemas biológicos, estabilizada por la complejidad de sus interacciones dinámicas, determina que la respuesta a la exposición a los contaminantes atmosféricos no sea uniforme. La perturbación induce en el ecosistema un aumento de la entropía. Los primeros síntomas estarán acompañados de una elevada dispersión en la respuesta de los organismos expuestos.

1.1. Sensibilidad diferencial de determinados organismos a la exposición a contaminantes atmosféricos

A medida que el contaminante, o la mezcla de contaminantes, abandona la atmósfera e ingresa en el sistema biológico, se expresa su potencial toxicidad. Su influencia sobre los organismos implicados en el ecosistema puede ser directa, alterando su capacidad de sintetizar o de degradar nutrientes; o indirecta, mediante la alteración del entorno en que estos organismos prosperan.

La sensibilidad diferencial a la contaminación atmosférica de componentes individuales determina la evolución del ecosistema. En este sentido, existe una gran variabilidad no sólo en cuanto a la reacción experimentada por distintas especies, sino incluso entre distintos individuos y entre clones. Las causas que determinan que un organismo sea capaz de superar el ataque del contaminante dependen tanto de su capacidad de autoprotección, como de su facultad de regeneración en caso de haberse visto afectado. En ambos casos, el resultado no depende únicamente de sus características metabólicas, por el contrario involucra su hábito, su morfología, su anatomía, su ultraestructura. La resistencia al contaminante es genética, en la medida en que el conjunto de su estrategia vital viene determinada por su genoma. Por otra parte, el hecho de ser resistente a un contaminante ni siquiera asegura la resistencia a ese mismo contaminante en presencia de sustancias, a priori inócuas, con las que pudiera interactuar. Es evidente, igualmente, que la resistencia a un contaminante dado, no implica una mayor resistencia frente a otros contaminantes.

En cualquier caso, como resultado de la exposición a contaminantes atmosféricos, en el seno de la comunidad sólo unas determinadas poblaciones entran en crisis dependiendo de la dosis o carga del contaminante. Algunas de estas poblaciones ya manifiestan síntomas medibles a dosis de contaminante que sólo superan ligeramente los niveles de fondo. Con la excepción de aquellos estudios basados en el análisis de bioacumuladores, son estas poblaciones con una elevada sensibilidad diferencial, las que permiten abordar una diagnosis temprana de las causas del potencial decaimiento del ecosistema. Se habla entonces de biomonitores cuando, basándose en una relación dosis-respuesta, se pretende valorar el nivel de contaminante en la atmósfera, o de bioindicadores, cuando el objetivo es identificar con antelación y de forma específica la acción del contaminante en el sistema biológico.

1.2. Interés del uso de organismos como biomonitores

A la hora de describir los niveles de contaminantes en la atmósfera y su evolución espacial o temporal, es preciso tener en cuenta que ningún organismo, por sensible que sea a la exposición a determinado contaminante, podrá manifestar una respuesta medible, con tal precisión que iguale o supere la de un analizador automático de gases en continuo. Aceptando este hecho, el interés de usar organismos vivos como monitores de contaminantes atmosféricos se ve restringido a que éstos son más baratos que una red automática de análisis de gases en cuanto a costos de instalación y mantenimiento se refiere. Con este fin, el de monitorizar niveles de contaminantes en la atmósfera, el objeto de una red de biomonitores es el de detectar puntos o áreas críticas en las que potencialmente los niveles de contaminante se aproximarían o incluso excederían los umbrales de tolerancia de los elementos del ecosistema. Un segundo objetivo lo constituye el poder deducir a partir de la sintomatología observada en qué áreas pudieron sobrepasarse los márgenes legales permitidos.

Los estudios basados en escalas que plantean una relación biunívoca simple entre la respuesta de un organismo sensible -cualquiera que sea- y la concentración de un contaminante en la atmósfera, conllevan un elevado nivel de incertidumbre, debido a que esta respuesta viene determinada por los efectos simultáneos de un elevado número de variables ambientales. Estos estudios sólo se justificarían como un capítulo preliminar encaminado a la optimización de la distribución de las estaciones de una red automática a instalar con posterioridad.

1.3. Interés del uso de organismos como bioindicadores

Frecuentemente el objetivo no es el de conocer el valor de la concentración de dióxido de azufre, óxidos de nitrógeno, ozono, o cualquier otro contaminante en la atmósfera. Incluso en el caso de conocerse, esta información sólo tiene sentido en cuanto que pudiera ser interpretada como la causa de una compleja fenomenología de síntomas observables en el ecosistema. Cuando el dato de inmisión de contaminantes pasa a un segundo plano, centrándose la cuestión en la diagnosis de una sintomatología, el bioindicador cobra un valor muy superior al de "*simple sucedáneo*" barato y poco preciso, de los equipos de análisis automático. Frente al analizador, el bioindicador muestra una respuesta integrada desde dos puntos de vista: dosis-respuesta e interacciones con otros contaminantes o factores ambientales.

En primer lugar, no suele ser el valor puntual de concentración de contaminante en la atmósfera el que desencadena la respuesta de los organismos expuestos. Es preciso considerar el periodo de exposición al tóxico. La variable independiente no debe ser la concentración de contaminante, sino la dosis, entendida como la relación no lineal entre concentración de contaminante y tiempo de exposición al mismo. Dado que el bioindicador, introducido en el medio natural, así como su entorno, suele encontrarse sometido a fumigaciones crónicas (bajas concentraciones durante largos periodos de exposición) su respuesta es el resultado de un efecto acumulativo y desde este punto de vista integra una dimensión temporal difícil de precisar con el analizador automático.

La segunda faceta de esa respuesta integrada, considera el hecho de que los compuestos presentes en la atmósfera no sólo coexisten sino que además pueden interaccionar. Sustancias por sí mismas inocuas o incluso estimulantes como los nitratos originados a partir de los óxidos de nitrógeno, pueden comportarse en

5306060890

presencia de otras sustancias (dióxido de azufre, ozono) como potenciadores de su efecto dañino (Welburn et al. 1981, Balaguér & Manrique 1991). Por otra parte, agentes neutralizantes, como el amonio, el polvo procedente de carreteras, canteras o de plantas fertilizantes, pueden jugar un papel tamponante muy importante protegiendo a los líquenes y a otros vegetales de la acción de contaminantes ácidos tales como el SO₂ o el NO₂ (Kauppi 1980a, Holopainen 1983).

En determinadas ocasiones la interacción es más compleja; tal es el caso del efecto de la combinación de dióxido de azufre con ozono sobre plantas de soja. Cuando los niveles de ambos contaminantes son próximos al umbral de fitotoxicidad, su efecto conjunto es sinérgico, pero si lo superan, a concentraciones elevadas, la acción es antagónica; el dióxido de azufre amortigua los efectos que cabría esperar tras una exposición a ozono (Heagle y Johnson 1979).

Los estudios que consideran el efecto integrado de más de dos contaminantes son hasta el momento muy escasos. Igualmente pobre es la información disponible sobre el efecto conjunto de contaminantes y otros factores de origen ambiental como sequía, heladas, etc. Sin embargo, el bioindicador y su entorno se hallan sujetos a todas las interacciones sinérgicas, antagónicas o aditivas de todos los factores ambientales, sean o no de origen antropogénico. Este hecho puede justificar aquellas observaciones de respuestas drásticas del bioindicador ante concentraciones bajas de un contaminante, e igualmente justifica la ausencia de respuesta o respuestas leves frente a dosis de contaminantes potencialmente más dañinas. Esta ventaja del bioindicador, capaz de poner de manifiesto la interacción entre contaminantes, no predecible a priori a partir de los datos de inmisión, implica, sin embargo, una limitación, en cuanto que el efecto de un contaminante determinado, puede quedar, en último extremo, diluido en una red de complejas interacciones.

En conclusión, la respuesta del bioindicador, como organismo sensible expuesto

a contaminantes, integra la dimensión temporal de la exposición y recoge además el conjunto de interacciones con otros factores ambientales.

Esta doble ventaja es necesaria pero no suficiente para discernir entre el bioindicador y cualquiera de los otros organismos inmersos en el ecosistema afectado. Además, el bioindicador debe reunir una sensibilidad diferencial al contaminante considerado, especificidad, y una respuesta a corto plazo, es decir, debe ser capaz de manifestar síntomas medibles con antelación al resto de los organismos expuestos.

Teniendo presente este perfil, en el caso de que el interés no radique en la evaluación cuantitativa de la concentración de un contaminante aislado, el bioindicador es el más adecuado pronosticador y descriptor de daños potenciales a otros miembros del ecosistema, atribuibles a contaminantes ambientales.

Entre los organismos empleados en la biomonitorización de los efectos del dióxido de azufre (SO_2), importante componente de la contaminación derivada de la combustión de carburantes fósiles, destacan los líquenes cuya adecuación ha sido ampliamente refrendada en la literatura científica previa.

1.4. Variables de respuesta

Cualquiera que sea el organismo elegido como bioindicador, considerado en su totalidad, representaría tal volumen de información que aún prescindiendo de aquella no relacionada directamente con el efecto de los contaminantes resultaría excesiva para ser procesada. Es preciso por tanto, seleccionar qué variable o variables de respuesta son las más representativas, sin olvidar que esta selección conlleva una importante pérdida de información. Esta elección se basará en una mayor especificidad y antelación en la respuesta frente al contaminante considerado.

En líquenes, la caracterización de la sensibilidad diferencial de aquellos procesos fisiológicos susceptibles, ha sido resumida en función de su sensibilidad creciente al SO₂ como: permeabilidad de la membrana celular < estado de los pigmentos < fotosíntesis-respiración < síntesis de proteínas < fijación de N₂ (Richardson & Nieboer 1983; Malhotra & Khan 1983). En paralelo a esta secuencia, se puede esbozar otra elaborada con las diferentes variables de respuesta relacionadas con aquellos procesos afectados. Con algunas de las variables ensayadas en líquenes y en orden creciente en cuanto al tiempo de respuesta, una secuencia sería: fluorescencia temprana de clorofilas *in vivo* > evolución de oxígeno > intercambio neto de dióxido de carbono > alteraciones ultraestructurales de las células del fotobionte > degradación de clorofilas a feofitinas > lavado de iones al exterior celular > síntomas visibles > cambios en la frecuencia y cobertura de especies líquénicas. Desafortunadamente, todas ellas son más tempranas que específicas, si bien la feofitinización de clorofilas, es decir, la sustitución del átomo de magnesio del anillo porfirínico por un protón, ha sido atribuido al resultado de la exposición a contaminantes ácidos (Ronen & Galun 1984). Menos tempranas que las ya expuestas son las variables de respuesta basadas en la presencia o la ausencia de especies o en cambios florísticos. Contra su prolongado tiempo de respuesta, debido a la lentitud con que estos cambios florísticos tienen lugar, cabe esgrimir su especificidad, dado que son capaces de valorar la desaparición de especies consideradas como sensibles a determinados contaminantes y la aparición de otras cuya autoecología original puede aportar información sobre el tipo de cambio que se está operando en el ecosistema. Desgraciadamente, estas valoraciones sobre la sensibilidad diferencial de las especies y su singularidad ecológica se basan, frecuentemente de forma exclusiva, en observaciones de campo, sin que hayan sido contrastadas en experiencias con fumigaciones controladas o en determinaciones de los óptimos ecológicos y fisiológicos.

Si bien se han realizado notables intentos de objetivizar la medida de variables de respuesta como frecuencia, cobertura, diversidad y abundancia (Ammann, Herzig, Liebendoerfer & Urech 1987; Nimis, Castello & Perotti 1990), su uso en estudios de bioindicación, suele estar sujeto a valoraciones subjetivas. Por ello, para completar o sustituir estos métodos, se han ensayado otros criterios basados en el análisis de ejemplares, tanto espontáneos como transplantados, de una sóla o de un pequeño conjunto de especies liquénicas seleccionadas (Galun & Ronen 1988).

1.5. La fluorescencia temprana de clorofilas in vivo

Tal como se ha comentado, la fotosíntesis es uno de los primeros procesos metabólicos que se ven afectados por la acción de los contaminantes atmosféricos. Por este motivo, cabe esperar que la medida de aquellas variables de respuesta que aporten información sobre la eficiencia con que dicho proceso tiene lugar, podrá evidenciar síntomas tempranos atribuibles al efecto del contaminante.

La medida de la fluorescencia reemitida como luz roja y roja lejana, procedente de las clorofilas de los sistemas antena del aparato fotosintético, viene siendo utilizada, desde hace largo tiempo, como indicador no destructivo de los procesos que tienen lugar in vivo durante la fotosíntesis (Krause & Weis 1984; Briantais et al. 1986; Renger & Schreiber 1986).

En organismos fotosintéticos adaptados a oscuridad la inducción de la fluorescencia de las clorofilas mediante un pulso de luz, responde a una cinética cuyos principales descriptores son: la señal de fluorescencia inicial (F_0), emitida cuando la gran mayoría de los centros de reacción del fotosistema II están aún abiertos; la fluorescencia máxima (F_p), que es alcanzada cuando los aceptores primarios de la

cadena de transporte electrónico se encuentran ya completamente reducidos; y la fluorescencia variable o inducida (F_v), definida como la diferencia entre los dos primeros parámetros, F_p y F_o (Fig 1; Öquist & Wass 1988).

La medida de los cambios observados en la intensidad de esta fluorescencia temprana, denominada así por considerar sólo la parte de la cinética que tiene lugar en los primeros 5 s tras el pulso inicial de luz, ha sido frecuentemente validada como técnica extremadamente sensible para valorar los efectos de distintos estreses ambientales en los vegetales (Lichtenthaler 1987b; Björkman & Powles 1984; Barnes et al. 1988; Arndt, 1974). Uno de estos efectos estudiados mediante la fluorescencia de las clorofilas es la fotoinhibición, que se manifiesta como una reducción en la tasa fotosintética de asimilación de CO_2 bajo intensidades de luz superiores a la saturante, así como en una caída del rendimiento fotónico o cuántico, en organismos expuestos a altas irradiancias (Demming & Björkman 1987). La fotoinhibición parece ser un fenómeno común en condiciones naturales, agravado frecuentemente en atmósferas contaminadas (Krause 1988).

El cálculo del cociente entre la fluorescencia variable y la máxima, F_v/F_p , resultado de la combinación de los mencionados descriptores de la cinética de fluorescencia temprana de clorofilas, inducida in vivo, se ha revelado como una variable de respuesta especialmente adecuada para la detección de daño atribuible a contaminantes atmosféricos (Schreiber et al. 1978; Barnes & Davison 1986). F_v/F_p se comportaría como un indicador extremadamente temprano de las alteraciones producidas, aunque inespecífico al mismo tiempo.

1.6. La degradación de clorofila a feofitina como variable indicadora de daño inducido por contaminantes ácidos

Es conocido desde hace más de sesenta años que la exposición al dióxido de azufre produce feofitinización de clorofilas (Dorries 1932). Sin embargo, aun en organismos tradicionalmente utilizados como bioindicadores de SO₂ como los líquenes, este fenómeno tardó en ser observado (Pearson & Skye 1965, Rao & Leblanc 1966, Nash 1973). Estudios posteriores han puesto de manifiesto que la feofitinización es una respuesta no sólo al SO₂, sino también a otros contaminantes ácidos como el ácido fluorhídrico o el dióxido de nitrógeno (Nash 1971, Nash 1976). En el caso del SO₂, la clorofila a es más sensible a su presencia que la clorofila b (Puckett et al. 1973, Malhotra 1976).

Ronen & Galun en 1984 observaron que la acidificación de extractos clorofílicos produce una modificación de su espectro de absorción en la franja visible, concretamente en la región del azul (Fig. 2). La densidad óptica en el máximo de absorbancia correspondiente a la clorofila a (en torno a los 435 nm) disminuye y, en contraste, aumenta en el máximo de la feofitina a (localizado a 415 nm). El cociente entre ambas absorbancias alcanza valores que oscilan entre 1.45, para extractos no acidificados, y 0.50, para el caso de máxima acidificación. La observación de este fenómeno, llevó a estos autores a proponer el cociente de absorbancias D.O.435nm/D.O.415nm (Phaeophytinization Quotient of chlorophyll a, PQa) como procedimiento rápido para la monitorización a gran escala del efecto de contaminantes en las clorofilas del fotobionte liquénico.

El uso de este índice para la bioindicación de contaminantes atmosféricos fue ensayado con transplantes de talos de Ramalina duriaei por Garty et al. en 1985. Si bien éste era el primer estudio de campo que aplicaba el PQa, el transplante de talos

Señal de fluorescencia

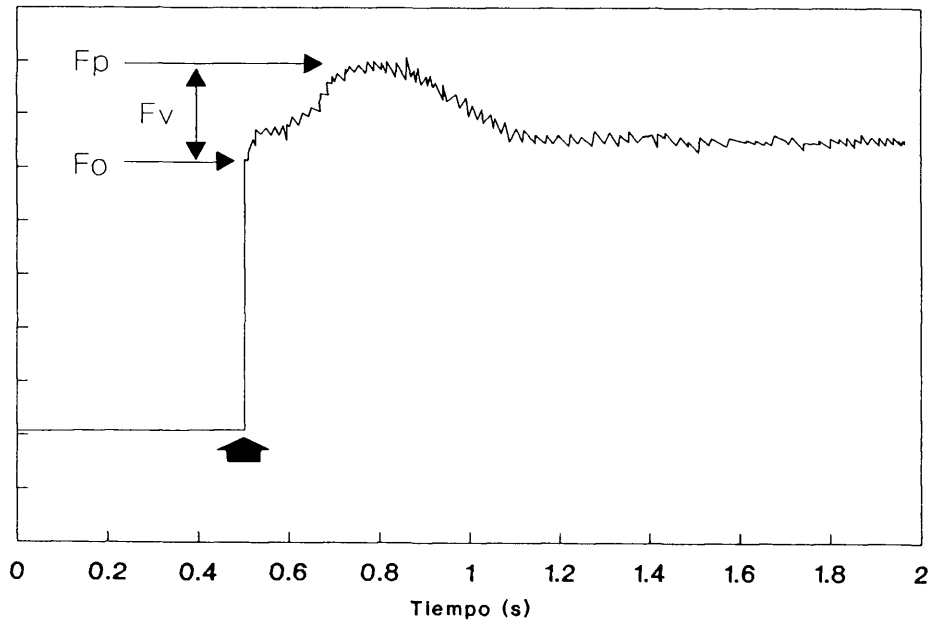
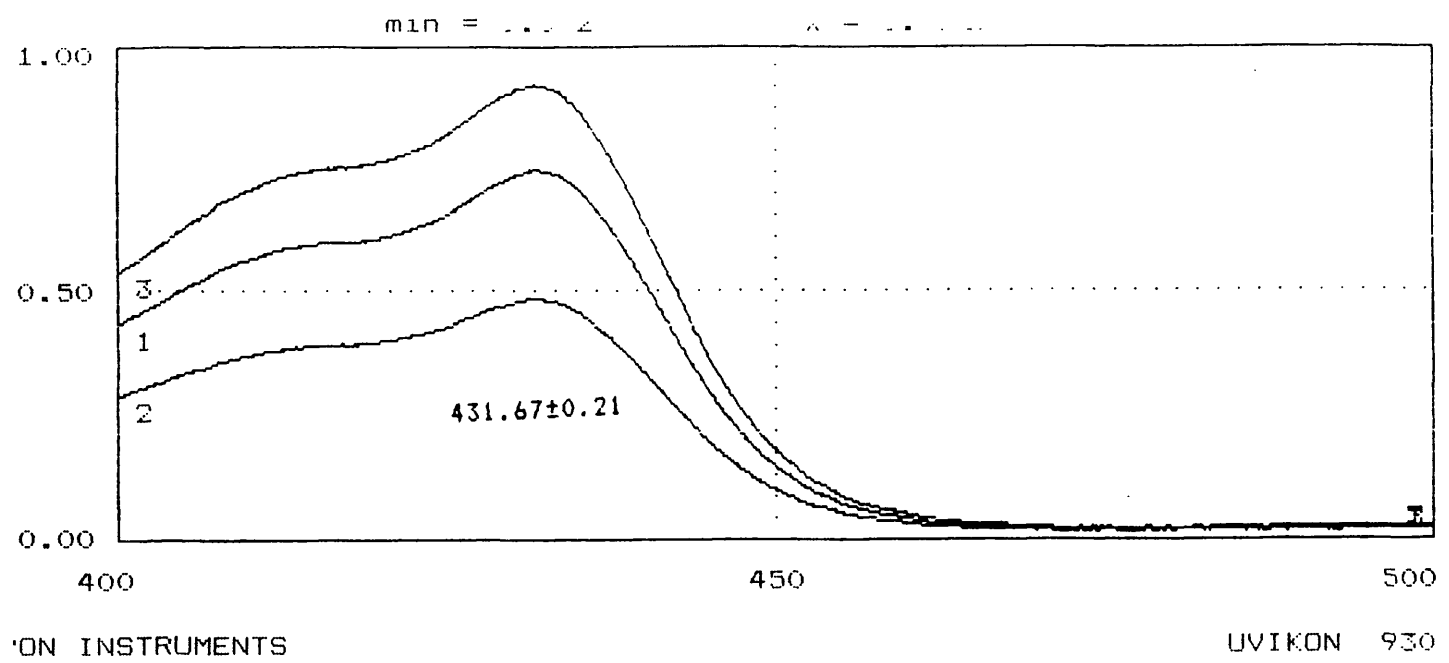


Figura 1. Cinética de la señal de fluorescencia de la clorofila, inducida en talos hidratados de *Ramalina farinacea*, preadaptados a oscuridad durante 15 minutos, al ser iluminados con un pulso de luz actínica, en el instante que indica la flecha de trazo grueso. F₀, señal de fluorescencia inicial; F_p, fluorescencia máxima; F_v, fluorescencia variable o inducida, definida como la diferencia entre los dos parámetros anteriores.



↓ +H⁺

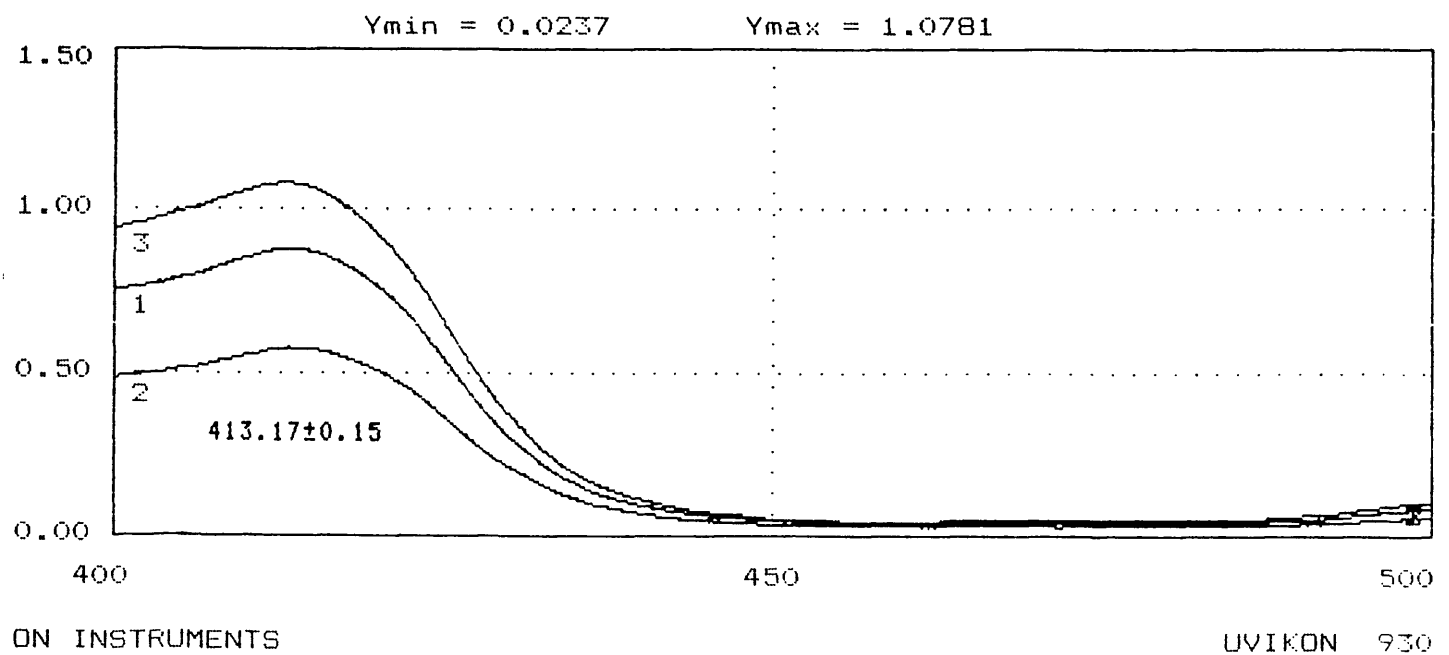


Figura 2. Cambio en el espectro de absorción de tres extractos en dimetil sulfóxido de clorofila a pura, tras la acidificación con ácido clorhídrico. Nótese cómo el máximo de absorbancia de la clorofila a localizado en la región del azul (432 nm) desaparece, al tiempo que se incrementa la absorción en el máximo correspondiente a la feofitina a (413 nm).

procedentes de estaciones control a zonas presuntamente expuestas a la acción de contaminantes atmosféricos, se había ensayado con anterioridad y se ha seguido utilizando hasta la actualidad (Brodo 1961; Schönbeck 1969; Pyatt 1970; Morgan-Huws & Haynes 1973; Nash 1975; Kauppi 1976; Wood & Nash 1976; Eversman 1980; Marsh & Nash 1979; Ferry & Coppins 1979; Dawson & Nash 1980; Nash & Sommerfeld 1981; Holopainen 1984b; Garty 1988; Boonpragob & Nash 1991).

Coincidiendo con observaciones previas que ya habían puesto de manifiesto la determinante influencia del pH y capacidad tampón del sustrato sobre el que se desarrollan los líquenes (Baddeley et al. 1971; Hill 1971; Türk & Wirth 1975), Manrique et al. (1989) constataron una estrecha correlación positiva entre el pH de diferentes sustratos y el valor del PQa en ejemplares de Anaptychia ciliaris que sobre ellos crecían de forma natural, en un territorio expuesto a fumigaciones con dióxido de azufre de $62 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (percentil 98).

Aun así, el uso del cociente de feofitinización estaba restringido a líquenes, como Ramalina duriaei o Anaptychia ciliaris, que prácticamente no acumulan metabolitos secundarios fenol-carboxílicos, de carácter ácido, conocidos como sustancias liquénicas. Sin embargo, estas especies sin sustancias liquénicas constituyen un reducido grupo en relación a la totalidad de los líquenes. Brown & Hooker (1977) y Brown (1980) habían observado el poder feofitinizante y oxidante de las sustancias liquénicas en los extractos de clorofilas. Igualmente constataron la interferencia de estas sustancias con los máximos de clorofila a y feofitina a, dado que también absorben en la región del azul. Por este motivo, algunos autores descartaron el uso del PQa (Sanz 1991). Afortunadamente, el almacenamiento de estos ácidos fenólicos es extracelular y este hecho ha permitido el desarrollo de técnicas sencillas tales como lavados sucesivos de acetona al 100% saturada o no con diferentes carbonatos (Brown & Hooker 1977, Hageman & Fahselt 1990; Sancho & Kappen

1989; Kappen et al. 1990; Balaguer & Manrique 1991).

Por otra parte, la reducida cantidad de muestra necesaria para la extracción de clorofilas de líquenes en DMSO (20 mg), la sencillez del método (sin necesidad de homogeneización, ni centrifugación), el corto tiempo de procesamiento de las muestras (40 minutos de incubación) y el amplio espectro de especies susceptibles de ser utilizadas como bioindicadoras (Silberstein & Galun 1988; Barnes et al. 1992), permite considerar el contenido en clorofilas y especialmente el PQa en estudios extensivos de territorios, con un alto número de estaciones de muestreo. Por ello, tanto el contenido en clorofilas y el PQa como la ya comentada fluorescencia temprana de clorofilas *in vivo*, aparecen como variables de respuesta aptas para afrontar el cartografiado de regiones supuestamente afectadas por la exposición a SO₂.

1.7. Cartografía de la calidad del aire mediante bioindicadores

Dado el bajo grado de especificidad de las variables de respuesta más utilizadas, puede ser difícil evaluar el peso de una fuente puntual de contaminante como causa de una sintomatología observada. En estos casos, tan importante como el valor de la variable de respuesta, es la evolución espacial de la misma, es decir, la búsqueda de gradientes espaciales del decaimiento de la variable, atribuibles al foco emisor de acuerdo con los vientos dominantes, la topografía y las condiciones de estabilidad atmosférica.

Muy diversos han sido los procesos industriales cuyos efectos sobre la simbiosis líquénica han sido considerados: centrales térmicas (Jacobson & Showman 1984; Eversman 1980; Marsh & Nash 1979; Will-Wolf 1980; Nash & Sommerfeld

1981; Crespo et al. 1981; Garty, Ronen & Galun 1985; Showman 1986; Garty 1988), industrias papeleras (Hoffman 1974; Newberry 1974; Holopainen 1983), fundiciones (Leblanc, Rao & Comeau 1972), plantas siderúrgicas (Rao & Leblanc 1967, Pyatt 1970), refinerías (Morgan-Huws & Haynes 1973, Taylor & Bell 1983), plantas procesadoras de gases ácidos (Skorepa & Vitt 1976; Case 1980), plantas procesadoras de fertilizantes (Holopainen 1983), fábricas de cerámica (Holopainen 1984a), fábricas de cementos (Kortesharju, Savonen & Säynätkari 1990), factorías de zinc (Nash 1972, 1975), fundiciones de cobre (Wood & Nash 1976; Dawson & Nash 1980), factorías de aluminio (Brodo 1961). En el caso de seguimientos de la calidad del aire basados en la cartografía sucesiva de un mismo territorio durante varios años, los líquenes aparecen como bioindicadores aptos no sólo para poner de manifiesto incrementos en los niveles de contaminantes en la atmósfera, mediante cambios regresivos de la flora líquénica (Sernander 1926, Schmid 1957, Züst 1977), sino incluso mejoras en la calidad del aire que se traducen en recolonizaciones de territorios tras reducirse los niveles de inmisión de contaminantes (Henderson-Sellers & Seaward 1979; Showman 1981; Bates, Bell & Farmer 1990).

Utilizando líquenes como bioindicadores, las variables de respuesta que han sido más frecuentemente cartografiadas son la distribución de las especies, el Índice de Pureza Atmosférica (IPA), y en menor medida otras, como la riqueza en cuanto a especies presentes en cada localidad (Rao & Leblanc 1967; De Wit 1976; Showman 1981, 1985), la cobertura y la frecuencia de las mismas (Metzler 1980), síntomas visibles (Metzler 1980), Índice de Abundancia-Densidad (Skorepa & Vitt 1976), Índice de Poleotolerancia (Trass 1973), contenido en azufre (Taylor & Bell 1983), contenido en diferentes metales, en calcio, cloro, fósforo (Garty, Ronen & Galun 1985, Garty 1988), grado de alteración ultraestructural (Holopainen 1984a), contenido en clorofilas totales, fotosíntesis neta y bruta, respiración en oscuridad, contenido en proteínas,

tasa de crecimiento, pérdida de fotoasimilados (Arb & Brunold 1990; Arb et al. 1990), feofitinización de clorofilas (Garty, Ronen & Galun 1985).

Considerando que la respuesta de estas variables bioindicadoras debe ser por definición más temprana que la del resto de los elementos del ecosistema expuestos al contaminante, el objeto de la elaboración de un mapa radica en poder anticipar una imagen del daño esperado en el área expuesta, en caso de aumentar la concentración de contaminante o el tiempo de exposición. Sólo en aquellas zonas en las que se detectan daños severos en el bioindicador, éstas podrían corresponderse con afecciones en elementos menos sensibles del ecosistema. Por tanto, el interés de la cartografía basada en los síntomas observados en el bioindicador seleccionado, consiste en la determinación de áreas de riesgo dentro de una región expuesta a contaminación atmosférica.

Un segundo paso, una vez acotadas las zonas de mayor riesgo, sería la caracterización de la causa de la sintomatología observada. Para ello, se utilizan métodos más costosos en cuanto a tiempo o cantidad de muestra requerida; métodos más específicos pero en ningún caso aplicables al barrido de grandes áreas.

Otra vía frecuentemente empleada para la determinación del agente causante es la de comparar el mapa de áreas de riesgo con otro de inmisión de contaminantes. En caso de considerar los principales contaminantes, se ha encontrado en estudios previos (Arb & Brunold 1990; Arb et al. 1990) una muy significativa correlación entre la concentración de O₃, NO₂, NO, o de SO₂, en invierno y la variable de respuesta: contenido en clorofilas totales ($R^2=0.81$; $P<0.01$). Arb et al. (1990) observaron, utilizando técnicas de regresión lineal múltiple, que era posible predecir el incremento en el contenido en clorofilas a partir de un aumento de los niveles de inmisión de contaminantes atmosféricos.

Incluso cuando sólo un contaminante predomina en el área de estudio, la

comparación es difícil dado que se desconoce qué factor es el que determina la respuesta del bioindicador. Los datos procedentes del análisis de líquenes suelen ser comparados con la media anual de las concentraciones de SO_2 , por ser ésta un valor habitualmente disponible. Esta comparación parece ser válida en regiones sujetas a niveles bajos de contaminante pero constantes (Gilbert 1970, Hawksworth & Rose 1970). De Wit (1976) comparando la riqueza líquénica en Holanda con diferentes medidas de inmisión de SO_2 , observó que los valores de invierno (entre octubre y marzo) eran mejores descriptores que los valores correspondientes a todo el año. Por otra parte, cabe preguntarse si la respuesta del bioindicador viene determinada por los picos de SO_2 o por los valores de concentración medios. La experiencia holandesa de cartografía de la contaminación atmosférica por SO_2 mediante líquenes concluyó que el uso de valores medios de concentración (percentil 50) posee un valor descriptivo más acertado que el de los picos de contaminante (percentil 98). Sin embargo, la correlación entre la variable de respuesta, en este caso riqueza líquénica, y las medidas de inmisión del contaminante mejoraban si en lugar de utilizar el percentil 50, 75 ó 98, se consideraba una combinación lineal de los percentiles 50 y 98 (De Wit 1976).

En cualquier caso, y sea cual sea la variable indicadora de contaminación atmosférica elegida para la cartografía de áreas de riesgo -especialmente si el objetivo es la monitorización-, su sensibilidad al contaminante considerado debe ser conocida y esta relación, indicador-dosis de contaminante, debe poder ser expresada como una función matemática altamente significativa (Nimis et al. 1991).

La elaboración de un mapa de estas características permite seleccionar un reducido número de estaciones de muestreo incluidas en un nivel de riesgo de daño conocido. Con ellas, es posible abordar el análisis de variables de respuesta que precisen procesos de preparación de las muestras más complejos y más largos. A

pesar de presentar estas desventajas, algunas de estas variables de respuesta son tanto o más específicas y tempranas que aquellas variables utilizadas en la cartografía del territorio estudiado, tal es el caso del análisis de las alteraciones de la ultraestructura del fotobionte liquénico. Su estudio no sólo permitirá contrastar el daño esperado en ejemplares procedentes de distintas estaciones ya cartografiadas, y por ende la fiabilidad del mapa, sino que además aportará información sobre los mecanismos implicados en el desarrollo de una sintomatología atribuible a la exposición al contaminante.

1.8. Alteraciones de la estructura celular del fotobionte liquénico inducidas por la exposición a contaminantes atmosféricos

Las perturbaciones descritas como consecuencia de la exposición a contaminantes atmosféricos y más concretamente al SO_2 , evidentemente se corresponden con distintos estados de alteración de la estructura celular de los simbiontes. El intento de visualizar estas alteraciones ha conducido a la aplicación de técnicas de microscopía capaces de presentar facetas cada vez más precisas de la sintomatología inducida por el contaminante.

En imágenes obtenidas mediante microscopía óptica convencional, el único fenómeno analizado como variable de respuesta es el porcentaje de algas plasmolizadas (Eversman 1978; Will-Wolf 1980). Sin embargo, este fenómeno representa un estado tan avanzado de afección que antes de que sea posible detectar cambios significativos en cuanto a la frecuencia de células colapsadas, la mayoría de las variables de respuesta comentadas ya habrían manifestado graves síntomas de daño (Holopainen 1984a; Holopainen 1984b). Al mismo tiempo, el colapso celular

puede ser consecuencia de multitud de factores (Holopainen 1986), es por ello, que su análisis no aporta ninguna información para la diagnosis del decaimiento observado.

Las técnicas de microscopía de fluorescencia ponen de manifiesto cambios en el color de las células de fotobionte liquénico tras la exposición al SO₂ (Kauppi 1980b). Si bien este método manifiesta síntomas previos al colapso celular, sin embargo, existe una gran dispersión en la respuesta, unida a la dificultad de objetivizar la medida mediante estimas basadas en escalas arbitrarias de clases de colores (Holopainen & Kauppi 1989).

A las deficiencias de los métodos de microscopía expuestos, se suma la escasa información que aportan sobre la faceta estructural del daño producido por la acción del contaminante. Frente a estos problemas, la microscopía electrónica de transmisión (MET) evidencia perturbaciones en la estructura celular incluso antes de que estos efectos sean irreversibles (Wellburn, Majernik & Wellburn 1972). La MET posibilita la descripción de una sintomatología basada en el progresivo deterioro estructural de la célula afectada. Este avance permite dilucidar dónde se encontrarían las primeras dianas subcelulares, entendiendo por diana, aquellos orgánulos en los que se manifestarían los primeros síntomas de alteración estructural, sugiriendo así potenciales mecanismos de acción del contaminante (Soikkeli & Kärenlampi 1984).

En líquenes con algas verdes, la exposición al SO₂ produjo avanzados estados de daño celular en el fotobionte, mientras que en el micobionte no se detectaron síntomas (Holopainen & Kauppi 1989). Este hecho centra la atención del análisis ultraestructural de los efectos debidos a la acción del SO₂, en el estudio de los cambios detectables en la célula algal. Estas observaciones coinciden con los resultados que presentan la fotosíntesis como un proceso más sensible al SO₂ que la respiración, dado que el principal componente de la respiración liquénica es fúngico.

Sin embargo, las primeras alteraciones del daño por SO₂ en el fotobionte liquénico, parecen no observarse en el cloroplasto sino en la mitocondria, como hinchamiento y deformación de sus crestas (Holopainen & Kauppi 1989). Es precisamente ésta la diferencia más acusada entre las sintomatologías observadas en líquenes y plantas vasculares, dado que en estas últimas, la mitocondria parece ser uno de los últimos orgánulos en acusar perturbaciones (Thomson 1975; Soikkeli 1981; Soikkeli & Kärenlampi 1984).

Por otra parte, la MET permite abordar la discusión sobre en qué medida distintos contaminantes generarían distintas sintomatologías ultraestructurales, es decir, hasta qué punto los resultados obtenidos son específicos de cada contaminante (Holopainen 1984a). En líquenes, se han descrito sintomatologías diferenciales atribuibles a la acción del SO₂, de compuestos nitrogenados, y de fluoruros (Holopainen & Kärenlampi 1985).

En resumen, a la luz de la literatura científica previa, la MET aparece como una técnica adecuada para la detección de síntomas tempranos y específicos causados por la exposición a contaminantes atmosféricos. Sin embargo, la complejidad del procesamiento de las muestras reduce su aplicación a la caracterización de efectos en proyecciones de territorios supuestamente expuestos a atmósferas contaminadas, una vez que estos han sido detectados mediante técnicas rutinarias de análisis de un elevado número de muestras.

JUSTIFICACION DEL ESTUDIO

2. Justificación del estudio

La sensibilidad diferencial de los líquenes a la exposición al SO₂, y como consecuencia de ella, su uso como bioindicadores, es un fenómeno ampliamente tratado en la prolífica literatura científica previa. Sin embargo, dado que la respuesta del bioindicador es consecuencia de la interacción de un elevado número de agentes causales, no parece adecuado extrapolar modelos elaborados para otras regiones con diferentes condiciones climáticas, en las que el ritmo vital de los organismos analizados responde a diferentes pautas, y donde las masas de aire contaminado difieren en su composición así como en su posterior evolución.

Por otra parte, son escasas las investigaciones que aunan el estudio de campo, en el cual el bioindicador está sometido a una compleja red de interacciones, con la experimentación en condiciones seminaturales, gracias a la cual se pueden contrastar hipótesis concretas sobre la sensibilidad a un determinado contaminante o a una mezcla de ellos, bajo condiciones ambientales que tienden a aproximarse a las naturales.

Por todo ello, parece interesante abordar desde esta doble vertiente - análisis de la sintomatología en el campo y experimentación en cámaras - el estudio de una problemática concreta en el marco de la Región Mediterránea.

El interés de analizar un territorio concreto potencialmente expuesto a contaminación atmosférica, conduce a considerar como área a estudiar, la Comarca del Bajo Maestrazgo y los Puertos de Morella, territorio en el cual se han desarrollado sucesivas evaluaciones de la calidad del aire, basadas en el uso de líquenes como bioindicadores.

En el verano de 1979, el equipo de la Dra. Ana Crespo de la Cátedra de Botánica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, realizó

un estudio preliminar con objeto de cartografiar distintas áreas de isocontaminación atmosférica en las inmediaciones de Andorra (Teruel), utilizando líquenes como monitores. Como variable de respuesta se empleó el Índice de Pureza Atmosférica, IPA (Leblanc & De Sloover 1970). En 1984, se amplía el área estudiada a la Comarca del Bajo Maestrazgo. En esta ocasión, se calculó el índice cuantitativo IPA y se realizó un estudio comparativo del espectro de absorción de extractos clorofílicos. Tras este estudio (1984 - 1986), no se detectaron perturbaciones de la flora, ni de la vegetación líquénica en el territorio. De hecho, especies líquénicas supuestamente sensibles al SO_2 , como Anapthychia ciliaris (L.) Körber entre otras, aparecían representadas de forma espontánea, tanto en el piso bioclimático mesomediterráneo como en el piso supramediterráneo, por ejemplares bien desarrollados y frecuentemente fructificados. Atendiendo a esta ausencia de daños en la flora y vegetación líquénica, cabía inferir que los niveles de contaminantes atmosféricos en el área de estudio no debieron superar el umbral por encima del cual se ven modificadas las comunidades líquénicas por desaparición de sus elementos más sensibles. No obstante, bajas concentraciones de estos contaminantes podrían estar reduciendo el rendimiento metabólico de los líquenes.

El estudio de esa sintomatología temprana, tanto en el ámbito de los ecosistemas naturales presuntamente expuestos al SO_2 , como bajo condiciones seminaturales de experimentación, planteó las cuestiones, cuyos análisis constituyeron los objetivos concretos de la presente memoria doctoral.

OBJETIVOS

3. Objetivos

1. Caracterización de la respuesta al SO₂ de distintas especies líquénicas representadas en la Comarca del Bajo Maestrazgo y en los Puertos de Morella.

La desaparición de cualquiera de los elementos del ecosistema debe pasar por etapas previas, tempranas, caracterizadas por modificaciones del metabolismo líquénico a distintos niveles y en diferente grado según la sensibilidad del organismo considerado a los cambios ambientales que se están produciendo. Teniendo presente este hecho y considerando que la totalidad de los anteriores estudios se han centrado en el análisis de cambios en la flora o vegetación líquénica, cabe replantearse la sensibilidad de algunas de las especies líquénicas representadas en el área prospectada, frente al contaminante más característico originado en procesos de combustión de carburantes fósiles, el SO₂.

1.i. Caracterización de la respuesta a la exposición a SO₂ a distintos niveles de análisis.

El estudio de la sintomatología inducida por la exposición a SO₂ incluye el conocimiento de la respuesta del líquen a distintos niveles de análisis, no sólo por ofrecer información sobre distintas facetas complementarias, sino también para valorar qué variables son las primeras en acusar perturbaciones atribuibles al efecto del contaminante y en qué medida los síntomas observados son específicos del mismo. Por ello, se plantea la evaluación de las siguientes variables de respuesta tras la exposición a este contaminante en cámaras de fumigación, donde las condiciones de experimentación son conocidas:

1. Variación en el contenido en clorofilas totales y degradación de la clorofila a a feofitina a.

Para el desarrollo de este punto debe cumplirse como objetivo previo, la optimización del método de extracción de clorofila a y b en dimetil sulfóxido (DMSO) y el ajuste de nuevas ecuaciones para su determinación.

2. Cambios en la fluorescencia temprana de las clorofilas *in vivo*.

Dado que las técnicas de medida de fluorescencia in vivo se encuentran aún en pleno desarrollo, es preciso adecuar el método al estudio de los líquenes. Antes de proceder a la evaluación del efecto atribuible a contaminantes ambientales, deberá analizarse la influencia de variables tales como relaciones hídricas e historia lumínica previa, en la señal de fluorescencia de las especies líquénicas consideradas.

3. Alteraciones de la ultraestructura del fotobionte líquénico.

1.ii. Caracterización de la respuesta a distintas dosis de SO₂.

Dado que la respuesta del bioindicador depende no sólo de la concentración del contaminante, sino que además depende del tiempo de exposición al mismo, deben estudiarse los efectos ante la variación conjunta de ambos. La relación no lineal entre estas variables - concentración y tiempo - define el concepto de dosis. Sin embargo, un mismo valor de dosis puede generar diferentes respuestas del organismo expuesto. Esto es, la respuesta a altas concentraciones durante breves periodos de tiempo puede desencadenar diferentes efectos que la exposición durante periodos prolongados a concentraciones moderadas del mismo contaminante. Por tanto, ambos supuestos deben ser considerados:

1. Efecto inducido por exposiciones agudas (cortos periodos de exposición a altas concentraciones de SO₂).

2. Efecto inducido por exposiciones crónicas (largos periodos de exposición a

concentraciones medias y bajas de SO₂).

I.iii. *Estudio de la interacción entre el SO₂ y el NO₃⁻ bajo distintas condiciones ambientales.*

Tras describir la sintomatología atribuible al SO₂, como único agente perturbador, el siguiente paso debe ser evaluar en qué medida esa respuesta se encuentra modulada por la interacción con otros contaminantes con los que el SO₂ coexiste, tales como los óxidos de nitrógeno. Estos óxidos de nitrógeno, que se originan en los mismos procesos que el SO₂, representan frecuentemente una fuente adicional de nitrato (NO₃⁻) para la vegetación. Por ello, dentro de la caracterización de la respuesta liquénica al SO₂, un objetivo principal es el estudio de la potencial interacción entre ambos contaminantes. Este objetivo incluye el análisis de la respuesta liquénica tras fumigaciones controladas bajo distintas condiciones de humedad y temperatura, y en distintos periodos del año.

II. *Seguimiento de la evolución de Anaptychia ciliaris en la Comarca del Bajo Maestrazgo y en los Puertos de Morella.*

En segundo lugar, dado que los resultados de laboratorio no son directamente extrapolables a la situación observada en los ecosistemas naturales, es preciso considerar la evolución de los organismos seleccionados como bioindicadores, incluidos en su hábitat. Este objetivo contempla dos planteamientos. Por una parte, la descripción de la evolución de ejemplares autóctonos de un área que pudiera estar sometida a la acción del SO₂; y por otra, el análisis de la respuesta de ejemplares procedentes de una localidad control, supuestamente no expuesta a concentraciones

tóxicas de este contaminante, tras ser transplantados al área potencialmente afectada. Este doble planteamiento conlleva un seguimiento en el tiempo del estado de los líquenes estudiados.

La labor investigadora a desarrollar *in situ*, se concreta en el análisis de la evolución del bioindicador liquénico en su entorno, a lo largo de cuatro años, en la Comarca del Bajo Maestrazgo y los Puertos de Morella. Este seguimiento incluye dos objetivos:

1. Análisis de la evolución temporal.
2. Análisis de la variación espacial.

La información que se obtenga, fruto de estos análisis, permitirá abordar la cartografía de las zonas de mayor riesgo potencial de daño en el área de estudio:

3. Elaboración del mapa de áreas de riesgo.

Por último, con los datos de inmisión de contaminantes atmosféricos, así como la información meteorológica y topográfica disponible, el objetivo final es discernir qué causas pueden estar implicadas en la respuesta de los líquenes *in situ* y en qué medida la determinan:

4. Análisis de selección progresiva de variables y elaboración de un modelo de respuesta mediante regresión múltiple.

MATERIALES Y METODOS

4. Materiales y métodos

4.1. Selección del material

La selección de las especies liquénicas, tanto para llevar a cabo los experimentos de fumigaciones controladas con SO₂, como para el seguimiento de su evolución en el área de estudio, debía considerar tres requisitos. En primer lugar, las especies seleccionadas deberían poseer un área de distribución que incluyera el territorio objeto de estudio. Además, no deberían presentar problemas taxonómicos que dificultasen su reconocimiento en el campo. Debería tratarse de líquenes de fácil recolección y tamaño suficiente (macrolíquenes) como para que fuera posible la recogida de sucesivas muestras en cantidad suficiente como para desarrollar los distintos análisis. En tercer lugar, atendiendo a la bibliografía, tendrían que ser especies liquénicas de sensibilidad media, con el fin de obtener una relación óptima entre el periodo de exposición al contaminante, o contaminantes, y el tiempo de respuesta. En otras palabras debería ser posible observar una evolución en función del tiempo, de una sintomatología atribuible al efecto de la exposición al contaminante.

En los primeros modelos desarrollados en Reino Unido, tres especies liquénicas, Anaptychia ciliaris (L.) Körb, Evernia prunastri (L.) Ach. y Ramalina farinacea (L.) Ach. mostraban una sensibilidad intermedia al SO₂, si bien las dos últimas se presentaban como especies más tolerantes que la primera (Hawksworth & Rose 1970; James 1982). En la Tabla 1, se especifica, junto a la especie seleccionada para cada una de las fumigaciones controladas con SO₂, la localidad donde fueron recogidos los especímenes, la fecha en que esta recolección tuvo lugar, así como el número de réplicas por tratamiento en cada experimento.

Tabla 1

Material seleccionado para cada una de las experiencias realizadas

Experimento	Especie	Localidad*	Recolección	Réplicas
1	<i>A. ciliaris</i>	Selas	9.1988	3
2	<i>A. ciliaris</i> <i>E. prunastri</i> <i>R. farinacea</i>	Selas	2.1989	6
3	<i>A. ciliaris</i> <i>E. prunastri</i> <i>R. farinacea</i>	Selas	2.1989	6
4	<i>R. farinacea</i>	S. Pablo	10.1989	10
5	<i>R. farinacea</i>	S. Pablo	6.1990	10
6	<i>R. farinacea</i>	S. Pablo	6.1990	10
7	<i>R. farinacea</i>	S. Pablo	11.1990	8
8	<i>R. farinacea</i>	S. Pablo	2.1991	5

* Los especímenes procedentes de Selas crecían sobre la corteza de Quercus faginea Lam. y los procedentes de San Pablo de los Montes sobre Quercus pyrenaica Willd.

Por otra parte, para la optimización del método de extracción y determinación del contenido en clorofilas en extractos en dimetil sulfóxido (DMSO), se recolectaron talos de las especies liquénicas E. prunastri y R. farinacea que crecían sobre Q. pyrenaica en San Pablo de los Montes (30SUJ8378, Toledo), de A. ciliaris, Ramalina fraxinea (L.) Ach., R. farinacea y E. prunastri sobre Q. faginea en Selas (30TWL7635, Guadalajara), de R. farinacea sobre Q. pyrenaica en La Herrería (30TVK0293, San Lorenzo del Escorial, Madrid), y de Usnea subfloridana

Stirt. y E. prunastri procedentes de Fagus sylvatica L., recogidas en Elsdon (30TNY9393, Northumberland, Reino Unido).

Para la adecuación del método de medida de la fluorescencia temprana de las clorofilas in vivo, se emplearon ejemplares de las especies líquénicas Platismatia glauca (L.) W. Culb. et C. Culb., Hypogymnia physodes (L.) Nyl., Pseudevernia furfuracea (L.) Zopf, R. farinacea, Parmelia saxatilis (L.) Ach. y E. prunastri, recogidos en octubre de 1989, en Holystone (30TNY9301, Northumberland, Reino Unido). Estas especies fueron seleccionadas con el fin de contrastar el método en ejemplares que se hubieran desarrollado en muy distintos hábitats, y por tanto, bajo diferentes regímenes hídricos, lumínicos, etc. Los especímenes de Platismatia glauca y de H. physodes crecían sobre las cortezas de los árboles en un bosque mixto de hayas (F. sylvatica) y robles (Quercus petraea (Mattuschka) Liebl.); los de R. farinacea y E. prunastri se recogieron en robles aislados (Q. petraea); y por último, los especímenes de Parmelia saxatilis y Pseudevernia furfuracea se desarrollaban sobre rocas silíceas, en una pared expuesta. Para el estudio del efecto inducido por la exposición a SO₂ y a NO₃⁻, utilizando como variable de respuesta la fluorescencia temprana de clorofilas in vivo, se utilizaron talos de R. farinacea (experimento 7, Tabla 1).

Para el seguimiento en el campo, en condiciones naturales, de la evolución de talos líquénicos procedentes de una zona control, supuestamente no afectada por la exposición a contaminantes, y transplantados al área de estudio, presuntamente contaminada, se seleccionó la especie líquénica A. ciliaris. Esta especie forma parte de la flora autóctona del área estudiada, en la que se la reconoce como especie común, desde hace más de un siglo (Loscos 1877). De hecho, ha sido encontrada creciendo sobre diferentes sustratos, en la Comarca del Bajo Maestrazgo y los Puertos de Morella: Pinus sylvestris L., Pinus nigra Arnold, Juniperus oxycedrus L., Quercus rotundifolia Lam., Q. faginea y rocas calcáreas (Manrique et al 1989). Por otro lado,

considerando que el seguimiento es anual y que se trata de analizar la evolución del estado del bioindicador, la sensibilidad de la especie seleccionada no debía ser tan elevada que, a bajas concentraciones del contaminante, la respuesta fuera tan drástica, que impidiera discernir entre áreas con diferentes grados de daño o entre periodos de tiempo en que la calidad del aire variara. A. ciliaris fué elegida como bioindicador capaz de manifiestar una respuesta medible de forma objetiva, a partir de la cual pudiera interpretarse el grado de alteración atribuible al SO₂, en una estación de muestreo dada, tras un periodo determinado de exposición.

Teniendo en cuenta, que las variables de respuesta a analizar son el contenido en clorofilas, así como el nivel de degradación de la mismas a feofitinas, la especie bioindicadora escogida tiene la ventaja de no presentar ni sustancias liquénicas (ácidos fenol-carboxílicos), ni antraquinonas (Miguel & Villa 1990; Manrique et al. 1989), que, si bien no llegarían a enmascarar la feofitinización debida a causas ambientales gracias a que existen métodos de extracción y evaluación de pigmentos que reducen la interferencia de estas sustancias (Brown & Hooker 1977; Silberstein & Galun 1988; Barnes et al. 1992), sin embargo, sí alargarían el procesamiento de las muestras en estudios de prospección de áreas en los que se tiende a analizar el mayor número de estaciones y réplicas posibles.

Los ejemplares recogidos para su transplante superaron en todos los casos los 500 mg de peso seco al aire, cantidad suficiente, si se considera que sólo se necesitan 20 mg por talo y campaña.

4.2. Características del área de estudio

El área objeto del estudio de campo basado en el seguimiento de la evolución de transplantes de A. ciliaris, se asimila a un cuadrado de 75 Km de lado, con 3° de

declinación Este, cuyos vértices, según la proyección U.T.M., se localizan al NW en 30TXL9757, al NE en 31TBF6850, al SW en 30TXK9381 y al SE en 31TBE5875. Al Noroeste, se extiende el Desierto de Calanda que se prolonga hacia la depresión del Ebro; al Noreste, queda el límite provincial entre Teruel y Tarragona, al Suroeste la Sierra de Gudar, y al Sureste, el territorio estudiado penetra en Castellón incluyendo el Bajo Maestrazgo (Mapa 1 y 2). Las cotas altitudinales están comprendidas entre los 300 m.s.m. en torno a la estación 16-La Estanca, y superan los 1.400 m.s.m., en los alrededores de la estación 14-Villarroya de los Pinares, localizada en las estribaciones de la Sierra de Gudar. Toda la zona es de orografía muy compleja, siendo frecuentes los barrancos y valles abruptos separados por farallones calizos.

La precipitación media anual disminuye bruscamente desde la costa levantina hacia el interior. A la mayor continentalidad, se une el hecho de estar la región occidental y septentrional del área de estudio a sotavento de los vientos húmedos, los cuales descargan en la fachada expuesta al Mediterráneo, que corre desde la cara oriental de la Sierra de Gudar, hasta el pico Encanadé y la Sierra de Montenegro. Teniendo en cuenta que a esta situación de sombra de lluvias se suma la baja cota a la que se encuentra el Desierto de Calanda, se comprende la extrema diferencia en cuanto a régimen de precipitaciones, que separa a Calanda (Teruel) o Andorra (Teruel) de La Cenia (Tarragona) o Castellfort (Castellón), tal cómo se observa en los ombioclimogramas que se presentan en las Figuras 3 y 4. Para el análisis de la influencia del número de días de lluvia y de la precipitación sobre las variables de respuesta, en el periodo comprendido entre una campaña de recogida de muestras y la siguiente, se tomaron los datos procedentes de las estaciones Calanda (Teruel), Abatuj (Teruel), Puebla de Benifasar (Castellón), Morella (Castellón), y fuera del área de estudio Navahermosa, en Toledo. Estos datos fueron cedidos por el Instituto Nacional de Meteorología.

En la región más septentrional del área de estudio dominan los vientos fuertes

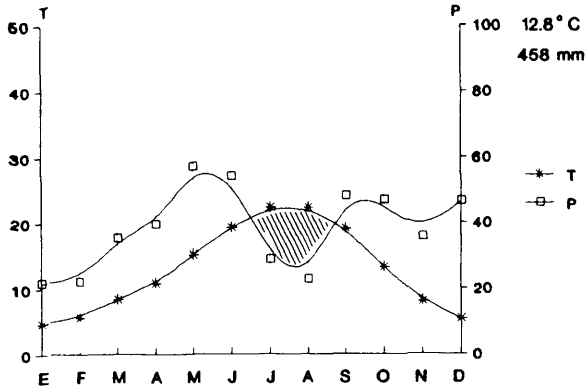


Mapa 1. Localización del área de estudio y de estaciones control.

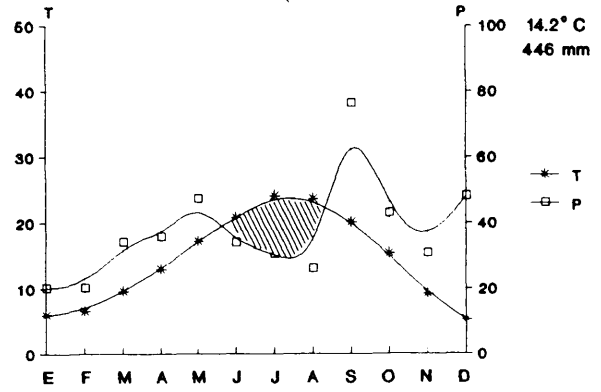


Mapa 2. Localización de las estaciones de muestreo en el área de estudio (cuadro de trazo grueso). La rosa de los vientos indica la frecuencia relativa de las procedencias de las masas de aire en Andorra, Teruel (Torre Meteorológica de la C.T. Teruel, 60 m, año 1984).

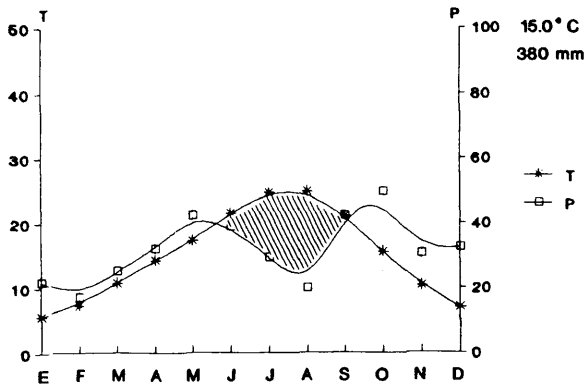
Andorra (Teruel)
(26-41) 714 m



Alcañiz (Teruel)
(9-21) 318 m



Calanda (Teruel)
(14-26) 466 m



Mazaleón (Teruel)
(20-26) 369 m

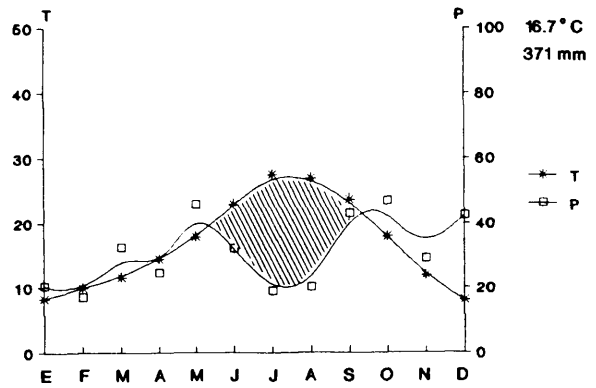


Figura 3. Ombroclimogramas de estaciones meteorológicas incluidas o próximas al área de estudio. A la derecha de cada diagrama se expresan la temperatura y la precipitación media anual.

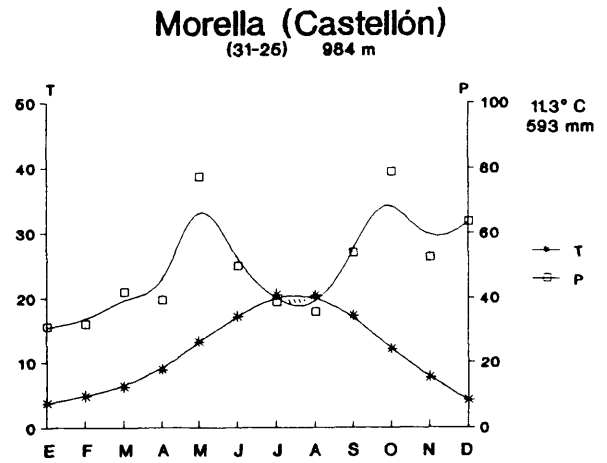
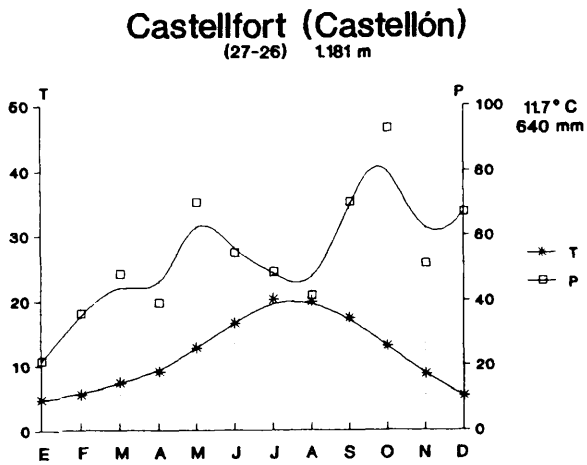
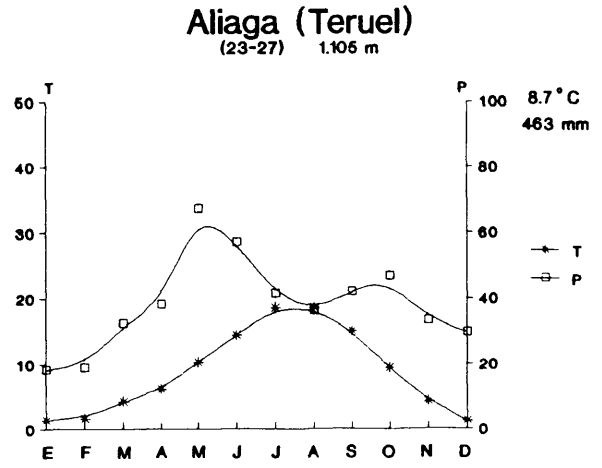
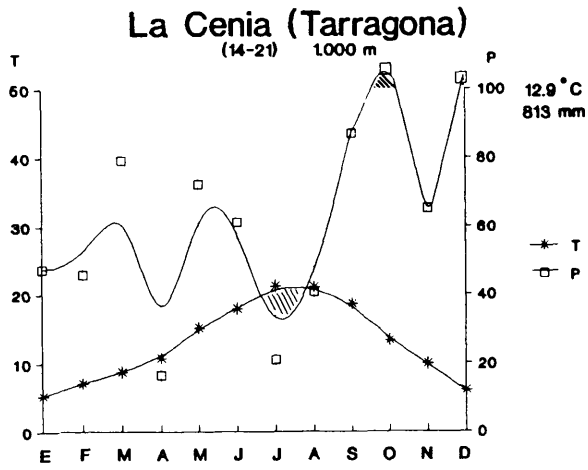


Figura 4. Ombroclimogramas de estaciones meteorológicas incluidas o próximas al área de estudio. A la derecha de cada diagrama se expresan la temperatura y la precipitación media anual.

procedentes del Oeste y del Noroeste, fruto de la canalización de masas de aire por el Valle del Ebro y de la circulación en las estribaciones prepirenaicas. Sin embargo, desde la costa, prevalece la dinámica de brisas marinas. En función de la fuerza de los vientos procedentes del interior, así se establece la resultante de la confrontación de ambos sistemas que determina la dirección y velocidad del viento en la región del Maestrazgo.

La vegetación potencial de este territorio estaría constituida por encinares y quejigares, dependiendo de la precipitación media anual, desde el bosque seco esclerófilo de Q. rotundifolia, hasta el subhúmedo marcescente de Q. faginea. En el encinar, las encinas alternan con enebros (J. oxycedrus), que en ocasiones forman bosquetes puros como consecuencia de la destrucción de las primeras. Tanto las etapas de degradación del quejigar como del encinar, suelen contar con la presencia del piorno azul (Erinacea anthyllis Link). Si bien el encinar bien desarrollado es fragmentario y en las estaciones estudiadas se halla reducido a bosquetes, en el caso de los quejigares, pueden encontrarse bosques en la cercanías de Herbés y Castell de Cabres.

Actualmente, la principal explotación forestal se centra en los pinares de repoblación que ocupan buena parte del área estudiada. Estos pinares están constituidos fundamentalmente por P. nigra, Pinus halepensis Miller, y P. sylvestris. En estas repoblaciones es frecuente que los pinos alternen con quejigos, encinas y especies subarborescentes autóctonas, por lo que más que una sustitución de la vegetación natural, se trata de una alteración de la misma.

Las estaciones de muestreo no han sido dispuestas de una forma regular o al azar en el territorio. Por el contrario, se ha pretendido incrementar su densidad en aquellas regiones donde atendiendo a estudios previos, podrían localizarse zonas de mayor riesgo de daño por contaminación atmosférica. Se han seleccionado trece localidades comprendidas entre los 650 y los 1.250 m.s.m. En ellas, se escogieron

como sustratos sobre los que realizar los trasplantes: P. sylvestris, P. nigra, P. halepensis y J. oxycedrus. Estas estaciones así como aquellas en las que se recogieron ejemplares autóctonos, y las estaciones elegidas como control, se relacionan en la Tabla 2.

El número de muestras analizadas por estación y campaña fue de cuatro. Sin embargo, esto no fue siempre posible, ya que durante el desarrollo del seguimiento se registraron pérdidas o deterioros en algunos trasplantes. También, en algunas estaciones, dada la baja frecuencia de ejemplares autóctonos, el número de muestras recolectadas, pertenecientes a distintos talos que crecían sobre distintos árboles, fue variable. El número de muestras analizadas de cada estación en las diferentes campañas, se recoge en la Tabla 3.

Tabla 2

Estaciones de muestreo

Estación	Tipo	Sustrato	UTM	Altitud (m.s.m)
1 Selas	Autóctono	Q. faginea	30TWL7635	1000
2 S. Pablo	Transplante	Q. pyrenaica	30SUJ8378	900
3 S. Pablo	Transplante	P. pinaster	30SUJ8378	900
4 C. Forestal	Transplante	P. nigra	30TYL478097	1100
5 Fuentespalda	Transplante	P. halepensis	31TBF502198	660
6 E. San Albert	Transplante	P. halepensis	31TBF499119	780
7 C. Cabres	Transplante	P. nigra	31TBF507048	1060
8 Herbés	Transplante	P. nigra	30TYL509087	1140
9 Corachar	Transplante	P. nigra	31TBF533079	1200
10 P. Aguila	Transplante	P. nigra	31TBF531045	1150
11 E. Cinctorres	Transplante	J. oxycedrus	30TYK398977	800
12 Carrascales	Transplante	P. nigra	30TYK446899	1080
13 R. Vallibona	Transplante	P. sylvestris	31TBE464971	1250
14 V. Pinares	Transplante	P. sylvestris	30TYK0692	1400
15 Peña Cortada	Transplante	P. halepensis	30TYL336090	980
16 La Estanca	Transplante	Soporte de madera	30TYL369484	300
17 Foz Calanda	Transplante	Soporte de madera	30TYL247349	500
18 Tore Miró	Autóctono	Q. rotundifolia	30TYL479045	1175
19 Fuentespalda	Autóctono	Q. rotundifolia	31TBF502198	660
20 E. San Albert	Autóctono	Q. rotundifolia	31TBF499119	780
21 C. Cabres	Autóctono	Q. faginea	31TBF507048	1060
22 Herbés	Autóctono	Q. faginea	30TYL509087	1140
23 Corachar	Autóctono	P. sylvestris- Crataegus monogyna	31TBF533079	1200
24 E. Cinctorres	Autóctono	Q. rotundifolia	30TYK398977	800
25 V. Pinares	Autóctono	J. oxycedrus	30TYK0692	1400
26 P. Cortada	Autóctono	Q. rotundifolia	30TYL336090	980
27 R. Vallibona	Autóctono	Q. faginea	31TBE464971	1250
28 Carrascales	Autóctono	Q. rotundifolia	30TYK446899	1080

Con el fin de comprobar que los sustratos receptores de los transplantes son comparables, se han realizado medidas del pH de las cortezas de acuerdo con métodos descritos por otros autores (Jøhnsen & Søchting 1973; Sidhu & Zakrevsky 1982). En

cada estación se evaluó el pH de las cortezas de cuatro ejemplares por especie. En aquellos puntos en los que se localizaron transplantes, estos se colocaron sobre los mismos cuatro árboles considerados para la medida del pH. Las muestras de corteza se tomaron entre 1.5 y 2 m sobre el suelo. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

Las medidas obtenidas de los valores de pH para las cortezas de los diferentes forófitos, están comprendidas dentro de lo descrito para las mismas especies por otros autores (Barkman 1958). Todos estos valores, a excepción del pH de la corteza de J. oxycedrus, pueden calificarse de ácidos (pH comprendido entre 3.3 y 4.5), por lo que si las muestras transplantadas se vieran sometidas en algún momento a la acción de algún contaminante de tipo ácido, dicha acción no se vería retardada o amortiguada por la capacidad neutralizante del sustrato. Precisamente, se ha elegido este tipo de forófitos, con corteza ácida, para mantener a los líquenes en un estado límite y que reflejen así la más mínima variación.

Para valorar en qué medida el hecho del transplante desde una corteza subneutra, como es la de Q. faginea (pH entorno a 5.9), hacia otra más ácida, repercute en los valores de las variables de respuesta, también se han realizado transplantes del mismo liquen, tanto sobre corteza subneutra (Q. pyrenaica Willd.) como sobre corteza ácida (Pinus pinaster Aiton), en las estaciones control 2,3-San Pablo de los Montes.

Tabla 3

Número de muestras analizadas.

		Campaña			
		Junio 88	Julio 89	Julio 90	Julio 91
1	Selas	-	4	4	4
2	S. Pablo	0	4	4	4
3	S. Pablo	0	4	4	4
4	C. Forestal	4	4	4	4
5	Fuentespalda	4	2	0	0
6	E. San Albert	4	4	4	4
7	Castell de Cabres	4	4	2	2
8	Herbés	4	4	4	4
9	Corachar	4	4	4	4
10	Pico del Aguila	4	4	4	4
11	E. de Cinctorres	4	4	4	4
12	Los Carrascales	4	4	4	4
13	R. de Vallibona	4	4	4	2
14	Villarroya	4	4	4	4
15	Peña Cortada	4	4	4	4
16	La Estanca	4	3	4	4
17	Foz Calanda	4	4	4	4
18	Torre Miró	4	4	4	4
19	Fuentespalda	4	1	0	0
20	E. San Albert	4	4	4	4
21	Castell de Cabres	4	4	4	4
22	Herbés	4	4	4	4
23	Corachar	0	3	4	4
24	E. de Cinctorres	0	1	4	4
25	Villarroya	4	4	4	4
26	Peña Cortada	4	4	4	4
27	R. de Vallibona	0	0	1	3
28	Los Carrascales	4	0	4	4

Tabla 4

Valores de pH de las cortezas de los principales forófitos receptores de transplantes

Estación	Forófito	pH Corteza*
4-Casa del Forestal	<i>Pinus nigra</i>	3.37 ± 0.05
5-Fuentespalda	<i>Pinus halepensis</i>	4.46 ± 0.06
6-Ermita de S. Albert	<i>Pinus halepensis</i>	3.71 ± 0.05
7-Castell de Cabres	<i>Pinus nigra</i>	3.45 ± 0.04
8-Herbés	<i>Pinus nigra</i>	3.53 ± 0.07
9-Corachar	<i>Pinus nigra</i>	3.51 ± 0.05
10-Pico del Aguila	<i>Pinus nigra</i>	3.43 ± 0.12
11-Enebral de Cinctorres	<i>Juniperus oxycedrus</i>	4.97 ± 0.33
12-Los Carrascales	<i>Pinus nigra</i>	3.68 ± 0.02
13-Repetidor de Vallibona	<i>Pinus sylvestris</i>	3.70 ± 0.13
14-Villarroya de los Pinares	<i>Pinus sylvestris</i>	3.57 ± 0.20
15-Peña Cortada	<i>Pinus halepensis</i>	3.83 ± 0.19

* Media ± Desviación típica de 4 muestras analizadas.

En conclusión, de los resultados que se muestran en la Tabla 4, se deduce que todas las especies de coníferas escogidas para la realización de los transplantes son muy homogéneas en lo que a pH se refiere.

Los ejemplares autóctonos en la estación 23-Corachar fueron recogidos sobre *Crataegus monogyna* Jacq. en las campañas de Julio de 1990 y 1991, por no encontrarse sobre pinos. Según estudios previos (Barkman 1958), el pH de la corteza de *C. monogyna* oscila en torno a 3.8, valor comparable al registrado en *P. sylvestris* en el presente estudio y por Barkman en 1958 (3.4-3.8).

Por otra parte, se han seleccionado tres tipos de estaciones control. El primer tipo, es aquel en el que no se detectan síntomas atribuibles a la exposición a contaminantes atmosféricos. La localidad elegida es 1-Selas, al Este de la provincia de Guadalajara, dada la exuberante y diversa flora líquénica que allí se presenta y

su distancia a presuntos focos contaminantes de importancia. Esta estación se halla a la altura del Km 174 de la Carretera Nacional 211, entre Alcolea del Pinar y Molina de Aragón. Se trata de un quejigar supramediterráneo sobre sustrato básico (Cephalanthero longifoliae-Quercetum fagineae), orientado hacia el Sur, en buen estado de conservación. En 1-Selas se realizaron los controles periódicos y a principios de Junio de 1988, se recogieron los talos que fueron transplantados al resto de las estaciones.

En segundo lugar, se escogió una localidad de valores de fondo de inmisión de SO₂. En la estación seleccionada, 2,3-San Pablo de los Montes (Toledo), el Instituto Nacional de Meteorología, el Ministerio de Obras Públicas y Urbanismo, y el Centro Nacional de Sanidad Ambiental, vienen realizando un seguimiento, no sólo de variables meteorológicas (precipitación, temperatura, etc.) sino además de valores de inmisión de SO₂, ozono, óxidos de nitrógeno, partículas y composición en iones disueltos en agua de lluvia. Los valores de inmisión de SO₂ en esta estación, en los periodos en que los ejemplares transplantados estuvieron expuestos entre una campaña de muestreo y la siguiente, se recogen en la Tabla 5. La especie liquénica A. ciliaris se haya representada de forma espontánea sobre roble (Q. pyrenaica) si bien es escasa en esta localidad.

Tabla 5

Valores de Inmisión de SO₂ (µg/m³) en San Pablo de los Montes.

	Junio 89/ Junio 89	Julio 89/ Junio 90	Julio 90/ Julio 91
Media ± S.D.	5.2 ± 7.9	6.0 ± 4.7	3.6 ± 4.0
Mediana	2.6	4.9	2.5
Percentil 98	32.2	21.5	16.5

El tercer grupo de estaciones control viene representado por 16-La Estanca y 17-Foz Calanda. Se trata de estaciones que coinciden con las de la red automática de ENDESA de medida en continuo de valores de inmisión de SO₂ (La Estanca y Monagrega, respectivamente). Dentro del espacio acotado para estas dos estaciones automáticas, se colocaron sendos soportes de madera sobre los que se localizaron los dos grupos de cuatro transplantes. Con estas estaciones se pretende analizar la evolución de los transplantes en puntos incluidos en el área de estudio, en los que los valores de inmisión de SO₂ son conocidos.

4.3. Método de transplante de líquenes en cámaras de fumigación y en el área de estudio

Los talos destinados a fumigaciones con SO₂ en cámaras o a transplantes al área de estudio, secados al aire, fueron transportados en oscuridad desde las

localidades de origen, reseñadas en la Tabla 1, hasta las instalaciones en las que se encontraban las cámaras de experimentación, o hasta las estaciones de muestreo.

En todos los casos el periodo de tiempo transcurrido entre la recolección y el trasplante en las cámaras de fumigación fue inferior a 24 h, con la excepción de los experimentos 1 y 7 (Tabla 1). En estos últimos, así como en todas las experiencias relacionadas con la optimización de los métodos de extracción, determinación y medida de la fluorescencia de las clorofilas, los ejemplares, secados al aire, fueron conservados en oscuridad y a -20°C hasta el comienzo del experimento.

En todas las fumigaciones realizadas, los talos liquénicos separados de su sustrato, y una vez limpios de restos, se emplazaron con sedal de pesca sobre una red plástica que colgaba del techo de las cámaras o de un soporte metálico. Siempre se evitó el uso de materiales susceptibles a la corrosión producida por el producto de la disolución del SO_2 gaseoso en el agua.

En lo que respecta al trasplante de ejemplares al área de estudio para analizar su evolución, en junio de 1988, especímenes procedentes de 1-Selas, fueron transplantados a las estaciones que se especifican en la Tabla 2 (Tipo = "Trasplante"). Los trasplantes consistieron en la colocación de cuatro especímenes por estación, pertenecientes a la especie A. ciliaris, sobre corteza de pino, o en su ausencia (11-Enebral de Cincorres) sobre corteza de enebro.

Los trasplantes se localizaron a una altura sobre el suelo entre 1,5 y 2 m, en cuatro árboles distintos del lindero del bosque, evitando los bordes de caminos y carreteras, o la excesiva cercanía de campos de cultivo. Los especímenes se sujetaron contra las cortezas mediante un tul de nylon clavado con tachuelas, las cuales no contactaban en ningún caso con el talo liquénico.

Justo antes de la colocación de cada trasplante, en Junio de 1988, y en los meses de Junio-Julio de 1989, 1990 y 1991, se tomó una muestra de cada uno de los cuatro ejemplares, transplantados o autóctonos, por estación de muestreo. Estas

muestras se trasladaron al laboratorio secadas al aire y en oscuridad, en un periodo no superior a 7 días. Una vez allí, se conservaron a -18°C en oscuridad, hasta su análisis.

4.4. Fumigaciones controladas con dióxido de azufre. Aporte simultáneo de nitrato

Se han realizado 8 fumigaciones controladas con SO_2 tal como se describen en la Tabla 6. Con ellas, el objetivo era analizar la respuesta liquénica en función del estado de los pigmentos fotosintéticos del fotobionte liquénico, a un amplio rango de concentraciones de SO_2 (de 350 a 118 ppb) durante periodos de tiempo de exposición que oscilaron entre las 5 horas (experimento 1) y los 73 días (experimento 3).

Los ejemplares se sometieron a un periodo previo de aclimatación en las cámaras de experimentación (Tabla 6). Durante este tiempo, las muestras se mantuvieron en condiciones similares a las que posteriormente reinarían durante la exposición al contaminante.

Al menos cinco días a la semana, desde el comienzo del periodo de aclimatación, todos los talos eran hidratados hasta goteo (20 ml/talo aproximadamente). El suministro de agua a los especímenes se realizaba mediante una pulverización con agua destilada, sólo una vez al día, a primera hora de la mañana. Este aporte restringido de agua ha sido utilizado por otros autores en un intento de simular el aporte hídrico propio de los ambientes en los que se desarrollan estos líquenes donde, frecuentemente, la única fuente de agua líquida son la crioprecipitaciones (Blum, Nash & Gebauer 1989).

En fumigaciones crónicas con SO_2 , se analizó, además del efecto atribuible a la exposición a SO_2 , el efecto del aporte de NO_3^- , sólo o en combinación con SO_2 . Este aporte consistió en una pulverización de KNO_3 (experimentos 2 y 3) o NaNO_3

(experimentos 4 al 8) disuelto en el suministro diario de agua destilada, en la concentración que se especifica en la Tabla 6. Con objeto de aproximar este tratamiento a los niveles de NO_3^- observados en ambientes contaminados, siempre se ensayó la concentración de NO_3^- de $50 \mu\text{eq/l}$, dado que ésta ha sido registrada como concentración media en agua de lluvia en East Midlands (U.K.) entre 1981-85 (UK RGAR 1987). El pH de la solución de NO_3^- , nunca difirió significativamente del pH del agua destilada, y osciló entre 5.8 y 6.1.

Tabla 6.
Fumigaciones con SO_2

Experimento	1	2	3	4	5	6	7	8
Concentración de SO_2 media (ppb)	350	151	165	122	141	140	118	124
S.D.	21	69	79	54	13	14	89	42
Aporte de NO_3^- media (μM)	-	50	50	50	50	50	50	50
								1000
Permanencia de los especímenes en las cámaras de experimentación (días)								
Aclimatación	0	13	13	6	7	7	0	6
Tratamiento	2.25	38	73	14	6	10	7	14

Todas las fumigaciones, salvo la experiencia 7, se desarrollaron en condiciones semi-naturales, en cuanto que los organismos se hacen crecer en ambiente natural, pero se encierran en cámaras que permiten su exposición a aire filtrado o a una mezcla con dosis preestablecidas del contaminante considerado (Sánchez Gimeno 1988). Estas experiencias tuvieron lugar en el invernadero experimental de la Central Térmica de Andorra (Teruel, España) de la Empresa Nacional de Electricidad, S.A. (ENDESA). En este invernadero, fabricado en vidrio con estructura de aluminio, se utilizaron dos cámaras (Fig. 5), una como control (3.2 x 1.3 x 2.3m) y la otra como cámara de fumigación (3.7 x 1.2 x 2.3m). Ambas estaban dotadas de un sistema de regulación que tendía a igualar la humedad y la temperatura en el interior del invernadero a las exteriores. Con el fin de evitar gradientes de concentración del contaminante, dos ventiladores por cámara homogenizaban, en el interior, el flujo del aire procedente del exterior. Antes de ingresar en las cámaras, el aire era filtrado a través de carbono activo especialmente tratado con el fin de maximizar su capacidad de retención de SO₂ (Filtros Ilbruck S.A.).

El SO₂, diluido al 10% en nitrógeno, se dirigía hacia dos vías alternativas en las que se encontraban dos reguladores de flujo, uno fijado en el umbral de concentraciones máximas de contaminante y otro en el de mínimas. Un regulador de gas estaba encargado de controlar la apertura de una electroválvula que dirigía el gas hacia alguno de los reguladores de flujo mencionados, en función de los valores de concentración de SO₂ en la cámara de fumigación medido en continuo por un analizador Thermoelectron 43 A UV-fluorescencia. Los niveles de SO₂ en ambas cámaras fueron registrados en continuo. El gas procedente de los reguladores de flujo era diluido posteriormente con aire procedente del exterior filtrado a través de carbono activo. Los valores medios y su desviación típica se calcularon a partir de los datos registrados cada dos horas.

Las condiciones de temperatura y humedad relativa del aire se registraron en

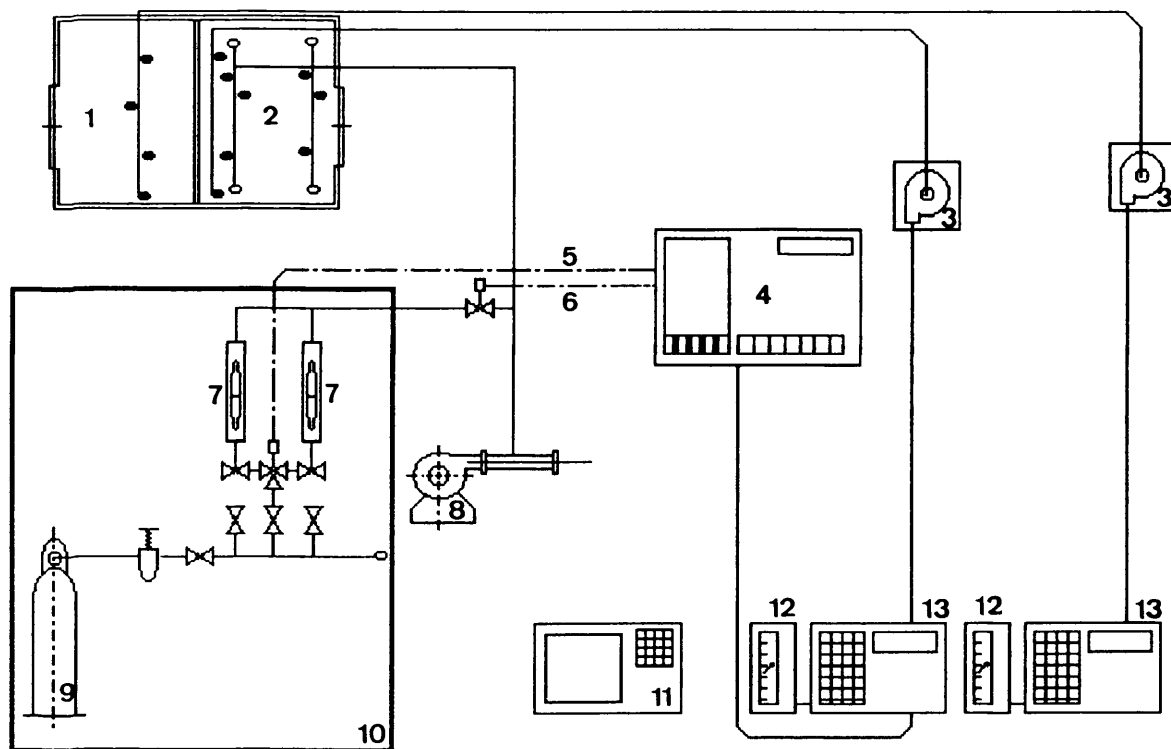


Figura 5. Diagrama esquemático del sistema de fumigación con SO₂ del invernadero experimental de la Central Térmica "Teruel" de ENDESA. 1, cámara de control; 2, cámara de fumigación con SO₂; 3, bomba de aspiración para el arrastre de la muestra de aire; 4, programador para la dosificación del SO₂; 5, señal del programador para la dosificación del gas; 6, señal de corte del aporte del gas; 7, rotámetros de carga y mantenimiento; 8, ventilador para el arrastre de gas a las cámaras; 9, botella de SO₂ al 10% en nitrógeno; 10, espacio termostatizado a 25 °C; 11, calibrador del analizador de SO₂; 12, registrador; 13, analizador de SO₂.

continuo mediante la colocación de un termohigrógrafo en cada una de las cámaras (control y fumigación), y uno más en el exterior. Si bien la humedad relativa del aire en el interior de las cámaras fué siempre superior a la exterior, las diferencias de temperatura observadas entre el interior y el exterior del invernadero dependieron de la estación del año y de la hora del día. Las mayores diferencias térmicas se produjeron a las horas de mayor insolación, es decir, a la hora en que se alcanzan las temperaturas máximas del día, y especialmente en verano e invierno. Esta diferencia puede llegar a ser de hasta un 10% por encima de la temperatura alcanzada en el exterior (Abad et al. 1987). La evolución de ambas variables durante la fumigación aguda de *A. ciliaris* con SO₂ (experimento 1), se representa en la Figura 6. Los valores medios de humedad relativa y temperatura durante las sucesivas fumigaciones se detallan en un capítulo posterior (5.2.1.2. *Efecto inducido por exposiciones crónicas al dióxido de azufre*).

El experimento número 7 se realizó en las instalaciones del Department of Agricultural and Environmental Science de la Universidad de Newcastle upon Tyne (Reino Unido) ya descritas por otros autores (Renner 1989). En ellas, se utilizaron cuatro cámaras (dos cámaras control mas dos cámaras de fumigación con SO₂). Las condiciones ambientales en estas cámaras eran controladas y se fijaron en un fotoperiodo luz:oscuridad de 10:14 h, a una intensidad de luz PAR que variaba entre 350 y 400 $\mu\text{mol fotones/m}^2\cdot\text{s}$, a 13°C y 100% de humedad relativa.

4.5. Variables de respuesta

La respuesta liquénica al SO₂, tanto en estudios en el campo como en cámaras de fumigación, siempre se evaluó mediante el análisis del estado de los pigmentos clorofílicos, esto es, mediante la valoración del contenido en clorofilas totales ($a + b$)

y la estimación de la proporción clorofila a/feofitina a (PQa).

Sin embargo, al mismo tiempo, se ensayaron otras variables, de respuesta más rápida, como son la fluorescencia temprana de clorofilas *in vivo*, y el análisis de la ultraestructura celular del fotobionte liquénico.

4.6. Extracción y determinación de pigmentos clorofílicos en dimetil sulfóxido

Tal como se ha expuesto en el capítulo 3. *Objetivos*, para medir con precisión las variaciones en el contenido en clorofilas a y b atribuibles a la exposición a contaminantes, fué necesario optimizar el método de extracción y el ajuste de nuevas ecuaciones para la determinación de estos pigmentos en dimetil sulfóxido (DMSO).

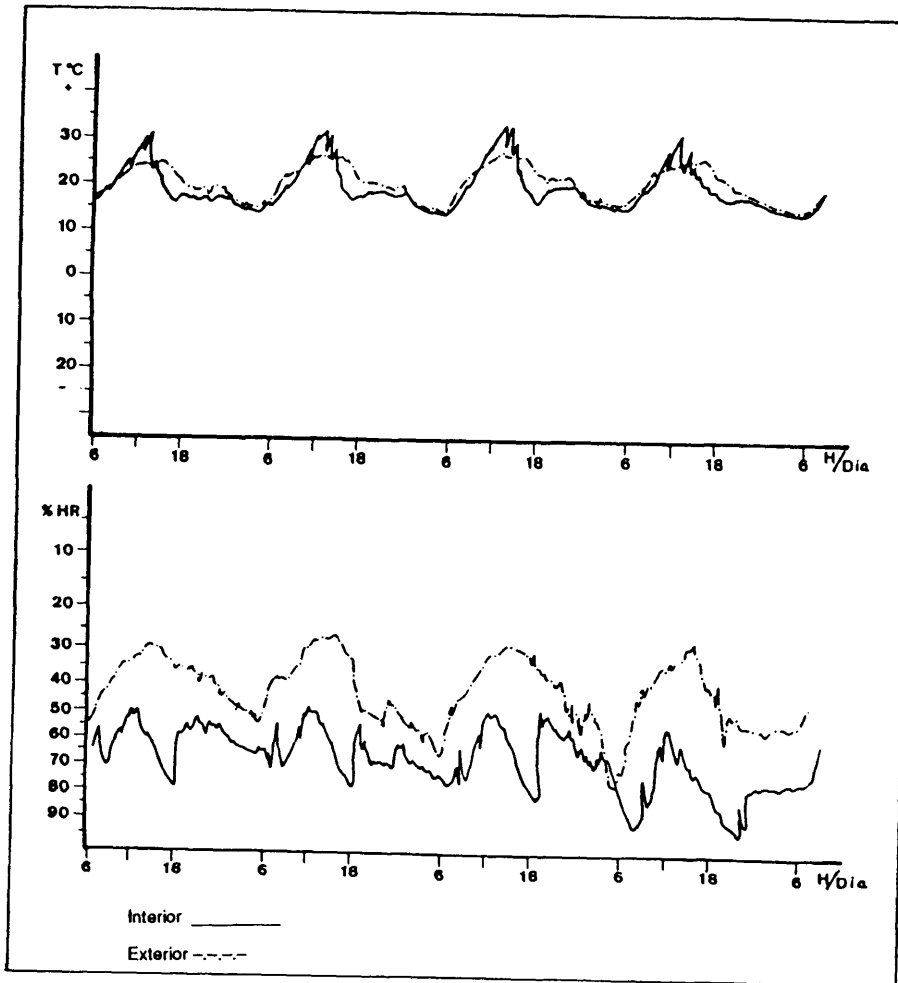


Figura 6. Humedad relativa y temperatura del aire en el interior y en el exterior del invernadero experimental, durante la fumigación aguda con SO_2 , de talos de *Anaptychia ciliaris*.

Tabla 7
Variables de respuesta

Experimento	Variable de respuesta analizada
1	Contenido en clorofilas <u>a+b</u> y PQa
2	Contenido en clorofilas <u>a+b</u> , PQa y Ultraestructura celular
3	Contenido en clorofilas <u>a+b</u> y PQa
4	Contenido en clorofilas <u>a+b</u> , PQa y Ultraestructura celular
5	Contenido en clorofilas <u>a+b</u> y PQa
6	Contenido en clorofilas <u>a+b</u> , PQa y Ultraestructura celular
7	Contenido en clorofilas <u>a+b</u> , PQa y Fluorescencia de clorofilas
8	Contenido en clorofilas <u>a+b</u> , PQa y Ultraestructura celular

En primer lugar, es preciso hacer notar que aunque la toxicidad del DMSO es relativamente baja, sin embargo, se absorbe a través de la piel, por lo que debe manejarse en todo momento con las medidas de seguridad adecuadas. Igualmente, para su manipulación, debe tenerse presente que su punto de congelación se encuentra a 18°C. Una descripción más detallada de la química y de la toxicología del

DMSO puede encontrarse en Jacob et al. (1971).

Todos los reactivos utilizados para la optimización del método de extracción y determinación de clorofilas, fueron de grado Analar. Los carbonatos empleados fueron anhidro (MgCO_3 (Probus 127310) y CaCO_3 (Merck 2066)). Las soluciones saturadas fueron filtradas antes de ser usadas. La acetona tamponada utilizada consistió en acetona al 80% en agua, que contenía 2.5 mM de tampón fosfato pH 7.8, filtrada a través de papel Whatman N° 3 impregnado con carbonato magnésico.

Para la determinación de los coeficientes específicos de absorción de las clorofilas a y b, tanto en DMSO (BDH) como en acetona (BDH) al 80% y tamponada, se emplearon soluciones de concentraciones conocidas de clorofilas a (Sigma C-5753) y b (Sigma C-5878) puras procedentes de espinaca, previamente diluidas en etanol al 95% (1 mg/ 500 μl). El espectro de absorción (350-750 nm) de las soluciones recién preparadas, se registró mediante un espectrofotómetro uv-visible, UVIKON modelo 930, de doble haz (precisión en la longitud de onda = 0.1 nm), utilizando cubetas de cuarzo de 1 cm de paso. Este espectrofotómetro permite la corrección automática de la línea de base, la programación de rutinas y la salida por impresora o disco de las lecturas de absorbancia a las longitudes de onda programadas. Para la localización de los máximos de absorción de las clorofilas a y b en la región del rojo de la banda visible, se utilizaron ocho réplicas de cada solución de clorofila. Todas las manipulaciones se realizaron en oscuridad con la única iluminación tenue de la luz verde de seguridad, y con acetona a 4°C.

Para determinar con precisión los coeficientes específicos de absorción, se midió la densidad óptica en el máximo de absorción de ambas clorofilas a y b, en duplicados de cinco concentraciones diferentes de clorofila a y en cuatro de clorofila b, preparadas en acetona tamponada al 80% en agua y DMSO. Estas concentraciones se eligieron de tal forma que los valores extremos de absorbancia se encontraran comprendidos entre 0.15 y 0.8 para una cubeta de espectrofotómetro de 1 cm de paso

de luz. Los coeficientes específicos de absorción fueron calculados mediante la pendiente de la recta ajustada entre la absorbancia y la concentración de clorofila. A partir de estos coeficientes se desarrollaron las ecuaciones para la determinación de las concentraciones individuales de clorofila a, clorofila b y totales (a + b), tal como se describe en el capítulo 5.1.1. *Optimización del método de extracción de clorofila a y b en dimetil sulfóxido (DMSO) y ajuste de nuevas ecuaciones para su cuantificación.*

Dado que el contenido en sustancias liquénicas de los talos interfiere con la correcta extracción y determinación de clorofilas, estos ácidos fenol-carboxílicos presentes en las especies analizadas, se extrajeron e identificaron según Culberson & Kristinsson (1970) y Culberson (1972). Para las técnicas de cromatografía en capa delgada (TLC), se utilizaron placas Merck Silica Gel F₂₅₄. La contribución de las sustancias liquénicas al peso seco al aire en cada especie fue calculada a partir de la diferencia en el peso de los especímenes, antes y después de seis lavados de 1 minuto con acetona al 100%.

Para el estudio de la eficiencia de diferentes tratamientos a la hora de reducir la feofitinización de las clorofilas en extractos de talos pertenecientes a especies que contienen sustancias liquénicas, se seleccionaron especímenes de E. prunastri y R. farinacea procedentes de San Pablo de los Montes. A partir de 20 mg de peso de talo seco al aire, se extrajeron las clorofilas mediante: (i) DMSO puro; (ii) lavados de las muestras con acetona al 100%, seguido de la extracción con DMSO puro; (iii) lavados con acetona al 100% saturada en MgCO₃, seguidos de extracción en DMSO saturado en MgCO₃; (iv) lavados con acetona al 100% saturada en CaCO₃ y extracción con DMSO saturado en CaCO₃; (v) lavados con acetona al 100% saturada en CaCO₃ y extracción con 2.5 mg/ml de polivinil pirrolidona (PVP; Sigma P-6755) en DMSO. Los lavados con acetona consistían en 6 inmersiones, de 1 minuto de duración cada una, en 3 ml del medio de lavado. Las clorofilas fueron extraídas de los talos utilizando 5 ml de DMSO con el aditivo correspondiente. Los tubos fueron incubados

durante 40 minutos a 65°C en oscuridad, agitándolos a intervalos regulares. Posteriormente, se dejaba que los extractos alcanzaran la temperatura ambiente antes de diluirlos en la proporción 1:1 con DMSO. La turbidez de los extractos fue comprobada por la dispersión de la luz a 750 nm. En el caso de que a esta longitud de onda, un extracto presentara una densidad óptica (D.O.) superior a 0.01, éste era pasado a través de un filtro de fibra de vidrio GFC, reduciéndose así su turbidez. La absorbancia de los extractos se midió a 750, 665, 648, 435, y 415 nm, en cubetas de cuarzo de 1 cm de paso, calibrados contra un blanco que contenía DMSO mas el correspondiente aditivo en su caso. Las concentraciones de clorofila a y b en los extractos fueron calculadas utilizando las ecuaciones basadas en los coeficientes específicos de absorción de ambas clorofilas estimados con este fin (véase Tabla 8 en el capítulo 5.1.1. *Optimización del método de extracción de clorofila a y b en dimetil sulfóxido (DMSO) y ajuste de nuevas ecuaciones para su cuantificación*). La feofitinización de las clorofilas en los extractos elaborados con los diferentes tratamientos fué estimada mediante el cálculo del coeficiente de feofitinización (véase más abajo). Para cada tratamiento se realizaron cinco réplicas procediendo cada réplica de un talo distinto.

La influencia de la temperatura durante la maceración para la extracción de ambas clorofilas, se valoró en talos de R. farinacea procedentes de San Lorenzo del Escorial (Madrid). Para ello, 4 réplicas de 20 mg de peso seco al aire por cada tratamiento fueron lavados con acetona saturada con CaCO₃ y extraídos sus pigmentos con DMSO saturado en CaCO₃, a distintas temperaturas, entre los 20° y los 70°C. Para minimizar la variabilidad dentro de cada tratamiento, todas las muestras se tomaron de un sólo talo de gran tamaño.

Con el fin de comparar los resultados obtenidos mediante DMSO frente a acetona al 80%, los pigmentos de talos de diferentes especies y procedencias (véase Tabla 12 en el capítulo 5.1.1.) fueron macerados o bien en DMSO en presencia de 2.5

mg/ml PVP_i a 65°C, tras los lavados con acetona saturada en CaCO₃; o bien en acetona al 80% tamponada, según dos métodos de extracción diferentes. El primero de ellos es el método tradicional de extracción en acetona al 80% descrito por Arnon (1949); según el cual, el material se homogeneizaba en un mortero con 5 ml de acetona al 80%, tamponada, con la ayuda de una pequeña cantidad de arena fina lavada con ácido. Posteriormente, el extracto resultante se llevaba hasta 10 ml con la misma acetona al 80% tamponada. Los extractos se centrifugaban entonces a 5000 xg durante 5 minutos, y se medía la absorbancia del sobrenadante a 663 y 646 nm contra un blanco de acetona al 80% tamponada. Los pigmentos del sedimento resultante de la centrifugación se volvieron a extraer con DMSO, de la forma descrita anteriormente. El segundo de los métodos de extracción de clorofilas con acetona al 80% se basaba en el descrito por Sancho & Kappen (1989) y Kappen et al. (1990). Las muestras eran sumergidas en nitrógeno líquido y homogeneizadas en el mortero con arena fina lavada con ácido. El polvo resultante se resuspendía en 2 ml de acetona al 80% tamponada. Entonces, los extractos eran centrifugados a 7000 xg durante 5 minutos. El sedimento se lavó dos veces más, con 1 ml de acetona al 80% tamponada. Los sobrenadantes de estas fracciones se juntaron y se llevaron posteriormente hasta un volumen final de 5 ml, para proceder a la medida de la absorbancia a 663 y 646 nm, contra blanco de acetona al 80% tamponada. En estos casos, se utilizaron cuatro réplicas por cada especie y tratamiento. Los valores de contenido de clorofila a y b, tanto en acetona como en DMSO, se determinaron mediante las ecuaciones redeterminadas de la Tabla 8 (capítulo 5.1.1.).

Para evaluar la estabilidad de los extractos pigmentarios en DMSO, se extrajeron las clorofilas de especímenes de E. prunastri y U. subfloridana, ambas procedentes de Elsdon (Northumberland), y de R. farinacea, de San Pablo de los Montes (Toledo), mediante DMSO saturado en CaCO₃ o acetona al 80% tamponada como se ha descrito anteriormente. Tras la medida de la absorbancia a 648 y 665 nm,

en el caso del DMSO, o a 645 y a 663 nm, en el caso de los extractos acetónicos, además de a 415 y a 435 nm, las muestras se devolvieron a su correspondiente tubo y se almacenaron en el frigorífico a 4°C en oscuridad. Tras 6 días, todos extractos se sacaron de la nevera, los extractos en DMSO fueron descongelados, y se midieron de nuevo, a las correspondientes longitudes de onda. En todos los casos, se determinaron las concentraciones de clorofila a y b, tal como ya se ha descrito, y el valor del PQa, como indicador de la degradación de la clorofila a. El interés de medir selectivamente la feofitinización de la clorofila a radica en que es más sensible a la acidificación que la clorofila b (Brown & Hooker 1977; Lichtenthaler 1987a). Este Índice de Feofitinización de la clorofila a, (Phaeophytinization Quotient of chlorophyll a; PQa), se calculó como el cociente entre las absorbancias a 435 nm y a 415 nm, máximos de la clorofila a y de la feofitina a en la región del azul, respectivamente. Cada tratamiento contó con 4 réplicas por especie.

4.7. Análisis de la fluorescencia temprana de las clorofilas in vivo

Antes del comienzo de los ensayos, los talos dedicados a la adecuación del método de medida de la fluorescencia de clorofilas en líquenes, se mantuvieron durante dos días, en cámaras de crecimiento a $20 \pm 2^\circ\text{C}$, $80 \pm 5\%$ HR y una velocidad del viento de 1m/s, hidratados mediante pulverización con agua de calidad "Nanopure" una vez al día tras el comienzo del periodo lumínico en las cámaras. La iluminación se realizó con lámparas de halogenuros metálicos reguladas para proporcionar un ciclo de 14 h de luz y 10 h de oscuridad, con una densidad de flujo fotónico de $5 \mu\text{mol}$ de fotones/ $\text{m}^2 \cdot \text{s}$.

Justo antes de cada medida, los talos se hidrataron hasta alcanzar su máximo contenido hídrico mediante pulverización con agua "Nanopure". Para llevar el control

del contenido en agua, los ejemplares se pesaron antes y después de cada medida de fluorescencia, con el fin de asegurar que las medidas no estuvieran influenciadas por la sequedad del talo.

El efecto de las diferencias en el contenido hídrico de las especies consideradas, se analizó en cuatro talos por especie, que se mantuvieron en las mismas condiciones anteriormente reseñadas. Estos talos eran sometidos a pulverizaciones con agua "Nanopure" y sacudidos posteriormente sobre un papel de filtro, hasta que se alcanzaba un peso constante. El contenido hídrico se expresó en mg de agua/mg de talo secado al aire (Green & Snelgar 1982). Para caracterizar cada una de las especies se tuvieron en cuenta tres parámetros: contenido hídrico máximo alcanzado, tasa de pérdida de agua (entendida como la pendiente de la porción lineal de la curva de desecación), y duración del estado hidratado (entendido como el tiempo transcurrido desde el nivel de máximo contenido hídrico hasta alcanzar el peso seco al aire). Durante todo el tiempo de duración del experimento, se mantuvieron especímenes control bajo las mismas condiciones ambientales, pero iluminados con 40-60 μmol de fotones/ $\text{m}^2\cdot\text{s}$, con el fin de evaluar el efecto de los sucesivos ciclos de hidratación-deshidratación.

Por otra parte, con el fin de analizar el efecto de distintos tratamientos lumínicos sobre la fluorescencia de las clorofilas, los talos fueron mantenidos en las mismas cámaras, bajo las mismas condiciones ambientales, pero iluminados con 300 μmol fotones/ $\text{m}^2\cdot\text{s}$ durante 3 días, y, posteriormente, con 1000 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ durante 3 días más. Finalmente, se favoreció la recuperación de las muestras al mantenerlas un periodo de 10 h en oscuridad, seguido de 5 h a 20 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$. Los talos durante estos tratamientos eran hidratados una vez al día y rehidratados justo antes de la medida de la fluorescencia al final de cada tratamiento.

Las medidas de los parámetros que describen la cinética de la fluorescencia temprana (<0.5 s) de la clorofilas in vivo, se realizaron a temperatura ambiente

mediante un fluorómetro portátil (Plant Stress Meter, BioMonitor AB S.C.I., Sweden), tal y como ha sido descrito por otros autores (Öquist and Wass, 1988), tanto en aquellas experiencias encaminadas a la adecuación de método como en aquellas otras dirigidas a la evaluación de la respuesta a contaminantes. Este instrumento consiste en un sistema de fibra óptica que transmite un pulso de luz actínica contra la superficie del líquen y recoge la señal de fluorescencia, predominantemente procedente del fotosistema II (PSII) del fotobionte liquénico, que es cuantificada mediante un fotodetector.

Para realizar las medidas, los líquenes fueron adaptados a oscuridad durante un periodo de 15 minutos, periodo suficientemente prolongado como para asegurar que el primer aceptor de la cadena de transporte electrónico (Q_A) se encuentra completamente oxidado, y al mismo tiempo suficientemente breve como para evitar la desecación excesiva del líquen (véase la Fig. 8 del capítulo 5.2.2.). Tras este periodo, los talos fueron iluminados con $200 \mu\text{mol fotones/m}^2\cdot\text{s}$ (Nivel 3). Esta intensidad del pulso de luz fue elegida dado que era lo suficientemente elevada como para permitir un valor constante de la variable F_v/F_p en muestras no tratadas y homogéneas (véase el capítulo 5.2.2. *Cambios en la fluorescencia temprana de las cloroïlas in vivo*, Fig. 10).

En el proceso de adecuación del método, se han realizado 2 medidas por cada uno de los 4 talos de las especies estudiadas, esto es, 8 medidas por especie y tratamiento lumínico. Para la evaluación del efecto de los contaminantes, se analizaron 8 talos distintos por cada tratamiento.

En cuanto a la terminología, se ha seguido la utilizada por Papageorgiou (1975): F_o , nivel de fluorescencia inicial; F_p , nivel máximo de la fluorescencia temprana; F_v , producción de fluorescencia variable o inducida ($F_p - F_o$); y F_v/F_p , definido como el cociente entre la fluorescencia variable y la fluorescencia máxima.

4.8. Análisis de la ultraestructura del fotobionte liquénico

También se ha estudiado mediante el análisis de las alteraciones inducidas en la estructura celular del fotobionte de R. farinacea y de A. ciliaris, el efecto producido por la exposición a SO₂ y a NO₃⁻, solos y en combinación. Estas perturbaciones se observaron en secciones ultrafinas de tres talos diferentes por cada tratamiento.

Tras la recolección de los especímenes en el campo, se tomaron muestras de los talos que fueron procesadas para microscopía electrónica de transmisión, en un periodo inferior a 24 h, con el fin de caracterizar el estado ultraestructural previo al ingreso de los ejemplares en las cámaras de experimentación. Al comienzo y al final de las fumigaciones, se obtuvieron tres pequeñas porciones por talo, siempre obtenidas a 5-6 mm del ápice de la lacinia. Estas muestras se fijaron in situ en glutaraldehído al 3.25% en tampón fosfato 0.05 M de pH 7.1, y se transportaron al laboratorio aprovechando un periodo de lavado de 20 h en tampón fosfato. Posteriormente, fueron post-fijadas, deshidratadas, e incluidas en resina Spurr, tal como ha sido descrito previamente por Ascaso, Brown & Rapsch (1988). Las secciones ultrafinas se obtuvieron utilizando un ultramicrotomo Ultracut E de Reichert con cuchilla de diamante y se tiñeron con citrato de plomo (Reynolds 1963).

4.9. Tratamiento estadístico de los datos

El tratamiento estadístico de los datos se realizó mediante el software Statgraphics vs. 2.6 (1987).

Los valores de las variables de respuesta (contenido en clorofilas, PQa, F_v/F_p, etc.) fueron comparados utilizando un Análisis de la Varianza (ANOVA) de una vía, en función de su correspondiente factor de clasificación (tratamiento, estación de

muestreo, campaña, etc). Previamente, se comprobó la normalidad de los datos mediante un Test de Kolmogorov-Smirnov, y la homocedasticidad utilizando el Test de la C de Cochran. En los casos en los que se detectó heterogeneidad de varianzas, se utilizó el análisis no paramétrico, de una sola vía, por rangos, Kruskal-Wallis.

Las posibles interacciones entre contaminantes se evaluaron mediante ANOVA de dos vías, utilizando como factores de clasificación el aporte de NO_3^- y la exposición al SO_2

En caso de que tras un ANOVA, las diferencias fueran significativas ($P < 0.05$), las medias se compararon mediante el test de la menor diferencia significativa (LSD).

En el estudio de campo, para cuantificar el decaimiento o alza de la variable de respuesta PQa a lo largo de los cuatro años de seguimiento, se utilizó como criterio, la pendiente de la recta de regresión calculada por Mínimos Cuadrados, considerando como variable dependiente los datos de PQa de cada transplante, y como variable independiente las campañas, desde 1988 a 1991. Con objeto de valorar la bondad del ajuste en cada estación de muestreo, se empleó el R^2 . En aquellos casos en que se intentó modelizar la variación observada en la respuesta líquénica en función de las combinaciones lineales de variables independientes, tanto en experiencias de campo como en cámaras, se procedió a una selección progresiva de variables seguida de un ajuste por regresión lineal múltiple.

4.10. Cartografía y representación tridimensional de funciones

Todos los mapas han sido obtenidos por mapeo automático computerizado, para evitar la subjetividad en la expresión cartográfica de los resultados. Para ello, se ha empleado el software SURFER vs. 4.07 (1989). Este programa se basa en el desarrollo de una retícula, cuyo tamaño de malla depende de los valores máximo y mínimo de

los datos introducidos. El método de interpolación utilizado para construir una retícula continua a partir de puntos irregularmente distribuidos, considera los valores de la variable de respuesta en los diez puntos más próximos a uno dado. La influencia de un punto en otro es inversamente proporcional a la distancia que las separa.

En cualquier caso debe tenerse en cuenta, que la fiabilidad no es la misma en cualquier punto del mapa, depende de la densidad de puntos de muestreo. También se utilizó este paquete para las representaciones gráficas tridimensionales de funciones matemáticas, procedentes de regresiones múltiples, en las que la variable de respuesta se enfrentaba a dos variables independientes.

RESULTADOS Y DISCUSION

5. Resultados y Discusión

5.1. Revisión metodológica

La inclusión de modificaciones en los métodos utilizados o la aplicación de técnicas novedosas al análisis de los líquenes, ha requerido un estudio profundo de puesta a punto de la metodología, con el resultado de nuevas propuestas que hacen más fácilmente aplicable y más fiable el uso de estos métodos. Asimismo, en el caso de técnicas desarrolladas para el análisis de plantas vasculares, fué necesario un estudio previo de adecuación de los métodos a organismos tan distintos como los líquenes.

5.1.1. Optimización del método de extracción de clorofila a y b en dimetil sulfóxido (DMSO) y ajuste de nuevas ecuaciones para su cuantificación

Hasta el momento se han venido utilizando una gran variedad de disolventes orgánicos, miscibles con medios acuosos, con el fin de extraer los pigmentos clorofílicos de los tejidos vegetales (Lichtenthaler 1987a). Al mismo tiempo, para el análisis cuantitativo espectrofotométrico de las clorofilas en los extractos, se han empleado ecuaciones adecuadas basadas en los recientemente actualizados coeficientes específicos de absorción de las clorofilas a y b en cada uno de los disolventes más comunmente utilizados (Lichtenthaler & Wellburn 1983; Porra, Thompson & Kriedemann 1989). Sin embargo, a pesar de que muchos de los medios de extracción más tradicionales han sido empleados con este fin desde hace casi medio siglo, su uso plantea algunos problemas entre los cuales cabe destacar el hecho

de que durante el proceso de extracción sea preciso homogeneizar el tejido vegetal y posteriormente centrifugar el extracto. Por este motivo, se han buscado disolventes orgánicos alternativos que permitan la extracción y determinación espectrofotométrica de las clorofilas a y b sin necesidad de ejecutar las operaciones mencionadas. Uno de estos disolventes es el dimetil sulfóxido (DMSO). Se trata de un producto que ha sido utilizado con éxito para la extracción de clorofilas de líquenes (Boonpragob & Nash 1991; Ronen & Galun 1984), de algas (Burnison 1980; Seeley, Duncan & Vidaver 1972; Shoaf & Lium 1976) y de tejidos intactos de plantas vasculares (Hiscox & Israelstam 1979). Independientemente de las ventajas que representa el uso del DMSO, se han seguido usando frecuentemente las ecuaciones ajustadas por Arnon (1949), desarrolladas para extractos en acetona al 90%, en estudios en los que se pretendía valorar la concentración de las clorofilas a y b en DMSO. Para ello, se basaban en la presunción de que el espectro de absorción de las clorofilas a y b (entre los 600 y los 700 nm) era idéntico en ambos disolventes. Sin embargo, en la actualidad se sabe que no es así; por ejemplo, la posición del máximo de absorción de la clorofila a en DMSO se encuentra a longitudes de onda más largas, pasando de encontrarse a 663 nm en extractos acetónicos, a 665 nm en extractos en DMSO. También es conocido que las ecuaciones de Arnon, tradicionalmente utilizadas, son poco precisas y no deben ser empleadas para la determinación de clorofila a o b, ni por tanto, para el cálculo del cociente de clorofilas a/b en extractos vegetales. Por todo ello, es preciso desarrollar nuevas ecuaciones específicas para extractos clorofílicos en DMSO.

A la vista de estas consideraciones, en el presente capítulo se replantea el uso del DMSO para la extracción y posterior determinación espectrofotométrica de las clorofilas a y b en líquenes. En primer lugar, se calcularán los coeficientes de absorción específicos de ambas clorofilas y con ellos se elaborarán nuevas ecuaciones para el cálculo de las concentraciones de las clorofilas a, b y a + b. Con objeto de

valorar la bondad del proceso seguido en el desarrollo de estas nuevas ecuaciones para DMSO, se redeterminarán simultáneamente los coeficientes de absorción específicos de las clorofilas en soluciones en acetona al 80%. Con estos coeficientes, se elaborarán las correspondientes ecuaciones para acetona al 80% y se compararán las estimaciones de las concentraciones de clorofilas a, b, y a + b en este disolvente con los valores obtenidos utilizando ecuaciones recientemente reajustadas para acetona al 80% (Lichtenthaler & Wellburn 1983; Porra, Thompson & Kriedemann 1989). En segundo lugar, se analizará el efecto de la temperatura en la extracción y obtención de las clorofilas a y b. En tercer lugar, se contrastará la eficiencia de distintos tratamientos a la hora de evitar la degradación de clorofilas a feofitinas durante el proceso de extracción en líquenes que contienen ácidos fenólicos (véase el capítulo 1.6. *La degradación de clorofila a feofitina como variable indicadora de daño inducido por contaminantes ácidos*). Por último, se compararán los resultados de la extracción y determinación de las clorofila a y b en diferentes líquenes, así como su estabilidad en los extractos pigmentarios en DMSO.

Determinación de los coeficientes específicos de absorción de las clorofilas a y b en DMSO y en acetona al 80%.

La posición de los máximos de absorción de la clorofila b en las regiones del rojo y del azul del espectro visible se localizan entre los correspondientes a la clorofila a, tanto en DMSO como en acetona al 80%. Sin embargo, los espectros de absorción de estas clorofilas difieren en ambos disolventes (Fig. 7). El máximo de absorción de las clorofilas a y b se desplaza hacia longitudes de onda mayores en DMSO (Fig. 7.; Tabla 8). Este desplazamiento en el máximo de absorción de la clorofila a en la región del rojo (ca. 2nm) es más pronunciado que el que experimenta en la región del azul

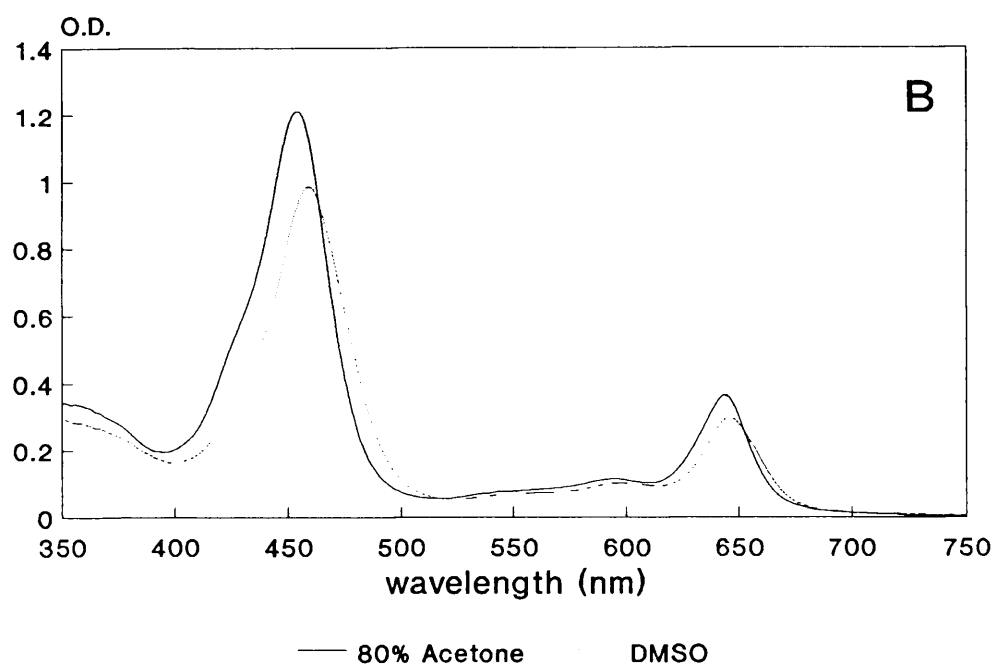
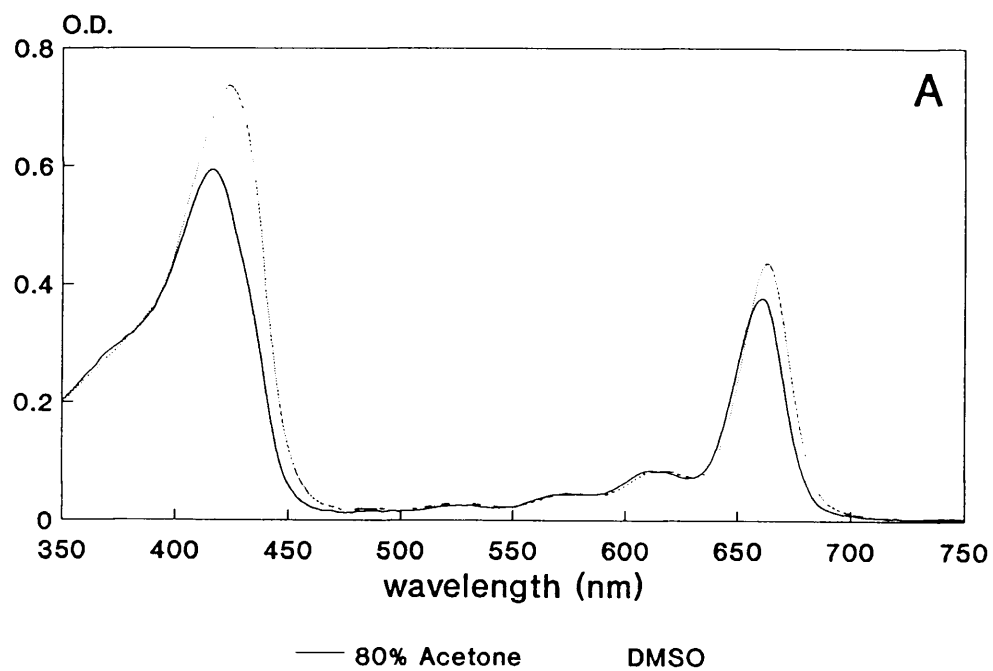


Figura 7. Comparación entre los espectros de absorción de clorofila a (A) y clorofila b (B) en DMSO y en acetona al 80%.

(ca. 0.7nm). Las longitudes de onda correspondientes a los máximos menores también experimentan desplazamientos semejantes.

Con el fin de determinar con precisión los coeficientes específicos de absorción, se prepararon soluciones de clorofila a y b puras en DMSO y en acetona al 80%. Asimismo, se registraron las absorbancias de ambas clorofilas en la región del rojo. En todos los casos se observó una alta correlación lineal significativa ($R^2 > 0.98$; $P < 0.00001$) entre la absorbancia y la concentración de clorofilas. Los coeficientes específicos de absorción (Tabla 8) fueron calculados utilizando la pendiente del ajuste por mínimos cuadrados entre la absorbancia y la concentración de clorofilas, de acuerdo con la Ley de Lambert-Beer: a , coeficiente específico de absorción de la clorofila a en su máximo de absorción; a' , coeficiente específico de absorción de la clorofila a en el máximo de absorción de la clorofila b; b , coeficiente de absorción específico de la clorofila b en su máximo de absorción; b' , coeficiente específico de absorción de la clorofila b en el máximo de absorción de la clorofila a. Utilizando estos coeficientes se ajustaron simultáneamente nuevas ecuaciones para la determinación de las concentraciones individuales ($\mu\text{g/ml}$) de clorofila a, clorofila b y clorofilas totales ($\underline{a} + \underline{b}$) en extractos pigmentarios preparados utilizando DMSO y acetona al 80% (Tabla 8).

Para valorar la precisión del método empleado, las ecuaciones dadas en la Tabla 8 para acetona al 80% fueron contrastadas con aquellas otras recientemente redeterminadas (Lichtenthaler & Wellburn 1983; Porra, Thompson & Kriedemann 1989). Entre ambas formulaciones se encontró una fiel correspondencia, difiriendo el valor calculado de clorofila a, b y $\underline{a}/\underline{b}$ en menos de un 4%. Esta diferencia es atribuible al error experimental de lectura del espectrofotómetro.

En las soluciones en DMSO, se midió la absorbancia a las longitudes de onda correspondientes (665/648 nm) y, aplicando las nuevas ecuaciones (Tabla 8), se calculó la concentración de la clorofila a, b y el cociente $\underline{a}/\underline{b}$. Para valorar el error

cometido en la determinación de las clorofilas en extractos en DMSO mediante ecuaciones desarrolladas para acetona, los valores obtenidos fueron comparados con aquellos procedentes de la aplicación de las ecuaciones para acetona, tras medir las absorbancias a 663 y 645 nm en las mismas soluciones, longitudes de onda que se corresponden con la localización de los máximos de absorción de clorofilas en acetona al 80%.

Tabla 8

Coefficientes específicos de absorción de la clorofila a y b en DMSO y en Acetona al 80%.

Ecuaciones para la cuantificación de las concentraciones

de clorofila a, b y clorofilas totales.

Disolvente	lectura (nm)	Coeficientes específicos	
		Clorofila a	Clorofila b
DMSO (100% puro)	664.9±0.1	74.8	15.1
	648.2±0.1	21.6	43.6
Acetona (80% v/v)	663.1±0.1	84.2	50.1
	646.2±0.2	20.3	11.6

Ecuaciones para la determinación cuantitativa de clorofilas:

DMSO (100% puro)	$C_a = 14.85A^{664.9} - 5.14A^{648.2}$
	$C_b = 25.48A^{648.2} - 7.36A^{664.9}$
	$C_{a+b} = 7.49A^{664.9} + 20.34A^{648.2}$
Acetona (80% v/v)	$Ca = 12.58A^{663.1} - 2.93A^{646.2}$
	$Cb = 21.14A^{646.2} - 5.09A^{663.1}$
	$Ca+b = 7.49A^{663.1} + 18.21A^{646.2}$

Las concentración de clorofila se obtiene en g/ml de extracto. Los valores de las longitudes de onda (nm) correspondientes a los máximos de absorción en la región del rojo, son la media de ocho replicados ± el error típico.

El uso de las ecuaciones para acetona al 80% en el caso del DMSO, rindió valores muy imprecisos. En caso de usarse las ecuaciones de Lichtenthaler & Wellburn (1983) se infravaloraba seriamente el contenido en clorofilas totales (ca. 17%) en las soluciones en DMSO, con determinaciones de la concentración de la clorofila b más erróneas (hasta un 45% menos) que en el caso de la clorofila a (ca. 10% menos), lo

cual resulta en acusadas sobrevaloraciones de la relación clorofila $\underline{a/b}$ (hata un 25%). De forma semejante, aunque en menor medida, las ecuaciones de Arnon infraestimaron la cantidad total de clorofila $\underline{a + b}$ presente en las soluciones en DMSO. Además, estas últimas ecuaciones ni siquiera deben ser utilizadas para el cálculo del cociente de clorofilas $\underline{a/b}$ en extractos de clorofilas en acetona (Lichtenthaler 1987a).

Determinación del contenido en sustancias liquénicas

Las sustancias liquénicas predominantes en los líquenes analizados se presentan en la Tabla 9. La única especie que no presentó sustancias liquénicas fue Anaptychia ciliaris. Las otras cuatro especies contenían cantidades significativas de estas sustancias, presentando diferencias cuantitativas y cualitativas interespecíficas. Estos resultados concuerdan con lo previamente descrito en la literatura (Culberson et al. 1977; Awasthi 1986). Igualmente, se detectaron diferencias significativas intraespecíficas ($P < 0.01$) en el contenido en ácidos fenólicos entre talos procedentes de distintas localidades.

Tabla 9

Principales sustancias líquénicas (SL) presentes en las especies estudiadas.

Especies	Sustancia líquénica	SL(%) / 100mg talo
U. subfloridana (1)	Ac. usneico Ac. tamnólico	14±5
E. prunastri (1,2)	Atranorina Cloratranorina Ac. usneico Ac. evérnico	13±1 (2) 8±2 (1)
R. farinacea (2,3)	Ac. usneico Ac. protocetrárico	6±1 (2) 4±1 (3)
R. fraxinea (3)	Ac. usneico	1±1
A. ciliaris (3)	Sin SL	0

La proporción de sustancias líquénicas se expresa como la media \pm la desviación típica (n = 4). Los ácidos tamnólico, evernico y protocetrárico contienen grupos carboxílicos libres.

Localidades de muestreo: (1) Elsdon (Northumberland, Inglaterra); (2) El Robledo (Toledo); (3) Selas (Guadalajara).

Eficiencia de distintos tratamientos para minimizar el efecto de las sustancias líquénicas en extractos clorofílicos

La degradación de las clorofilas es un problema común cuando se realizan extracciones de pigmentos en líquenes que acumulan sustancias líquénicas ácidas. Consecuentemente, se ha estudiado la eficiencia de distintos tratamientos a la hora de prevenir la feofitinización de extractos en DMSO procedentes de dos especies líquénicas de las que se conoce el contenido en sustancias líquénicas. La degradación de las clorofilas a feofitinas fue medida mediante el cálculo del POa (véase el capítulo

1.6. La degradación de clorofila a feofitina como variable indicadora de daño inducido por contaminantes ácidos). Dado que el máximo de absorción de la feofitina a en la región del azul en DMSO (413.2 ± 0.2 nm S.E., $n=3$) es muy próximo al observado en acetona al 80% (412.3 ± 0.3 S.E., $n=3$), es posible usar el PQa en extractos acetónicos.

Tabla 10

Eficiencia de diferentes tratamientos encaminados a minimizar la degradación de las clorofilas en extractos de talos pertenecientes a dos especies que contienen sustancias liquénicas.

Tratamiento	Evernia prunastri ¹		Ramalina farinacea ¹	
	PQa	clorofila a+b	PQa	Clorofila a+b
I	1.16a	1.54d	0.99f	1.86j
II	1.13a	1.55d	1.17g	1.84j
III	1.23ab	1.96d	1.23g	2.38k
IV	1.25ab	2.13de	1.21g	2.16k
V	1.30b	2.79e	1.27g	2.05k

Tratamientos:(I) DMSO puro; (II) lavados con acetona 100% y extracción en DMSO puro; (III) lavados con acetona 100% saturada en MgCO₃ seguidos de extracción en DMSO saturado en MgCO₃; (IV) lavados con acetona 100% saturada en CaCO₃ seguidos de extracción en DMSO saturado en CaCO₃; (V) lavados con acetona 100% saturada en CaCO₃ seguidos de extracción en DMSO con 2.5 mg/ml PVP. La concentración de clorofila se expresa en $\mu\text{g}/\text{mg}$ de peso seco al aire de talo.

Los valores medios, para una misma especie, que presentan la misma letra no difieren significativamente ($P < 0.005$).

¹ Ejemplares recolectados en El Robledo (San Pablo de los Montes, Toledo).

Tras el ANOVA, se concluyó que existían diferencias significativas en cuanto al efecto de los distintos tratamientos sobre el contenido en clorofilas totales y el PQa en ambas especies. Cuando se extrae con DMSO puro, los lavados con acetona pura, previos a la extracción, no produjeron ninguna mejora significativa en la obtención de

las clorofilas, en ninguna de las dos especies (Tabla 10). Sin embargo, la adición de $MgCO_3$ o $CaCO_3$ a los lavados de acetona y al DMSO, mejoró la obtención de las clorofilas en ambas especies y redujo la degradación de clorofilas a feofitinas, tal como pone de manifiesto el incremento en el PQa. La mejora en la obtención de las clorofilas como consecuencia de la adición de carbonatos a los lavados y al medio de extracción fué estadísticamente significativa ($P < 0.05$) en Ramalina farinacea, pero no fue así en Evernia prunastri (en ejemplares procedentes de El Robledo, Toledo). En cualquier caso, aunque los procedimientos expuestos reducían la feofitinización de las clorofilas durante la extracción a partir de muestras de líquenes que contenían sustancias liquénicas, no se pudo evitar por completo que tuviera lugar, en cierta medida, la degradación de las clorofilas debido a la presencia de estas sustancias. Prueba de ello, es que, aún tras los repetidos lavados con acetona saturada en carbonato, se observó una significativa relación inversa entre el valor de PQa y el contenido en sustancias liquénicas de talos de ambas especies, tanto en extractos en DMSO ($R^2 = 0.89$, $P < 0.001$) como en extractos acetónicos ($R^2 = 0.91$, $P < 0.003$).

Para minimizar esta degradación de las clorofilas, el tratamiento más eficaz resultó ser el que incluía seis lavados de un minuto de las porciones de talo a analizar, con acetona al 100% saturada en $CaCO_3$, seguidos de la extracción en DMSO en presencia de PVP_i. La PVP_i es un compuesto frecuentemente utilizado en estudios bioquímicos, por su capacidad de captar restos fenólicos y protones en los extractos. Este tratamiento mejoró significativamente ($P < 0.05$) la obtención de las clorofilas en comparación con los resultados obtenidos en ambas especies con DMSO puro, con o sin baños previos de acetona pura (Tabla 10).

Influencia de la temperatura en la extracción y obtención de clorofilas a y b

Talos de Ramalina farinacea procedentes de El Robledo (Toledo), fueron incubados a distintas temperaturas comprendidas entre los 20°C y los 70°C en DMSO saturado en CaCO₃. No se encontraron diferencias significativas entre los contenidos en clorofilas obtenidos entre los 40°C y los 70°C (Tabla 11). Sin embargo, a temperaturas inferiores a 40°C la extracción de las clorofilas de los talos fue incompleta, extrayéndose peor la clorofila b, lo cual genera valores significativamente superiores de la tasa de clorofilas a/b ($P < 0.05$). El PQa no varió significativamente, indicando que no hubo degradación de clorofila a durante el periodo de 40 minutos de extracción a temperaturas elevadas (Tabla 11). En consonancia con estos resultados, cuando soluciones puras de clorofila a y b fueron mantenidas a 65°C durante 45 minutos en oscuridad, las pérdidas de ambas clorofilas fueron despreciables (< 1% en clorofila a; < 3% en clorofila b).

Tabla 11

Efecto de la temperatura durante la maceración en la extracción de la clorofila a y b en DMSO

Temperatura (°C)	Clorofila a (µg/mg)	Clorofila b (µg/mg)	a/b	PQa
20	1.84a	0.42c	4.37e	1.32g
30	1.69a	0.40c	4.19e	1.32g
40	2.44b	0.63d	3.86f	1.30g
50	2.58b	0.68d	3.82f	1.25g
60	2.50b	0.68d	3.70f	1.31g
65	2.25b	0.59d	3.83f	1.28g
70	2.37b	0.64d	3.73f	1.32g

Los valores medios que presentan la misma letra no difieren significativamente ($P < 0.05$).

Comparación entre el DMSO y la acetona al 80% para la extracción y determinación de clorofilas a y b.

Los datos procedentes de la extracción de clorofilas totales, clorofila a y clorofila b se presentan en la Tabla 12. La maceración de las muestras a 65°C durante 45 minutos en DMSO con 2.5 mg/ml PVP_i tras los lavados con acetona saturada en CaCO₃, extrajo eficazmente las clorofilas de los ejemplares de las especies líquénicas consideradas. Tras la extracción con DMSO, de las muestras ya procesadas, que habían perdido por completo su color verde, no pudo reextraerse cantidad alguna extra de clorofila. Por el contrario, siguiendo el método tradicional de extracción de clorofilas

(Arnon 1949), homogeneizando la muestra en acetona y posteriormente centrifugando los extractos, la extracción era incompleta. Después de la centrifugación, los residuos sedimentados permanecían aún ligeramente verdes. Cuando estos restos eran resuspendidos en DMSO con 2.5 mg/ml PVP_i, el contenido en clorofilas remanente fue totalmente extraído. Cabe esperar que el procedimiento tradicional de homogenizado del tejido vegetal de plantas vasculares, como paso previo a la extracción de las clorofilas en acetona, resulte ser menos eficaz en el caso de los líquenes, en los que el fotobionte se encuentra inmerso en una matriz fúngica.

Utilizando el método de extracción con DMSO propuesto y las ecuaciones reajustadas correspondientes (Tabla 8), el incremento en la obtención de las clorofilas fue muy significativo ($P < 0.001$) y representaba un 40-50% respecto a los resultados obtenidos mediante el método tradicional con acetona. La extracción con DMSO mejoró, en todos los casos, la obtención de clorofila a en mayor medida que la de la clorofila b.

Tabla 12

Comparación entre la extracción de las clorofilas de diferentes especies líquénicas en DMSO y en acetona al 80%

Especies	Clorof. a+b		Clorof. a		Clorof. b		PQa	
	DMSO	Acet.	DMSO	Acet.	DMSO	Acet.	DMSO	Acet.
E.prunastri(1)	2.31	1.23c	1.87	0.88c	0.44	0.35	1.24	1.04b
U.subflor.(1)	1.58	0.94a	1.33	0.73a	0.25	0.21	1.16	0.71c
R.farinacea(2)	2.34	1.45b	1.73	1.04b	0.61	0.42a	1.30	1.20b
R.farinacea(3)	2.73	1.73c	2.20	1.26b	0.53	0.47	1.23	1.13b
R.fraxinea(4)	1.40	0.82a	1.26	0.65b	0.14	0.17	1.39	1.20c
R.farinacea(4)	1.88	0.83b	1.63	0.67b	0.16	0.25	1.34	1.17a
A.ciliaris(4)	1.15	1.06	1.00	0.84	0.15	0.22	1.41	1.22c
E.prunastri(4)	1.46	0.85b	1.26	0.67b	0.20	0.18	1.16	0.93b

Localidades de muestreo: (1) Elsdon (Northumberland, Inglaterra); (2) La Herrería (Madrid); (3) El Robledo (Toledo); (4) Selas (Guadalajara).

Las diferencias significativas entre tratamientos se determinaron mediante un test LSD y se expresan: a, P<0.05; b, P<0.01; c, P<0.001.

Siguiendo un método más reciente de extracción de clorofilas en acetona (Kappen et al. 1990) con algunas modificaciones, en el que los líquenes eran homogeneizados en nitrógeno líquido hasta ser reducidos a polvo y posteriormente extraídos repetidas veces con acetona saturada en MgCO₃, se consiguió la extracción total de las clorofilas de la muestra vegetal. Los restos en los que ya se había practicado la extracción, no permanecían verdes y no se obtuvieron clorofilas tras intentar la reextracción en DMSO (Tabla 12). Al valorar las concentraciones de clorofila a, b y a+b, aplicando las ecuaciones redeterminadas (Tabla 8), no se observaron diferencias significativas entre los resultados procedentes de ambos disolventes en Anaptychia ciliaris. Sin embargo, en ejemplares de las especies

Ramalina farinacea, Ramalina fraxinea y Evernia prunastri, si bien en lo que a clorofila b se refiere no se detectaron diferencias significativas entre ambos solventes, la extracción de la clorofila a mejoró significativamente ($P < 0.05$) cuando se realizó con DMSO (Tabla 12). Consecuentemente, los valores estimados de concentración de clorofilas totales (a + b) en extractos en DMSO, fueron un 40% más elevados en estas tres especies liquénicas. El PQa fue significativamente inferior en extractos acetónicos que en DMSO, en todas las especies estudiadas (Tabla 12), lo cual indica una mayor degradación de clorofila a a feofitina a. Prueba de que las variaciones en el contenido en clorofilas son debidas, en gran medida, a esta feofitinización de la clorofila a, es que se encontró una significativa correlación lineal entre la proporción de clorofila a/b y PQa, tanto en acetona ($r = 0.41$, $P < 0.04$) como en DMSO ($r = 0.78$, $P < 0.0001$). Además, considerando todas las especies estudiadas y ambos disolventes, se observó una relación exponencial altamente significativa entre PQa y la proporción a/b ($r = 0.78$, $P < 0.00001$).

Estabilidad de los extractos en DMSO

El almacenamiento de los extractos de clorofilas en DMSO a 4°C en oscuridad durante 6 días, no produjo cambios significativos ni en la concentración en clorofilas totales, ni en el PQa, lo cual indica que no hubo degradación de clorofilas durante el periodo de almacenamiento (Tabla 13). Por el contrario, sí se detectó un significativo descenso ($P < 0.001$) de la concentración de clorofilas totales en los extractos en acetona al 80%, tras ser almacenados durante el mismo periodo de tiempo. Estos extractos acetónicos experimentaron un significativo descenso de PQa tan acusado ($P < 0.001$) tras 6 días de almacenamiento, que debía interpretarse como la casi absoluta degradación de la totalidad de la clorofila a a feofitina a.

Estudios paralelos con plantas vasculares, concretamente con muestras de acículas de Picea abies (Barnes et al. 1992), han puesto de manifiesto que cuando los extractos de pigmentos en DMSO son almacenados a 4°C en oscuridad, se observan marcadas diferencias entre aquellos extractos repetidamente congelados y descongelados, respecto a aquellos almacenados el mismo intervalo de tiempo, pero sólo descongelados al final de este periodo (Fig. 8). En los extractos descongelados repetidas veces, despues de ser descongelados por segunda vez en el tercer día de almacenamiento, el contenido en clorofilas totales descendió significativamente ($P < 0.05$), y continuó descendiendo cada vez que eran de nuevo descongelados (Fig. 8b). En estos extractos, la tasa a/b se vió reducida día a día, observándose un efecto más acusado en la clorofila a que en la b (Fig. 8a).

Tabla 13

Estabilidad de las clorofilas en los extractos en DMSO y en acetona al 80%

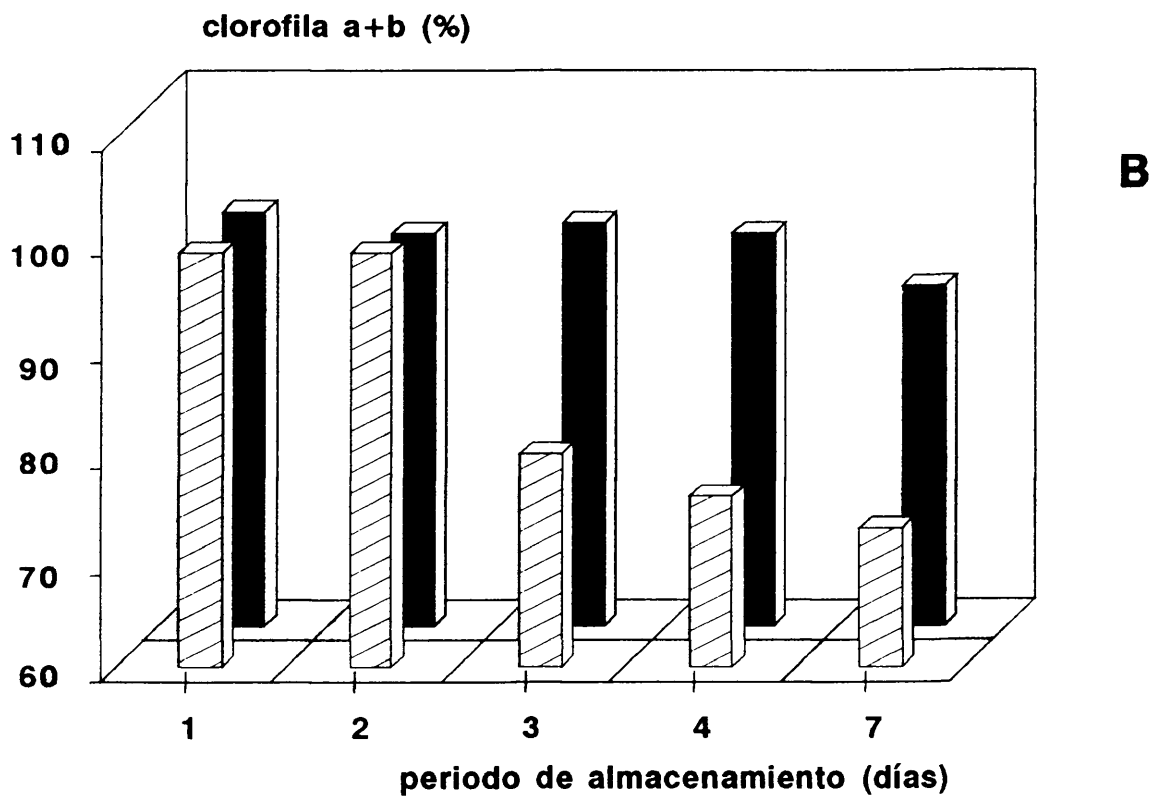
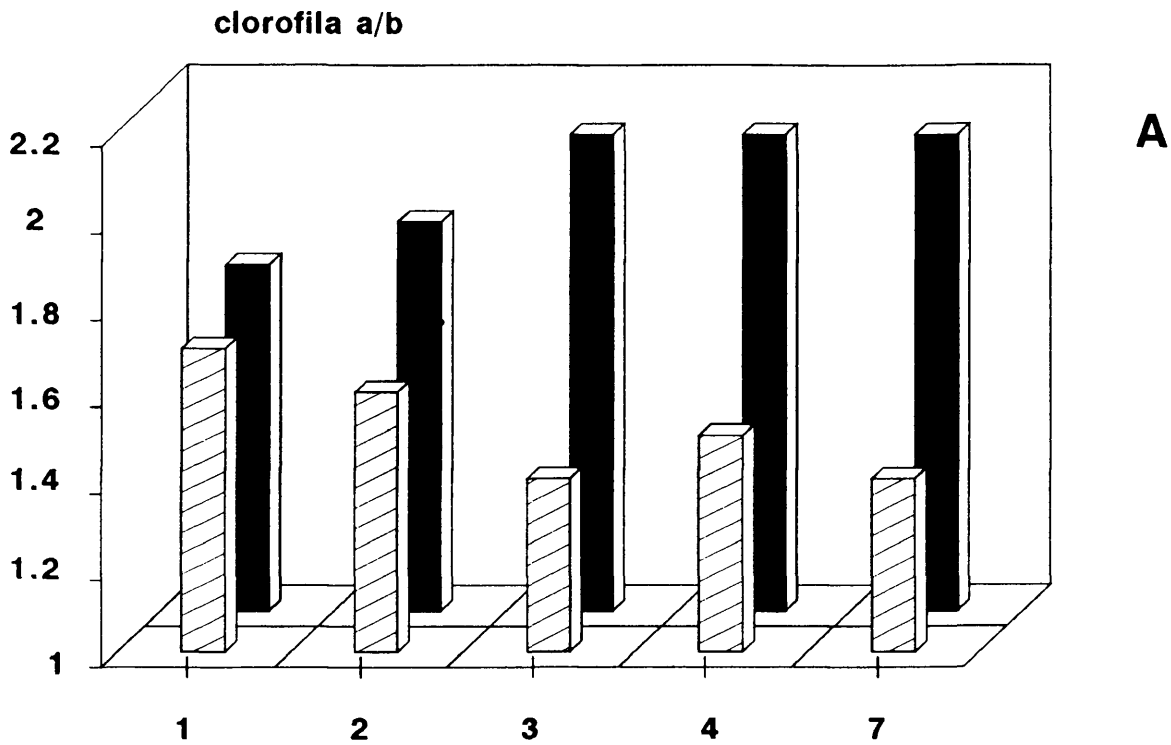
Especies	DMSO		Acetona 80%	
	0 días	6 días	0 días	6 días
Clorofila a+b (µg/mg)				
E. prunastri (1)	2.31a	2.30a	1.23d	0.70g
U. subfloridana (1)	1.58b	1.55b	0.94e	0.60h
R. farinacea (2)	2.73c	2.67c	1.73f	0.76j
PQa				
E. prunastri (1)	1.24t	1.24t	1.04x	0.64v
U. subfloridana (1)	1.16w	1.16w	0.71y	0.48w
R. farinacea (2)	1.23t	1.23t	1.13z	0.68v

Los valores medios que presentan la misma letra no difieren significativamente ($P < 0.05$).
 Locaidades de muestreo: (1) Elsdon (Northumberland, Inglaterra); (2) El Robledo (Toledo).

Por el contrario, no se observó efecto alguno ni en el contenido en clorofilas totales, ni en la tasa a/b en aquellos extractos descongelados sólo una vez, tras 7 días de almacenamiento (Fig. 8a,b).

5.1.2. Adecuación del método de medida de la fluorescencia temprana *in vivo* en líquenes. Efecto de la irradiación y del estado de hidratación del talo.

Tal como se expuso en 1.5. *La fluorescencia temprana de clorofilas in vivo*, la medida de la fluorescencia temprana de las clorofilas ha sido descrita como una





 **descongelado diariamente**
 **descongelado una única vez**

Figura 8. Estabilidad de extractos de clorofilas en DMSO almacenados a 4°C en oscuridad. El valor de clorofila a + b se expresa como porcentaje del valor medio correspondiente al día 1.

herramienta adecuada para la evaluación de la actividad fotosintética y de la vitalidad de un amplio espectro de vegetales. Las principales ventajas del análisis de la señal de fluorescencia son: i) se trata de un método no destructivo, ii) los ejemplares pueden ser medidos en su hábitat natural siendo mínimamente perturbados, iii) los descriptores de la cinética de fluorescencia inducida pueden ser medidos rápidamente tras un breve periodo de adaptación a oscuridad, iv) estos parámetros ofrecen una información detallada y temprana no sólo del estado de los pigmentos fotosintéticos, sino al mismo tiempo, de la funcionalidad del aparato fotosintético en su conjunto y de forma pormenorizada.

En este capítulo se comprobará la adecuación del método de medida de la fluorescencia temprana de clorofilas in vivo. Tres motivos justifican dedicar una especial atención al efecto producido por la exposición a medias y altas intensidades de luz. En primer lugar, el interés de valorar hasta que punto la historia lumínica previa a la toma de las medidas de fluorescencia determina la respuesta expresada por F_v/F_p . En segundo lugar, comprobar en qué medida los patrones de respuesta observados en una especie liquénica son generalizables a los líquenes o por el contrario existen diferentes estrategias protectoras contra altas irradiancias o diferencias en cuanto a su capacidad de reuperación. Por último y en tercer lugar, cuando el objetivo final es evaluar la respuesta a la contaminación ambiental, el análisis del efecto de altas intensidades de luz tiene un interés añadido, dado que la exposición a altas densidades de flujo fotónico puede sensibilizar a los líquenes frente a otros estreses ambientales como los producidos por los contaminantes atmosféricos (Nash et al. 1990). Antes de proceder a evaluar el efecto de la intensidad lumínica sobre el fotobionte liquénico, así como su dependencia del patrón hídrico de diferentes especies, será preciso realizar una serie de controles para confirmar que las medidas de fluorescencia temprana de clorofilas in vivo, se toman en las condiciones adecuadas.

Periodo de adaptación a oscuridad

En primer lugar, en ejemplares de Platismatia glauca, se valoró el efecto de la duración del periodo de adaptación a oscuridad previo a la toma de las medidas (Fig. 9). En este sentido, se observó que el cociente F_v/F_p alcanzaba el valor máximo tras 20 minutos de adaptación a oscuridad. Sin embargo, a partir de los 15 minutos, las variaciones de este cociente ya eran despreciables. Por este motivo, las muestras fueron siempre preadaptadas a oscuridad durante un periodo de 15-20 minutos antes de proceder a la inducción de la cinética de fluorescencia.

Relación entre F_v/F_p y el contenido hídrico del talo

Por otra parte, dado que los líquenes son organismos poikilohídricos, su contenido hídrico es altamente dependiente del aporte de agua, así como de la humedad relativa ambiental. Es un fenómeno conocido que las variaciones hídricas del talo conllevan cambios en el albedo y en el color del mismo, posiblemente debidos a la variación de la transparencia del cortex superior (Lange 1954; Kershaw 1975; Sancho & Kappen 1989; Sancho, Valladares & Ascaso 1992; Büdel 1992). Estas variaciones determinan igualmente la señal de fluorescencia del talo líquénico, hasta tal punto, que cuando el ejemplar se encuentra en estado seco al aire, la señal es nula (Jensen & Feige 1991). Esta relación entre F_v/F_p y el contenido hídrico del talo se evaluó en ejemplares de Platismatia glauca e Hypogymnia physodes. Tal como ya ha sido descrito por otros autores (Jensen & Feige 1991), se comprobó que el cociente F_v/F_p no se ve afectado por variaciones en el contenido hídrico que tengan lugar por encima de un umbral. El contenido hídrico umbral por encima del cual la señal de fluorescencia permanece constante se encontró en 0.5 mg de agua por mg de peso de talo secado al aire (Fig. 10), por lo que se deshechó cualquier medida de

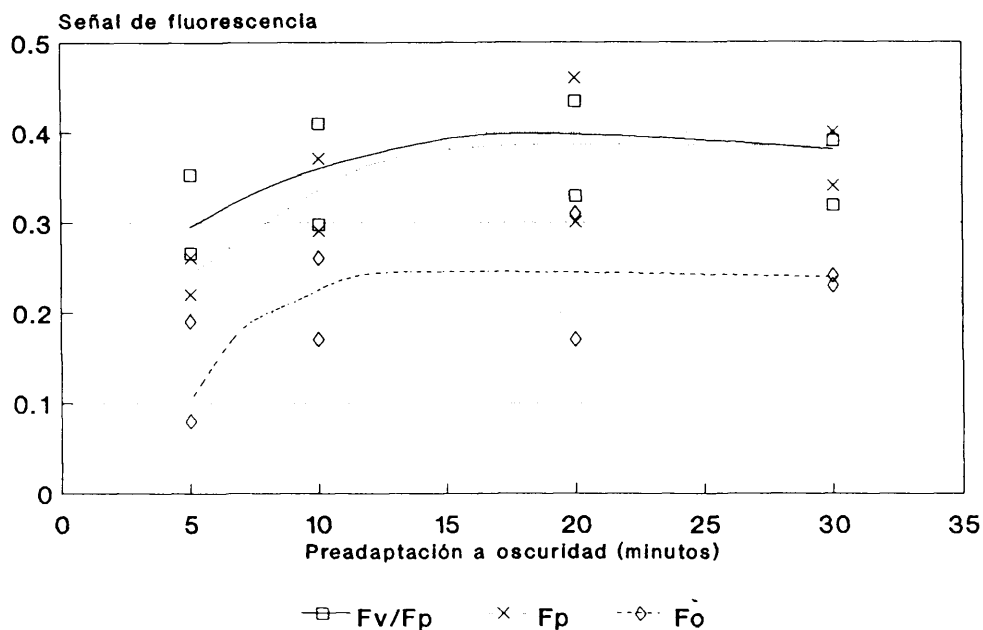


Figura 9. Relación entre la señal de fluorescencia y el tiempo de adaptación a oscuridad previo a la medida, en talos de *Hypogymnia physodes*. Un periodo de 15 minutos es suficientemente prolongado como para obtener una fluorescencia máxima y al mismo tiempo suficientemente breve como para evitar que decaiga la señal por efecto de la pérdida de agua del talo liquénico.

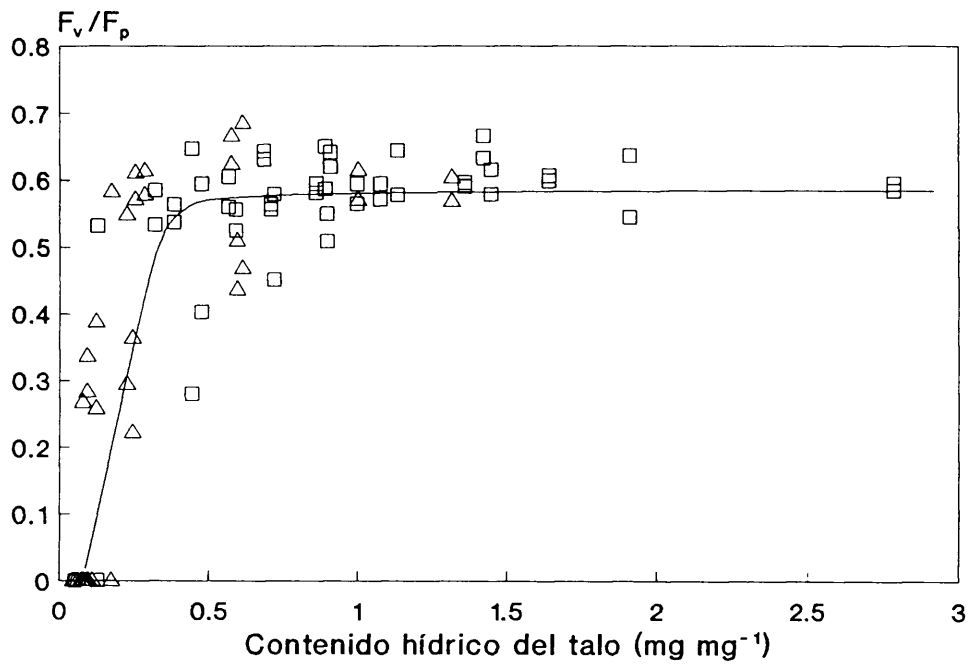


Figura 10. Relación entre la señal de fluorescencia, medida como el cociente F_v/F_p , y el contenido hídrico del talo, en *Hypogymnia physodes* (□) y *Platismatia glauca* (△). Obsérvese que por encima de 0.5 mg de agua/mg de peso seco de talo, la variable F_v/F_p es independiente del contenido hídrico talino.

fluorescencia que hubiera sido tomada en talos con contenidos hídricos inferiores.

Intensidad del pulso de luz actínica inductor de la cinética de fluorescencia

El cociente F_v/F_p debe medirse en cinéticas de fluorescencia inducidas por pulsos de luz actínica de tal intensidad que saturen todos los aceptores de electrones del fotosistema II (PSII; Öquist & Wass 1988). En este caso, F_p se identifica con F_m , entendiéndose F_m como el valor máximo de F_p . En las experiencias realizadas, se empleó un pulso de luz de $200 \mu\text{mol quanta/m}^2\cdot\text{s}$ (nivel 3). Esta intensidad de pulso no fue suficiente como para que F_m y F_o alcanzasen su valor máximo; sin embargo el cociente F_v/F_p mostró una típica curva de saturación, alcanzando su máximo ya en el nivel 2 (Fig. 11). Las relaciones observadas utilizando líquenes, entre F_p , F_o y F_v/F_p y la intensidad del pulso de luz actínica coincidieron con las ya descritas por otros autores en plantas vasculares (Öquist & Wass 1988). Por este motivo, el valor de F_v/F_p fué considerado como un adecuado estimador del valor de F_v/F_m , propuesto por otros autores como indicador del estado de vitalidad de los líquenes (Jensen & Feige 1991).

Efecto de la exposición prolongada a densidades de flujo fotónico crecientes y su dependencia del estado de hidratación del talo

Con el fin de valorar las diferencias entre las especies liquénicas estudiadas, en lo que se refiere al patrón de pérdida de agua, se obtuvieron sus cinéticas de deshidratación (Fig. 12). A partir de estas curvas, se calcularon los tres descriptores seleccionados para la caracterización de las relaciones hídricas de cada una de las

especies líquénicas: contenido hídrico máximo alcanzado, duración del estado hidratado y tasa de deshidratación. Estos valores se presentan en la Tabla 14.

Tabla 14
*Caracterización de las especies líquénicas estudiadas
 en función de sus patrones de deshidratación*

Especies	Max. contenido hídrico	Duración del estado hidratado	Tasa de deshidratación
P. glauca	1.72±0.15	120	-0.037
H. physodes	1.50±0.18	126	-0.031
P. furfuracea	1.63±0.11	105	-0.041
R. farinacea	1.08±0.14	60	-0.031
P. saxatilis	1.65±0.03	160	-0.031
E. prunastri	1.67±0.25	80	-0.076

Media ± S.D.

El efecto atribuible a la exposición a densidades de flujo fotónico crecientes se puso de manifiesto mediante el análisis del parámetro F_v/F_p , cuyos valores se recogen en la Tabla 15. En todas las especies líquénicas analizadas, el tratamiento con $300 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ produjo una caída del valor de F_v/F_p que en algunos casos llegó a ser de un 16% respecto a los valores originales. Sin embargo, esta reducción sólo fue estadísticamente significativa en Platismatia glauca, H. physodes, y Pseudevernia furfuracea ($P < 0.01$). La exposición a flujos fotónicos más elevados ($1000 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$) tuvo un efecto más acusado que se reflejó en una reducción de F_v/F_p de hasta un 39%. Tras este tratamiento, el decaimiento fue significativo en todas las especies estudiadas ($P < 0.01$). Por otra parte, se observaron diferencias significativas entre las especies en lo que respecta a su respuesta a ambos tratamientos lumínicos. Este

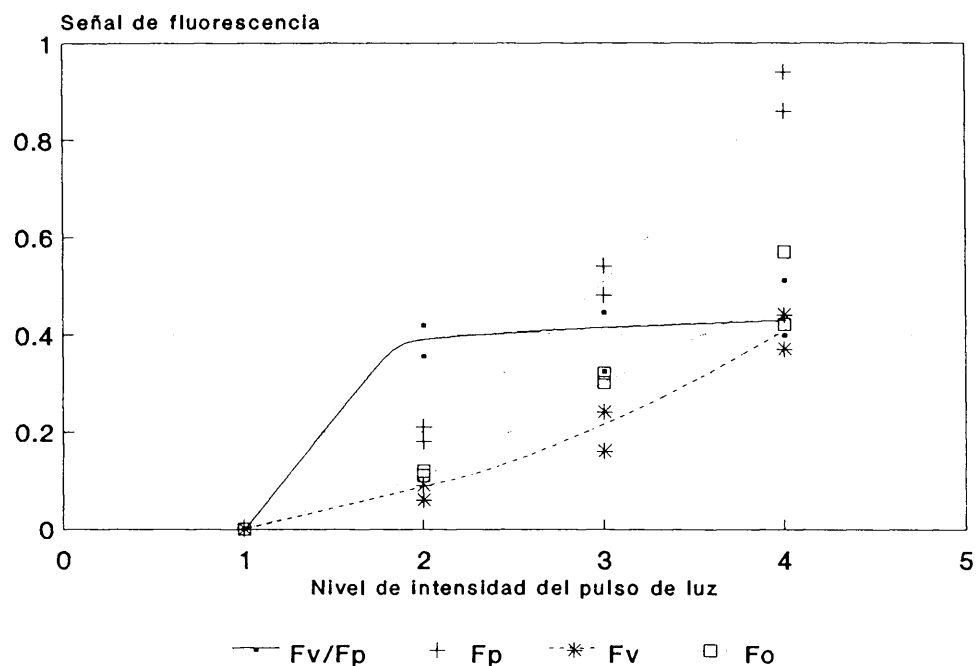


Figura 11. Señal de fluorescencia obtenida en talos de *Hypogymnia physodes* al incrementar la intensidad del pulso de luz actínica. **Nivel 1**, $50 \mu\text{mol fotones/m}^2\cdot\text{s}$; **Nivel 2**, $100 \mu\text{mol fotones/m}^2\cdot\text{s}$; **Nivel 3**, $200 \mu\text{mol fotones/m}^2\cdot\text{s}$; **Nivel 4**, $400 \mu\text{mol fotones/m}^2\cdot\text{s}$. Si bien los valores de F_o , F_p y F_v crecen a medida que aumenta la intensidad, F_v/F_p muestra una cinética de saturación, que alcanza un valor aproximadamente constante, cuando el nivel de intensidad es superior a 2.

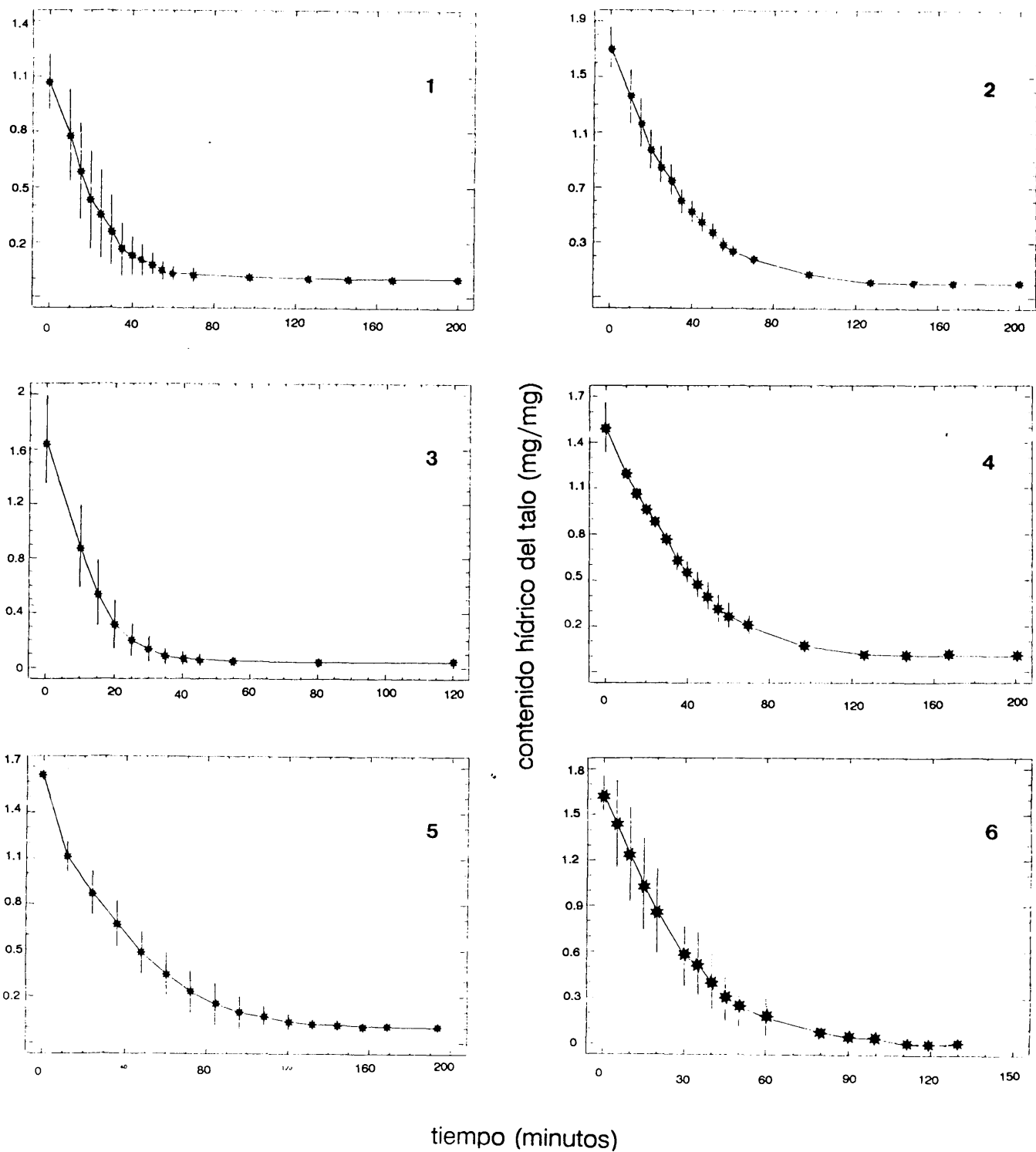


Figura 12. Curvas de desecación de talos de las especies líquénicas estudiadas. Los ejemplares se dejaron secar a $20 \pm 2^\circ\text{C}$, $80 \pm 5\%$ HR y una velocidad del viento de 1 m/s. Cada punto es el resultado de la media de cuatro valores y las barras verticales representan la desviación típica. **1**, *Ramalina farinacea*; **2**, *Platismatia glauca*; **3**, *Evernia prunastri*; **4**, *Hypogymnia physodes*; **5**, *Parmelia saxatilis*; **6**, *Pseudevernia furfuracea*.

hecho pone de manifiesto que existen diferencias en cuanto a la sensibilidad de las distintas especies liquénicas a la exposición prolongada a medias y altas intensidades de luz.

El decaimiento generalizado de F_v/F_p estuvo basado tanto en un incremento de F_o , como en un descenso del valor de F_p en todas las especies liquénicas estudiadas (Tabla 16 y 17). Un incremento en F_o ha sido interpretado como indicativo de daño fotoinhibidor del PSII; por el contrario, un descenso de F_p indicaría un aumento en la liberación del excedente de energía mediante su disipación inocua en forma de calor (Demmig and Björkman 1987).

Tres patrones de respuesta diferentes se pueden distinguir en las especies estudiadas. En primer lugar, en Platismatia glauca y Pseudevernia furfuracea, especies en las que se detectó una inhibición significativa atribuible a la exposición a $300 \mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$, sólo resultó significativo el aumento en los valores de F_o tras el tratamiento con 300 y $1000 \mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ ($P < 0.05$).

Tabla 15

Variación de la relación F_v/F_p de las especies liquénicas estudiadas tras el tratamiento con diferentes intensidades de luz

Especies	A	B	C	D
	F_v/F_m	F_v/F_m *	F_v/F_m *	F_v/F_m
<i>P. glauca</i>	0.65±0.04	0.55±0.04 s	0.42±0.05 s	0.48±0.08 s
<i>H. physodes</i>	0.60±0.05	0.52±0.03 s	0.38±0.08 s	0.55±0.04 ns
<i>P. furfuracea</i>	0.61±0.05	0.52±0.04 s	0.46±0.08 s	0.57±0.04 ns
<i>R. farinacea</i>	0.61±0.09	0.53±0.07 ns	0.43±0.09 s	0.51±0.07 ns
<i>P. saxatilis</i>	0.58±0.09	0.52±0.05 ns	0.35±0.07 s	0.54±0.06 ns
<i>E. prunastri</i>	0.60±0.16	0.53±0.06 ns	0.40±0.15 s	0.52±0.05 ns

Media ± S.D.

* Significación estadística de la diferencia con respecto a los valores iniciales (tratamiento A), basadas en un test LSD (s, $P < 0.01$; ns, no significativo).

Tratamientos: A, 5 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$; B, 300 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$; C, 1000 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$; D, 20 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$.

Teniendo en cuenta la interpretación ya expuesta sobre el significado de las variaciones en F_o y F_p , este patrón de respuesta se correspondería con una baja capacidad fotoprotectora de disipación de la energía en forma de calor (F_p no varió significativamente), por lo que se producen daños en el PSII (F_o se incrementó desde 0.26 ± 0.14 y 0.15 ± 0.03 hasta 0.40 ± 0.09 y 0.19 ± 0.03 , en Platismatia glauca y Pseudevernia furfuracea respectivamente).

Tabla 16

Variación de la relación F_p de las especies líquénicas estudiadas tras el tratamiento con diferentes intensidades de luz

Especies	A	B	C	*
P. glauca	0.26±0.14	0.41±0.04	0.40±0.09	s
H. physodes	0.17±0.05	0.20±0.04	0.21±0.05	ns
P. furfuracea	0.15±0.03	0.18±0.03	0.19±0.03	s
R. farinacea	0.29±0.03	0.31±0.05	0.29±0.04	ns
P. saxatilis	0.15±0.04	0.16±0.03	0.19±0.04	ns
E. prunastri	0.27±0.06	0.32±0.03	0.35±0.06	s

Media ± S.D.

* Significación estadística del incremento, basado en un ANOVA de una vía, en los casos de E. prunastri, H. physodes, R. farinacea, Parmelia saxatilis y Pseudevernia furfuracea, o un análisis Kruskal-Wallis, en Platismatia glauca (s, $P < 0.05$; ns, no significativo).

Tratamientos: A, 5 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$; B, 300 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$; C, 1000 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$.

Frente a este patrón de respuesta, en R. farinacea, que sólo manifestó síntomas significativos tras la exposición a la más elevada densidad de flujo fotónico, el decaimiento de F_p no fue significativo ($P > 0.05$), pero por el contrario, sí se observó un muy significativo descenso de F_p ($P < 0.001$). Estaríamos, en este caso, frente a la estrategia opuesta, es decir, la eficiencia del mecanismo fotoprotector (F_p descendió desde 0.77 ± 0.14 hasta 0.51 ± 0.05) impediría la afeción del PSII.

Tabla 17

Variación de la relación F_p de las especies liquénicas estudiadas tras el tratamiento con diferentes intensidades de luz

Especies	A	B	C	*
P. glauca	0.74±0.34	0.90±0.11	0.69±0.16	ns
H. physodes	0.44±0.16	0.42±0.08	0.35±0.11	ns
P. furfuracea	0.40±0.11	0.38±0.06	0.36±0.06	ns
R. farinacea	0.77±0.14	0.65±0.08	0.51±0.05	**
P. saxatilis	0.37±0.11	0.34±0.06	0.30±0.03	ns
E. prunastri	0.69±0.21	0.69±0.09	0.58±0.07	*

Media ± S.D.

* Significación estadística del descenso, basado en un ANOVA de una vía, en los casos de H. physodes y Pseudevernia furfuracea, o un análisis Kruskal-Wallis, en E. prunastri, R. farinacea, Parmelia saxatilis y Platismatia glauca (**, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$; ns, no significativo).

Tratamientos: A, 5 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$; B, 300 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$; C, 1000 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$.

En E. prunastri, tanto el incremento de F_o como la caída de F_p fueron significativos ($P < 0.05$), por lo que esta situación sería interpretada como intermedia entre las anteriormente descritas. Esto es, existiría disipación de la energía en forma de calor (F_p descendió desde 0.69 ± 0.21 a 0.58 ± 0.07), pero el mecanismo no es lo suficientemente eficaz como para evitar que, en alguna medida, se vea dañado el PSII (F_o ascendió desde 0.27 ± 0.006 hasta 0.35 ± 0.06).

Tras un periodo de recuperación a una densidad de flujo fotónico más baja (20 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$), F_v/F_p experimentó un incremento respecto a los valores obtenidos tras el tratamiento con 1000 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$, en todas las especies. Si bien en la mayoría de los casos, tras el periodo de recuperación, los valores de F_v/F_p llegaron a no diferir significativamente de los valores originales obtenidos antes del tratamiento con 300

$\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$, sin embargo, en ninguna especie se observó una recuperación del 100%. Posiblemente, sea preciso mantener los ejemplares a baja densidad de flujo fotónico durante un periodo más largo de tiempo, para alcanzar la recuperación absoluta. Sin embargo, el tratamiento con baja intensidad de luz, esto es, 10 h de oscuridad seguidas de 5 h a $20 \mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$, fue suficiente como para poner de relieve diferencias en la capacidad de recuperación entre las distintas especies estudiadas. En este sentido, sólo en Platismatia glauca, la recuperación no fue significativa tras este tratamiento ($P < 0.01$; Tabla 15). Este hecho está en consonancia con la interpretación previa que sugería que en esta especie el PSII había sido dañado.

Con el fin de estimar en qué medida las variaciones en la respuesta en términos de F_v/F_p , dependen de los diferentes tratamientos lumínicos, se ajustó un modelo mediante regresión lineal. Aceptando que las diferencias interespecíficas de sensibilidad a la luz podrían deberse a los distintos estados de hidratación de los ejemplares durante los tratamientos, también se incluyeron los descriptores de las cinéticas de deshidratación como variables independientes en el análisis de regresión múltiple. El resultado de este análisis reveló como variables que determinan la respuesta de forma altamente significativa ($P < 0.01$), la densidad de flujo fotónico y la duración del estado hidratado. Las contribuciones al modelo del contenido hídrico máximo alcanzado y la tasa de pérdida de agua de cada una de las especies, también fueron significativa aunque en menor medida ($P < 0.05$). Por tanto, la diferencias interespecíficas en la respuesta no sólo vinieron determinadas por la diferente capacidad para fotoproteger el aparato fotosintético, sino, además, por las fluctuaciones en el contenido hídrico de los ejemplares de cada especie, durante los tratamientos con distintas irradiancias. Con la excepción de Parmelia saxatilis, los talos de aquellas especies que permanecieron más tiempo hidratadas (Pseudevernia furfuracea, Platismatia glauca y H. physodes) fueron sensibles incluso al tratamiento con $300 \mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$. Por el contrario, los ejemplares de E. prunastri y R. farinacea, con

las más breves permanencias en estado hidratado, sólo fueron fotoinhibidos con la más alta irradiancia.

En conclusión, el modelo ajustado explicaba el 94% de la variabilidad observada en F_v/F_p (Tabla 18). Es preciso mencionar, que el efecto de la densidad de flujo fotónico era tan acusado, que incluso considerando únicamente esta variable independiente el valor de R^2 ya ascendía al 90%.

Tabla 18

Modelo para la variación del cociente F_v/F_p

Variable independiente	Coficiente	S.E.	Nivel de significación
Constante	0.57	0.04	0.0001
PPFD	-1.97E-4	0.12E-4	0.0001
Tasa de deshidratación	-2.195	0.75	0.0117
Tiempo de secado	-1.40E-3	0.38E-3	0.0028
Contenido hídrico máx.	0.17	0.06	0.0082
$R^2 = 94\%$			

5.2. Caracterización de la respuesta al dióxido de azufre

Tal como se contemplaba en el capítulo 3, uno de los principales objetivos ha sido la caracterización de una sintomatología observada en los líquenes como consecuencia de la exposición al SO₂. Este estudio se ha abordado desde tres facetas diferentes: análisis de las variaciones cuantitativas del contenido en clorofilas y su transformación a feofitinas, de los cambios en la fluorescencia de las clorofilas, y estudio de las alteraciones de la ultraestructura del fotobionte liquénico. Los resultados procedentes de estos tres niveles se expondrán en el presente capítulo.

5.2.1. Variación del contenido en clorofilas totales y degradación de la clorofila a a feofitina a

El interés de conocer la respuesta frente a distintas dosis de contaminante con el fin de poder modelizar, en último término, la relación dosis-respuesta, así como el de valorar la posible influencia de otras variables ambientales como moduladores de la respuesta del bioindicador, justifica el evaluar tanto el efecto inducido por exposiciones agudas como el producido por exposiciones crónicas al contaminante considerado, bajo distintas condiciones ambientales y en combinación o no con NO₃⁻. La consecución de este doble objetivo se abordará a continuación.

5.2.1.1. Efecto inducido por exposiciones agudas a dióxido de azufre

Fumigaciones agudas con SO₂, esto es, exposiciones breves a altas concentraciones del contaminante, podrían inducir la aparición de síntomas en

líquenes, de forma semejante a los que se observarían en el medio natural tras picos episódicos de concentración de SO₂ en la atmósfera. Estas altas concentraciones de contaminante durante cortos periodos han sido valorados por algunos autores como de vital importancia para la supervivencia de los líquenes en áreas industriales (Huebert et al. 1985). Sin embargo, cabe esperar que la intensidad del daño producido por estas exposiciones agudas dependa del estado de actividad del talo y por ende de su estado de hidratación. Por esta razón, en regiones de clima mediterráneo donde el aporte hídrico es restringido durante largos periodos, el valor determinante de estos episodios podría verse reducido. Para analizar esta hipótesis, se seleccionó la especie líquénica *Anaptychia ciliaris*, especie sensible al SO₂ según estudios de campo previos, realizados en la Región Mediterránea (Manrique et al. 1989). Ejemplares de esta especie fueron fumigados con $1000 \pm 60 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (350 ± 21 ppb) de SO₂. La respuesta a las 0, 5, 25, 30, 49 y 54 h desde el comienzo de la exposición al contaminante, se valoró mediante el análisis de las variaciones del PQa y del contenido en clorofilas totales.

Efectos inducidos por la exposición aguda a SO₂ en Anaptychia ciliaris

Los resultados obtenidos se representan en las Figura 13 y 14. A la vista de la evolución de los controles, no se observó decaimiento alguno atribuible al tiempo de permanencia de los ejemplares en las cámaras.

Por otra parte, en ningún momento, a lo largo de las 54 h de experimentación, se detectaron diferencias significativas entre los especímenes fumigados con SO₂ y los especímenes control, mantenidos en aire filtrado. En este periodo, no se observó decaimiento significativo de ninguna de las variables de respuesta medidas en relación con el tiempo de exposición al contaminante. Sin embargo, mientras la correlación

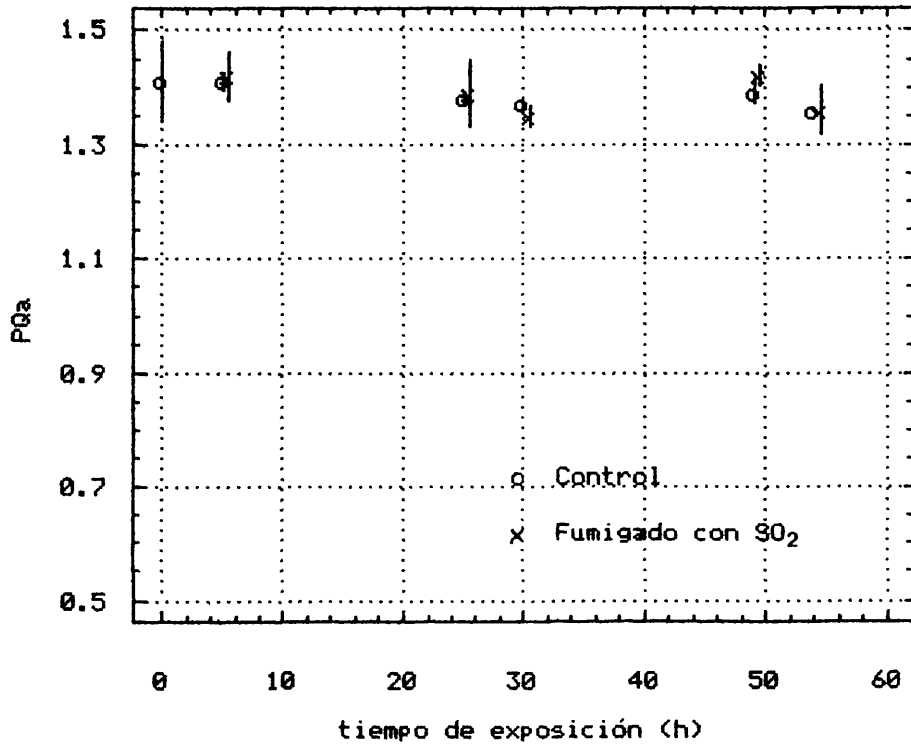


Figura 13. Evolución del PQa en función del tiempo de exposición al contaminante en talos de *Anaptychia ciliaris* fumigados con 350 ppb de SO₂. Nótese que tras 72 h, aún no se observa un decaimiento significativo de la variable de respuesta.

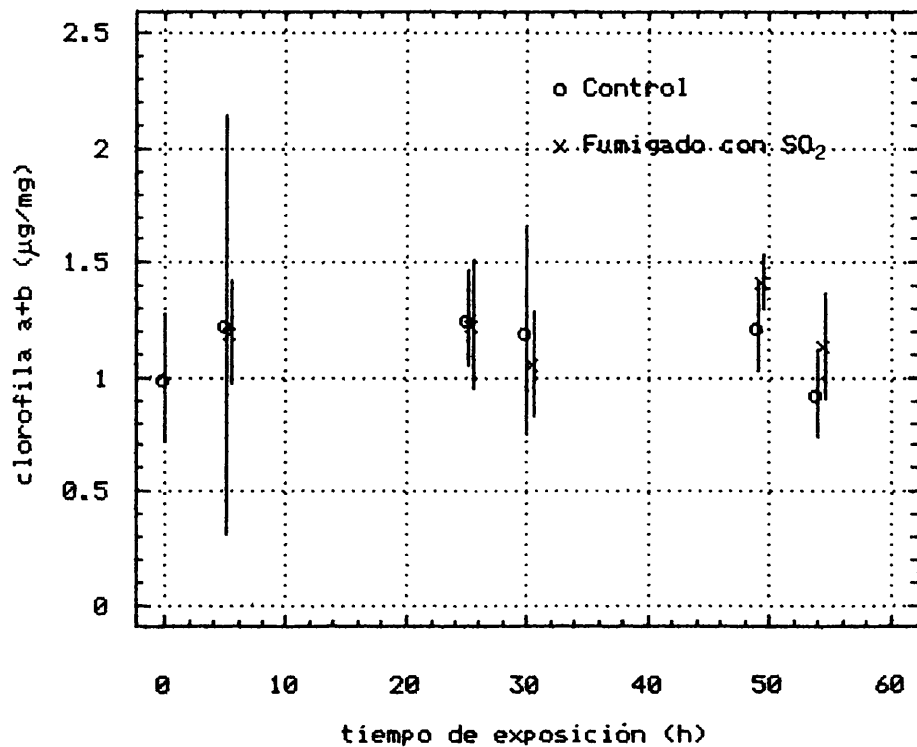


Figura 14. Evolución del contenido en clorofilas en función del tiempo de exposición al contaminante en talos de *Anaptychia ciliaris* fumigados con 350 ppb de SO₂. Nótese que tras 72 h, aún no se observa un decaimiento significativo de la variable de respuesta.

entre contenido en clorofilas totales y PQa no fué significativa en los controles ($r = 0.26$, $P < 0.29$), sí lo fué en el caso de los datos procedentes de ejemplares fumigados ($r = 0.52$, $P < 0.02$). Si bien el decaimiento atribuible al tiempo de fumigación no es significativo, y por tanto, no se detectan daños inducidos por el contaminante, el hecho de un aumento de la correlación entre PQa y contenido en clorofilas totales indica que algunos talos podrían estar experimentando primeros síntomas de degradación de clorofilas a feofitinas, sin que ello se traduzca en una respuesta generalizada.

5.2.1.2. Efecto inducido por exposiciones crónicas a dióxido de azufre

Los líquenes experimentan perturbaciones atribuibles a exposiciones crónicas al dióxido de azufre (SO_2) (Fields 1988). Atendiendo a esta evidencia, tradicionalmente se ha planteado una relación biunívoca entre síntomas de degradación -bien de sus comunidades, bien del estado de los simbiontes- y concentraciones de SO_2 en la atmósfera. Son numerosos los trabajos que proponen, o se basan, en escalas que relacionan concentración de SO_2 , como variable independiente, con la presencia de determinadas especies liquénicas, como variable dependiente (Hawksworth & Rose 1970; James 1982; Crespo et al. 1977; Crespo & Bueno 1982). Estos estudios, generalmente realizados en el campo, donde es difícil calcular el tiempo de exposición al contaminante, suponen que la respuesta viene determinada únicamente por la concentración media de SO_2 . Son muy escasos los trabajos en los que se cuestiona si es la media u otro estadístico, o quizás una combinación de ellos, la medida de concentración del contaminante en la atmósfera que con más peso determina la respuesta del bioindicador (De Witt 1976). Por otra parte, tanto en estudios de campo como de laboratorio, no se aborda la definición del concepto de dosis, entendida como

la relación con mayor valor descriptivo entre la concentración de contaminante y el tiempo de exposición al mismo.

A todo ello hay que sumar que el SO_2 no actúa de forma aislada. Como ya se ha comentado, es difícil valorar en qué medida variables ambientales y nutricionales determinan la sensibilidad del líquen frente a los contaminantes y modulan su respuesta.

Con el fin de abordar estos puntos, en este capítulo se analizará la respuesta de talos de la especie Ramalina farinacea (L.) Ach. a través de la valoración del PQa y el contenido en clorofilas totales (a + b), tras fumigaciones crónicas con SO_2 , esto es, tras largos periodos de exposición a concentraciones medias o bajas de SO_2 (Tabla 19). En primer lugar, se valorará el posible ruido introducido por la propia metodología, concretamente por la permanencia de los especímenes en las cámaras de experimentación cuando estos son fumigados durante largos periodos.

En segundo lugar, de los siete experimentos realizados, se considerarán aquellas muestras ($n=132$) expuestas únicamente a SO_2 , con el fin de valorar el efecto inducido por este contaminante cuando actúa de forma aislada. En este apartado, se planteará qué descriptor de la concentración de SO_2 en las cámaras determina en mayor medida la respuesta del líquen. A continuación, se analizará la relación entre concentración de contaminante y tiempo de exposición al mismo. Finalmente, para concluir el análisis de la respuesta al SO_2 , se comparará la información procedente de la medida del PQa con aquella que se deduce del cálculo del contenido en clorofilas totales.

Por último, se considerará el total de casos analizados ($n=250$), descritos en función de 10 variables que potencialmente podrían estar modulando la respuesta del líquen al SO_2 (Tabla 19). Mediante un análisis de selección progresiva de estas variables, se seleccionará el subconjunto de variables que presente el más alto valor descriptivo. Es preciso hacer constar que en este capítulo sólo se valorarán los efectos

aditivos de las variables independientes o, a lo sumo, de sus productos; interacciones más complejas se analizarán en un capítulo posterior (5.2.4. *Influencia del aporte de nitrato en la respuesta al dióxido de azufre*). Con el mencionado subconjunto de variables seleccionadas, se ajustará un modelo lineal por regresión múltiple con el fin de globalizar la información procedente de diversas experiencias concretas, y así poder estimar cuál sería la respuesta teórica en situaciones no ensayadas previamente.

Decaimiento de los controles con el tiempo de permanencia en las cámaras

Tal como se ha comentado, en fumigaciones crónicas, el efecto perjudicial del tiempo de permanencia de los especímenes en las cámara de experimentación puede no ser despreciable. Para contrastar esta hipótesis, se ha evaluado la posible dependencia de los valores de PQa de los tratamientos control respecto al tiempo en días de permanencia en las cámaras (t). La correlación entre ambas variables resultó ser altamente significativa ($P < 0.001$). La relación entre ambas variables respondía a una función hiperbólica, por lo que la pendiente negativa se amortigua a medida que aumenta el periodo de experimentación (Fig. 15):

$$PQa = 0.45 * t^{-0.1} \quad R^2 = 36\% \quad (1)$$

Por tanto, dado que se observa un decaimiento de la variable de respuesta atribuible a la sola permanencia de los especímenes en las cámaras, debe analizarse el decaimiento diferencial de los ejemplares fumigados con SO₂ respecto al observado en los controles. Con objeto de intentar discernir entre el efecto inducido por el tiempo de experimentación y el atribuible a la exposición al contaminante, se valoró la respuesta de cada una de las 250 muestras como porcentaje relativo a su

correspondiente valor medio control, tanto en el caso del PQa como de las clorofilas totales.

Valor descriptivo de distintas medidas de los niveles de SO₂

El hecho de evaluar la bondad de los descriptores de los niveles de SO₂ en las cámaras de fumigación, trasciende al interés puramente metodológico, dado que aporta información sobre si el bioindicador responde principalmente a picos episódicos o a valores medios de la concentración del contaminante. Con el fin de averiguar cuál o cuales de las medidas realizadas explicaba con mayor precisión la variación observada en el PQa, se ha aplicado un análisis de selección progresiva de variables a las medidas que se citan a continuación:

- Concentración media (ppb) de SO₂ (*s*)
- Valor máximo de la concentración de SO₂ registrado durante el periodo de fumigación (*m*)
- Diferencia entre el valor máximo y el mínimo de los valores registrados (*a*)
- Desviación típica de los valores medios de concentración de SO₂ (*sds*).
- Producto del número de días de exposición al contaminante por la concentración del mismo (*ds*)

De todas ellas fue *ds*, el mejor descriptor de la variación observada en el PQa ($R^2 = 69\%$). Las contribuciones de *m*, *a* y *sds* no resultaron ser significativas.

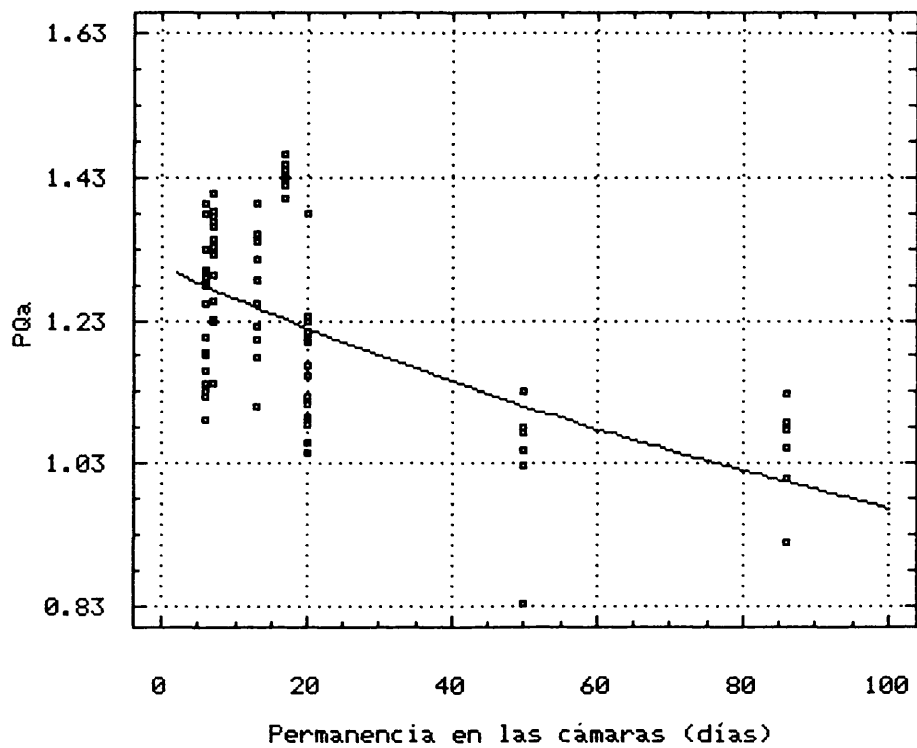


Figura 15. Evolución de los valores del PQa de talos de *Ramalina farinacea*, sometidos al tratamiento control, en función del tiempo de permanencia en las cámaras de experimentación. Se observa un decaimiento significativo que responde a una función hiperbólica.

Relación dosis-respuesta

La Figura 16 representa el modelo de superficie de respuesta calculado a partir de la regresión lineal de los valores de PQa, en función del tiempo de exposición al contaminante (*tf*) y de la concentración del mismo (*s*). La combinación lineal de ambas variables explica un elevado porcentaje de la respuesta medida ($R^2 = 71\%$):

$$\text{PQa (\% del control)} = 100 - 0.048 * s \text{ (ppb)} - 0.883 * tf \text{ (días)} \quad (2)$$

La contribución de ambas variables independientes fué altamente significativa (*s*, $P < 0.01$; *tf*, $P < 0.0001$).

Sin embargo, un modelo lineal, como el expresado, sólo tendría sentido cuando ambas variables sean cero simultáneamente, o por el contrario, cuando ninguna de las dos lo sea. Frecuentemente, esta restricción queda salvada al definir dosis como el producto de *s* por *tf* (Hur & Wellburn 1991). Al evaluar el valor descriptivo de este producto (*ds*) en los datos procedentes de las fumigaciones controladas con SO_2 , se detectó una relación hiperbólica altamente significativa entre PQa y *ds* ($P < 0.00001$), que explicaba un mayor porcentaje de la respuesta observada que la expresión (2) ($R^2 = 82\%$):

$$\text{PQa} = 1000 / (9.83 + 0.002 * ds) \quad (3)$$

Esta relación que alcanza el más alto valor descriptivo atribuible únicamente a la exposición al SO_2 , se representa en la Figura 17. A partir de estos resultados se concluye que la respuesta del bioindicador a la exposición al contaminante no es lineal, sino que por el contrario responde a una función cuya pendiente se amortigua a medida que aumenta la dosis, y que depende por tanto, no sólo de la concentración

media del contaminante en la atmósfera sino además del tiempo que dura la exposición al mismo.

Relación entre las variaciones observadas en el PQa y en el contenido en clorofilas totales como consecuencia de la exposición al SO₂

La exposición al SO₂ indujo un decaimiento significativo tanto del PQa ($P < 0.0001$) como del contenido en clorofilas totales ($P < 0.0001$). El decaimiento diferencial del PQa de los líquenes expuestos al contaminante frente a los mantenidos en aire filtrado, fué acompañado de un descenso en contenido en clorofilas totales. Sin embargo, la correlación negativa entre la dosis de SO₂ -expresada en ppb por días- y el PQa de ejemplares expuestos a este contaminante ($r = -0.82$), es superior a la correlación entre dosis de SO₂ y el valor del contenido en clorofilas totales ($r = -0.58$). Por tanto, el PQa respondía con mayor fidelidad a la exposición al SO₂ que la medida del contenido en clorofilas totales.

El coeficiente de variación, definido como el cociente entre la desviación típica y la media, fué menor en el caso del PQa que en el del contenido en clorofilas totales. Es decir, se obtuvo una menor dispersión en la respuesta de distintos ejemplares sometidos al mismo tratamiento; posiblemente debido a que la síntesis-degradación de clorofilas viene determinada por otras causas además de la feofitinización de las mismas.

Cabe plantearse, en qué medida la información que se deduce del PQa y la procedente de la variación en el contenido en clorofilas es redundante. Ambas variables están directamente vinculadas por definición. Necesariamente una degradación de clorofilas, aun no siendo por feofitinización, debe producir una caída del índice, siempre que no afecte también al contenido en feofitinas. De la misma

Figura 16. Regresión lineal de los valores del PQa en función del tiempo de exposición al SO₂ y de la concentración del mismo.
 $R^2 = 71\%$.

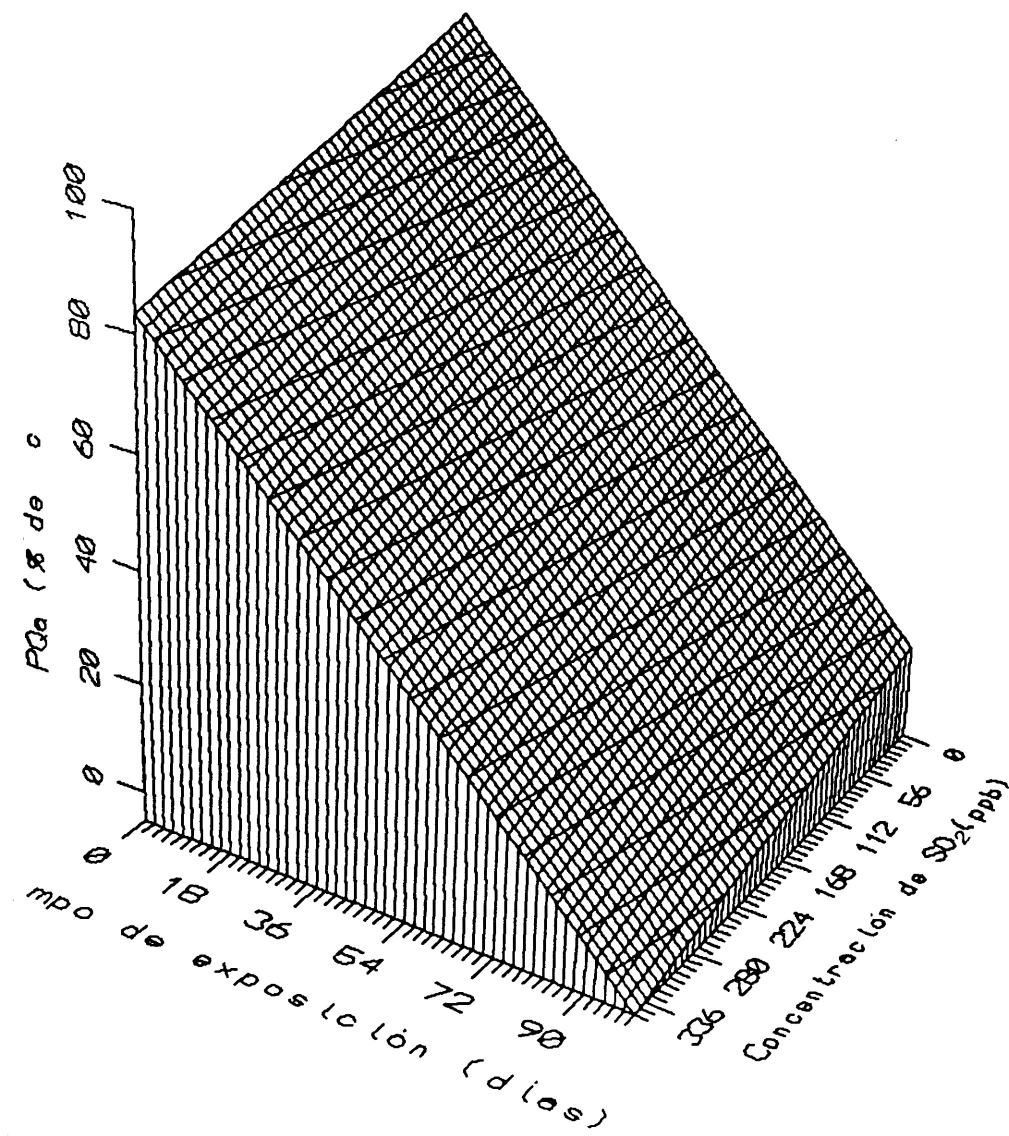
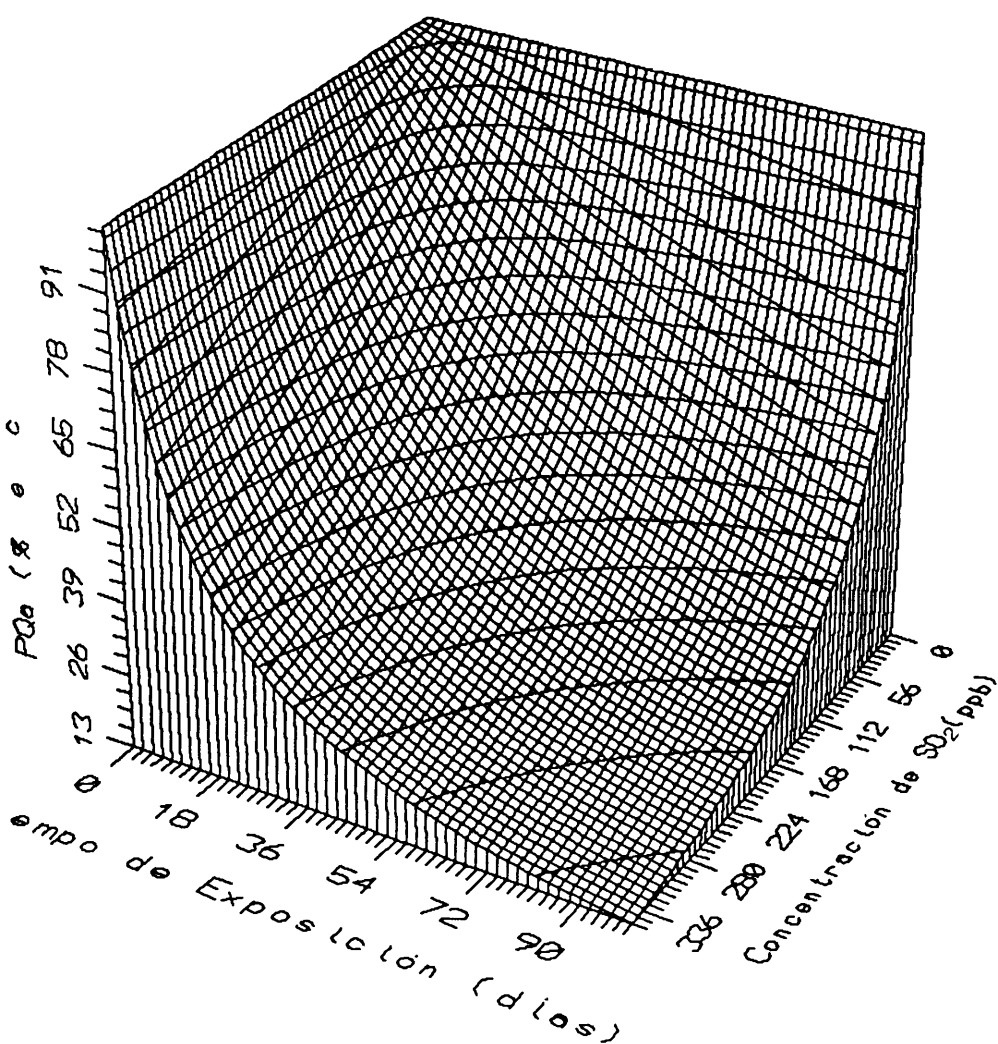


Figura 17. Regresión lineal de los valores del PQa en función de la dosis de SO_2 , definida como el producto de la concentración media del contaminante multiplicada por el tiempo de exposición al mismo. $R^2 = 82\%$.



forma, la feofitinización implica una reducción del contenido en clorofilas, siempre que no vaya acompañada de un estímulo de la síntesis de clorofilas. Considerando sólo aquellas muestras no expuestas a SO_2 ($n=140$), los valores absolutos de PQa y contenido en clorofilas no se correlacionaron ($r=14\%$, $P>0.1$). Ahora bien, tras la exposición al SO_2 , el coeficiente de correlación (r) entre ambas variables se incrementó hasta el 63% y pasó a ser muy significativo ($P<0.0001$). Este resultado pone en evidencia como, en ejemplares procedentes de ambientes no contaminados, la variación del contenido en clorofilas no es explicada por un cambio del cociente de feofitinización. Dicho de otro modo, la información de ambas variables no es redundante, y en el caso de que lo llegue a ser -correlación lineal significativa- será debido a la acción de un agente feofitinizante, como es en nuestro caso el SO_2 . El incremento de la correlación entre contenido en clorofilas y PQa, ha sido también observado en estudios de campo (Boonpragob & Nash 1991).

Moduladores de la respuesta al SO_2

Dado que el PQa es un indicador más fiel y sensible de la presencia del SO_2 que la variación del contenido en clorofilas, tal como se ha puesto de manifiesto a lo largo de este capítulo, en adelante se valorará la respuesta a este contaminante como variación del PQa.

Se han medido 10 variables de diverso tipo, que potencialmente podrían estar modulando la respuesta del líquen al SO_2 . El objetivo perseguido es el de encontrar una combinación de variables que explique un mayor porcentaje de la respuesta que el explicado únicamente por la dosis de SO_2 . Las 10 variables consideradas son:

- 1.- Dosis de SO_2 , entendida como el producto de la concentración media en ppb

por los días de fumigación (ds).

2.- Concentración media (μM) de NO_3^- en el agua destilada que se suministraba a los especímenes en forma de pulverización (n).

3.- Dosis de NO_3^- , definida como el producto de la concentración de este ión (μM) por el número de días que se suministró (dn).

4.- Precipitación en mm/m^2 en los 10 días anteriores a la recolección de los talos (p).

5.- Estacionalidad, entendida como aquella variable capaz de describir las diferencias en la respuesta de los líquenes atribuibles a cambios temporales ligados a un ciclo anual (s). s se define como el sumatorio del número de días por el número del mes en curso desde la recogida hasta el final de la experiencia (dado que las condiciones ambientales en las cámaras intentaban aproximarse a las naturales del exterior del invernadero) dividido por el número total de días:

$$s = \frac{\sum(\text{días} * \text{n}^\circ \text{ del mes})}{\text{total de días}} \quad (4)$$

Para evitar que meses próximos (como Diciembre-Enero) alcanzasen valores extremos de la variable, se tomó el valor de la función:

$$e = \text{sen } \pi*(s-1)/11 \quad (5)$$

que es continúa a lo largo del tiempo. De esta forma, la variable *estacionalidad (e)* presenta valores mínimos en Diciembre-Enero y máximos en Junio-Julio.

6.- Número de días en que se registraron temperaturas inferiores a 5°C en el interior de las cámaras de experimentación durante el periodo de aclimatación o durante las fumigaciones (*ch*).

7- Número de días en que se registraron temperaturas inferiores a 0°C en el interior de las cámaras de experimentación durante el periodo de aclimatación o durante las fumigaciones (*f*).

8.- Temperatura media en el interior de las cámaras de fumigación durante el periodo de exposición al contaminante (*te*). Esta variable se define como la media de las temperaturas medias diarias, que a su vez se definen como la suma de la temperatura máxima diaria mas la mínima, dividida por 2.

9.- Humedad relativa media en el interior de las cámara de fumigación durante el periodo de exposición al contaminante (*h*). Esta variable se define como la media de las humedades relativas medias diarias, que a su vez se definen como la suma de la humedad relativa máxima diaria mas la mínima, dividida por 2.

10-Número de días que permanecieron los líquenes en las cámaras en periodo de aclimatación (*ta*).

A continuación se realizó un análisis de selección progresiva de variables

utilizando como variable dependiente la transformación logarítmica natural del PQa, dado que la pendiente de la respuesta se amortigua a dosis elevadas. El proceso progresivo introduce variables en el subconjunto de las seleccionadas a partir de las diez propuestas, en la medida que éstas mejoran significativamente su valor descriptivo. Además contrasta con cada entrada, que las variables que ya formaban parte de dicho subconjunto conservan su significación. El resultado es la relación de las variables que mejor predice los cambios del PQa, dado que presenta el más alto coeficiente de correlación entre todos los subconjuntos posibles de ese mismo tamaño y la introducción de cualquiera de las otras variables no seleccionadas no mejora significativamente la predicción.

Para la selección se han propuesto dos variables independientes más, procedentes de la combinación de las ya descritas, dado que mejoraban significativamente el nivel de correlación. Dichas combinaciones son p (precipitación) multiplicada por e (estacionalidad), y ds (dosis de SO_2) multiplicada por f (número de días con heladas). El significado biológico de estas combinaciones se analiza más adelante.

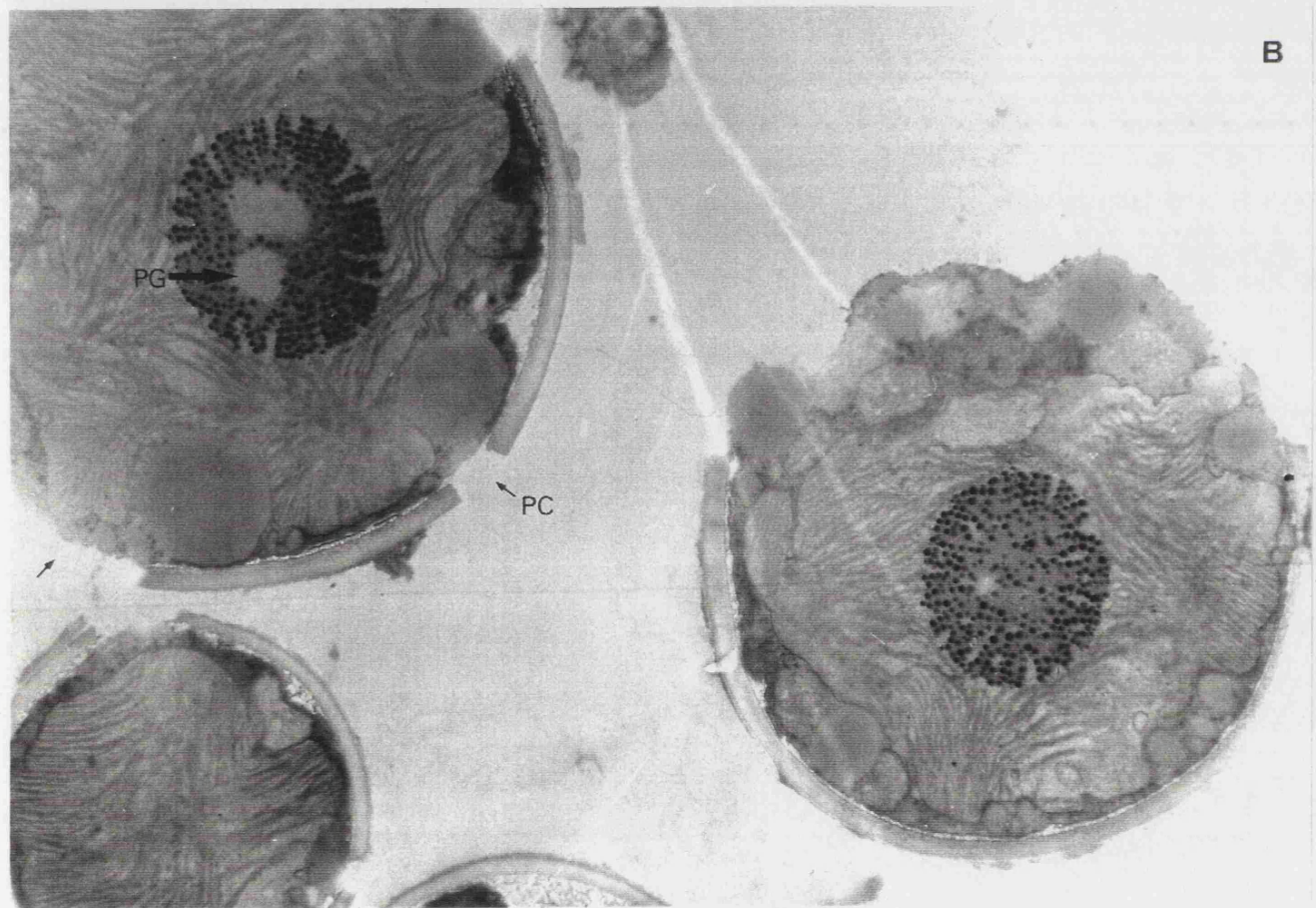
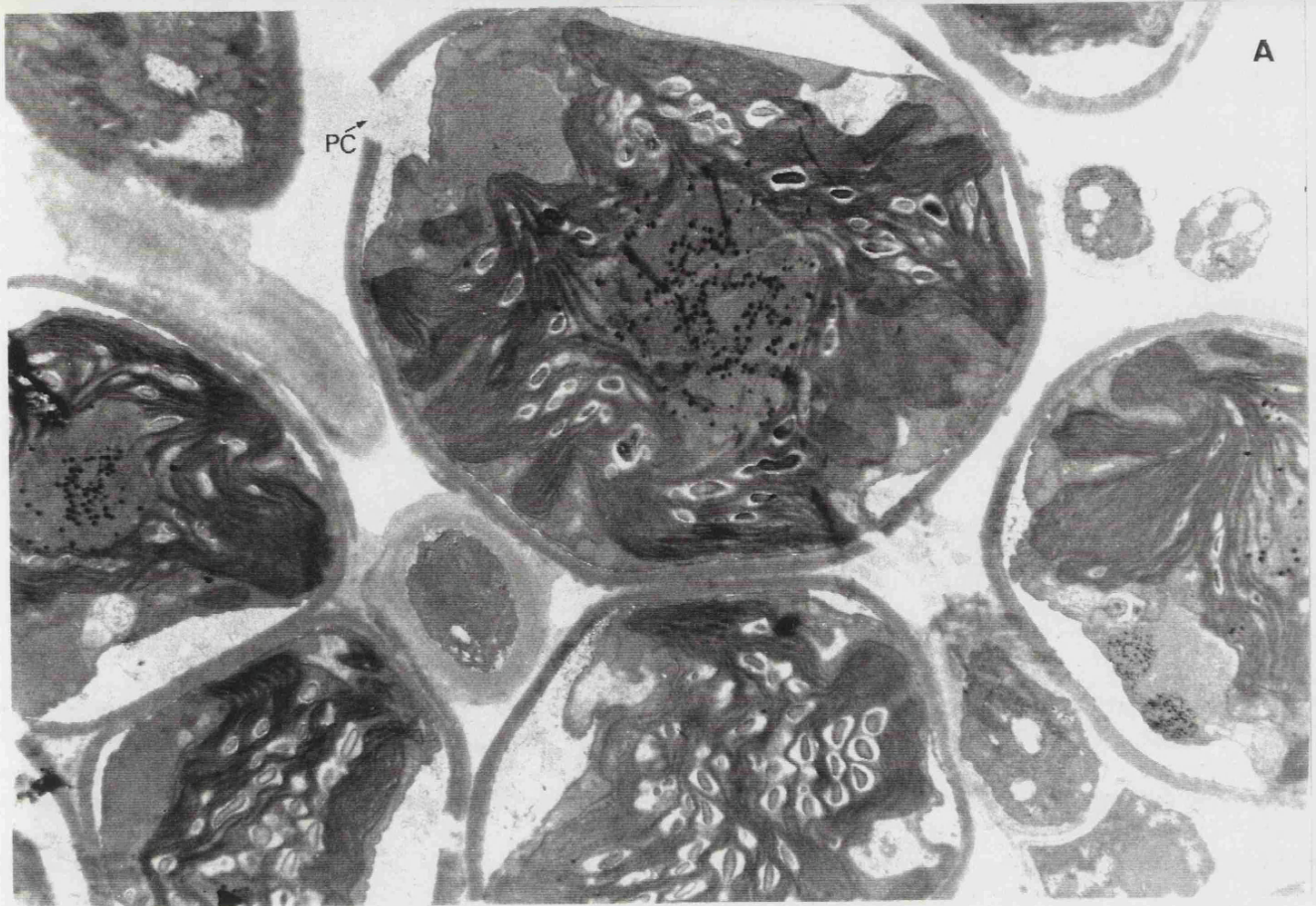


Figura 18. Imágenes del fotobionte de talos de *Anaptychia ciliaris* (A, x 11.172) y de *Ramalina farinacea* (B, x 7.980) sometidos al tratamiento control, tras 37 días de permanencia en las cámaras. Se observan síntomas de deterioro celular, tales como interrupciones de la pared celular (PC) o como regiones del pirenoides desprovistas de pirenoglóbulos (PG).

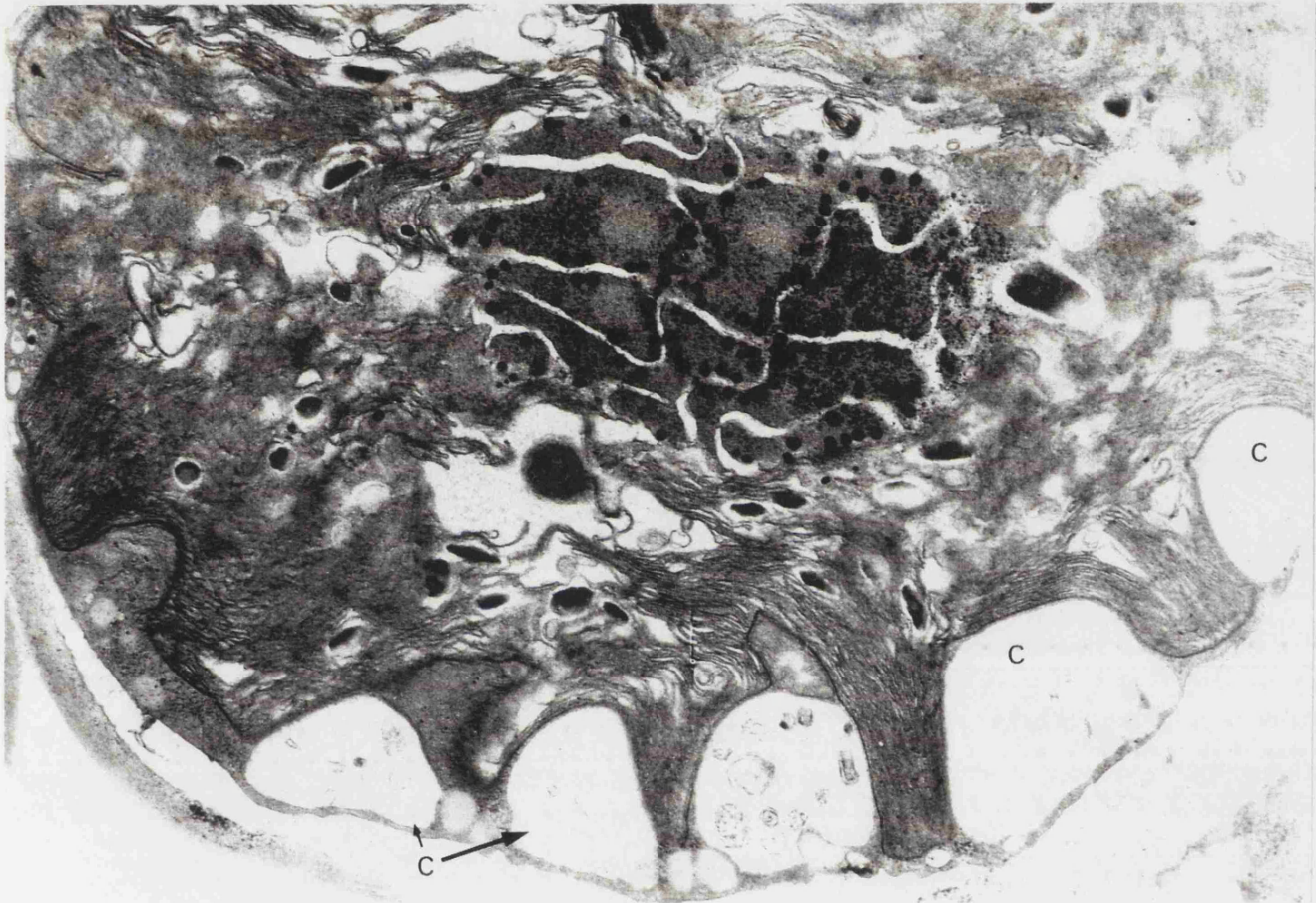


Figura 19. Detalle de los complejos multivesiculares (C) observables en células del fotobionte líquénico de talos sometidos al tratamiento control, tras 37 días de permanencia en las cámaras de experimentación. x 19.426.

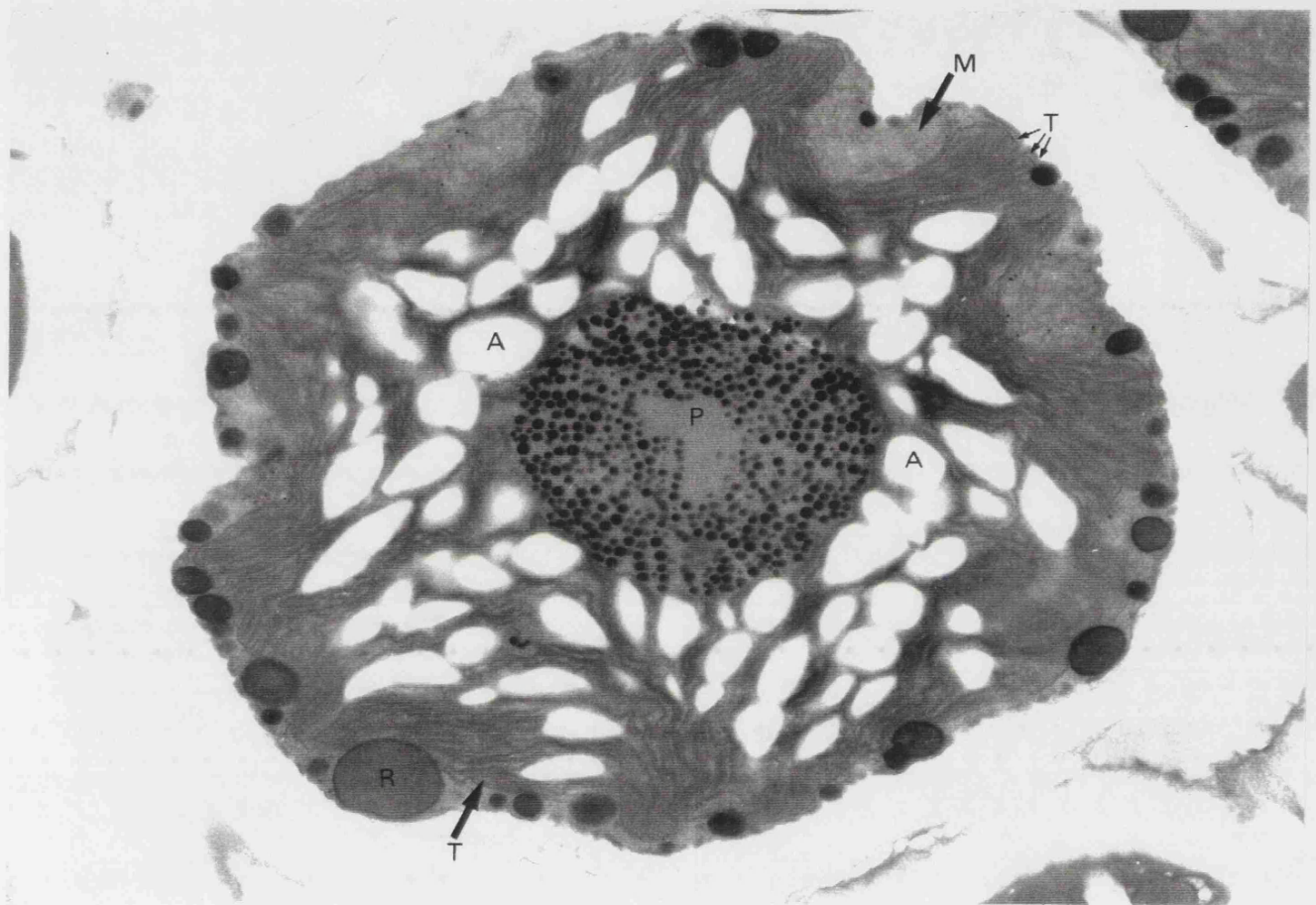


Figura 20. Célula algal de *Ramalina farinacea*, procedente del tratamiento control, mostrando su cloroplasto central con su pirenoide (P) provisto de numerosos pirenoglóbulos, gránulos de almidón (A) entre las láminas tilacoidales (T), mitocondrias (M) con crestas bien estructuradas, y cuerpos de reserva (R). x 18.240.



Figura 21. Imagen del fotobionte de *Ramalina farinacea* sometido al tratamiento con NO_3^- . x 16.758.

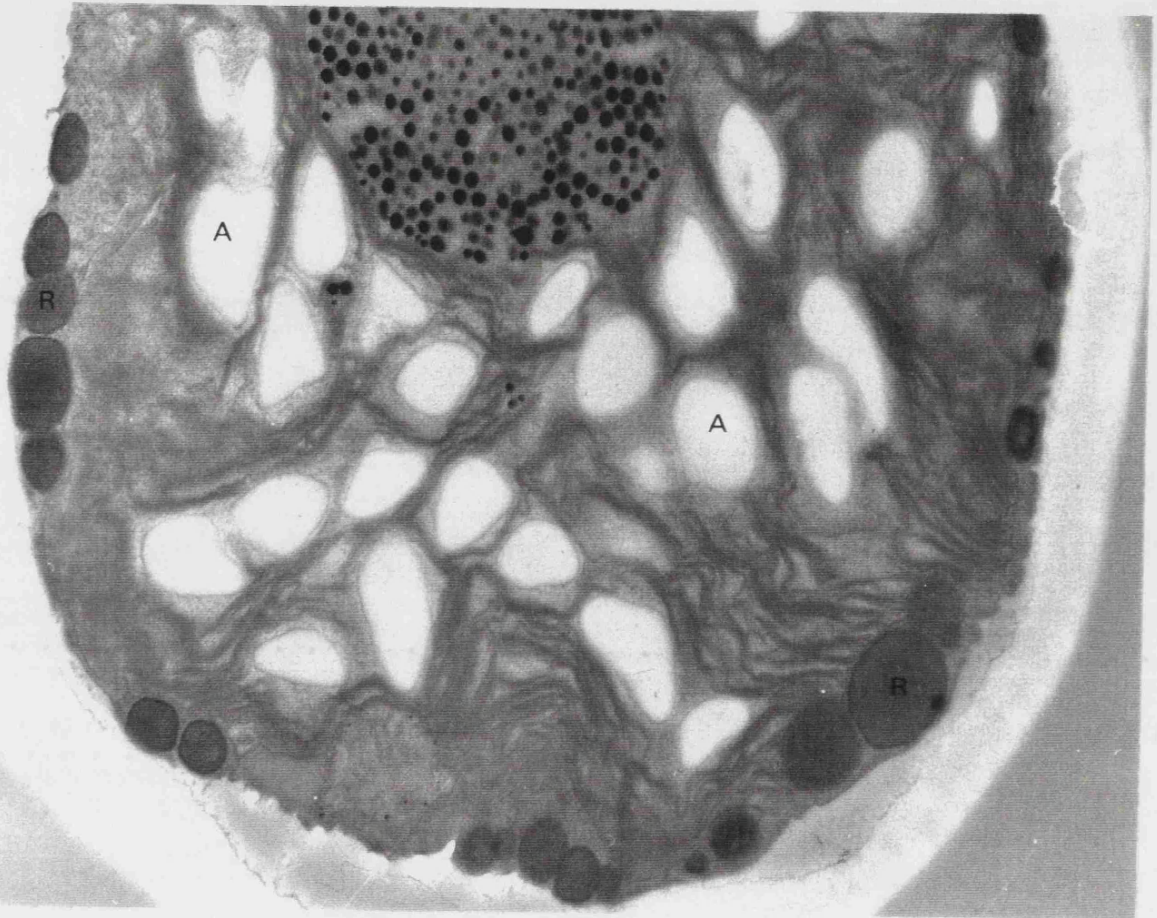


Figura 22. Detalle del fotobionte de *Ramalina farinacea* sometido al tratamiento con NO_3^- . Los cuerpos de reserva (R) y los gránulos de almidón (A) se encontraron en apariencia y número semejante a las células control. x 24.250.

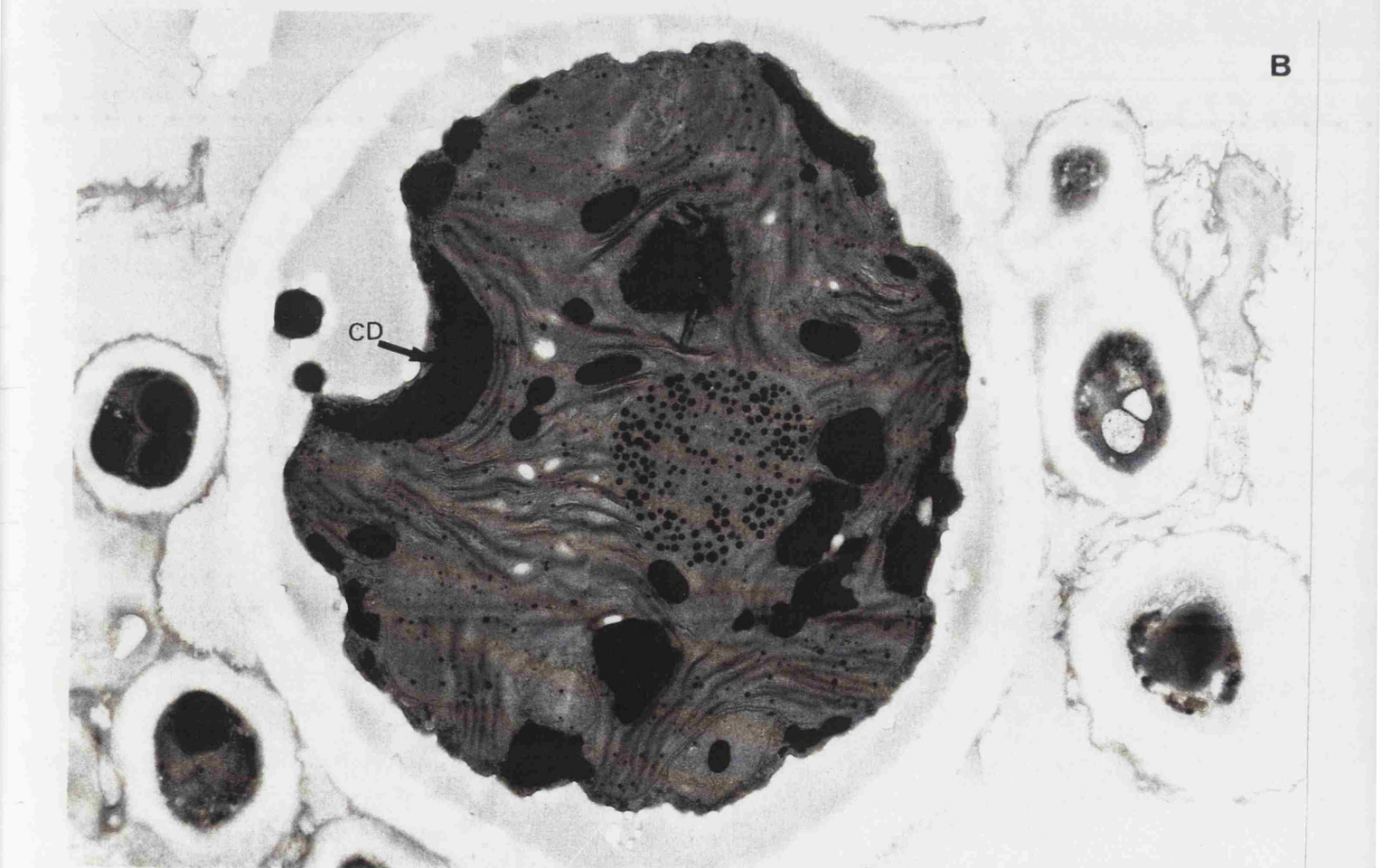
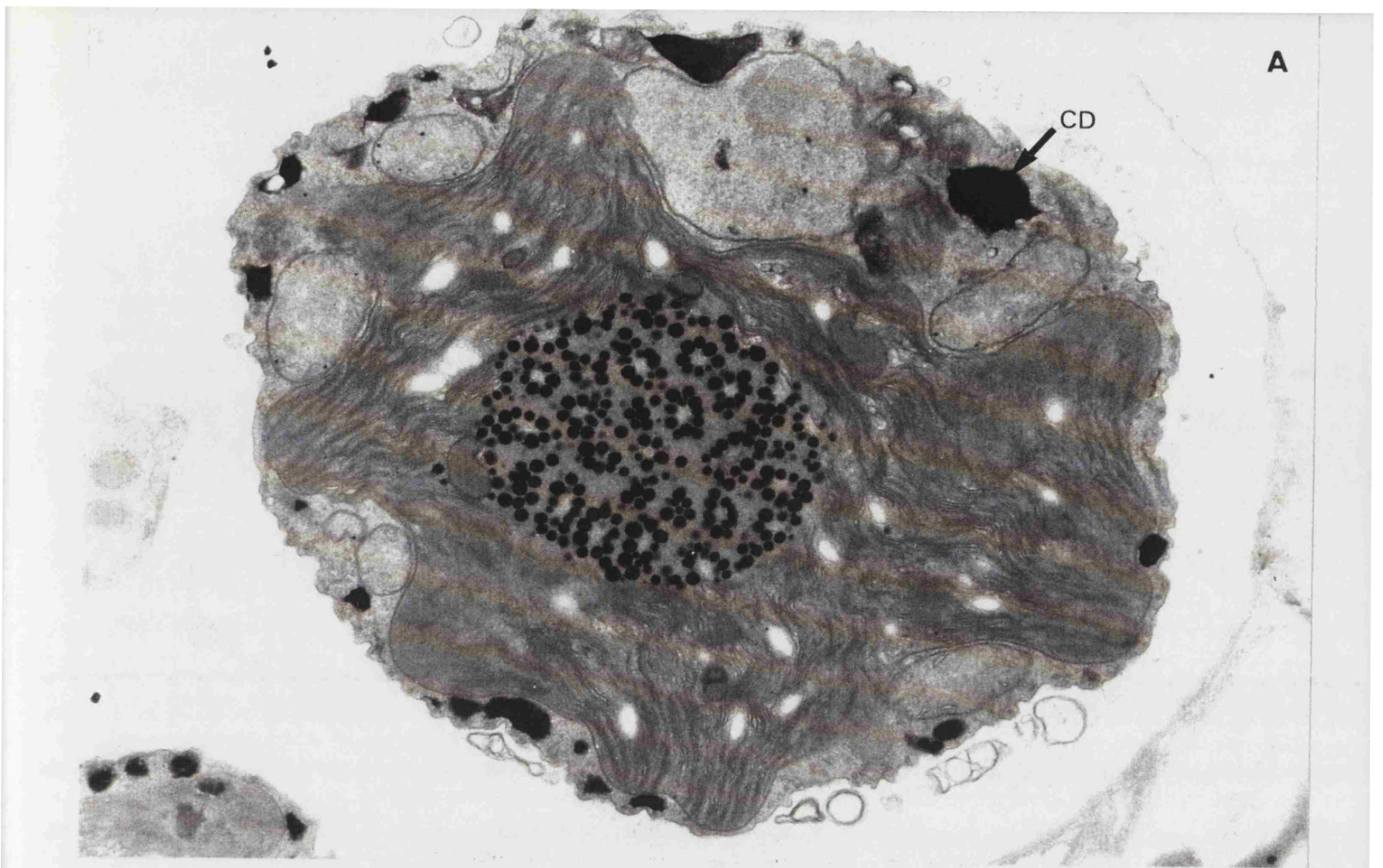


Figura 23. Imagen del fotobionte de *Ramalina farinacea*. En raras ocasiones se observaron cuerpos densos (CD) a los electrones, que se disponían hacia la periferia celular donde adoptan una forma de media luna, tanto tras el tratamiento con NO_3 (A, x 20.235), como tras la exposición a NO_3 en combinación con SO_2 (B, x 17.100).

Tabla 19

Experimento	2	3	4	5	6	7	8
Variable							
Niveles de SO₂							
ds	5587	12045	1708	846	1400	826	1736
sds	68.6	79.4	54.3	13	14.1	88.7	42.1
m	360	1160	282	165	170	400	230
a	360	1160	270	45	60	400	215
Aporte de NO₃							
n	50	50	50	50	50	50	50/1000
dn	2500	4300	700	300	500	7000	700/14000
Condiciones ambientales							
p	2.1	2.1	0	4.6	4.6	61.2	8.7
e	0.441	0.611	0.467	0.980	0.985	0.282	0.282
ch	8	12	0	0	0	0	11
f	0	0	0	0	0	0	4
te	11.8	12.2	14.2	19.2	18.8	13.3	7.2
h	63.1	62.3	78.3	61.7	65.3	99.9	64.6
Permanencia en las cámaras de experimentación							
ta	13	13	6	7	7	0	6
t	51	86	20	13	17	7	20
Nº de muestras/ tratamiento¹							
	6	6	10	10	10	8	5
Nº de muestras del punto cero²							
	-	-	10	10	-	-	5
Total	24	24	50	50	40	32	35

255 muestras analizadas, 5 "outliers", 250 valores de POA considerados.

¹ Tratamientos: control, con aporte de nitrato, fumigación con dióxido de azufre, exposición combinada a ambos contaminantes.

² Punto cero: Toma de muestras al finalizar el periodo de aclimatación y antes de iniciarse los tratamientos.

Como resultado del proceso de selección progresiva de variables se obtuvieron las variables ds , ds por f , y p por e .

El análisis realizado seleccionó así como mejores descriptores:

- la dosis de SO_2
- el efecto conjunto de SO_2 y heladas, y
- la precipitación en los días anteriores a la recolección, cuyo efecto varía estacionalmente.

Es interesante destacar la selección del efecto conjunto de heladas y SO_2 , dado que, en condiciones naturales, es precisamente en invierno, bajo situaciones anticiclónicas, cuando más frecuentemente se alcanzan valores máximos de inmisión de SO_2 . Es un hecho conocido que el SO_2 aumenta la vulnerabilidad de los vegetales frente a las adversidades del invierno en general, y más concretamente frente a las heladas (Davison & Barnes 1986; Davison, Barnes & Renner 1988). Una posible explicación es que el efecto del SO_2 se ve acentuado en invierno dado que, por lo general, los procesos metabólicos de reparación y detoxificación del vegetal se encuentran ralentizados (Jones & Mansfield 1982). Sin embargo, un factor cuya contribución en este efecto es especialmente importante cuando se estudian organismos poikilohídricos, como los líquenes, es que la solubilidad del SO_2 en el agua es más elevada a bajas temperaturas (Weast & Astle 1980).

En lo que se refiere a la selección de la variable fruto del producto de las precipitaciones por la estacionalidad, su alto valor descriptivo podría interpretarse en relación con el contenido del talo liquénico en iones lixiviables. Se ha demostrado que el contenido talino de algunos de estos iones varía de forma estacional (Boonpragob, Nash & Fox 1989; Boonpragob & Nash 1990). Entre estos iones se encuentra el NO_3^- , cuya variación no sólo depende de su capacidad de ser soluble en agua y, por ello, susceptible de ser arrastrado por el agua de lluvia, sino que incluso su concentración

en el propio agua de lluvia podría variar estacionalmente (Hicks 1989). A pesar de no haber sido seleccionadas las variables relacionadas con el aporte de NO_3^- , para el desarrollo de un modelo de regresión lineal, esta sustancia puede interactuar con el SO_2 , afectando a la respuesta líquénica, tal como se valorará posteriormente (véase el capítulo 5.2.4).

Superficie de respuesta al SO_2

Con las variables seleccionadas se ajustó el siguiente modelo mediante regresión múltiple:

$$\text{Log PQa} = b_0 + b_1 * ds + b_2 * ds * f + b_3 * p * e \quad (6)$$

Siendo b_i los coeficientes cuyos valores se recogen en la Tabla 20.

Del análisis de la varianza se concluye que el PQa se relaciona linealmente con al menos alguna de las variables independientes previamente seleccionadas. Es decir, se descarta la hipótesis de que todos los coeficientes sean iguales a cero ($P < 0.0001$).

Tabla 20

Coeficiente	Valor	Error típico	t	P
b_0	4.638	0.012	376.703	0.0001
b_1	-0.108E-3	3.288E-6	-32.823	0.0001
b_2	-0.003E-2	4.929E-6	-6.179	0.0001
b_3	-6.835E-3	2.051E-3	3.333	0.0010

El 83% de la variación del parámetro PQa es explicada por el presente modelo ($R^2 = 83\%$). Por otra parte, mediante el análisis de la t que contrasta que cada uno de estos coeficientes sea igual a cero, o dicho de otro modo, que al menos una de estas variables no mejore significativamente la estima, se rechaza en todos los casos esta hipótesis nula con el nivel de significación expuesto en la Tabla 20 para cada variable.

5.2.2. Cambios en la cinética de fluorescencia temprana de las clorofilas in vivo

El análisis de la cinética de fluorescencia inducida, ha sido frecuentemente utilizado para evaluar los efectos, en plantas vasculares, de estreses ambientales tales como los producidos por la exposición a altas temperaturas (Weis 1985, Schreiber & Bilger 1987), por la sequía (Cornic et al. 1989), la exposición a altas intensidades de luz (Krause 1988, Demmig-Adams et al. 1990a; Demmig-Adams et al. 1990b), el efecto de las heladas y la aclimatación a bajas temperaturas (Krause & Somersalo 1989), la depresión de la fotosíntesis al medio día (Demmig-Adams et al. 1989), la exposición a O₃ (Schreiber et al. 1978; Barnes & Davison 1986; Gries et al. 1992), etc. Sin embargo, no se conoce ningún estudio publicado que evalúe el efecto del SO₂ en la simbiosis líquénica, mediante el análisis de las variaciones en la cinética de la fluorescencia temprana de las clorofilas in vivo.

Por otra parte, la medida de los descriptores de la cinética de la señal de fluorescencia, y especialmente el análisis de F_v/F_p , ha sido descrita como el método que detecta con mayor antelación -mayor que cualquiera de los métodos ensallados hasta el momento- síntomas inespecíficos inducidos por estrés (Schreiber et al. 1978; Barnes & Davison 1986).

Por estos motivos, en este capítulo se abordará el estudio de los efectos atribuibles a la exposición en cámaras al SO₂ y al NO₃, por separado y en combinación, mediante la medida de F_v/F_p . Posteriormente, con el fin de valorar las posibles causas del potencial decaimiento de este parámetro, se analizará si las variaciones de F_v/F_p son debidas a cambios en los valores de F_o , de F_p , o de ambos, así como su relación con los efectos observados en el PQa y el contenido en clorofilas totales.

Decaimiento de F_v/F_p atribuible a la exposición al dióxido de azufre y al aporte de nitrato en ejemplares de Ramalina farinacea

Los valores obtenidos se han resumido en la Tabla 21. Tal como se describió en el apartado correspondiente (véase 4.4. *Fumigaciones controladas con dióxido de azufre*), los ejemplares se mantuvieron durante 7 días, bajo una intensidad de luz PAR de 350-400 $\mu\text{mol quanta/m}^2\cdot\text{s}$, a 13°C y 100% de humedad relativa. A la vista de los resultados obtenidos en el capítulo 5.1.2, esta prolongada exposición a intensidades de luz moderadamente elevadas explica el bajo valor medio de F_v/F_p obtenido en el tratamiento control, en comparación con los valores comprendidos entre 0.6 y 0.7, propios de ejemplares mantenidos en cámaras a bajas intensidades de luz o en su hábitat natural bajo el dosel vegetal (véase el capítulo 5.1.2).

El aporte de NO_3^- por sí mismo no produjo efecto alguno. Tras este tratamiento, los valores de F_v/F_p no diferían de los obtenidos en el tratamiento control, por lo que el aporte de NO_3^- parece no atenuar el ya mencionado efecto de la exposición prolongada a altas intensidades de luz.

Aún siendo bajo el valor medio control en términos comparativos, sin embargo la exposición al SO_2 redujo muy significativamente el valor de F_v/F_p ($P < 0.0001$). Esta reducción que tras la exposición a SO_2 representaba una caída del 57% respecto al valor medio control, se vió acentuada, hasta alcanzar el 80%, cuando a la exposición al SO_2 se sumaba un aporte de NO_3^- .

Este efecto de la combinación NO_3^- y SO_2 , más tóxico que el del SO_2 por separado, se reflejó en una reducción del valor de F_o . Esta reducción sólo fué significativa tras la acción conjunta de ambos contaminantes ($P < 0.0005$; Tabla 21).

La caída del valor de F_o se ha interpretado como indicadora de daños en los centros de reacción del PSII, y más concretamente de degradación de clorofilas

(Schreiber et al. 1978). Esta interpretación coincide con los datos de pigmentos, obtenidos a partir de extractos de los mismos talos utilizados para las medidas de la señal de fluorescencia. A la vista de los valores de PQa, se observó una feofitinización significativa ($P < 0.0006$) de la clorofila a tras la exposición a SO_2 , acentuada por el aporte simultáneo de NO_3^- (Tabla 21). Por otra parte, mientras que la caída de F_o ya era significativa, la variación en el contenido total en clorofilas sólo manifestaba una tendencia no significativa hacia valores más bajos, tras la exposición al SO_2 , sólo o en combinación con NO_3^- (Tabla 21).

A la reducción de F_o se sumó el decaimiento significativo de F_p como consecuencia de la exposición a SO_2 ($P < 0.0001$). Este efecto, de nuevo; se vió agravado por la mezcla de contaminantes. En vegetales sometidos a otros estreses, tales como sequía, senescencia o bajas temperaturas, en lugar de una caída de los valores de F_p , se observa un significativo incremento (Lichtenthaler 1987b; Ögren & Öquist 1985; Sundbond & Öquist 1982). Sin embargo, el decaimiento de F_p también ha sido observado tras la exposición a otros contaminantes atmosféricos como el O_3 (Barnes & Davison 1986; Schreiber et al. 1978). Esta bajada en los valores de F_p se debe a un descenso en el número de moléculas del aceptor primario (Q_A) que se reducen tras el pulso de luz actínica. Este descenso se explicaría si tuviera lugar una caída de la actividad enzimática encargada de la ruptura de las moléculas de agua al comienzo del proceso fotosintético (Schreiber et al 1978). Al bajar la eficiencia de esta actividad enzimática como consecuencia de la acción del contaminante, la presión de electrones procedentes del centro donante del PSII sería insuficiente para alcanzar niveles normales de reducción de la población de Q_A . En consecuencia, la exposición al SO_2 , sólo o en combinación con NO_3^- , podría no sólo haber inducido una feofitinización de las clorofilas, sino además posiblemente, daños en el centro lítico de agua. Sin embargo, no debe descartarse la posibilidad de que, en alguna medida, los iones sulfito y bisulfito en el medio intracelular, procedentes de la disolución del

SO₂ gaseoso, actúen como potenciales aceptores de electrones (Puckett et al. 1974), pudiendo interferir con el transporte electrónico hacia Q_A, y contribuyendo por tanto al descenso en los valores de F_p.

Tabla 21

Relación entre las variaciones en la cinética de fluorescencia y el estado de los pigmentos clorofilicos tras el el tratamiento con SO₂ y NO₃

	Control	SO ₂	NO ₃	SO ₂ +NO ₃
F _v /F _p	0.463±0.124 _a	0.202±0.158 _b	0.479±0.061 _a	0.088±0.164 _b
F _o	0.323±0.023 _a	0.216±0.158 _a	0.333±0.045 _a	0.083±0.153 _b
F _p	0.630±0.139 _a	0.318±0.257 _b	0.640±0.119 _a	0.128±0.235 _b
PQa	1.26±0.09 _a	1.11±0.10 _b	1.27±0.09 _a	1.04±0.16 _b
Clorofila a+b (µg/mg)	1.83±0.74 _{ab}	1.28±0.34 _b	2.13±0.46 _a	1.47±0.67 _b

Media ± Desviación típica. Los valores medios con el mismo subíndice no difieren significativamente (P>0.05) dentro de una misma variable de respuesta.

5.2.3. Alteraciones de la ultraestructura del fotobionte liquénico

Con el fin de completar el cuadro de síntomas ya observados y con el interés de analizar los primeros cambios detectables en Ramalina farinacea y Anaptychia ciliaris, atribuibles al efecto del SO₂, en este capítulo se abordará mediante el uso de técnicas de microscopía electrónica de transmisión (MET), el análisis de las alteraciones en la estructura subcelular. En primer lugar, se describirá de forma cualitativa la fenomenología observada y se comparará con la descrita para otras especies liquénicas. En segundo lugar, se comparará la información obtenida mediante esta técnica con la procedente del análisis de pigmentos clorofílicos. Por último, se valorará el efecto del aporte de NO₃⁻, por separado y en combinación con el SO₂, sobre la ultraestructura del fotobionte.

Evolución de los especímenes mantenidos bajo condiciones control

No se han detectado cambios cualitativos en la ultraestructura de los líquenes desde el momento de su recolección atribuibles al periodo de aclimatación en las cámaras de experimentación, ni tampoco como consecuencia de la duración del tratamiento, siempre que no fuera superior a 15 días. Sin embargo, en el experimento número 2, tras 37 días de permanencia de los líquenes en las cámaras, se observaron claros síntomas de deterioro celular, que no obstante no se volvieron a observar en el resto de los experimentos. Así, en las paredes del fotobionte aparecían interrupciones, tanto en las preparaciones de A. ciliaris como de R. farinacea (Fig 18a y 18b). Al mismo tiempo, en estas muestras, se observaron complejos multivesiculares, indicadores de una elevada actividad lisosómica propia de procesos de digestión de constituyentes celulares y de degradación celular (Fig. 19). Por otro

lado, se observaron anomalías en el pirenoide de R. farinacea, que si bien responde al tipo impressa (Friedl 1989), sin embargo, tras el largo periodo de permanencia de los talos en las cámaras, hidratados una vez al día con agua destilada, presentaba regiones desprovistas de pirenoglóbulos (Fig. 18b). No se detectaron anomalías semejantes en el pirenoide, tipo arboricola, del fotobionte de A. ciliaris (Fig. 18a). Los diferentes tipos de pirenoide en las especies estudiadas, impressa en R. farinacea y arboricola en A. ciliaris (Friedl 1989), ponen de manifiesto que ambas especies liquénicas difieren en la especie del fotobionte trebuxoide.

Tal como se ha mencionado, en las experiencias en las que los tratamientos no superaron los 15 días, no se observaron alteraciones en la ultraestructura del fotobionte de R. farinacea. En esta especie liquénica, las células algales mostraron el cloroplasto central con su pirenoide provisto de numerosos pirenoglóbulos, gránulos de almidón entre las láminas tilacoidales, mitocondrias con crestas bien definidas y cuerpos de reserva. Estos últimos, constituidos exclusivamente por lípidos sin membrana envolvente, y de una densidad homogénea (Fig. 20).

Efecto del aporte de nitrato

Tras el tratamiento con nitrato de los especímenes de ambas especies (Fig. 21), se observó que el aspecto ultraestructural del fotobionte se asemejaba mucho al que presentaron los controles no tratados. Los cuerpos de reserva y los gránulos de almidón se encontraron en apariencia y número semejante a las células control (Fig. 22), si bien, el uso de estudios cuantitativos precisos podría poner de manifiesto diferencias entre los efectos de ambos tratamientos.

En raras ocasiones se observaron unos cuerpos densos a los electrones, más frecuentes en la periferia celular, por debajo del plasmalema, donde adoptan la forma de media luna (Fig. 23a y 23b). Si bien estos cuerpos sólo se observaron tras el

tratamiento con NO_3^- , ya fuese aplicado sólo o en combinación con SO_2 , su significado es ambiguo. Para algunos autores, estas inclusiones osmiofílicas son inducidas por diversos compuestos nitrogenados, tanto en forma de nitrato como de amonio, y su presencia puede valorarse como indicadora de este tipo de compuestos en la atmósfera (Holopainen & Kärenlampi 1985; Holopainen 1986). Sin embargo, estos autores utilizaban concentraciones de NO_3^- doscientas veces superiores a la empleada en este estudio (0.01M frente a $50 \mu\text{M}$ de NaNO_3). No obstante, apoyando esta interpretación, recientemente se ha detectado un alto contenido en nitrógeno en estos cuerpos densos mediante técnicas de microanálisis de Rayos X (Tarhanen, Oksanen & Holopainen 1992). Para otros autores estos cuerpos podrían ser acúmulos de polifosfatos, observables en muestras tratadas con KH_2PO_4 (Chilvers et al. 1978; Ascaso & Fortun 1981). Por otro lado, hay datos que parecen indicar que en ciertos fotobiontes (Ascaso, Brown & Rapsch 1985) estas estructuras son un artefacto producido durante el proceso de preparación de la muestra para MET. Aunque en fotobiontes trebuxoides no se ha demostrado que la fijación para MET produzca este tipo de artefactos, no se descarta que puedan producirse por un efecto conjunto entre la acción del contaminante y el fijador.

Las células de las hifas del micobionte de los líquenes, tras el tratamiento con NO_3^- , presentaban numerosas vacuolas con contenido granular y los cuerpos concéntricos, aunque observables, estaban mal definidos en determinadas zonas del citoplasma (Fig. 24). Estos síntomas estarían en consonancia con la hipótesis de que el micobionte es más sensible a la contaminación por compuestos nitrogenados que el fotobionte (Holopainen & Kärenlampi 1985; Hällbom & Bergman 1979; Kauppi 1980a). Sin embargo, dicha afirmación sigue siendo tan sólo una hipótesis a contrastar en futuros estudios, que no sólo demuestren la aparición de los síntomas, sino que además valoren el significado y la repercusión de dichos síntomas en relación con la fisiología del micobionte.

Comparación entre las alteraciones en la ultraestructura y las variaciones del PQa, atribuibles a la acción del dióxido de azufre

En los casos en los que los valores medios de PQa de los talos tratados con SO₂ descendieron por debajo de la unidad, la ultraestructura celular del fotobionte se encontraba en un estado terminal de daño, en el que la perturbación de los sistemas de membrana había conducido a la plasmolisis celular, al mismo tiempo que los orgánulos se habían desintegrado y constituían una matriz heterogénea (Fig. 25). En casi la totalidad de los experimentos realizados, cuando los valores medios de PQa tras el tratamiento con SO₂ fueron superiores a la unidad, la diferencia con el valor de PQa control no fue significativa. En resumen, antes de que la respuesta en valores de PQa fuera significativa, la ultraestructura celular del fotobionte ya había sufrido severas alteraciones. Este fenómeno concuerda con lo descrito en experiencias previas, según las cuales la degradación de las clorofilas es un proceso que tiene lugar con posterioridad al decaimiento celular, quizás como consecuencia de que al menos aparentemente, las membranas tilacoidales son de las últimas estructuras en desintegrarse (Silva-Pando & Ascaso 1982; Holopainen & Kärenlampi 1984).

La adecuación de la MET para visualizar estados iniciales de daño, permitió la descripción de una sintomatología basada en las alteraciones en la estructura celular producidas por la exposición al SO₂. Para ello, se utilizaron aquellas imágenes obtenidas en experiencias donde el decaimiento del PQa o no era significativo o al menos no alcanzaba valores inferiores a 1; esto es, en el experimento 2 para el caso de A. ciliaris y 4 y 6 para el caso de R. farinacea.



Figura 24. Las células del micobionte de los talos de *Ramalina farinacea*, tras el tratamiento con NO_3^- , presentaban numerosas vacuolas con contenido granular (V) y los cuerpos concéntricos (CC), aunque observables, se encontraban mal definidos. x 39.900.



Figura 25. Estado terminal de degradación celular del fotobionte de *Ramalina farinacea*, tras la exposición a SO_2 . x 17.100.

Sintomatología producida por la exposición al SO₂

Antes de que el efecto del SO₂ fuera agudo se observó una elevadísima dispersión en la respuesta, posiblemente como consecuencia de la heterogeneidad de la población de algas en simbiosis dentro del talo, debida a las diferencias en cuanto a la fase del ciclo vital en que se encuentran, a su estado de actividad, etc (Greenhalgh & Anglesea 1979; Hill 1985; Larson & Carey 1986). La exposición al contaminante produjo que coexistieran estados muy tempranos de alteración ultraestructural con otros en los que aparecían células absolutamente colapsadas y degeneradas, en estrecha proximidad (Fig. 26), fenómeno que también ha sido observado en anteriores estudios (Kauppi 1980b).

En los primeros estadios de afección por la exposición a SO₂, las células algales no parecieron sufrir grandes cambios en la forma y lobulación del cloroplasto, si bien sí se observó un acusado descenso de la densidad de tilacoides en su interior (Fig. 27). La mayor extensión de los espacios intertilacoidales dejaba al descubierto zonas del estroma con un aspecto granuloso. Al igual que en los controles, los granos de almidón estaban presentes en el estroma.

En el citoplasma, las mitocondrias (Figura 28) presentaban en su interior estructuras semejantes a figuras de mielina. El aspecto externo de estas figuras parece indicar que están formadas por membranas ordenadas concéntricamente, pudiéndose pensar que los lípidos que las forman pueden tener su origen en la degradación de algunas de las crestas. Esta idea parece confirmarse al observar que en aquellas células, en un estado más avanzado de degradación, en las que se observaban los primeros síntomas de alteración del cloroplasto, las mitocondrias ya aparecían con su matriz y sus crestas destruidas (Figura 29). Este hecho apoya la hipótesis de que en los líquenes el primer orgánulo diana de la acción del SO₂ es la mitocondria, entendiéndose por diana, aquel orgánulo que primero manifiesta alteraciones

estructurales, si bien queda por dilucidar si también son primeras dianas desde el punto de vista funcional.

En una secuencia creciente de alteración celular, la membrana se fué separando de la pared mostrando moderados niveles de plasmolisis, posiblemente como consecuencia de perturbaciones de su permeabilidad. A medida que la plasmolisis era más pronunciada, el cloroplasto, el núcleo y los cuerpos de reserva lipídicos fueron perdiendo su integridad, hasta sólo ser discernible, en el seno de la masa resultante, la presencia de gránulos de almidón y restos del pirenoide. Ya en este estado terminal la membrana celular aparecía rota y la célula ya colapsada dejaba escapar su contenido. Esta secuencia de daños coincide con la descrita por Holopainen & Kauppi (1989) para Bryoria capillaris Ach. Brodo e Hypogymnia physodes (L.) Nyl.

Influencia del aporte de nitrato en la respuesta al dióxido de azufre

Prácticamente no se observaron estados iniciales de alteración de la estructura celular, dado que cuando el efecto del SO_2 por separado era leve la mezcla con NO_3^- resultó ser sinérgicamente más tóxica, y cuando el decaimiento inducido por el SO_2 era severo, el aporte simultáneo de NO_3^- , aún comportándose como un antagónico, no llegaba a elevar los valores medios de PQa por encima de la unidad (véase el capítulo 5.2.4). Aún teniendo presente esta limitación, no se observaron síntomas distintos a los ya descritos.

Es interesante destacar que siempre se observó una total coincidencia entre PQa y el análisis de la estructura celular por MET, en lo que se refiere al patrón de respuesta a la mezcla de estos contaminantes. Esta coincidencia se evidenció en el experimento 4, en el que frente a los efectos inducidos por la exposición al SO_2 por separado (Fig. 27), tras el tratamiento con la mezcla de contaminantes se observó un



Figura 26. La exposición a SO_2 produjo que coexistieran estados muy tempranos de alteración ultraestructural con otros en los que aparecían células absolutamente colapsadas y deterioradas, en estrecha proximidad. x 11.400.



Figura 27. En las primeras fases de afección por la exposición a SO_2 , las células algales no parecieron sufrir grandes cambios en el cloroplasto, si bien sí se observó un acusado descenso de la densidad de tilacoides, dejando al descubierto zonas del estroma con aspecto granuloso (E). x 13.965.

marcado efecto sinérgico resultado del cual todas las células algales aparecían colapsadas (Fig. 30). Al igual que en los estados terminales producidos por la exposición al SO_2 , tras el tratamiento con $\text{SO}_2 + \text{NO}_3^-$, se distinguían restos del pirenoide destruido y restos de almidón (Fig. 31).

5.2.4. Influencia del aporte de nitrato en la respuesta al dióxido de azufre

La mayor parte de la investigación en torno a los líquenes como organismos sensibles a la contaminación atmosférica se centra en el análisis de los efectos producidos por la exposición al SO_2 como contaminante aislado (Fields 1988).

Sin embargo, en la atmósfera, este contaminante coexiste con otros, originados también en procesos de combustión. Tal es el caso de los óxidos de nitrógeno (NO_x) (Nash 1976). A su vez, los NO_x constituyen una fuente adicional de nitratos (NO_3^-) para la vegetación (Tingey et al. 1971; Halliwell 1984; UK TERG 1988).

Así, con frecuencia los vegetales se verán sometidos al efecto inducido por la combinación de SO_2 y NO_3^- . En plantas vasculares ha sido ampliamente analizado el efecto sinérgico de esta combinación (UK RGAR 1987). Por el contrario, en líquenes, los potenciales efectos sinérgicos inducidos por mezclas de contaminantes constituyen una faceta poco analizada (Fields 1988). En este sentido, se ha sugerido que la presencia de polvo atmosférico rico en nitrógeno puede neutralizar el efecto sobre los líquenes del SO_2 así como el de otros contaminantes ácidos (Kauppi 1980a; Kauppi & Mikkonen 1980; Kauppi & Halonen 1992). Algunos autores han observado que altos contenidos de nitrato en repetidos episodios de lluvia ácida, no sólo neutralizan el efecto de los sulfatos sino que además tienen un marcado efecto fertilizante sobre los líquenes de bosques boreales (Scott et al. 1989).

Por contra, el descubrimiento de que determinadas combinaciones de SO_2 y NO_3^- pueden producir un daño más severo que el SO_2 como único agente, incluso cuando

ninguno de los dos contaminantes por separado produce un decaimiento significativo, justifica una ulterior investigación acerca de los efectos de esta combinación de contaminantes (Balaguer & Manrique 1991).

En un capítulo anterior (5.2.1.2. *Efecto inducido por exposiciones crónicas a SO₂*), se valoraron las relaciones lineales entre los efectos inducidos por ambos contaminantes, sin embargo, dado que las posibles interacciones entre ellos introducen un término no lineal en el modelo de respuesta a la mezcla de contaminantes, en este capítulo se abordará el análisis de todos los tipos de respuesta observados.

En primer lugar, se analizarán las variaciones del PQa, como porcentaje del valor medio control, en respuesta a fumigaciones durante periodos medios de exposición a concentraciones bajas de SO₂, sólo o en combinación con NO₃, en talos de Ramalina farinacea (Tabla 19, experimentos 4, 5, 6 y 8). En esta primera parte, se tratarán las relaciones entre los distintos tipos de respuesta, así como la posibilidad de predecir la respuesta a la combinación SO₂+NO₃.

En segundo lugar y para concluir el capítulo, se expone con mayor profundidad el tipo de respuesta sinérgica en Ramalina farinacea, Anaptychia ciliaris y Evernia prunastri, dado que se trata de la primera vez que este patrón se observa en líquenes (Tabla 19, experimentos 2 y 4). Previamente, se comparará la sensibilidad de estas especies frente a ambos contaminantes por separado.

Respuesta a la combinación SO₂+NO₃ en relación con la respuesta inducida por ambos contaminantes por separado

Tal como se ha descrito en capítulos anteriores la exposición al SO₂ produce un decaimiento significativo del PQa (5.2.1.2. *Efecto inducido por exposiciones crónicas*

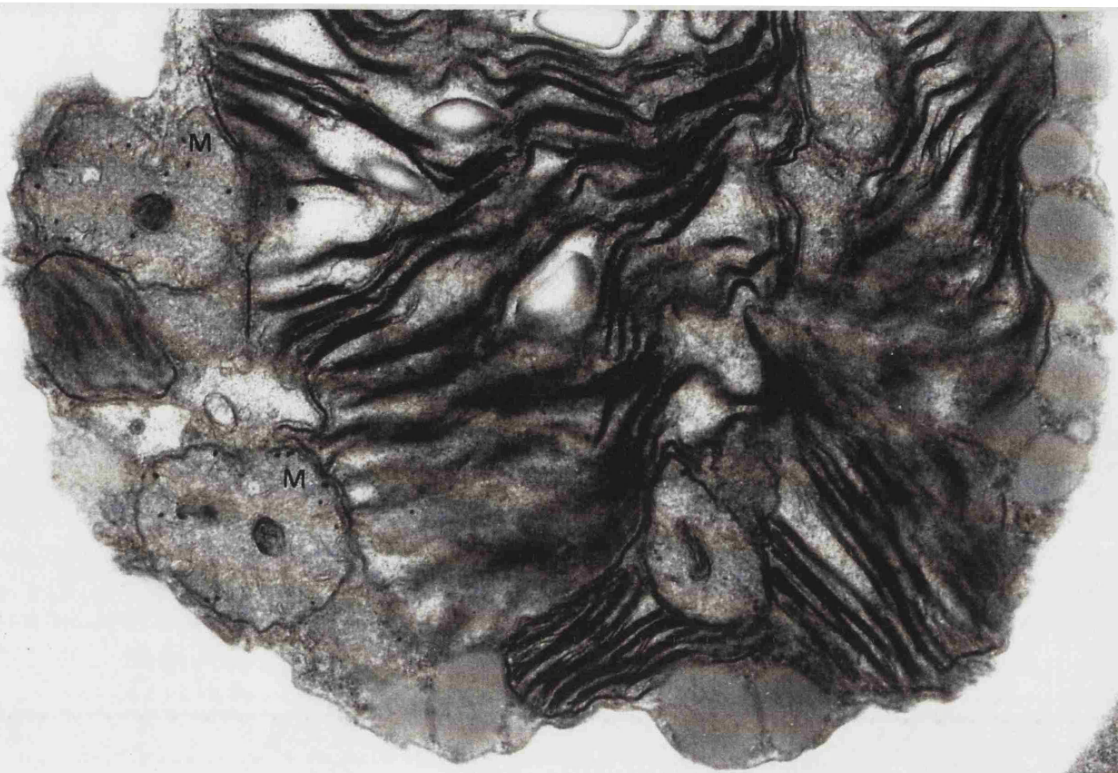


Figura 28. La mitocondria (M) del fotobionte líquénico fué el primer orgánulo donde se acusaron alteraciones atribuibles a la exposición al SO_2 . En ellas, se observaban estructuras semejantes a figuras de mielina. x 31.350.

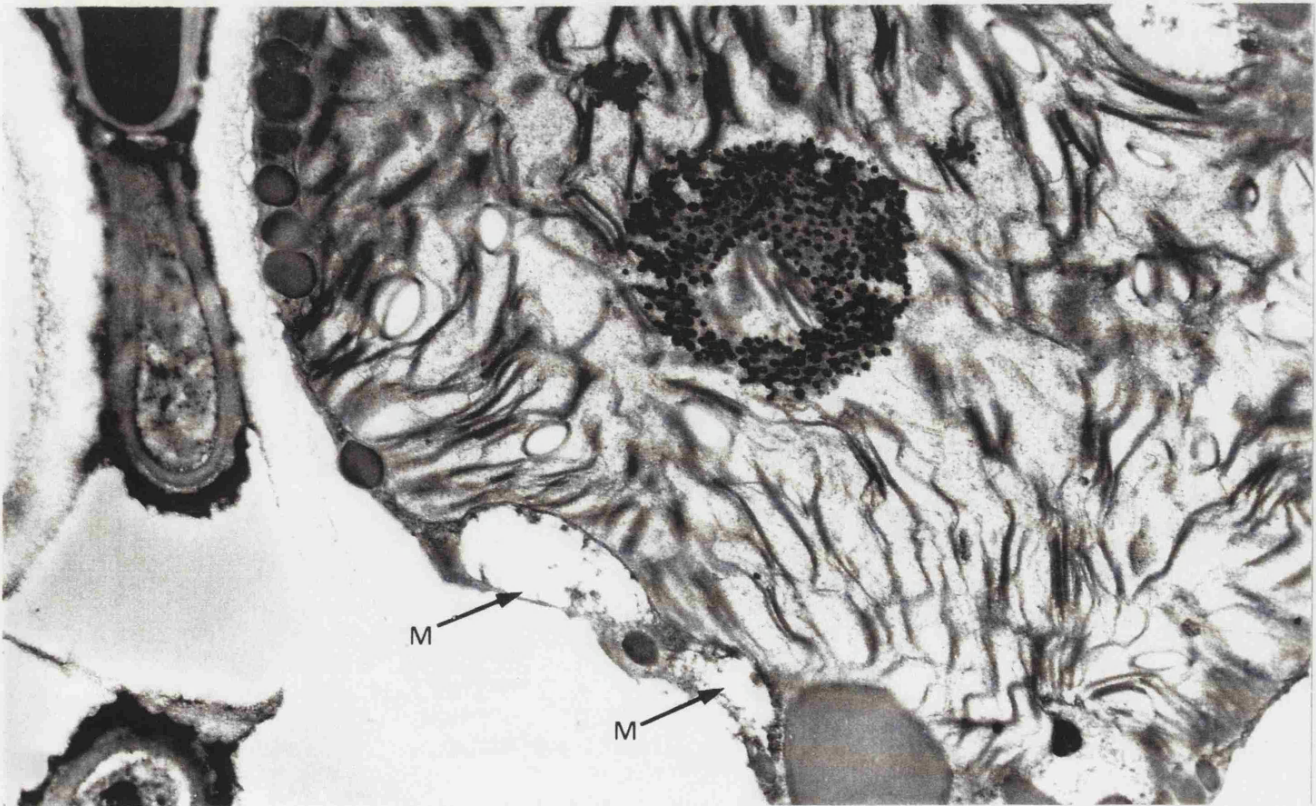


Figura 29. Detalle del avanzado estado de deterioro de las mitocondrias (M) del fotobionte líquénico tras la exposición a SO_2 . x 17.100.

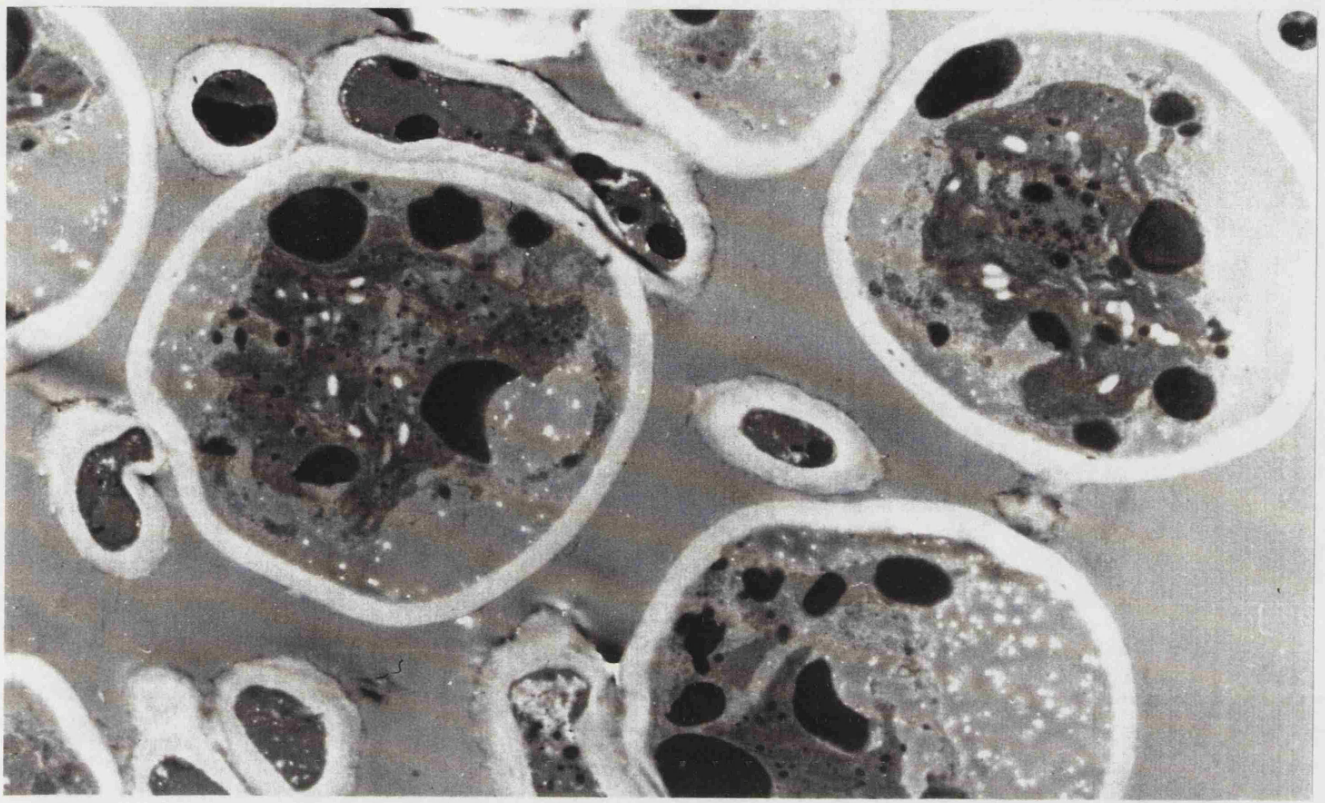


Figura 30. La combinación de NO_3^- y SO_2 , en ocasiones, indujo un marcado efecto sinérgico que se manifestó en una acusada degradación de las células algales. x 7.980.

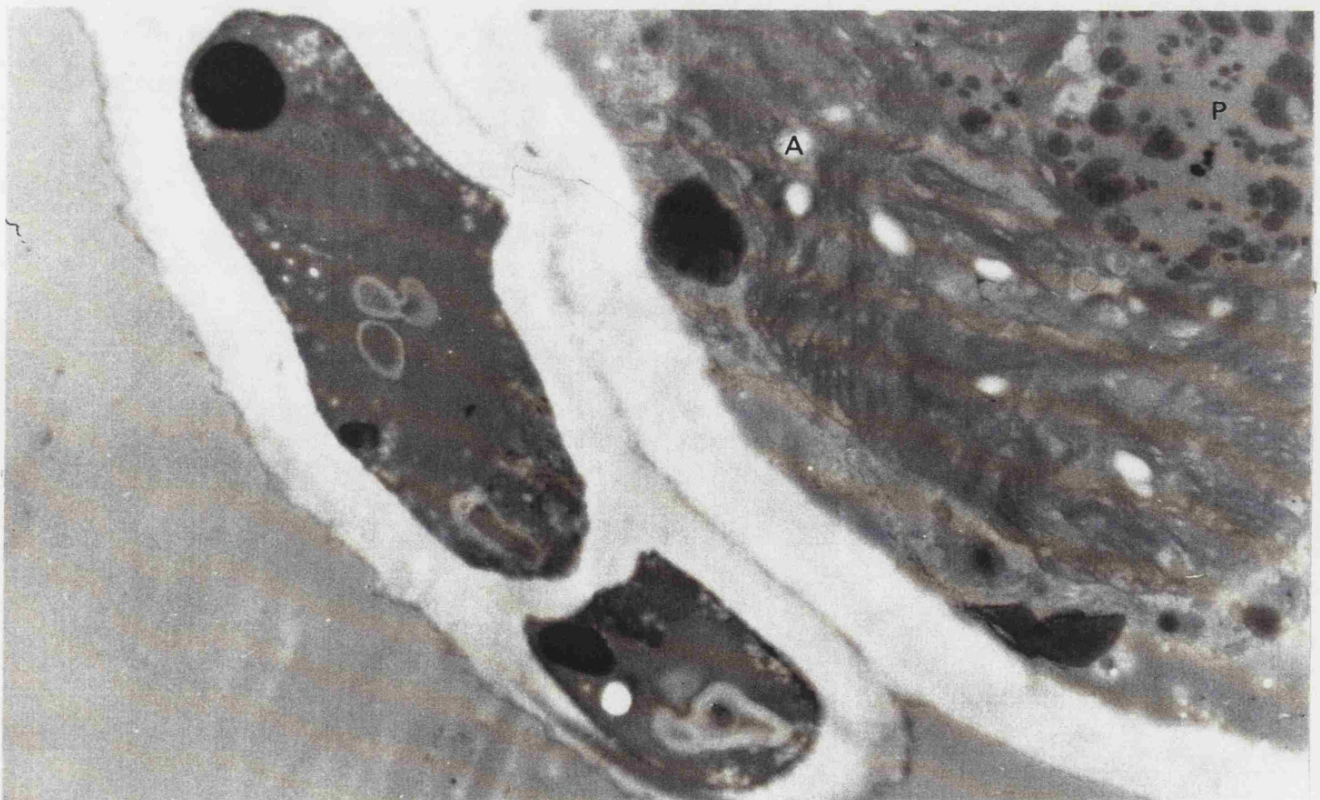


Figura 31. En las células del fotobionte sólo se distinguían restos del pirenoide destruido (P) y de gránulos de almidón (A), como consecuencia del sinergismo entre el SO_2 y el NO_3^- . x 20.235.

a SO_2). Sin embargo, en ninguno de los experimentos considerados en este capítulo se observó efecto significativo alguno atribuible únicamente al tratamiento con NO_3^- . Ahora bien, si se suministra esa misma concentración de NO_3^- a talos que están siendo simultáneamente expuestos a SO_2 , se puede observar (Fig. 32):

- (i) un efecto sinérgico de la combinación de ambos contaminantes, más dañino que el inducido por el SO_2 (Fig. 32a),
- (ii) ningún efecto (Fig. 32b y 32c),
- (iii) un efecto atenuante del daño inducido por SO_2 (Fig. 32d).

Estos resultados aparentemente contradictorios, responden a un patrón común. El sinergismo se observó cuando el tratamiento con SO_2 por separado no indujo un descenso del PQa significativo en relación al control (experimento 4, Fig. 32a). Por el contrario, el nitrato amortiguó significativamente el efecto inducido por SO_2 , cuando el efecto dañino de este contaminante por separado fue máximo (experimento 8, Fig. 32d).

Para valorar en qué medida el efecto combinado de ambos contaminantes difería del que cabría esperar suponiendo un patrón aditivo de respuesta, se restó al valor medio de PQa obtenido tras el tratamiento $\text{SO}_2 + \text{NO}_3^-$, la suma de los valores medios de PQa procedentes de los tratamientos con estos contaminantes por separado, considerando con signo positivo el decaimiento y negativo el ascenso del PQa respecto al control:

$$\text{Efecto no aditivo} = \text{PQa}_{\text{SO}_2 + \text{NO}_3} - (\text{PQa}_{\text{SO}_2} + \text{PQa}_{\text{NO}_3}) \quad (1)$$

De esta forma, un efecto sinérgico se corresponde con valores positivos y por el contrario, un efecto mitigador con valores negativos. El efecto no aditivo presentó una elevada correlación con los valores medios de PQa procedentes del tratamiento con SO_2 solamente ($r = -0.78$). Esta correlación fué superior a la observada entre el efecto no aditivo y las dosis de contaminantes utilizadas en el tratamiento combinado

(dosis de SO₂, r = 0.16; dosis de NO₃⁻, r = 0.23).

La transformación logarítmica del porcentaje de decaimiento del PQa por efecto del SO₂, explicó más del 80% del efecto no aditivo de la combinación (R² = 81.1%):

$$\text{Efecto no aditivo} = 28 - 11 * \text{Log} (\text{PQa}_{\text{SO}_2}) \quad (2)$$

Dado las expresiones (1) y (2) presentan la misma variable dependiente, pueden ser igualadas:

$$\text{PQa}_{\text{SO}_2+\text{NO}_3} - (\text{PQa}_{\text{SO}_2} + \text{PQa}_{\text{NO}_3}) = 28 - 11 * \text{Log} (\text{PQa}_{\text{SO}_2}) \quad (3)$$

A partir de la expresión (3) y tras un análisis de regresión múltiple realizado con el fin de ajustar los coeficientes, el descenso medio del PQa inducido por la combinación SO₂+NO₃⁻ puede predecirse conociendo los efectos de ambos contaminantes por separado:

$$\text{PQa}_{\text{SO}_2+\text{NO}_3} = 454 + 21 * \text{PQa}_{\text{SO}_2} + 24 * \text{PQa}_{\text{NO}_3} - 295 * \text{Log} (\text{PQa}_{\text{SO}_2}) \quad (4)$$

Esta función explicó el 96.9% (R²) de la respuesta al tratamiento conjunto con ambos contaminantes, expresada como porcentaje medio de decaimiento del PQa en relación a los valores control.

Comparación de la sensibilidad a SO₂ y a NO₃⁻ de E. prunastri, R. farinacea y A. ciliaris

Antes de proceder a valorar el efecto sinérgico de la combinación, es interesante analizar cuales fueron las respuestas de las distintas especies liquénicas estudiadas, a ambos contaminantes por separado. En este sentido, tras la

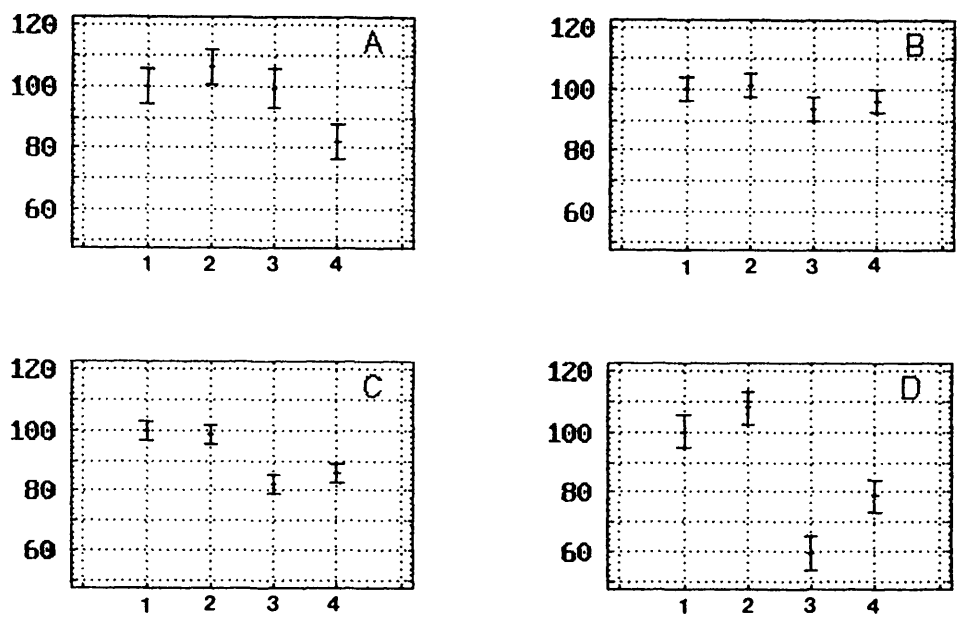


Figura 32. Variación del PQA tras el tratamiento control (1), nitrato (2), dióxido de azufre (3), o la combinación de ambos contaminantes (4), en cuatro experimentos distintos (A, experimento nº 4; B, experimento nº 5; C, experimento nº 6; D, experimento nº 8). Las barras de error representan los intervalos de confianza del 95%, basados en un test LSD.

comparación de medias de los tratamientos aplicados en el experimento 2, se observó que como consecuencia de la fumigación con 151 ppb de SO₂ durante 38 días, los valores de PQa de E. prunastri y R. farinacea eran significativamente más bajos (Tablas 23 y 24). Por el contrario, A. ciliaris se comportó como una especie menos sensible, dado que no experimentó una caída significativa atribuible a la fumigación con SO₂ (Tabla 22). Este hecho contrasta con las escalas de sensibilidad al SO₂ propuestas por los modelos desarrollados en Reino Unido, en las que se presentaba a R. farinacea y E. prunastri como especies más tolerantes que A. ciliaris (Hawksworth & Rose 1970; James 1982).

Salvo en A. ciliaris, en que se observó un efecto estimulante en la proporción clorofila a/feofitina a, el tratamiento con nitrato no indujo cambios significativos, si bien, las medias del tratamiento con nitrato fueron en todos los casos superiores a las medias del tratamiento control.

Efecto sinérgico inducido por la combinación de SO₂ y NO₃⁻

El análisis de la varianza de dos factores en A. ciliaris, puso de manifiesto un significativo sinergismo de la combinación SO₂+NO₃⁻. El efecto resultante del tratamiento con ambos contaminantes es, por tanto, más dañino que el que cabría esperar por simple adición de los efectos observados cuando se aplican por separado (P<0.01). Este patrón de respuesta se ajusta al descrito en el epígrafe anterior para fumigaciones crónicas de R. farinacea, esto es, el efecto no significativo del tratamiento con SO₂ se corresponde con un significativo efecto sinérgico de la mezcla de contaminantes.

Aunque las medias del tratamiento con SO₂+NO₃⁻ en E. prunastri y R. farinacea (151 ppb SO₂ durante 38 días) fueron el 10% y el 8% más bajas que los respectivos tratamiento con SO₂, este descenso no es significativo. Sin embargo, los valores de

PQa en los tratamientos con SO₂, sólo o en combinación con NO₃⁻, fueron extremadamente bajos, hecho que puede ser atribuido a que ambos tratamientos en las dos especies (SO₂ y SO₂+NO₃⁻) hayan sido tan intensos que su resultado sea un nivel mínimo del PQa. Esta interpretación también explicaría por qué la respuesta de estas dos especies no se ajusta al patrón descrito previamente.

Para contrastar esta hipótesis, en el siguiente experimento, se seleccionó una de las especies en que no se detectaba sinergismo y se redujo la exposición a SO₂ a 14 días y su concentración a 122 ppb (Tabla 19, experimento 4). En esta experiencia se observó, de forma significativa, el efecto sinérgico de la combinación, al mismo tiempo que los valores de PQa en las muestras tratadas sólo con SO₂, no difirieron significativamente de los del control (Tabla 25, Fig. 32a).

Tabla 22

Comparación de tratamientos en A. ciliaris

Método: LSD. Intervalos del 95%				
Tratamientos	N	Media	S.D.	Grupos Homogéneos
Control	6	1.10	0.23	a
Dióxido de azufre	6	1.02	0.12	ab
Nitrato	6	1.34	0.12	c
Ambos contaminantes	6	0.91	0.07	b

Tabla 23
 Comparación de tratamientos en *E. prunastri*

Método: LSD. Intervalos del 95%				
Tratamientos	N	Media	S.D.	Grupos Homogéneos
Control	6	1.19	0.09	a
Dióxido de azufre	6	0.66	0.11	b
Nitrato	6	1.20	0.09	a
Ambos contaminantes	6	0.59	0.16	b

Tabla 24
 Comparación de tratamientos en *R. farinacea* (experimento 2)

Método: LSD. Intervalos del 95%				
Tratamientos	N	Media	S.D.	Grupos Homogéneos
Control	6	1.03	0.10	a
Dióxido de azufre	5	0.72	0.28	b
Nitrato	6	1.12	0.12	a
Ambos contaminantes	6	0.65	0.16	b

Tabla 25
 Comparación de tratamientos en *R. farinacea* (experimento 4)

Método: LSD. Intervalos del 95%				
Tratamiento	N	Media	S.D.	Grupos Homogéneos
Control	10	1.17	0.10	a
Dióxido de azufre	10	1.13	0.18	a
Nitrato	10	1.24	0.13	a
Ambos contaminantes	10	0.96	0.21	b

5.3. Seguimiento *in situ* de la evolución de Anaptychia ciliaris

Se ha realizado un seguimiento de la calidad atmosférica de la Comarca del Bajo Maestrazgo y los Puertos de Morella mediante bioindicadores liquénicos, durante el periodo comprendido entre junio de 1988 y julio de 1991. Este estudio se basaba en el análisis de la evolución de ejemplares autóctonos y transplantados al área de estudio, pertenecientes a la especie Anaptychia ciliaris. Como variables de respuesta, se midieron el contenido en clorofilas y la proporción clorofila a/feofitina a (Índice de Feofitinización, PQa) en los especímenes muestreados. El PQa es una medida temprana de daños en vegetales causados por la exposición a contaminantes ácidos, tal como ha sido contrastado en experiencias tanto de laboratorio como de campo. Dada la sensibilidad de la variable PQa, así como de la especie liquénica considerada, los síntomas que se observen en transplantes, no deben interpretarse como degradación del ecosistema, sino como indicadores de riesgo de daño potencial, en caso de persistir las causas que los indujeron.

En total se han prospectado 28 estaciones, de las que se han analizado un total de 380 muestras.

5.3.1. Evaluación de la respuesta liquénica por estaciones de muestreo

En este capítulo se recogerán los resultados obtenidos en cada una de las estaciones de muestreo, así como una valoración sucinta de la evolución de cada una de las estaciones a lo largo de los cuatro años del seguimiento realizado.

Los datos se expondrán en formato de ficha y en ella se recoge:

- Número y nombre de la Estación

- Localización en cuadrícula U.T.M.
- Altitud sobre el nivel del mar.
- Sustrato sobre el que se desarrollaban los ejemplares.
- Número de muestras analizadas por año.
- Valores medios \pm Desviación típica del PQa.
- Nivel de Significación de la variación registrada entre los valores del PQa de cada año.
- Pendiente de la recta de regresión ajustada por Mínimos Cuadrados considerando el PQa de los ejemplares transplantados (a excepción de Selas) como variable dependiente frente al año de recogida de muestras.
- Valores medios y Desviación típica del Contenido en Clorofilas totales (μg de clorofila a + b/mg de talo liquénico).
- Nivel de Significación de la variación registrada entre los contenidos en clorofilas de cada año.
- Descripción de la evolución de la estación considerada.
- Representación gráfica de los valores de PQa y recta de regresión a partir de los valores de los transplantes.
- Representación gráfica de los valores de los contenidos en clorofilas totales.

1, Selas

30TWL7635 1.000 m.s.m.

- Sustrato

transplantes: -
 autóctonos: Quercus faginea

- Muestras analizadas

	1988	1989	1990	1991
transplantes:	-	-	-	-
autóctonos:	-	4	4	4

- Índice de Feofitización (PQa)

	1988	1989	1990	1991	P
transplantes:	-	-	-	-	-
autóctonos:	1.44±0.04	1.44±0.05	1.44±0.03	1.38±0.04	NS

Pendiente de evolución del PQa de transplantes = -0.016

- Contenido en clorofilas totales (µg/mg de talo)

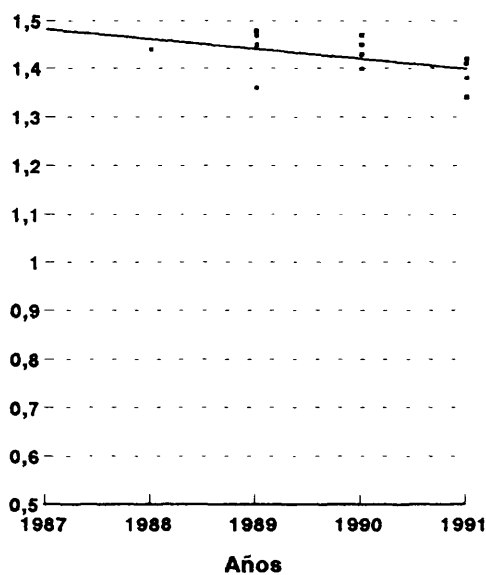
	1988	1989	1990	1991	P
transplantes:	-	-	-	-	-
autóctonos:	1.30±0.19	1.23±0.12	1.51±0.07	1.43±0.16	NS

- Descripción: Estación control en la que no se observa variación significativa ni en el PQa, ni en el contenido en clorofilas, a lo largo de las cuatro campañas

Nota: Los valores de 1988 corresponden a las medias de los transplantes realizados.

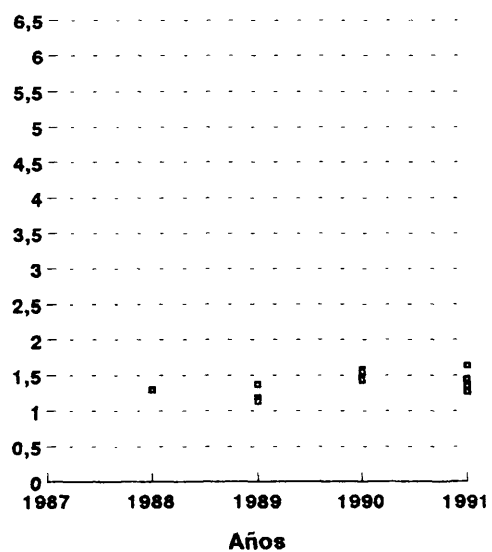
Media ± Desviación típica. NS=No significativo, * = P<0.05, ** = P<0.01, *** = P<0.001.

PQa



Autóctono

Clorofilas totales (µg/mg)



Autóctono

2,3, San Pablo de los Montes

30SUJ8378

900 m.s.m.

-Sustrato

transplantes: Quercus pyrenaica - Pinus pinaster

autóctonos: -

-Muestras analizadas

	1988	1989	1990	1991
transplantes en Roble:	-	4	4	4
transplantes en Pino:	-	4	4	4

-Índice de Feofitinización (PQa)

	1988	1989	1990	1991	P
Sobre Roble:	-	1.41± 0.04	1.40± 0.05	1.28± 0.17	NS
Sobre Pino:	-	1.42± 0.02	1.33± 0.04	1.37± 0.04	*

Pendiente de evolución de PQa de transplantes (R)=-0.051 (P)=-0.032

-Contenido en clorofilas totales (µg/mg de talo)

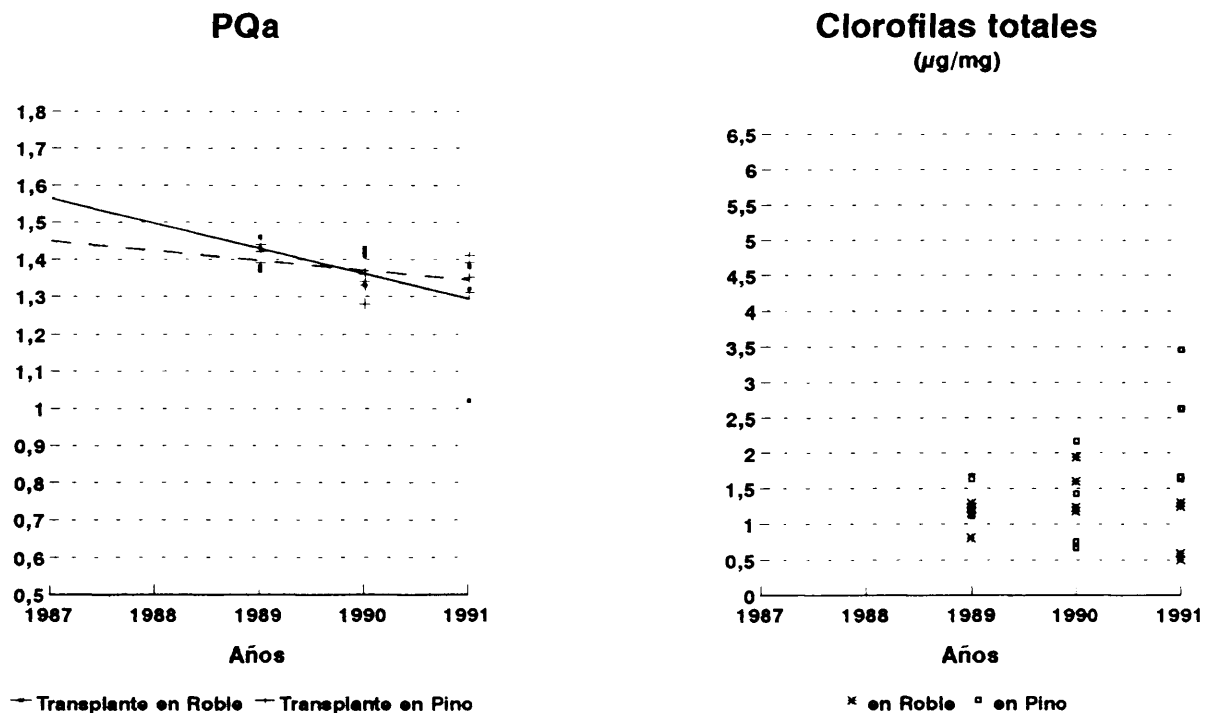
	1988	1989	1990	1991	P
Sobre Roble:	-	1.12± 0.22	1.49± 0.35	0.91± 0.42	NS
Sobre Pino:	-	1.41± 0.28	1.26± 0.70	2.35± 0.87	NS

-Descripción:

Estación control de valores de inmisión conocidos.

Se observa un decaimiento significativo del PQa de los talos transplantados sobre pino, en el año 1990.

Media±Desviación típica. NS=No significativo, * = P<0.05, ** = P<0.01, *** = P<0.001.



4, Casa del Forestal

30TYL478097 1.100 m.s.m.

-Sustrato

transplantes: Pinus nigra

autóctonos: -

-Muestras analizadas

	1988	1989	1990	1991
transplantes:	4	4	4	4
autóctonos:	-	-	-	-

-Índice de Feofitinización (PQa)

	1988	1989	1990	1991	P
transplantes:	1.44±0.03	1.44±0.01	1.39±0.04	1.30±0.16	*
autóctonos:	-	-	-	-	-

Pendiente de evolución del PQa de transplantes = -0.046

-Contenido en clorofilas totales (µg/mg de talo)

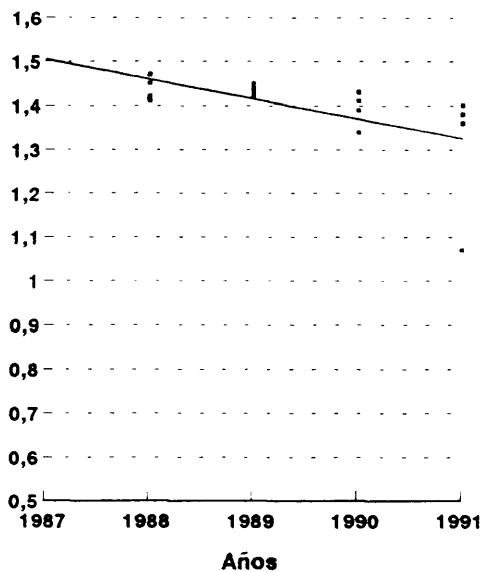
	1988	1989	1990	1991	P
transplantes:	1.26±0.39	1.76±0.52	2.04±1.16	1.90±1.44	NS
autóctonos:	-	-	-	-	-

-Descripción:

Decaimiento significativo del PQa de pendiente moderada. A pesar del marcado incremento en la dispersión de los datos, las medias se mantienen en torno a valores de PQa óptimos.

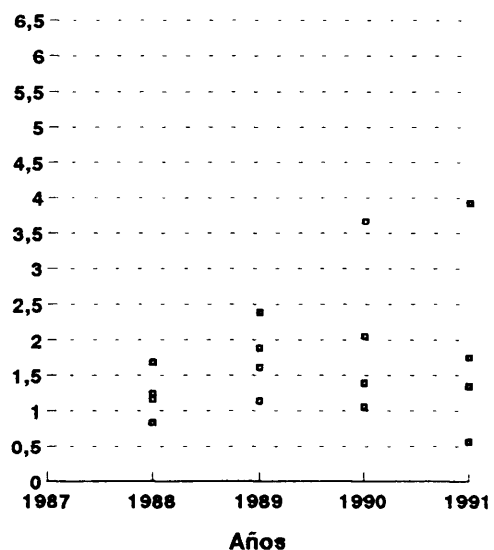
Media±Desviación típica. NS=No significativo, * = P<0.05, ** = P<0.01, *** = P<0.001.

PQa



— Transplante

Clorofilas totales (µg/mg)



□ Transplante

5,19, Fuentespalda

31TBF502198 660 m.s.m.

-Sustrato

transplantes: Pinus halepensis
 autóctonos: Quercus rotundifolia

-Muestras analizadas

	1988	1989	1990	1991
transplantes:	4	2	0	0
autóctonos:	3	1	0	0

-Índice de Feofitización (PQa)

	1988	1989	1990	1991	P
transplantes:	1.45±0.03	1.41±0.07	-	-	-
autóctonos:	1.39±0.03	1.47	-	-	-

Pendiente de evolución del PQa de transplantes = -

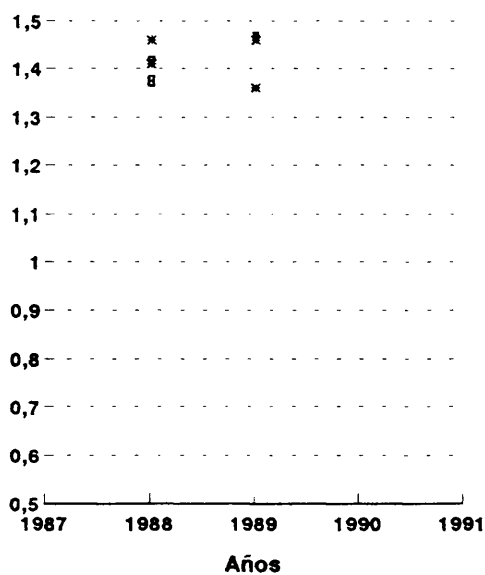
-Contenido en clorofilas totales (µg/mg de talo)

	1988	1989	1990	1991	P
transplantes:	1.45±2.71	1.28±0.76	-	-	-
autóctonos:	2.11±	3.12	-	-	-

-Descripción: Ambas estaciones (5 y 19) se deshecharon por la desaparición tanto de ejemplares transplantados como de autóctonos.

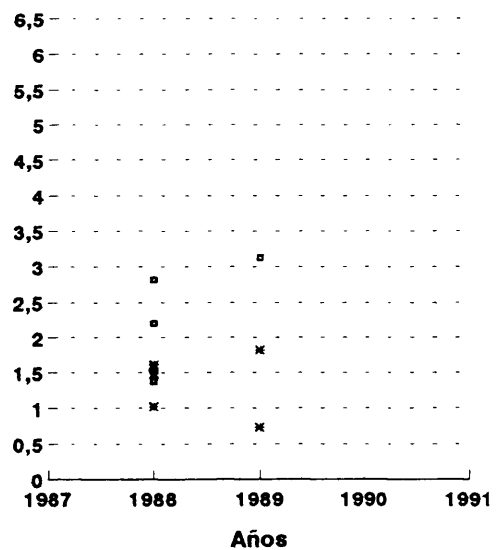
Media±Desviación típica. NS=No significativo, * = P<0.05, ** = P<0.01, *** = P<0.001.

PQa



* Transplante □ Autóctono

Clorofilas totales (µg/mg)



* Transplante □ Autóctono

6,20, Ermita de San Albert

31TBF499119 780 m.s.m.

- Sustrato

transplantes: Pinus halepensis
 autóctonos: Quercus rotundifolia

- Muestras analizadas

	1988	1989	1990	1991
transplantes:	4	4	4	4
autóctonos:	3	4	4	4

- Índice de Feofitinización (PQa)

	1988	1989	1990	1991	P
transplantes:	1.47±0.01	1.45±0.03	1.26±0.38	1.21±0.23	NS
autóctonos:	1.42±0.08	1.47±0.03	1.45±0.01	1.42±0.02	NS

Pendiente de evolución del PQa de transplantes = -0.091

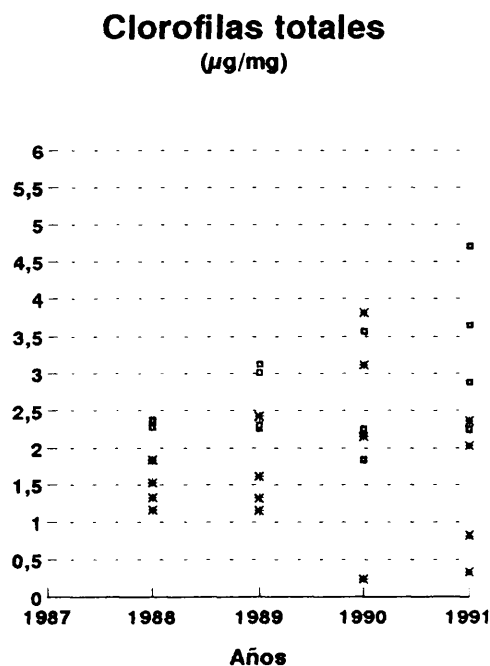
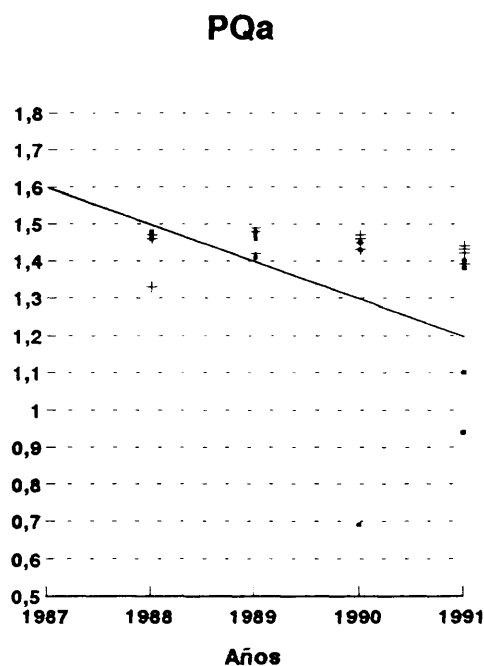
- Contenido en clorofilas totales (µg/mg de talo)

	1988	1989	1990	1991	P
transplantes:	1.45±0.29	1.63±0.56	2.33±1.55	1.39±0.97	NS
autóctonos:	2.13±0.29	2.68±0.45	2.46±0.78	3.37±1.06	NS

- Descripción:

Pronunciada pendiente de decaimiento del PQa de los transplantes, que no llega a ser significativo dada la gran dispersión en los valores registrados.

Media ± Desviación típica. NS=No significativo, * = P<0.05, ** = P<0.01, *** = P<0.001.



x Transplante + Autóctono

x Transplante □ Autóctono

7,21, Castell de Cabres

31TBF507048 1.060 m.s.m.

-Sustrato

transplantes: Pinus nigra
 autóctonos: Quercus faginea

-Muestras analizadas

	1988	1989	1990	1991
transplantes:	4	4	2	2
autóctonos:	2	4	4	4

-Índice de Feofitización (PQa)

	1988	1989	1990	1991	P
transplantes:	1.45±0.03	1.26±0.17	1.04±0.57	1.36±0.04	NS
autóctonos:	1.46±0.01	1.41±0.12	1.44±0.03	1.40±0.02	NS

Pendiente de evolución del PQa de transplantes = -0.061

-Contenido en clorofilas totales (µg/mg de talo)

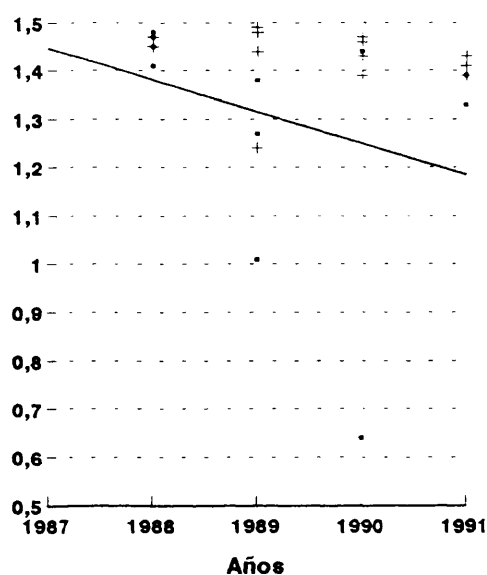
	1988	1989	1990	1991	P
transplantes:	1.36±0.29	0.62±0.32	1.42±0.54	3.08±0.49	NS
autóctonos:	2.91±0.68	1.60±0.23	2.00±0.51	1.95±0.40	NS

-Descripción:

Se observa una bajada en los valores medios de PQa de los transplantes durante 1989 y 1990, acompañada de un aumento de la desviación típica.

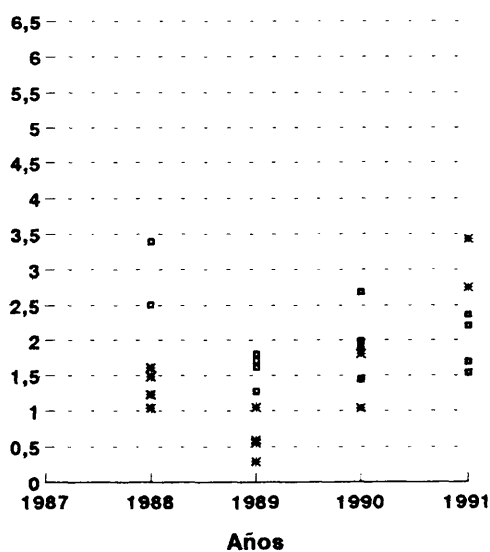
Media ± Desviación típica. NS=No significativo, * = P<0.05, ** = P<0.01, *** = P<0.001.

PQa



+ Transplante + Autóctono

Clorofilas totales (µg/mg)



* Transplante ◻ Autóctono

8,22, Herbés

30TYL509087 1.140 m.s.m.

-Sustrato

transplantes: Pinus nigra
 autóctonos: Quercus faginea

-Muestras analizadas

	1988	1989	1990	1991
transplantes:	4	4	4	4
autóctonos:	3	4	4	4

-Índice de Feofitinización (PQa)

	1988	1989	1990	1991	P
transplantes:	1.44±0.06	1.46±0.03	1.35±0.07	1.33±0.06	*
autóctonos:	1.43±0.03	1.45±0.02	1.44±0.04	1.34±0.11	NS

Pendiente de evolución del PQa de transplantes = -0.044

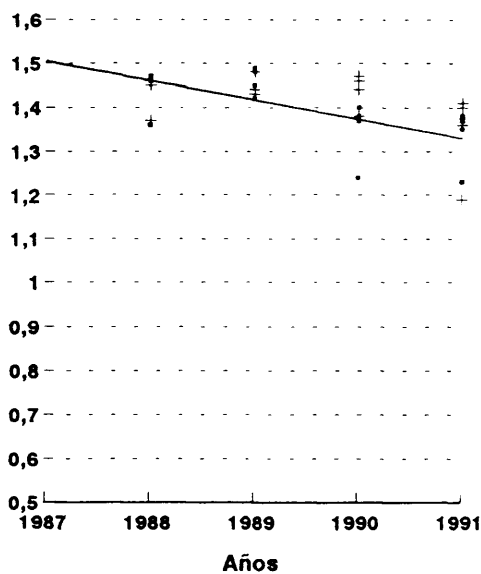
-Contenido en clorofilas totales (µg/mg de talo)

	1988	1989	1990	1991	P
transplantes:	1.65±0.78	1.38±0.13	1.81±0.33	1.76±0.45	NS
autóctonos:	2.04±0.48	1.53±0.45	1.24±0.41	1.20±0.33	NS

-Descripción: Decaimiento significativo del PQa de transplantes, si bien los valores medios se encuentran próximos al óptimo.

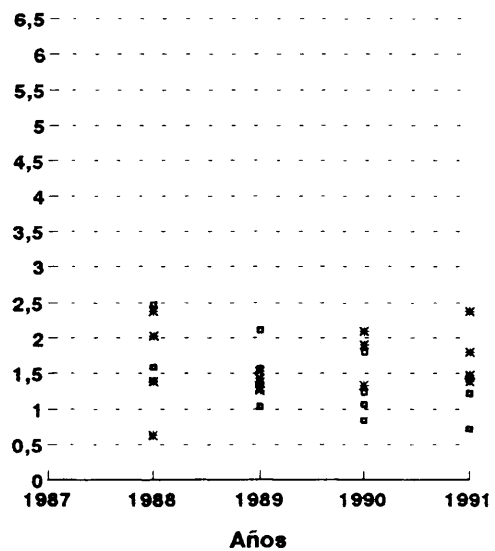
Media ± Desviación típica. NS=No significativo, * = P<0.05, ** = P<0.01, *** = P<0.001.

PQa



— Transplante + Autóctono

Clorofilas totales (µg/mg)



x Transplante o Autóctono

9,23, Corachar

31TBF533079 1.200 m.s.m.

-Sustrato

transplantes: Pinus nigra

autóctonos: Pinus sylvestris - Crataegus monogyna

-Muestras analizadas

	1988	1989	1990	1991
transplantes:	4	4	4	4
autóctonos:	0	3	4	4

-Índice de Feofitinización (PQa)

	1988	1989	1990	1991	P
transplantes:	1.43±0.05	1.30±0.09	1.26±0.09	1.04±0.15	**
autóctonos:	-	1.01±0.25	1.33±0.18	1.41±0.03	NS

Pendiente de evolución del PQa de transplantes = -0.126

-Contenido en clorofilas totales (µg/mg de talo)

	1988	1989	1990	1991	P
transplantes:	1.26±0.39	1.40±0.29	1.51±0.56	0.90±0.15	NS
autóctonos:	-	2.14±1.80	1.15±0.33	2.36±0.48	NS

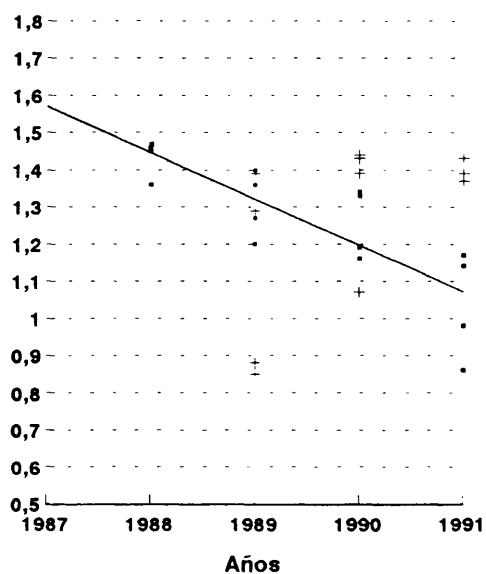
-Descripción:

Decaimiento muy significativo del PQa de transplantes, unido a una pronunciada pendiente de bajada, que indican que se trata de una estación con síntomas de daño.

El ascenso no significativo del PQa de autóctonos puede ser debido al sustrato (Pino en 1989; Majuelo en 1990 y 1991)

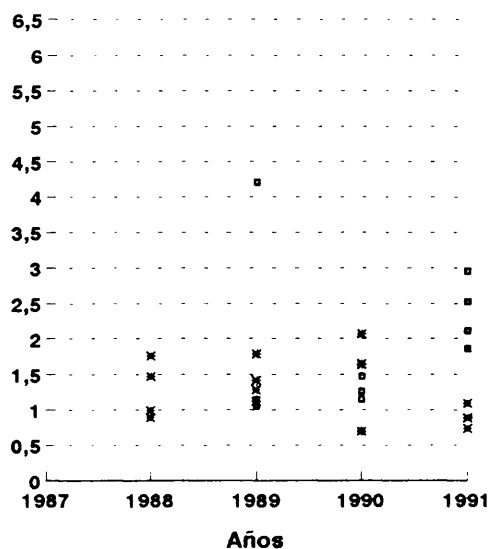
Media ± Desviación típica. NS=No significativo, * = P<0.05, ** = P<0.01, *** = P<0.001.

PQa



• Transplante × Autóctono

Clorofilas totales (µg/mg)



× Transplante □ Autóctono

10, Pico del Aguila

31TBF531045 1.150 m.s.m.

-Sustrato

transplantes: Pinus nigra
 autóctonos: -

-Muestras analizadas

	1988	1989	1990	1991
transplantes:	4	4	4	4
autóctonos:	-	-	-	-

-Índice de Feofitinización (PQa)

	1988	1989	1990	1991	P
transplantes:	1.45±0.01	1.12±0.30	1.05±0.34	1.09±0.20	*
autóctonos:	-	-	-	-	-

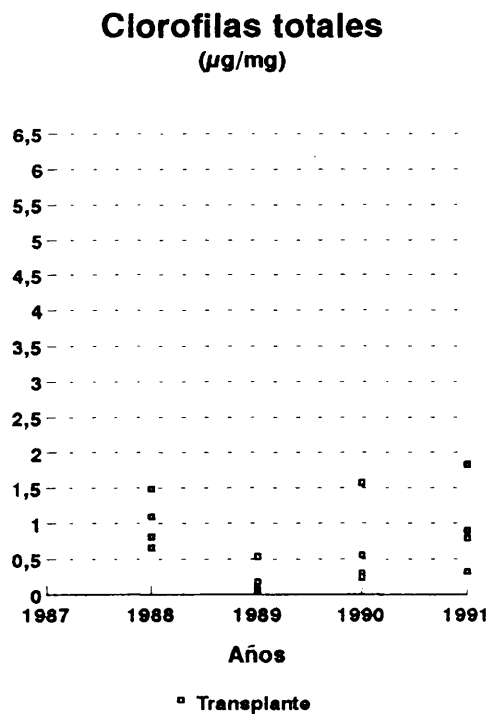
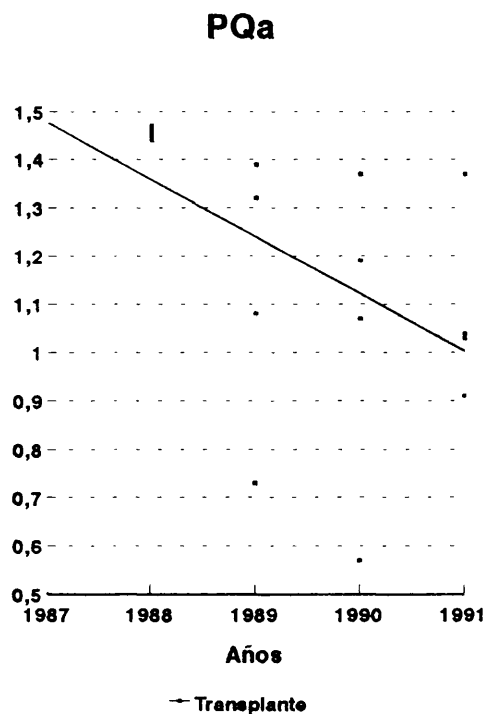
Pendiente de evolución del PQa de transplantes = -0.114

-Contenido en clorofilas totales (µg/mg de talo)

	1988	1989	1990	1991	P
transplantes:	0.97±0.39	0.21±0.22	0.67±0.62	0.96±0.63	NS
autóctonos:	-	-	-	-	-

-Descripción: Estación con síntomas de daño: marcada pendiente de descenso del PQa de transplantes, bajada significativa del PQa que llega a alcanzar valores indicativos de degradación total de las clorofilas, lo cual se corresponde con los muy bajos valores de clorofilas registrados. A todo ello se une una elevada dispersión de los datos.

Media ± Desviación típica. NS=No significativo, * = P<0.05, ** = P<0.01, *** = P<0.001.



11,24, Enebral de Cinctorres

30TYK398977

800 m.s.m.

-Sustrato

transplantes: *Juniperus oxycedrus*

autóctonos: *Quercus rotundifolia*

-Muestras analizadas

	1988	1989	1990	1991
transplantes:	4	4	4	4
autóctonos:	-	1	4	4

-Índice de Feofitinización (PQa)

	1988	1989	1990	1991	P
transplantes:	1.43±0.04	1.47±0.02	1.25±0.34	1.39±0.05	.
autóctonos:	-	1.46	1.41±0.08	1.37±0.07	NS

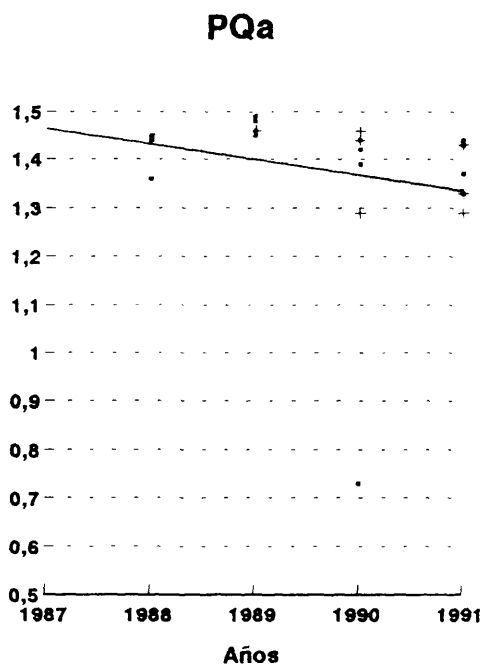
Pendiente de evolución del PQa de transplantes = -0.037

-Contenido en clorofilas totales (µg/mg de talo)

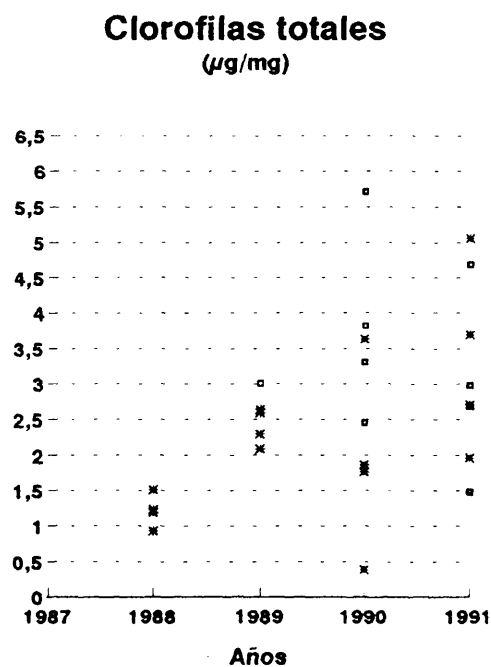
	1988	1989	1990	1991	P
transplantes:	1.26±0.19	2.40±0.26	1.91±1.33	3.36±1.34	NS
autóctonos:	-	3.01	3.82±1.38	2.96±1.32	NS

-Descripción: Decaimiento significativo del PQa de transplantes, si bien sólo se alcanzan valores medios moderadamente bajos en 1990.

Media ± Desviación típica. NS=No significativo, * = P<0.05, ** = P<0.01, *** = P<0.001.



• Transplante + Autóctono



* Transplante □ Autóctono

12,28, Los Carrascales

30TYK446899 1.080 m.s.m.

-Sustrato

transplantes: Pinus nigra
 autóctonos: Quercus rotundifolia

-Muestras analizadas

	1988	1989	1990	1991
transplantes:	4	4	4	4
autóctonos:	2	-	4	4

-Índice de Feofitinización (PQa)

	1988	1989	1990	1991	P
transplantes:	1.42±0.05	1.46±0.01	1.42±0.02	1.34±0.06	*
autóctonos:	1.44±0.04	-	1.36±0.13	1.36±0.04	NS

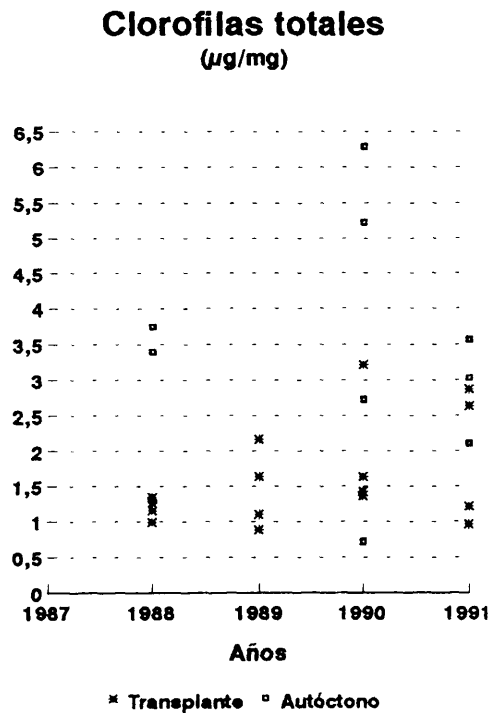
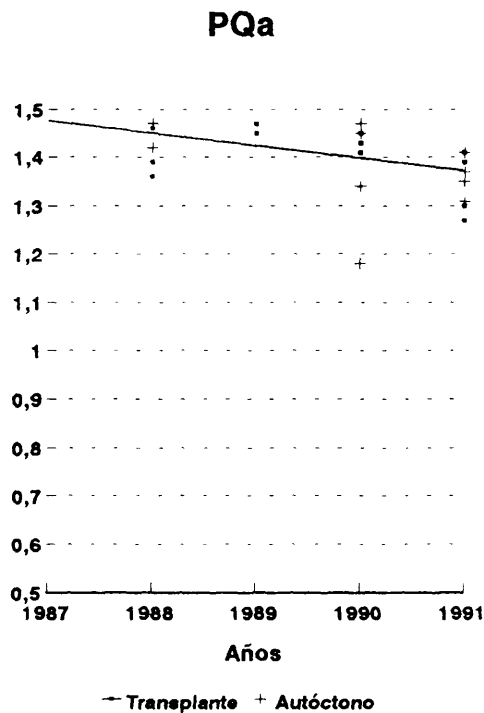
Pendiente de evolución del PQa de transplantes = -0.032

-Contenido en clorofilas totales (µg/mg de talo)

	1988	1989	1990	1991	P
transplantes:	1.16±0.19	1.45±0.58	1.91±0.88	1.92±0.97	NS
autóctonos:	3.59±0.29	-	3.74±2.51	2.71±0.72	NS

-Descripción: El decaimiento significativo del PQa de transplantes, no debe interpretarse como síntoma de daño dado que se trata de valores óptimos de PQa, unidos a una muy ligera pendiente.

Media ± Desviación típica. NS=No significativo, * = P<0.05, ** = P<0.01, *** = P<0.001.



13,27, Repetidor de Vallibona

31TBE464971 1.250 m.s.m.

-Sustrato

transplantes: Pinus sylvestris
 autóctonos: Quercus faginea

-Muestras analizadas

	1988	1989	1990	1991
transplantes:	4	4	4	2
autóctonos:	-	-	1	3

-Índice de Feofitinización (PQa)

	1988	1989	1990	1991	P
transplantes:	1.39±0.11	1.39±0.10	1.36±0.07	1.22±0.12	NS
autóctonos:	-	-	1.44	1.42±0.02	-

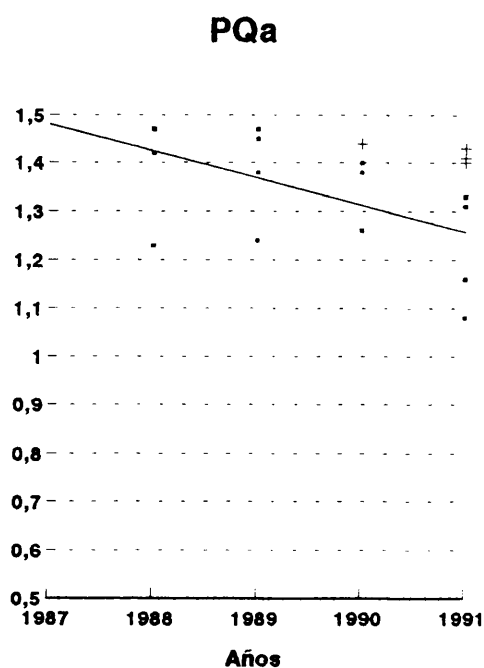
Pendiente de evolución del PQa de transplantes = -0.069

-Contenido en clorofilas totales (µg/mg de talo)

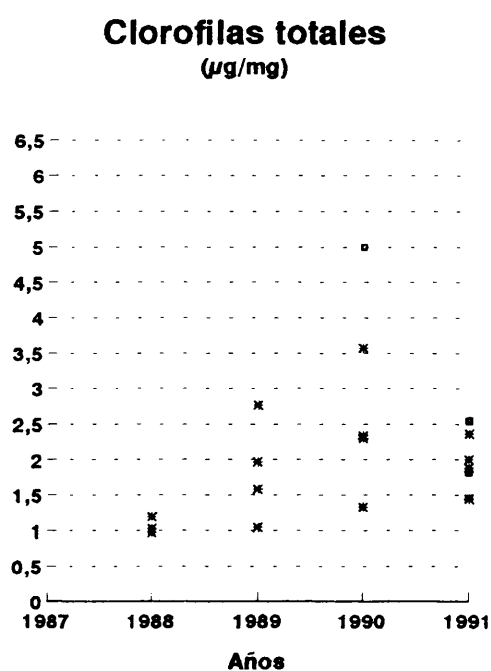
	1988	1989	1990	1991	P
transplantes:	1.07±0.10	1.84±0.72	2.38±0.92	1.92±0.38	NS
autóctonos:	-	-	5.00	1.94±0.55	NS

-Descripción: No se detectan síntomas de daño.

Media ± Desviación típica. NS=No significativo, * = P<0.05, ** = P<0.01, *** = P<0.001.



— Transplante + Autóctono



* Transplante □ Autóctono

14,25, Villarroya de los Pinares

30TYK0692

1.400 m.s.m.

-Sustrato

transplantes: Pinus sylvestris
 autóctonos: Juniperus oxycedrus

-Muestras analizadas	1988	1989	1990	1991
transplantes:	4	4	4	4
autóctonos:	4	4	4	4

-Índice de Feofitización (PQa)

	1988	1989	1990	1991	P
transplantes:	1.46±0.01	1.42±0.03	1.43±0.01	1.40±0.03	NS
autóctonos:	1.46±0.03	1.45±0.01	1.43±0.01	1.35±0.09	*

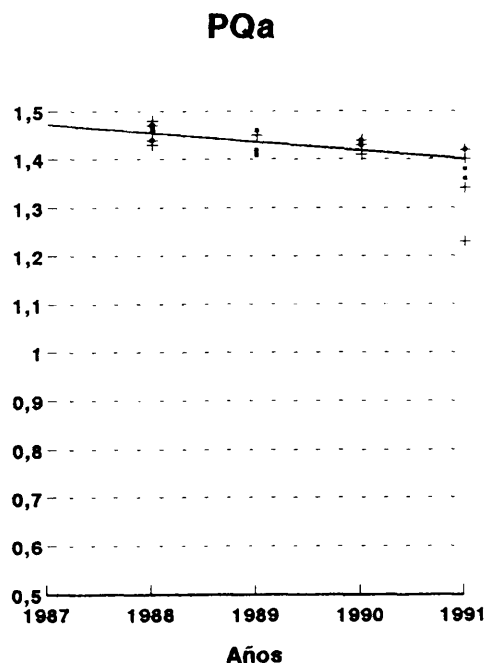
Pendiente de evolución del PQa de transplantes = -0.013

-Contenido en clorofilas totales (µg/mg de talo)

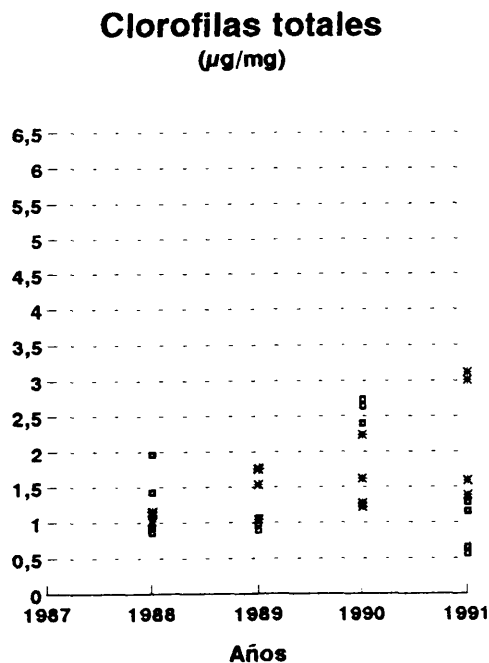
	1988	1989	1990	1991	P
transplantes:	1.07±0.10	1.53±0.34	1.59±0.47	2.28±0.92	NS
autóctonos:	1.25±0.19	0.97±0.07	2.25±0.68	0.91±0.36	NS

-Descripción: Estación con valores óptimos tanto de clorofilas como de PQa.
 No se detecta ningún síntoma de daño.

Media ± Desviación típica. NS=No significativo, * = P<0.05, ** = P<0.01, *** = P<0.001.



— Transplante + Autóctono



* Transplante □ Autóctono

15,26, Peña Cortada

30TYL336090 980 m.s.m.

- Sustrato

transplantes: Pinus halepensis
 autóctonos: Quercus rotundifolia

- Muestras analizadas

	1988	1989	1990	1991
transplantes:	4	4	4	4
autóctonos:	4	4	4	4

- Índice de Feofitización (PQa)

	1988	1989	1990	1991	P
transplantes:	1.44±0.03	1.45±0.02	1.28±0.30	1.37±0.06	NS
autóctonos:	1.44±0.02	1.46±0.01	1.38±0.06	1.35±0.09	*

Pendiente de evolución del PQa de transplantes = -0.039

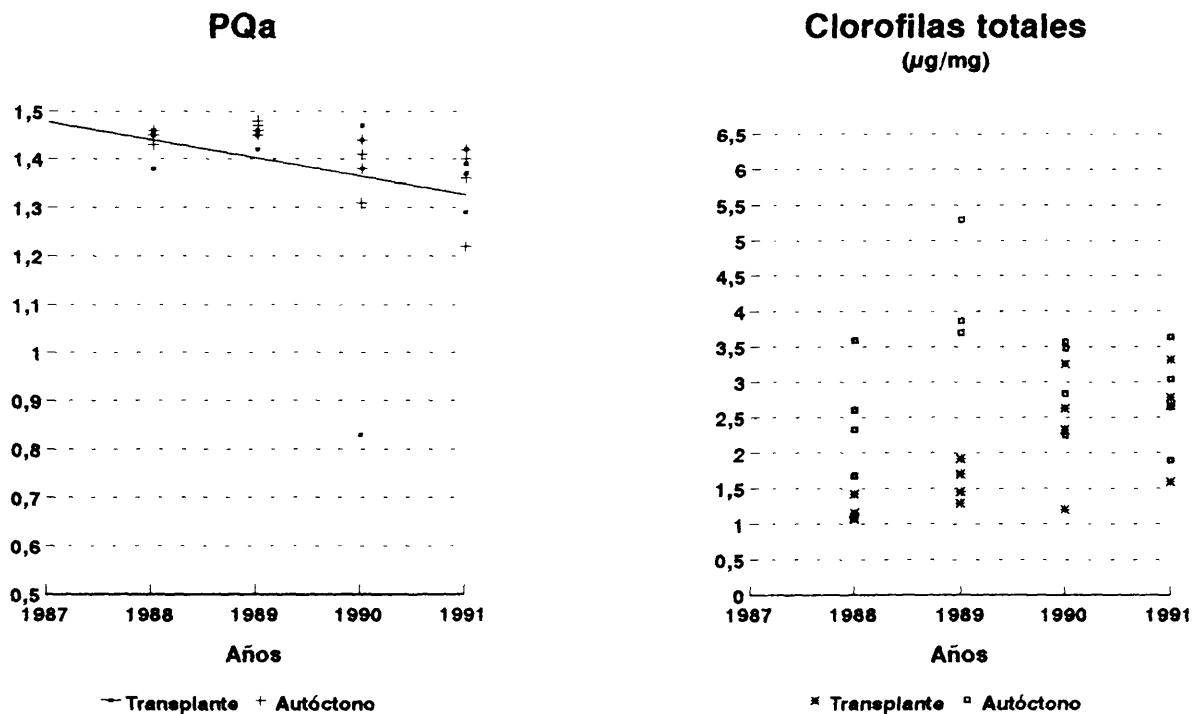
- Contenido en clorofilas totales (µg/mg de talo)

	1988	1989	1990	1991	P
transplantes:	1.16±0.19	1.60±0.28	2.35±0.86	2.59±0.72	NS
autóctonos:	2.52±0.78	4.14±0.77	3.03±0.62	2.81±0.73	*

- Descripción:

Estación en la que no se detectan síntomas de daño.
 Las diferencias significativas en autóctonos se deben a los elevados valores registrados en ambas variables de respuesta en 1989.

Media ± Desviación típica. NS=No significativo, * = P<0.05, ** = P<0.01, *** = P<0.001.



16, La Estanca

30TYL369484 300 m.s.m.

-Sustrato

transplantes: Soporte de madera
 autóctonos: -

-Muestras analizadas

	1988	1989	1990	1991
transplantes:	4	3	4	4
autóctonos:	-	-	-	-

-Índice de Feofitinización (PQa)

	1988	1989	1990	1991	P
transplantes:	1.46±0.02	1.38±0.07	1.38±0.08	1.26±0.25	NS
autóctonos:	-	-	-	-	-

Pendiente de evolución del PQa de transplantes = -0.053

-Contenido en clorofilas totales (µg/mg de talo)

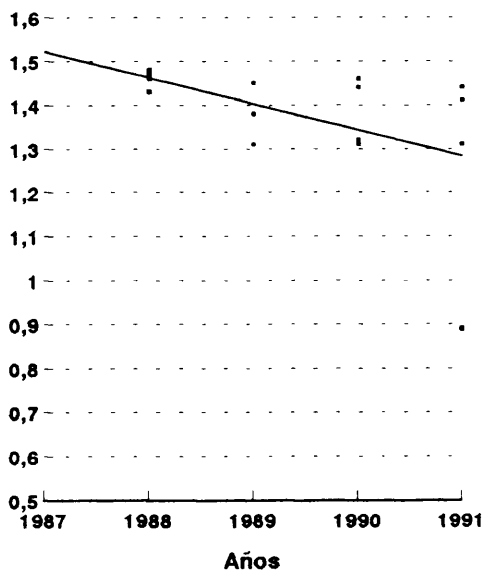
	1988	1989	1990	1991	P
transplantes:	1.16±0.39	1.17±0.76	1.13±1.13	1.64±1.43	NS
autóctonos:	-	-	-	-	-

-Descripción:

Estación de la red automática de ENDESA, en la que no se observa decaimiento significativo en ninguna de las variables de respuesta.

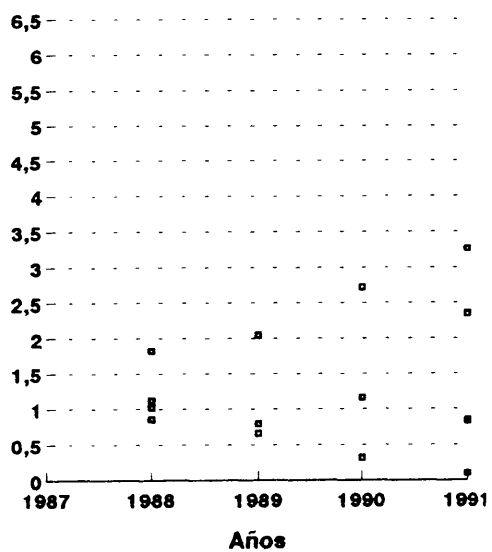
Media ± Desviación típica. NS=No significativo, * = P<0.05, ** = P<0.01, *** = P<0.001.

PQa



— Transplante

Clorofilas totales (µg/mg)



□ Transplante

17, Foz Calanda

30TYL247349 500 m.s.m.

-Sustrato

transplantes: Soporte de madera
 autóctonos: -

-Muestras analizadas

	1988	1989	1990	1991
transplantes:	4	4	4	4
autóctonos:	-	-	-	-

-Índice de Feofitinización (PQa)

	1988	1989	1990	1991	P
transplantes:	1.46±0.02	1.44±0.02	1.45±0.01	1.36±0.09	NS
autóctonos:	-	-	-	-	-

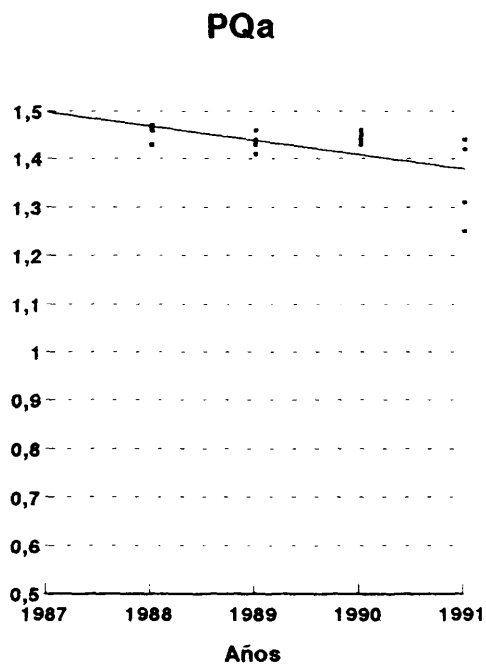
Pendiente de evolución del PQa de transplantes = -0.025

-Contenido en clorofilas totales (µg/mg de talo)

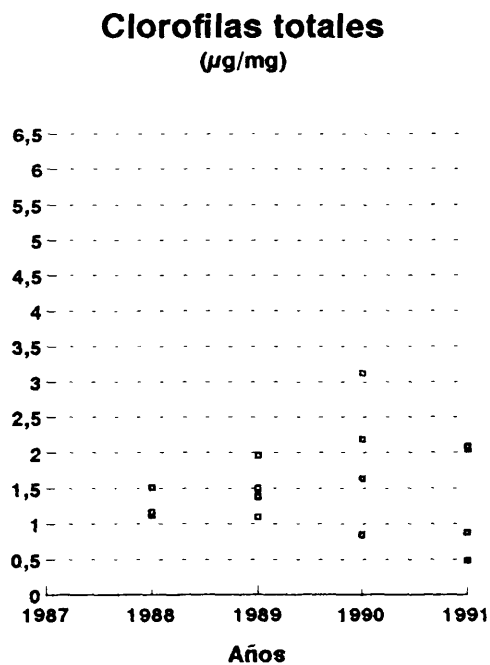
	1988	1989	1990	1991	P
transplantes:	1.26±0.19	1.49±0.36	1.95±0.96	1.37±0.82	NS
autóctonos:	-	-	-	-	-

-Descripción: Estación de la red automática de ENDESA (Monagrega) en la que no observa decaimiento significativo en ninguna de las variables de respuesta.

*Media ± Desviación típica. NS=No significativo, * = P<0.05, ** = P<0.01, *** = P<0.001.*



— Transplante



□ Transplante

18, Torre Miró

30TYL479045 1.175 m.s.m.

- Sustrato

transplantes: -
 autóctonos: Quercus rotundifolia

- Muestras analizadas

	1988	1989	1990	1991
transplantes:	-	-	-	-
autóctonos:	2	4	4	4

- Índice de Feofitización (PQa)

	1988	1989	1990	1991	P
transplantes:	-	-	-	-	-
autóctonos:	1.41±0.04	1.44±0.01	1.46±0.02	1.41±0.02	NS
<i>Pendiente de evolución del PQa de transplantes = -</i>					

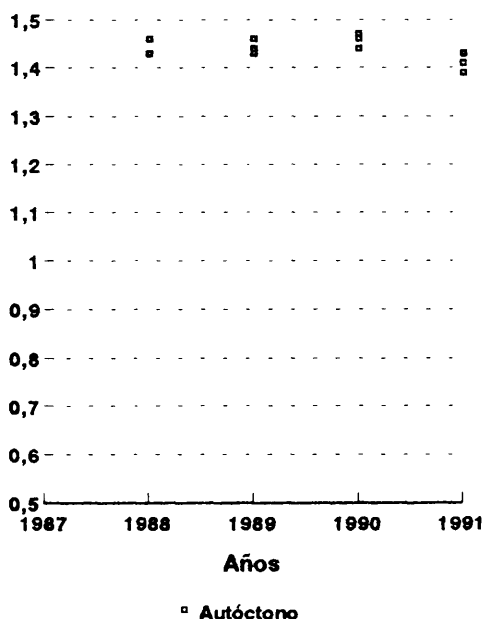
- Contenido en clorofilas totales (µg/mg de talo)

	1988	1989	1990	1991	P
transplantes:	-	-	-	-	-
autóctonos:	3.20±0.97	4.30±0.58	5.22±1.55	3.98±0.72	NS

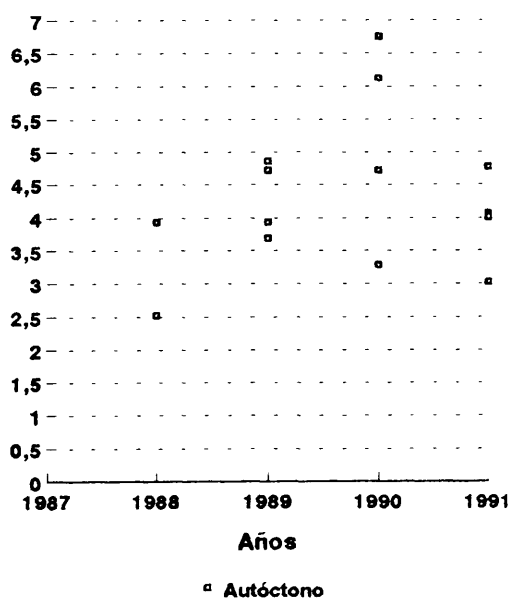
- Descripción: Estación con valores óptimos de PQa y muy elevados contenidos en clorofilas.

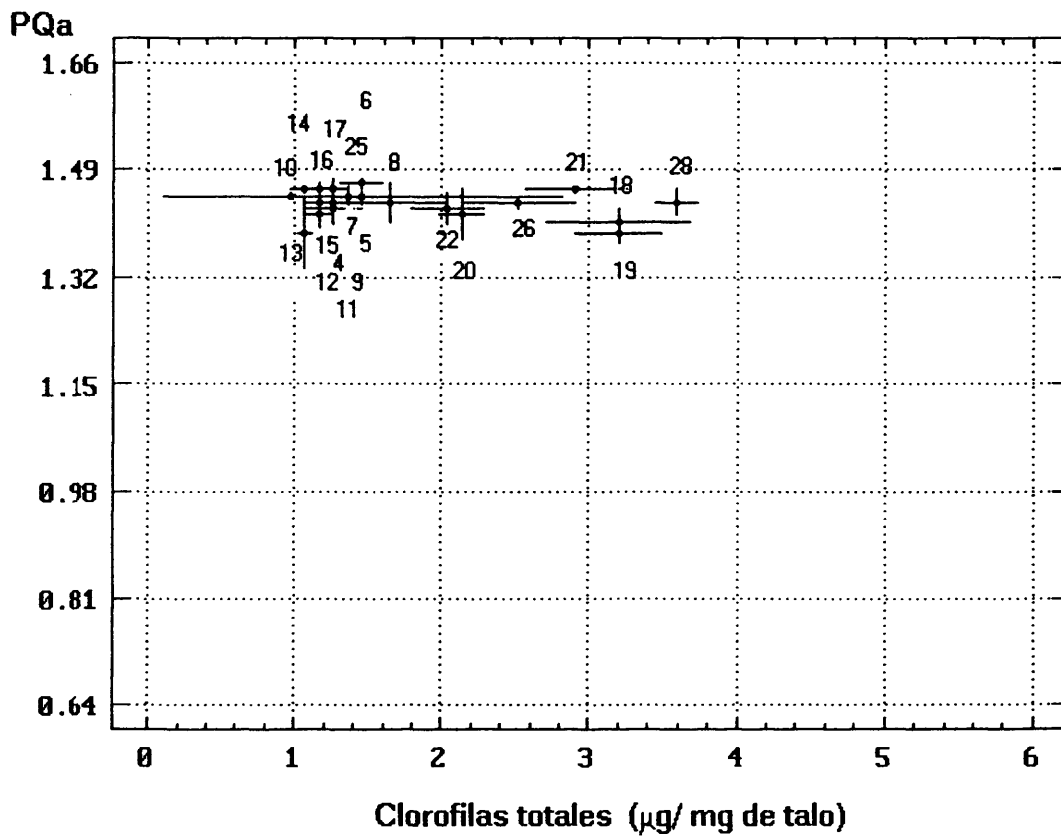
Nota: Los valores de 1988 corresponden a las medias de los transplantes realizados.
 Media ± Desviación típica. NS=No significativo, * = P<0.05, ** = P<0.01, *** = P<0.001.

PQa



Clorofilas totales (µg/mg)





media \pm error típico

Figura 33. Distribución de las estaciones de muestreo según sus correspondientes valores medios de contenido en clorofilas y PQa, en 1988.

5.3.2. Análisis de la evolución temporal

En lo que se refiere al Índice de Feofitinización (PQa), los valores registrados en la primera campaña, junio de 1988, fueron homogéneamente óptimos. No sólo en aquellos ejemplares transplantados, procedentes todos ellos de la estación control 1-Selas, cuyo valor medio de PQa fué de 1.44 ± 0.02 , sino también en los ejemplares autóctonos (recogidos en 19-Fuentespalda, 20-Ermita de San Albert, 21-Castell de Cabres, 22-Herbés, 25-Villarroya de los Pinares, 26-Peña Cortada y 28-Los Carrascales), en los que se observaron medias que oscilaban entre 1.39 y 1.46, valores que deben interpretarse como una adecuada proporción entre clorofila \bar{a} y feofitina \bar{a} . No se detectó, por tanto, feofitinización de clorofilas atribuible a la acción perjudicial de agentes acidificantes, ni en los que en este año se transplantaban al área de estudio, ni en los que allí crecían de forma natural.

Sí se detectaron, por el contrario, desde esta primera campaña, diferencias poblacionales en cuanto al contenido en clorofilas totales ($P < 0.0001$). Las muestras procedentes de 1-Selas presentaban contenidos que oscilan entre 0.9 y 1.7 μg de clorofila $\bar{a} + \bar{b}$ /mg de talo liquénico. En contraste, las muestras autóctonas del Maestrazgo y Puertos de Morella, duplicaban estos valores, estando comprendidos sus contenidos medios entre 2.0 y 3.6 μg /mg. Los ejemplares autóctonos procedentes de 25-Villarroya de los Pinares, cuyo contenido medio era de 1.26 μg /mg, se encuadraban con aquellos procedentes de 1,Selas y distaban de los valores propios de los autóctonos del Maestrazgo. En la Figura 33, contrasta la gran homogeneidad en cuanto a PQa con la dispersión en relación al contenido en clorofilas. En función de los contenidos en clorofilas totales, el grupo de los transplantados y autóctonos de Villarroya de los Pinares se segregaba de los autóctonos de las estaciones del Maestrazgo y Puertos de Morella.

Un año más tarde, en junio de 1989, se observó que los valores medios de PQa

se seguían manteniendo constantes entre 1.37 y 1.47, salvo cuatro excepciones: 7-Castell de Cabres, 9,23-Corachar, y 10-Pico del Aguila. De ellas, sólo 10-Pico del Aguila, decaía significativamente ($P < 0.05$) respecto al resto de las estaciones muestreadas, tanto en PQa como en contenido en clorofilas. Entre las causas que determinaban la ausencia de talos autóctonos en esta estación deben hallarse las que justifican la fuerte caída en un año de un PQa óptimo de 1.45 ± 0.01 a un valor 1.12 ± 0.30 que denota una acentuada feofitinización de las clorofilas.

En Corachar, no se encontraron ejemplares creciendo sobre pino, en la campaña de junio de 1988, dada su baja frecuencia; en junio de 1989, se recogieron 3 muestras sobre pino que aunaban un elevado contenido en clorofilas, propio de los ejemplares autóctonos de este territorio, con valores de PQa (1.01 ± 0.25), significativamente inferiores a todos los registrados en esta campaña, con la excepción de 10-Pico del Aguila ($P < 0.05$). Los ejemplares transplantados en Corachar presentaban una media inferior a la del año anterior, si bien este descenso no fué significativo (de 1.43 ± 0.05 a 1.30 ± 0.09).

Las muestras procedentes de Castell de Cabres presentaron un marcado contraste entre transplantes y autóctonos. Mientras los valores de PQa de talos transplantados bajaban desde un PQa medio de 1.45, en el año 1988, a 1.26, en 1989, los valores correspondientes a ejemplares autóctonos prácticamente se mantuvieron (de 1.46 a 1.41). Parece poco probable que esta divergencia en la respuesta sea atribuible al efecto del transplante dado que no se observó en ninguna de las demás estaciones de muestreo. Por otra parte, la mayor capacidad neutralizante de la corteza de Quercus faginea, forófito sobre el que se desarrollaban los ejemplares autóctonos, podría estar amortiguando el efecto de agentes acidificantes que sí se manifestarían en los transplantes sobre Pinus nigra.

La estrecha proximidad geográfica de las tres localidades mencionadas (Castell de Cabres, Corachar y Pico del Aguila) con una sintomatología semejante, conduce a

pensar que debía estar actuando un agente común, causante del decaimiento liquénico observado.

En cuanto a contenido en clorofilas totales se seguía observando, al igual que en la campaña anterior, que de las 8 estaciones de ejemplares autóctonos incluidas en el Maestrazgo, 6 presentaban valores significativamente ($P < 0.05$) más altos que la mayor parte de los transplantados, y que los autóctonos de 1-Selas y de 25-Villarroya de los Pinares.

Valorando conjuntamente ambas variables de respuesta, se pueden diferenciar tres tendencias (Fig. 34):

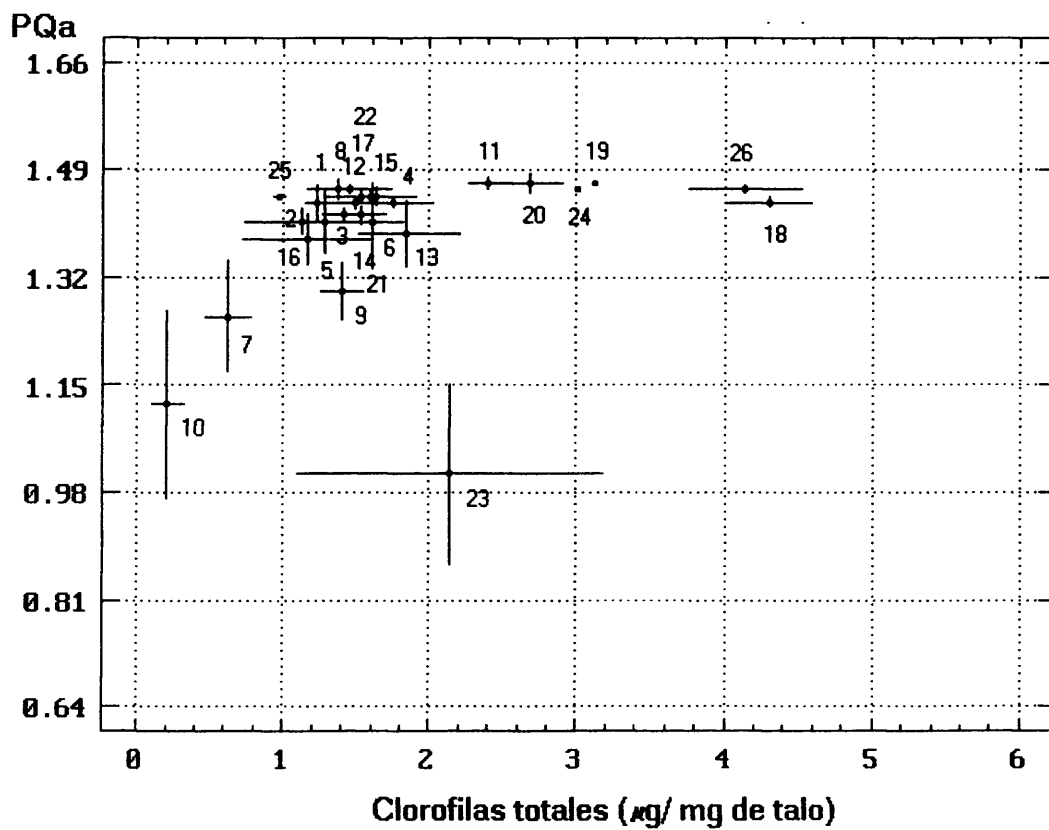
1. Area de posible riesgo de daño por contaminantes ácidos: Estaciones que acusaron un descenso en el valor medio de PQa, alcanzando valores inferiores a 1.30: 7-Castell de Cabres, 9,23-Corachar y 10-Pico del Aguila (sólo en 23 y 10 resultaron ser significativamente más bajos que en el resto de las estaciones muestreadas en 1989).

2. Estaciones con valores óptimos de PQa:

- 2.1 Con bajo contenido en clorofilas: la mayoría de los restantes transplantes, 1-Selas, 25-Villarroya de los Pinares, 21-Castell de Cabres, 22-Herbés.

- 2.2 Con alto contenido en clorofilas: 18-Torre Miró, 19-Fuentespalda, 20-Ermita de San Albert, 11,24-Enebral de Cinctorres y 26-Peña Cortada.

La panorámica descrita hasta ahora se corresponde, en líneas generales, con la que se observó posteriormente en la campaña desarrollada en julio de 1990. Las bajadas que fueron estadísticamente significativas en los valores de PQa frente a los registrados en la campaña anterior en estaciones como 12-Los Carrascales o 25-Villarroya de los Pinares, en las que la reducción es de 1.46 a 1.44 y de 1.45 a 1.43 respectivamente, no fueron significativas desde el punto de vista fisiológico. En otras



media \pm error típico

Figura 34. Distribución de las estaciones de muestreo según sus correspondientes valores medios de contenido en clorofilas y PQa, en 1989.

palabras, considerando que por definición el PQa varía desde 1.48 a 0.53, una bajada de dos centésimas en el índice no puede ser interpretada como síntoma de decaimiento fisiológico. Por el contrario, en las muestras de talos autóctonos de 26-Peña Cortada se registró una caída de PQa que aunque seguía permaneciendo en torno a valores óptimos, se correspondía con la de los transplantes, no significativa ($P > 0.05$) pero mucho más acusada (de 1.45 a 1.28) y estaba acompañada de un incremento en clorofilas (de 1.596 $\mu\text{g}/\text{mg}$ liquen a 2.350 $\mu\text{g}/\text{mg}$ liquen). Es interesante destacar como la mayor degradación de clorofilas a feofitinas entre las estaciones control se registró en los transplantes sobre pino en 3-San Pablo de los Montes frente a los valores óptimos registrados sobre roble en 2-San Pablo de los Montes.

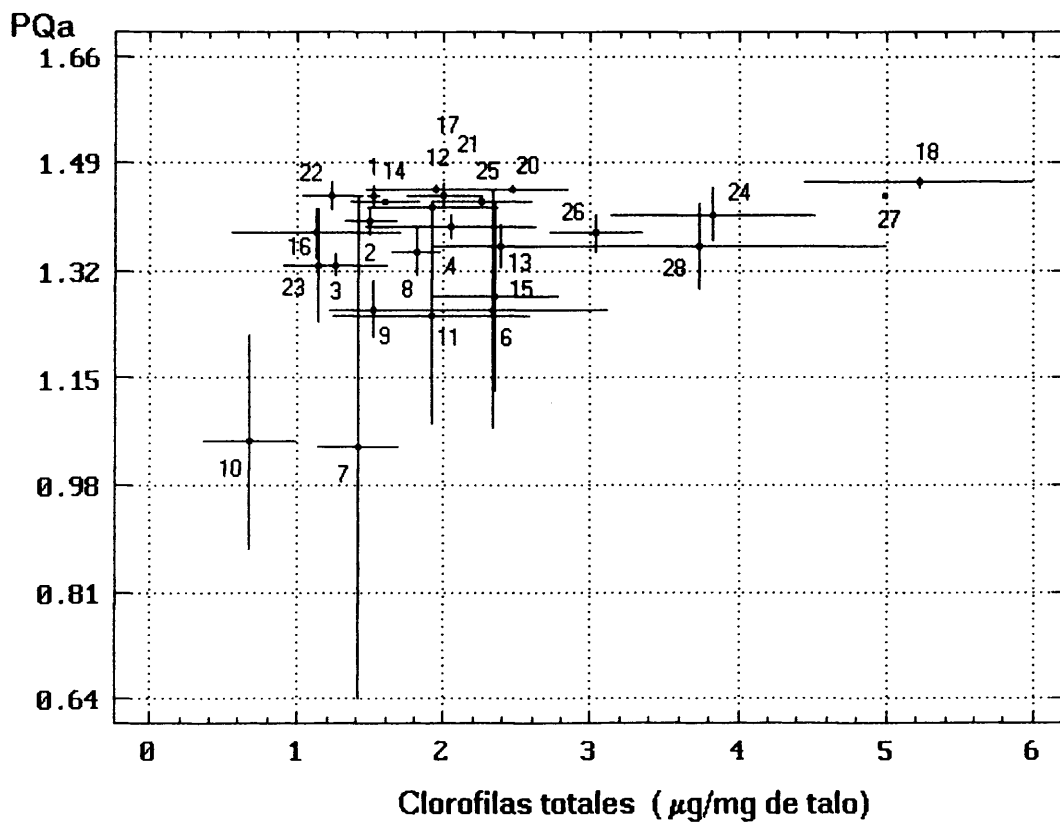
En cuanto a la evolución del área de riesgo, esbozada ya en 1988, en el análisis correspondiente a 1990, 10-Pico del Aguila y 7-Castell de Cabres se confirmaron como las estaciones más afectadas, si bien la caída con respecto a junio de 1989 no fué significativa. Al haberse destruidos dos transplantes en el periodo que separa la campaña de 1989 de la de 1990, los bajos valores registrados en 7-Castell de Cabres deben interpretarse con cautela, dado que responden a tan sólo dos muestras. En la tercera localidad de este área, Corachar, se agotaron los escasos ejemplares que crecían espontáneamente sobre pino. Por ello, se optó por recolectar muestras de ejemplares autóctonos procedentes de Crataegus monogyna, dado que este forófito presenta un valor de pH de corteza semejante al registrado en Pinus sylvestris. En estos ejemplares se observó una marcada diferencia respecto al valor medio de PQa registrado en la campaña anterior (de 1.01 en 1989 a 1.33 en 1990). Atendiendo a la homogeneidad del pH de la corteza de ambos forófitos, cabría interpretar este ascenso como una recuperación frente a anteriores campañas, sin embargo, el pH no es la única variable a considerar y la diferencia de sustrato pone en duda la comparabilidad entre los resultados obtenidos en la campaña de junio de 1989 y los de la campaña de julio de 1990. Los talos transplantados en esta misma localidad

mantuvieron su PQa moderadamente bajo.

Las estaciones 8-Herbés, 4-Casa el Forestal y 6-Ermita de San Albert acusaron una reducción de PQa, hecho que se une a su proximidad geográfica al área más afectada (Pico del Aguila-Castell de Cabres), por lo que su evolución debe ser objeto de especial atención. En conclusión, la caída más pronunciada en los valores de PQa parece restringirse a estaciones geográficamente próximas (10-Pico del Aguila, 7-Castell de Cabres) rodeadas por otras que inician un ligero declive.

En la Figura 35, se resume gráficamente lo observado en la campaña de julio de 1990, esto es, una tendencia hacia valores más elevados de contenido en clorofilas, una mayor varianza entre las estaciones con ejemplares transplantados y la confirmación de 10-Pico del Aguila y 7-Castell de Cabres como las estaciones más afectadas en contraste con el ascenso de 23-Corachar.

La inercia de un sistema a permanecer en un estado de equilibrio, se manifiesta cuando al sufrir éste una perturbación externa, no todos los elementos del sistema responden homogéneamente, sino que por el contrario, se detecta un incremento de la dispersión en las variables que caracterizaban el estado original de dicho sistema. Este fenómeno se reflejaba en la muy baja desviación típica de los valores de PQa de los líquenes transplantados en 1988, que respondía a una situación de equilibrio en la población de Anaptychia ciliaris en el quejigar de Selas. Igualmente estables aparecían los ejemplares autóctonos del área de estudio, en cuanto a PQa se refiere, en esta primera campaña. El transplante es, sin duda, una perturbación de las condiciones iniciales de equilibrio. A lo largo de las campañas sucesivas, 1989 y 1990, los ejemplares transplantados evolucionaron hacia un nuevo equilibrio. Esta evolución no sólo se reflejó en la variación de sus valores medios de PQa o contenido en clorofilas totales, sino que fué acompañada de un incremento de las desviaciones típicas, o dicho de otro modo, los aumentos de desviaciones típicas podrían interpretarse en muchos casos como situaciones de cambio o de baja estabilidad.



media \pm error típico

Figura 35. Distribución de las estaciones de muestreo según sus correspondientes valores medios de contenido en clorofilas y PQa, en 1990.

El núcleo correspondiente a los ejemplares procedentes de Selas que se observaba claramente en 1988 (con valores de PQa en torno a 1.4 y contenido en clorofilas próximo a 1.5 $\mu\text{g}/\text{mg}$), se fué desdibujando en las campañas de 1989, 1990 y especialmente, de 1991. En 1991, se apreciaba una baja dispersión de los valores de óptimos de PQa de todas las estaciones con ejemplares autóctonos y la mayoría de los transplantados frente a la elevada dispersión en las estaciones con bajos valores de PQa. Esta tendencia hacia valores bajos de PQa (inferiores a 1.3, y en muchos casos a 1.2), caracterizaba el Area de Riesgo de daño potencial por contaminantes ácidos. La estación que permanece como centro de ese área desde 1989 hasta 1991 fué 10-Pico del Aguila. La estación 9-Corachar presentaba un lento pero significativo ($P < 0.01$) decaimiento de su valor medio de PQa a lo largo de los cuatro años de seguimiento (1.43-1.30-1.26-1.04), hasta formar parte con la estación 10 de ese centro de Area de Riesgo. La estación 7-Castell de Cabres, presentaba una muy marcada recuperación, si bien, tal como se ha dicho, este resultado debe ser interpretado con precaución dado el pequeño tamaño de muestra.

De aquellas estaciones geográficamente próximas, sólo 6-Ermita de San Albert, no sólo mantuvo su tendencia hacia valores de PQa más bajos, sino que este moderado decaimiento fué acompañado de una fuerte desviación típica. Las otras dos estaciones que se apuntaban en 1990, 4-Casa de Forestal y 8-Herbés, presentaron valores óptimos de PQa en 1991.

En conclusión, tras la campaña de 1991, las tres tendencias esbozadas a lo largo de este seguimiento aparecían de la siguiente forma (Fig. 36):

1. Area de posible riesgo de daño por contaminantes ácidos: Estaciones con bajos valores medios de PQa (< 1.2): 9-Corachar y 10-Pico del Aguila.
2. Estaciones con valores óptimos de PQa:
 - 2.1 Con bajo contenido en clorofilas: Este núcleo cada año menos definido, a causa de la acomodación de los transplantes a sus nuevas

condiciones, sigue contando con 1-Selas, 25-Villarroya de los Pinares y 22-Herbés.

2.2 Con alto contenido en clorofilas: 18-Torre Miró, 20-Ermita de San Albert, 11,24-Enebral de Cinctorres y 26-Peña Cortada.

Tal como se ha comentado en el capítulo 5.2.1.2, el coeficiente de correlación entre PQa y contenido en clorofilas y su significación, ha sido propuesto como indicador de daño por contaminantes ácidos. El aumento del coeficiente de correlación y de su significación, no debe interpretarse como una generalización del daño por feofitización, ni como un incremento en el número de estaciones afectadas. Por el contrario, una mayor correlación indicaría que aquellas estaciones con valores inferiores de contenido en clorofilas, presentan además una mayor proporción de feofitina frente a clorofila, o dicho de otro modo, en esas estaciones -y sólo en ellas- el descenso en clorofilas podría ser debido a su degradación a feofitinas. Igualmente el aumento de la correlación también implica que las estaciones con altos valores de contenido en clorofilas presentan valores de PQa elevados. A la luz de esta interpretación, los valores recogidos en la Tabla 26, reflejan un buen estado de los ejemplares transplantados en 1988, al no haber correlación significativa entre PQa y contenido en clorofilas. Sin embargo, tras el primer periodo (junio de 1988 a julio 1989) se observó un incremento del coeficiente hasta el 80%, lo que significa que en determinadas estaciones hubo una acusada degradación de clorofilas a feofitinas, mientras que otras mantuvieron sus contenidos y PQa elevados. El segundo pico de correlación de los transplantes y el único significativo del conjunto de muestras analizadas, en 1991, viene determinado por una mejor definición de las estaciones, es decir, se desdibuja el grupo original de los transplantes para perfilarse un grupo de estaciones con bajos valores en ambas variables frente a estaciones con elevados contenidos de clorofilas -como es propio de las estaciones del Maestrazgo- y altos

valores de PQa.

Tabla 26
Correlación entre contenido en clorofilas y PQa

	1988	1989	1990	1991
Transplantes:				
Coefficiente de correlación	0.247	0.808	0.388	0.719
Nivel de confianza	0.394	0.0002	0.153	0.003
Nº de valores medios	14	16	15	15
Global:				
Coefficiente de correlación	-0.311	0.320	0.390	0.593
Nivel de confianza	0.160	0.111	0.049	0.001
Nº de valores medios	22	26	26	26

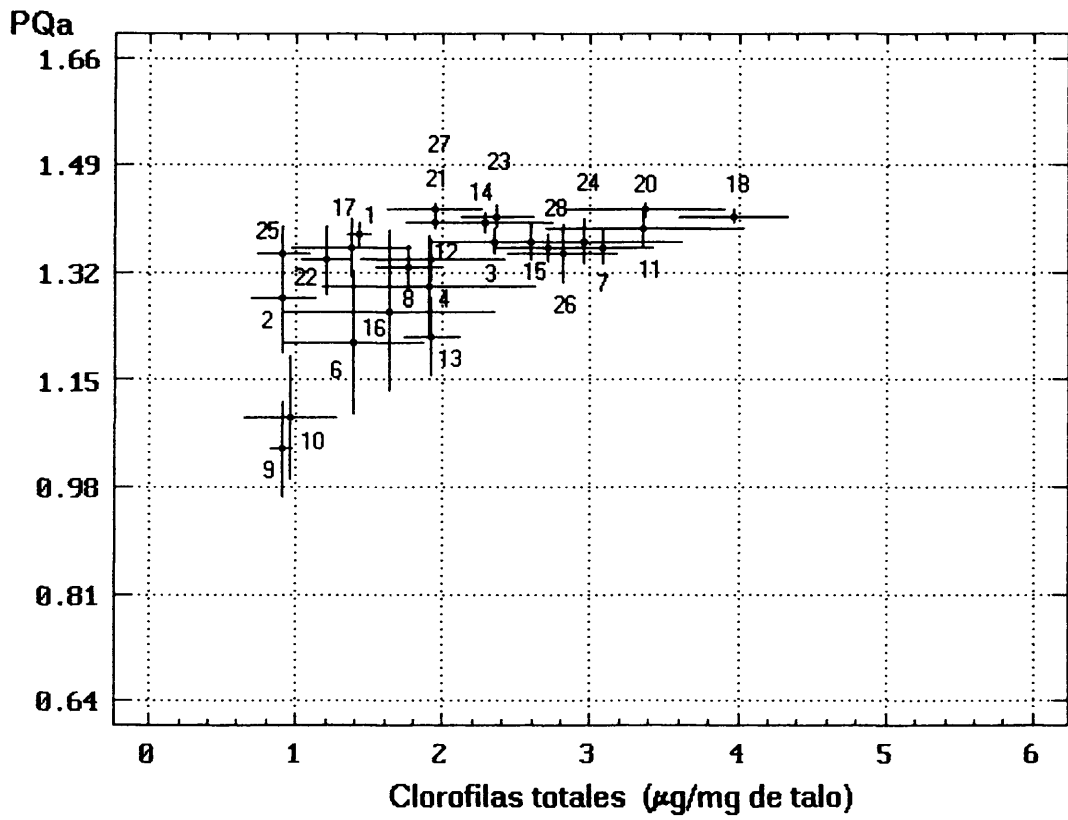
Efectos del transplante de talos liquénicos

Tras los cuatro años de estudio, es preciso destacar algunas consideraciones metodológicas sobre el transplante de talos liquénicos de la especie Anaptychia

ciliaris.

Desde el punto de vista de la evolución del PQa, más que un daño global de los trasplantes, donde la diferencia entre estaciones se limitaría a la velocidad con que cada juego de cuatro trasplantes sufre un daño irreversible, en realidad lo que se observaba era un número elevado de estaciones que se mantenían en valores medios de PQa óptimos (> 1.30), comparables a los registrados en la población original, la cual no se hallaba presuntamente sometida a ningún tipo de estrés ambiental. Entre ellas, algunas, como 14-Villarroya de los Pinares, no manifestaron variación significativa a lo largo de todo el seguimiento, otras, como 12-Los Carrascales, dada la muy reducida dispersión de los valores registrados, presentan variación significativa ($P < 0.05$) sin que ello sea síntoma de un decaimiento fisiológico, como ya se ha comentado.

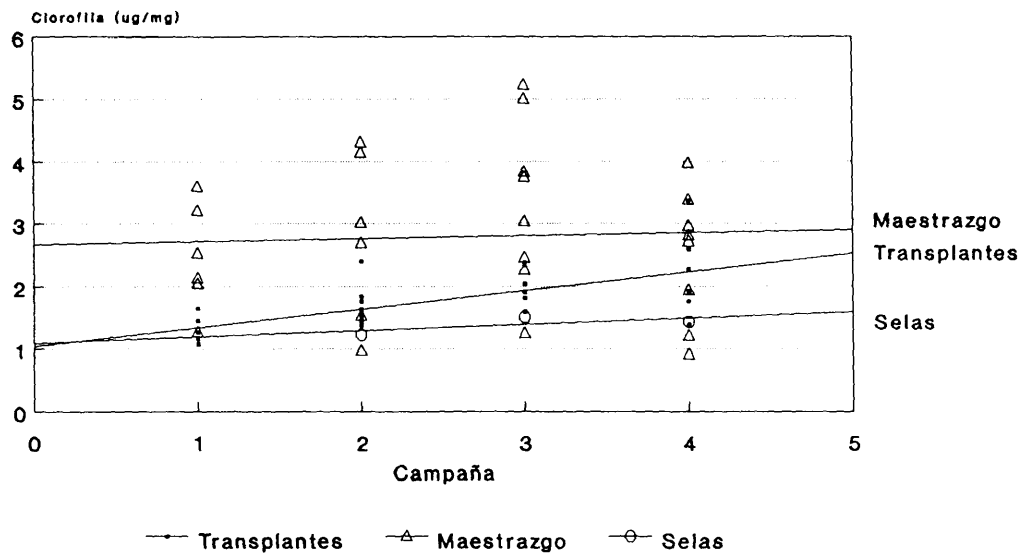
En cuanto a los contenidos en clorofilas, el hecho de que los valores sean más elevados en aquellos ejemplares que crecen en la Comarca del Bajo Maestrazgo y Puertos de Morella que en los controles y trasplantes, puede atribuirse a muy variadas causas: diferencias poblacionales, nutricionales, condiciones de iluminación, etc. Los talos de Anaptychia ciliaris trasplantados en este área tendieron a incrementar su contenido en clorofilas (Fig. 37). En cualquier caso, esta tendencia parece manifestarse de forma menos concentrada desde el punto de vista geográfico, que la disminución de los valores de PQa. Sin embargo, no puede descartarse la posibilidad de que estos niveles más elevados sean debidos a bajas concentraciones de contaminantes en el área. Trabajos recientes detectan una correlación positiva entre el incremento en contenido en clorofilas totales en líquenes y la proximidad a núcleos urbanos (Arb & Brunold 1990; Arb et al. 1990). Otros autores describen un incremento en clorofilas tras fumigaciones controladas con ozono y óxidos de nitrógeno, (Ellin & Seaward 1989) o tras la exposición a contaminantes nitrogenados (Kauppi 1980a).



media ± error típico

Figura 36. Distribución de las estaciones de muestreo según sus correspondientes valores medios de contenido en clorofilas y PQa, en 1991.

Efecto del transplante de especímenes de Selas al Maestrazgo.



Se han desechado las estaciones con valores bajos de PQa (7-21, 9-23, 10)

Figura 37. Variación de la concentración de clorofilas en ejemplares de *Anaptychia ciliaris* trasplantados al área de estudio. Los contenidos en clorofilas tienden a valores más próximos a los registrados en los ejemplares autóctonos del Maestrazgo.

Al cabo de cuatro años de haber realizado los trasplantes, se constata en algunas de las estaciones, que las clorofilas de ejemplares trasplantados no se feofitinizan, e incluso parecen responder a una acomodación a la nueva situación. De lo cual debe concluirse que la evolución esperada de un talo trasplantado, no necesariamente responde a una cinética lineal de decaimiento sino que puede manifestar sucesivos cambios tal como corresponde a un organismo que se mantiene activo.

5.3.3. Análisis de la variación espacial de los trasplantes: Areas de Riesgo

Utilizando exclusivamente la información correspondiente a ejemplares trasplantados y como variable de respuesta el PQa, puede plantearse no sólo su evolución temporal sino en qué medida ésta se corresponde con la localización geográfica de las estaciones y con la topografía de la región. En la Figura 38 se recoge la superficie de respuesta del PQa de ejemplares trasplantados en el cuadrado de aproximadamente 75 Km de lado que se ha definido como área de estudio.

Aun teniendo presente que, tal como se comentaba en el anterior epígrafe, la respuesta de los trasplantes no es lineal, se ha considerado que la forma más objetiva de resumir la variación del PQa de los trasplantes a lo largo de los años, es considerar la pendiente de la recta de regresión, que relaciona al PQa, como variable dependiente, con el año en que tuvo lugar la campaña de recogida de muestras (véase el capítulo 5.3. 1).

La Figura 39, recoge la dimensión espacial de la pendiente de decaimiento del PQa de los trasplantes. A pesar de la baja densidad de estaciones de muestreo por unidad de superficie y de que su distribución no es regular, se observa como las pendientes no se distribuyen de forma aleatoria, sino que por el contrario reflejan un gradiente hacia valores más negativos (decaimientos más pronunciados del PQa) hacia el Este del area de estudio. De esta forma, se puede acotar un área de riesgo de daño potencial por contaminantes ácidos, con pendientes inferiores a -0.090.

Para calibrar la significación de los valores de las pendientes de decaimiento del PQa, es preciso considerar que las estaciones control 2,3-San Pablo de los Montes, con valores de inmisión de SO₂ de fondo, presentaban valores de pendiente de -0.051 y -0.032 respectivamente. Teniendo en cuenta estos valores, puede concluirse que en parte del área de estudio no se detectan síntomas de daños por contaminantes ácidos (como ocurre en las inmediaciones de Villarroya de los Pinares), o si se

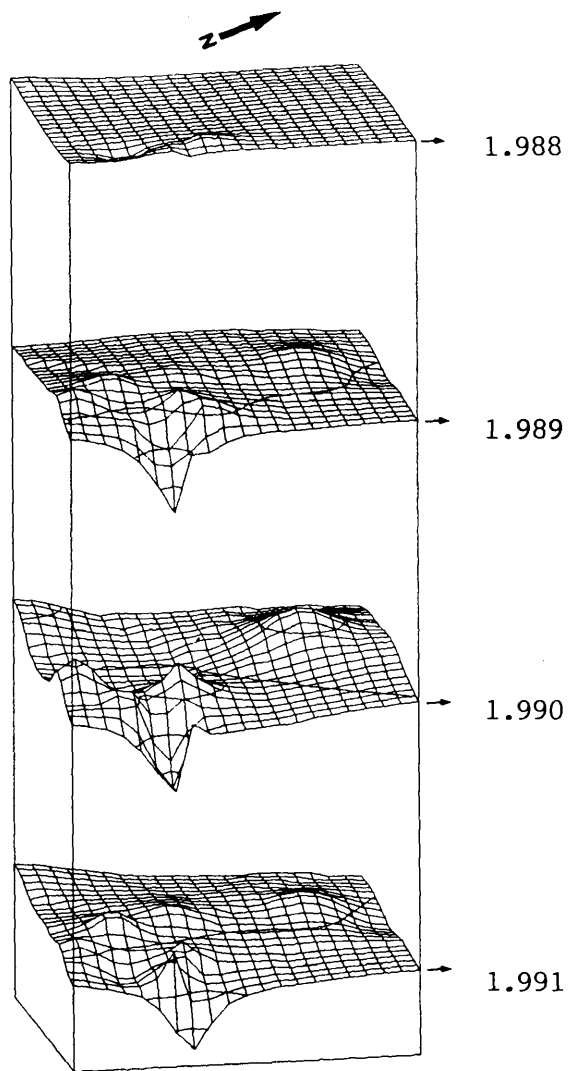
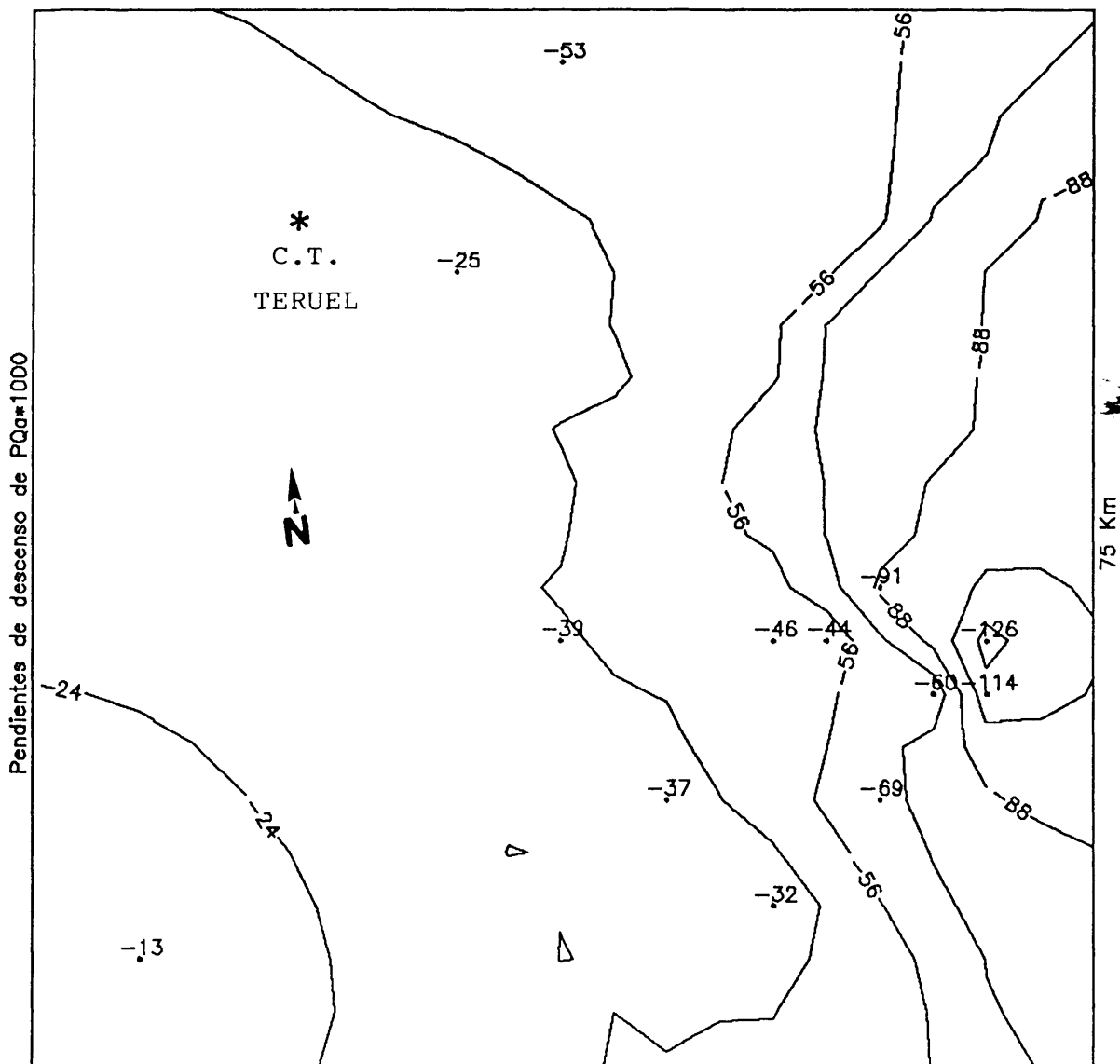


Figura 38. Superficies de respuesta del PQa de los ejemplares trasplantados al área de estudio, correspondientes a cada una de las campañas del seguimiento. Los ejes X e Y representan los lados de 75 Km del cuadrado estudiado; el eje Z recoge los valores del PQa. Se aprecia la dimensión espacial del decaimiento diferencial de la variable de respuesta.

Figura 39. Mapa de Areas de Riesgo basado en los valores de las pendientes de decaimiento del PQa de ejemplares trasplantados.



detectan, a medida que nos acercamos al área de riesgo, estos síntomas son comparables a los registrados en la estación tomada como control, en la provincia de Toledo, donde se registraban valores medios inferiores a $6.0\mu\text{g SO}_2/\text{m}^3$.

El área de riesgo que se describe, concuerda con los resultados obtenidos en anteriores estudios, que detectaban una menor vitalidad, o una mayor pobreza en líquenes, hacia el SE de la Central Térmica Teruel, coincidiendo con los vientos dominantes.

En septiembre de 1986, se realizó un análisis de la situación de las clorofilas de ejemplares autóctonos de Anaptychia ciliaris en un área más reducida que la del actual estudio, pero con una mayor densidad de estaciones de muestreo. Ambos mapas, el elaborado en 1986 y el que resume el seguimiento desde 1988 a 1991, coinciden en señalar que el área de mayor riesgo, se centraba en Corachar y Pico del Aguila (Fig. 40).

5.3.4. Elaboración de un modelo de respuesta: Posibles causas del decaimiento del PQa

La relación entre el gradiente espacial establecido por las pendientes de decaimiento del PQa y la topografía compleja de la región estudiada, se representa de forma gráfica en la Figura 41. En ésta se observa cómo el área de riesgo coincide con las sierras que corren paralelas a la costa y más concretamente con las estribaciones al Suroeste de la Sierra de Montenegro y el Encanadé. A la vista de la proximidad geográfica entre las estaciones con un decaimiento más pronunciado del PQa y de la correspondencia entre el área de riesgo que aquellas determinan y la topografía, cabe plantear qué variables ambientales determinan la sintomatología observada en los ejemplares transplantados.

Para encontrar qué agentes podían explicar mejor la variación del PQa observada, se realizó un análisis de selección progresiva de variables partiendo de un juego de diez:

- Campaña: Año de recogida de las muestras.

- Inmisión de SO₂ (μg/m³): se consideraron los datos procedentes de la estación de San Pablo de los Montes cedidos por el Centro Nacional de Sanidad Ambiental, y en el área de estudio, aquellos procedentes de las estaciones de la red de vigilancia de la contaminación atmosférica de la Empresa Nacional de Electricidad S.A., en las inmediaciones de la C.T. Teruel y en el Maestrazgo, facilitados por ENDESA.

Estos datos se procesaron como inmisión media de SO₂ y percentil 98 en el periodo comprendido entre campaña y campaña, y percentil de 98 y media de inmisión de SO₂ en el otoño e invierno anterior a la recogida de las muestras.

- Precipitación total (mm)
- Número de días de lluvia
- pH del agua de lluvia
- altitud sobre el nivel del mar (m.s.m.)

Tras el análisis sólo se seleccionan como variables con valor explicativo significativo, "campaña", "número de días de lluvia" y "precipitación total". Con estas variables se ajustó un modelo mediante Regresión Múltiple (Tabla 27).

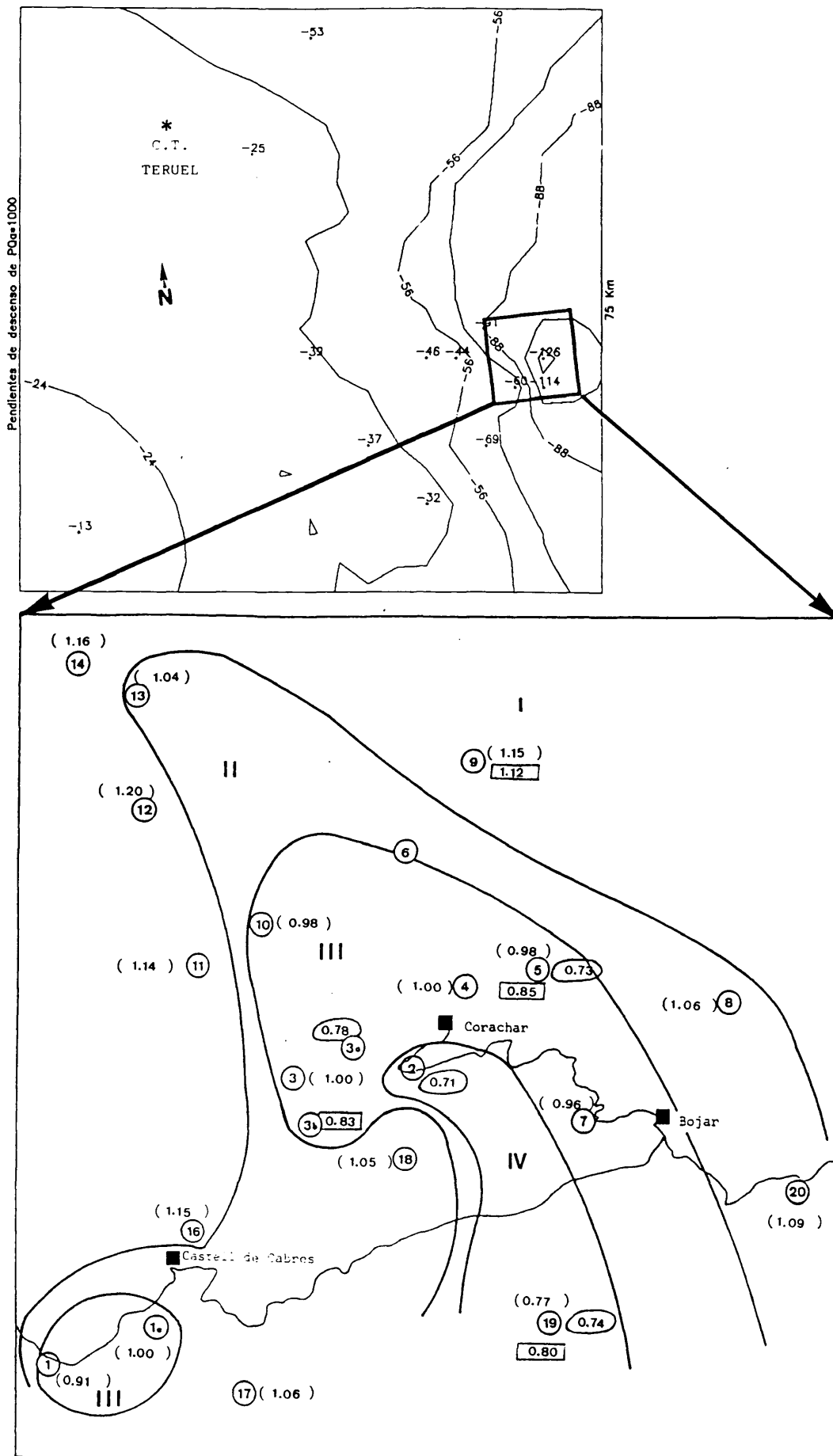


Figura 40. El territorio estudiado en 1986 (mapa inferior), incluido dentro del considerado en el actual seguimiento (mapa superior), fue dividido en "Áreas de Feofitización" (en números romanos) basadas en los valores del PQa de talos autóctonos procedentes de distintos forófitos (*Quercus spp.* ()); *Pinus spp.* (o); *Juniperus oxycedrus* (□);).

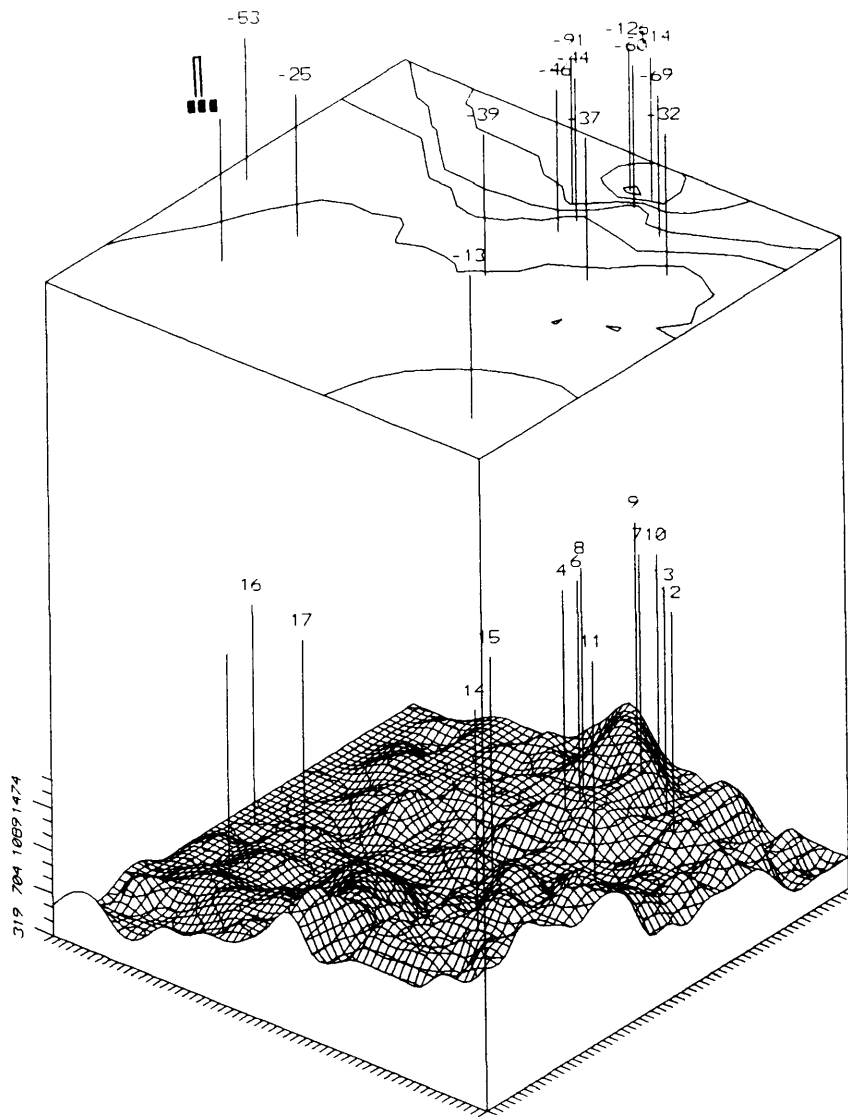


Figura 41. Solapamiento del Mapa de Areas de Riesgo con el levantamiento topográfico de la zona de estudio. Los valores en el plano superior se corresponden con las pendientes de decaimiento del PQa. Los números de las estaciones de muestreo aparecen en el plano inferior. En ambos mapas se localiza la posición de la C.T. Teruel.

Tabla 27

Modelo para la variación del PQa de transplantes

Variable independiente	Coficiente	S.E.	Nivel de significación
Constante	108.10	26.34	0.0002
Campaña	-0.05	0.01	0.0002
Precipitación total	-0.6E-5	3.7E-6	0.0001
Nº de días de lluvia	1.3E-3	4.0E-4	0.0016
R ² = 60%			

Las variables seleccionadas resultaron ser muy altamente significativas y entre las tres explicaban el 60% de la variabilidad del PQa.

En el modelo, se observó una relación inversamente proporcional entre el paso del tiempo y el PQa. El hecho de que se haya seleccionado la variable "campaña", implica que la respuesta liquénica medida como PQa, es una respuesta acumulativa, esto es, no es independiente el valor observado un año del valor observado el siguiente. Las causas del decaimiento que se reúnen bajo ese "paso del tiempo" pueden ser de índole muy diversa, pero en cualquier caso no se trata de causas puntuales o episódicas, sino de agentes persistentes que actúan paulatinamente sobre el estado fisiológico de los transplantes.

El número de días de lluvia y la precipitación total, tienen un efecto contrapuesto. Mientras que a medida que aumenta el primero el PQa tiende hacia valores más elevados, la precipitación total favorece la feofitización de las clorofilas.

El efecto estimulante, o al menos protector, de una mayor frecuencia de precipitaciones podría estar relacionado con un mayor número de ciclos de secado del talo liquénico y por ello, un más largo periodo de actividad metabólica, lo cual podría favorecer la reconstrucción de los daños en el aparato fotosintético.

El hecho de que una variable sea deshechada durante el proceso de selección, implica que o bien no está involucrada como causa determinante de la respuesta, o bien que no se trata de una relación lineal simple la que vincula a ambas variables.

Quizás esta sea la causa por la que no aparece como significativa la relación entre el PQa y el pH del agua de lluvia. Valores superiores a 6.5, no inducen feofitinización de clorofilas *in vivo*, y por ende no modifican el PQa. La alta significación, en el modelo, de la precipitación total como variable determinante del decaimiento del PQa, podría ser debido, no sólo a una mayor intensidad de lavado del talo liquénico, sino también a una respuesta frente a valores de pH moderadamente bajos. Los valores más bajos de PQa se observan de forma exclusiva allí donde el pH del agua de lluvia caída es inferior a 6.0. Situaciones como la observada en las estaciones 16-La Estanca y 17-Foz Calanda, en las que los niveles de inmisión de SO₂, eran cinco veces superior en la segunda que en la primera (3µg/m³ frente a 15µg/m³, respectivamente) sin que se observara un decaimiento significativo de los transplantes en ninguna de las dos, podrían sin embargo explicarse teniendo en cuenta que la precipitación en ambas presenta un pH medio superior a 7.

Tanto si está el pH de las precipitaciones implicado en la respuesta como si no, lo cierto es que la disposición de las áreas de riesgo coincide, a grandes rasgos, con el mapa de la precipitación total recogida durante el periodo de realización del seguimiento. Tal como se describió anteriormente (véase el capítulo 4.2. *Características del área de estudio*), Calanda o La Estanca no sólo están en situación de sombra de lluvias, sino que además su condición de depresión topográfica determina que en estos últimos años no se hayan superado los 380 mm. Localidades

como Villarroya de los Pinares o Morella, a pesar de encontrarse a mayor altitud, se orientan hacia el interior, por lo que se han recogido como valores medios más elevados 546 y 828 mm respectivamente. Es en la falda de las sierras costeras enfrentada al mar, donde las brisas húmedas descargan. Así, en la Puebla de Benifasar la precipitación total se eleva hasta valores medios de 1.436 mm. Y son precisamente estas exposiciones las que coinciden con los valores más acusados de decaimiento del PQa.

DISCUSION GENERAL

6. Discusión general

A la vista de los resultados obtenidos en la optimización del método de evaluación de clorofilas (capítulo 5.1.1), se concluye que, cuando se analizan ejemplares pertenecientes a especies con sustancias liquénicas, es recomendable el uso del procedimiento propuesto para la extracción en DMSO, con el fin de evitar interferencias en el espectro de absorción de las clorofilas, así como la degradación de los pigmentos durante el proceso de extracción. En el caso de que la extracción se realice en DMSO, para la cuantificación del contenido en clorofila a, clorofila b, clorofilas totales y la proporción de clorofila a/b, deben emplearse las ecuaciones desarrolladas específicamente para extractos en este disolvente (Tabla 8, capítulo 5.1.1).

Estas mismas ecuaciones han sido contrastadas paralelamente en extractos de pigmentos procedentes de una amplia gama de plantas vasculares (Barnes et al. 1992). Al igual que se observaba en Anaptychia ciliaris, especie sin sustancias liquénicas, en los estudios realizados con plantas vasculares no se han encontrado diferencias significativas entre el contenido en clorofilas, calculado mediante las ecuaciones propuestas a partir de extractos en DMSO, y el obtenido mediante el método, de uso generalizado, de extracción de clorofilas en acetona al 80%, desarrollado por Arnon (1949) y actualizado por diversos autores (Lichtenthaler & Wellburn 1983; Porra et al. 1989). Sin embargo, aún en estos casos en que la extracción en DMSO es tan eficaz como en acetona, el uso del DMSO en estudios ecofisiológicos o de prospección de amplios territorios, conlleva importantes ventajas al no ser preciso ni homogeneizar la muestra, ni centrifugar el extracto. En primer lugar, permite afrontar el análisis de un más elevado número de réplicas, incluso en estudios de campo, en los que no se dispone de aparatos pesados como son las

centrífugas. En segundo lugar, el material vegetal puede ser difícil de homogeneizar eficazmente como es el caso de las algas liquenizadas que se encuentran inmersas en el interior de la estructura constituida por las hifas del micobionte liquénico. En tercer lugar, tras la extracción con DMSO, persisten, sin mayores alteraciones estructurales, los restos del material vegetal ya sin clorofilas, lo cual permite utilizar este material en estudios posteriores de localización de diversos componentes (Scott & Robson 1991). Asimismo, también es recomendable el uso del DMSO cuando la cantidad de muestra disponible es reducida, hecho frecuente en el estudio de los líquenes, o cuando el material a analizar contiene una baja concentración de clorofilas en sus tejidos, como por ejemplo ocurre, en el estudio de plantas vasculares, en el caso de semillas etioladas (Barnes et al. 1992).

La optimización del método de extracción y cuantificación de clorofilas y la adecuación del método de medida de la señal de fluorescencia de clorofilas *in vivo* (capítulo 5.1.2), han permitido fundamentar los resultados obtenidos en líquenes expuestos a contaminantes atmosféricos, cuando se utilizan variables de respuesta relacionadas con el estado de los pigmentos fotosintéticos. Sin embargo, se ha constatado que las variables de respuesta relacionadas con la degradación de las clorofilas detectaban efectos que se correspondían con avanzados estados de alteración ultraestructural de las células algales (capítulo 5.2.3). En cualquier caso, es interesante destacar la congruencia de la respuesta liquénica tanto medida como variación en el contenido en clorofilas totales o cambios en el PQa, como en términos de F_0 y F_v/F_p (capítulo 5.2.2), o como alteración de la estructura celular del fotobionte liquénico.

Entre las variables de respuesta al SO_2 , el PQa aparece como un indicador más preciso que la variación en el contenido en clorofilas totales, dado que presenta un mayor coeficiente de correlación con la dosis de SO_2 , unido a una menor dispersión en la respuesta (menor coeficiente de variación). Cabe destacar, el uso del coeficiente

de correlación entre ambas variables de respuesta como indicador del efecto del contaminante.

El análisis de la variación del PQa, puso de manifiesto una baja sensibilidad de los líquenes frente a fumigaciones agudas con SO₂. El hecho de no observarse decaimiento alguno en los ejemplares de Anaptychia ciliaris tras la exposición a este contaminante durante 54 h (capítulo 5.2.1.1), concuerda con la baja sensibilidad demostrada por Ramalina farinacea a los picos de concentración de SO₂ en las cámaras durante las fumigaciones crónicas. La dosis de SO₂, entendida como el producto de la concentración media por el número de días de exposición al contaminante (Hur & Wellburn 1991), ha resultado ser el mejor descriptor de la respuesta liquénica en términos de PQa. Al mismo tiempo, las contribuciones de la desviación típica, de los valores máximos alcanzados durante las fumigaciones, o de la distancia entre los valores máximos y mínimos de la concentración de SO₂ registrados en las cámaras, no resultaron ser significativas (capítulo 5.2.1.2).

En resumen, los líquenes parecen no denotar síntomas, en cuanto a degradación de clorofilas se refiere, frente a picos de concentración del contaminante, por lo que serían mejores bioindicadores del efecto de exposiciones crónicas que de episodios de fumigaciones agudas con SO₂. Estos resultados obtenidos en cámaras están en consonancia con los observados en trabajos de campo en áreas en las que se detectaban severos síntomas de deterioro en líquenes epífitos. Tal es el caso del seguimiento de los efectos observados en los líquenes, en respuesta a diversos contaminantes atmosféricos, realizado en Holanda, entre 1976 y 1990, en el que se puso de manifiesto que eran las tendencias en la concentración de SO₂, expresadas como valores medios, y no los picos episódicos, las que determinaban la respuesta liquénica (Van Dobben, 1992). Una posible explicación estribaría en que si bien exposiciones breves a elevadas dosis del contaminante reducen muy significativamente la tasa fotosintética, sin embargo, no producen daños irreversibles.

Puckett et al. (1974) observaron una reducción del 90% de la tasa de asimilación neta de CO₂ de Umbilicaria muhlenbergii, tras la exposición a 75 ppm de SO₂ durante 15 minutos, al tiempo que no detectaban variaciones en el contenido en clorofilas. Otros autores han observado una significativa recuperación, tras haber inducido una depresión de la fotosíntesis en talos de Evernia mesomorpha al exponerlos a 350 ppb durante 1 h (Huebert et al. 1985).

En cualquier caso, sea cual sea la explicación de este fenómeno, queda demostrado que no es posible predecir la magnitud de la respuesta liquénica, ignorando la duración de la exposición al contaminante. Coincidiendo con recientes estudios (Sanz, Gries & Nash 1993) y de acuerdo con los resultados expuestos, cabe sugerir que las escalas de sensibilidad de los líquenes al SO₂, deben basarse en una relación dosis-respuesta, dado que ésta depende no sólo de la concentración media del contaminante en la atmósfera sino además del tiempo que dura la exposición al mismo (capítulo 5.2.1.2).

Por otra parte, la cinética de dicha relación dosis-respuesta no es lineal. Por el contrario, se trata de una función cuya pendiente se amortigua a medida que aumenta la dosis (capítulo 5.2.1.2). Basándose en este hecho, cabría argumentar que en el caso de fumigaciones crónicas, cuando el tiempo de exposición al contaminante es del orden de años -tal como ocurre frecuentemente en los estudios de campo-, la importancia de la duración de la exposición podría pasar a un segundo plano. Téngase en cuenta, que las escalas, tradicionalmente empleadas para biomonitorizar niveles de contaminantes, basadas en la relación entre respuesta liquénica y concentración media de contaminante, que ignoran el tiempo de exposición, han sido elaboradas a partir de estudios de campo.

Sin embargo, los resultados obtenidos en el seguimiento in situ de la evolución de talos de Anaptychia ciliaris se oponen a esta hipótesis (capítulo 5.3). Entre las variables independientes que mejor explicaban el decaimiento del PQa, se encontraba

el tiempo de exposición de los transplantes en el área de estudio. Es preciso considerar que la hipótesis de que este hecho podría deberse a un decaimiento generalizado por efecto del trasplante es poco probable, dado que el 40% de las estaciones con transplantes presentaron valores medios de PQa óptimos (> 1.30) a lo largo de los cuatro años de estudio. Por ello, el hecho de que el tiempo transcurrido, desde que tuvo lugar el trasplante, tenga un alto valor descriptivo, indica que el decaimiento del PQa en determinadas estaciones responde a un efecto acumulativo a lo largo del tiempo y por ende, conduce a considerar una causa persistente más que episódica o puntual. Por este motivo, aún en estudios de campo, tras largos periodos de exposición al agente inductor del daño, parece igualmente importante tener en cuenta la variable "tiempo de exposición" y, en conclusión recomendar, aún para estos estudios, el desarrollo de escalas fundamentadas en la relación dosis-respuesta.

Estudios previos han demostrado que esa respuesta frente al contaminante engloba diversos mecanismos de acción en el caso del SO_2 (Fields 1988). Tanto en Ramalina farinacea como en Anaptychia ciliaris, las mitocondrias del fotobionte liquénico se revelaron como las primeras dianas subcelulares en las que se manifestaba la toxicidad del SO_2 (capítulo 5.2.3). La alta sensibilidad de las mitocondrias del fotobionte parece ser característico de la respuesta liquénica (Holopainen 1986). Solapando con avanzadas etapas de alteración estructural de las mitocondrias, el cloroplasto manifestaba un marcado descenso de la densidad de tilacoides, acompañado de una deformación de los mismos, que permitía observar amplios espacios del estroma con un marcado aspecto granular. Sin embargo, la aparición de síntomas ultraestructurales, no debe interpretarse necesariamente como indicadora de perturbaciones en la funcionalidad de los orgánulos celulares. Es decir, aún no se conoce cuál es el significado y la repercusión de cada una de las alteraciones estructurales observadas, en la fisiología celular. Por ello, el concepto de orgánulos diana debe ser entendido con cautela y siempre dentro de su sentido

estructural.

Como consecuencia de la exposición al SO_2 , la variación en la señal de fluorescencia, en términos de F_p , podría interpretarse como una caída de la eficiencia en la reducción de la población de moléculas del primer aceptor de la cadena de transporte electrónico fotosintético (Q_A). Estadios más avanzados de daño se corresponderían con fenómenos de degradación de pigmentos, tales como la feofitinización de las clorofilas.

Las primeras aproximaciones que establecían escalas basadas en una relación biunívoca y simple entre la concentración media de SO_2 , como variable independiente, y la respuesta líquénica, como variable dependiente (Hawksworth & Rose 1970; James 1982; Crespo et al. 1977; Crespo & Bueno 1982), han dado paso a modelos múltiples que consideran además de la dosis del contaminante, otras variables independientes. Los resultados obtenidos en la presente investigación (capítulo 5.2.1.2 y 5.2.4) muestran que tras el mismo número de días de exposición (20 días) a valores medios de concentración de SO_2 prácticamente iguales (122 ppb frente a 124 ppb), el porcentaje de decaimiento del PQa respecto al valor medio control, en ocasiones fué del 3.4%, no significativo, y en otras del 40.4% y significativo ($P < 0.05$). Esta diferencia evidencia que la respuesta al SO_2 viene determinada por otras variables además de la dosis de contaminante. En el modelo desarrollado por Grace, Gillespie & Puckett (1985), la concentración media de SO_2 umbral para un periodo de exposición de 24 h, por encima de la cual se detectaban daños en líquenes (pérdida de potasio), se estimaba a partir de los valores de la velocidad del viento, la temperatura y humedad relativa del aire, la temperatura en la superficie del talo líquénico, y el contenido hídrico inicial del talo líquénico. Sean éstas u otras las variables que determinen la respuesta al SO_2 , el hecho es que el desarrollo de un modelo necesariamente conlleva la selección de un subconjunto restringido de variables independientes, de entre todas las posibles, capaz de explicar la respuesta

observada y con esta base predecir, con cierto grado de certidumbre, la respuesta que cabría esperar frente a futuros valores de estas variables o incluso, frente a situaciones no experimentadas. La selección de estas variables es, en sí misma, un proceso de síntesis de la información recogida en el conjunto de medidas que *a priori* podrían determinar la respuesta al contaminante. Mediante un análisis de selección progresiva de variables, se seleccionaron tres variables a partir de un conjunto que también incluía el aporte de nitrato, bajas temperaturas, temperatura media y humedad relativa media durante las fumigaciones, entre otras. Las variables que constituían el conjunto con mayor valor descriptivo resultaron ser, la dosis de SO₂, el efecto conjunto de SO₂ y heladas, y la precipitación en los días anteriores a la recolección, cuyo efecto variaba estacionalmente. Es interesante destacar la coincidencia entre el modelo y el seguimiento *in situ* de la evolución de los pigmentos en *Anaptychia ciliaris*, al ser seleccionado en ambos casos el efecto de la precipitación sobre la respuesta liquénica. Al tratarse de un muestreo anual, no es posible valorar el efecto de la estacionalidad, sin embargo, el estudio de campo coincide con el modelo, al atribuir un papel negativo a la precipitación, en este caso, a la precipitación total recogida entre campaña y campaña. En contraste con este resultado, se detectó un efecto estimulante o al menos protector, de una mayor frecuencia de las precipitaciones (mayor número de días de lluvia). Tal como ya se ha comentado (capítulo 5.3), este hecho podría estar relacionado con un mayor número de ciclos de hidratación-deshidratación del talo liquénico, y por ello, con un más largo periodo de actividad metabólica, lo cual podría favorecer los procesos de reparación de posibles daños.

El interés del modelo propuesto no se limita a su capacidad de predecir la respuesta liquénica en experimentos en cámaras, sino que su mayor aportación consiste en el planteamiento de hipótesis de trabajo, basadas en evidencias previas, a contrastar en futuras investigaciones sobre moduladores de la respuesta al SO₂, que potencialmente podrían estar operando en el medio natural.

Sin embargo, dado que el modelo planteado se basa en la combinación lineal de variables independientes, o a lo sumo, del producto de las mismas, este modelo no contempla interacciones más complejas, como es, por ejemplo, la descrita para la combinación del SO₂ y el NO₃⁻ (capítulo 5.2.4). En este sentido, no es de extrañar que el aporte de nitrato no haya sido seleccionado como descriptor de la respuesta líquénica, dado que su efecto puede ser extremadamente distinto cuando se aplica sólo o en combinación con SO₂.

Estudios previos indican que el NO₃⁻ cuando es suministrado aisladamente a líquenes, en dosis moderadas, presenta un efecto fertilizante (Kauppi 1980a; Blum et al. 1989). Este efecto se corresponde con un incremento en el número y tamaño de las células algales y en el contenido en clorofilas (Holopainen & Kärenlampi 1985). Tras 14 días de tratamiento con una solución acuosa de NO₃⁻, de la misma concentración que la empleada en anteriores estudios, 0.01M (Holopainen & Kärenlampi 1985; Kauppi 1980a), se observó un incremento del 30% en el contenido medio en clorofilas de talos de Ramalina farinacea (experimento 8, capítulo 5.2.1.2). Sin embargo, incluso con una concentración de NO₃⁻, similar a la registrada en el agua de lluvia de lugares presuntamente contaminados, 50µM (UK RGAR 1987), se detectó un incremento en la proporción clorofila/feofitina, que sólo fue significativo en el caso de Anaptychia ciliaris, tras 38 días de aplicación. Por tanto, un aporte suplementario de NO₃⁻, podría explicar los resultados de campo observados en el área estudiada, en la que, a los valores más elevados de contenido en clorofilas totales observados en los ejemplares autóctonos, se sumaba una tendencia progresiva hacia valores superiores en los transplantes. Diversos autores han detectado un incremento en el contenido en clorofilas de líquenes, como resultado del efecto producido por contaminantes atmosféricos (Arb & Brunold 1990; Arb et al. 1990; Ellin & Seaward 1989; Kauppi 1980a). Sin embargo, se desconoce cuál sería el efecto esperado ante la posible interacción entre contaminantes nitrogenados y el SO₂, frecuentemente

emitidos simultáneamente por las mismas fuentes.

A la luz de los resultados obtenidos cuando se combina el aporte de NO_3^- con la exposición a SO_2 , parece evidente que el mero conocimiento de la coexistencia de ambos compuestos en atmósferas contaminadas, no es suficiente información como para predecir si el efecto sobre la simbiosis líquénica será sinérgico, antagónico o aditivo. Este abanico de posibilidades en la respuesta ha llevado a algunos autores, que estudiando la interacción de SO_2 con otros contaminantes obtuvieron este mismo resultado, a calificarla como respuesta variable ("*variable response*"; Heagle & Johnston 1979). Sin embargo, esta respuesta no varía aleatoriamente, de hecho, su divergencia del patrón aditivo está vinculada al grado de daño que causaría el SO_2 , en caso de que actuara aisladamente, es decir, en ausencia de otros contaminantes. De los experimentos en cámaras, se concluye que cuando el daño producido por la exposición a SO_2 , era severo, entonces el aporte simultáneo de NO_3^- , amortiguaba el efecto del SO_2 . Por el contrario, en aquellos casos en que el efecto de la exposición al SO_2 no era significativo, la mezcla producía un daño superior al que cabría esperar a partir de la suma de los efectos de ambos contaminantes por separado, es decir, se observaba una interacción sinérgica. Esta estrecha relación permite estimar el tipo de respuesta a la mezcla de ambos contaminantes, conociendo el efecto que produciría el SO_2 por separado (capítulo 5.2.4). En este sentido, cobran especial importancia para la estima del tipo de respuesta a la mezcla $\text{SO}_2 + \text{NO}_3^-$, los modelos dirigidos a la predicción de la respuesta al SO_2 que no consideran la interacción de éste con otros contaminantes.

Este patrón de respuesta a la combinación de SO_2 y NO_3^- , que no había sido descrito en líquenes anteriormente, ya había sido observado al exponer plantas vasculares al SO_2 en combinación con el NO_3^- (Tingey et al. 1971; Ashenden & Mansfield 1978; Ashenden 1979; Ashenden & Williams 1980). Sin embargo, llama la atención que este mismo patrón también se había observado en plantas vasculares

en respuesta a la combinación del SO_2 con otros contaminantes atmosféricos, como el O_3 (Matsushima 1971; Tingey et al. 1973; Heagle & Johnston 1979) o el HF (McCune 1984). A partir de los estudios realizados sobre la interacción entre SO_2 y HF, se ha propuesto el desarrollo de modelos del tipo "superficie de respuesta", que resuman los efectos más que aditivos, aditivos y menos que aditivos en función de los efectos inducidos por las diferentes dosis de contaminante por separado, superando así la aparente contradicción entre las distintas respuestas observadas frente a la misma mezcla de contaminantes (McCune 1984). Este tipo de superficies de respuestas podrían aplicarse a la interacción del SO_2 con el NO_3^- o con el O_3 (Runeckles 1984). A la luz de esta interpretación globalizadora quedarían explicadas algunas de las pocas interacciones entre contaminantes observadas en líquenes. Tal es el caso de la interacción entre SO_2 y O_3 , en la que cuando uno de los gases inducía daños significativos, cuando era aplicado por separado, la mezcla aminoraba estos efectos, comportándose por tanto el SO_2 como antagonista del O_3 (Eversman & Sigal 1987).

Se han sugerido diversos mecanismos con el fin de explicar el detrimento producido por la combinación de SO_2 y NO_3^- ; todos ellos basados en el desequilibrio de los niveles de nitrito en el interior celular y en la acción simultánea de éste con el ión sulfito (Wellburn et al. 1981; Wellburn 1990). Al mismo tiempo, otros autores han hipotetizado que los contaminantes nitrogenados podrían neutralizar los efectos producidos por contaminantes ácidos (Kauppi 1980a), o al menos aminorarlos al incrementar la capacidad de asimilación de los vegetales expuestos e inducir en ellos un aumento en la síntesis de proteínas (Scott et al. 1989). Sin embargo, no se conoce cuál pudiera ser la base fisiológica capaz de explicar que una misma mezcla de contaminantes pueda inducir efectos tanto sinérgicos, como antagónicos, como aditivos.

Igualmente, permanece la duda acerca de si esta variada fenomenología

observada en experiencias en cámaras de fumigación, realmente tiene lugar en los hábitat donde estas especies crecen de forma espontánea. En otras palabras, serán precisas posteriores investigaciones que acoten, de entre todas las posibilidades ensayables en cámaras, cuántas serían posibles en condiciones naturales y en qué situaciones podrían llegar a ser reales.

BIBLIOGRAFIA

7. Bibliografía

- ABAD, M.A.; ABADIA, J.; HUERTA, J.L. & FERNANDEZ, J.M. 1987. Evaluación de los efectos de los agentes contaminantes sobre sistemas biológicos en un invernadero experimental. Inédito.
- AMMANN, K.; HERZIG, R.; LIEBENDOERFER, L. & URECH, M. 1987. Multivariate correlation of deposition data of 8 different air pollutants to lichen data in a small town in Switzerland. *Advances in Aerobiology* 51: 401-406.
- ARB, C. & BRUNOLD, C. 1990. Lichen physiology and air pollution. I Physiological responses of in situ *Parmelia sulcata* among air pollution zones within Biel, Switzerland. *Can. J. Bot.* 68: 35-42.
- ARB, C., MUELLER, C., AMMANN, K. & BRUNOLD, C. 1990. Lichen physiology and air pollution. *New Phytol.* 115: 431-437.
- ARNDT, U. 1974. The Kautsky-effect: a method for the investigation of the action of air pollutants in chloroplast. *Environ. Poll.* 6: 181-194.
- ARNON, D.I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplast polyphenoloxidase in Beta vulgaris. *Plant Physiology* 24(1): 1-15.
- ASCASO, C.; BROWN, D.H. & RAPSCH, S. 1985. Ultrastructural studies of desiccated lichens. In: Lichen physiology and cell biology. Brown, D.H. Ed. Plenum Press. New York. E.E.U.U.
- ASCASO, C.; BROWN, D.H. & RAPSCH, S. 1988. The effect of desiccation on pyrenoid structure in the oceanic lichen Parmelia laevigata. *Lichenologist* 20 (1): 31-39.
- ASCASO, C. & FORTUN, C. 1981. Ultrastructural modifications and uptake of nutrient elements in Lasallia pustulata after treatment with different solutions. *Ann. Edafol. Agrobiol.* 7-8: 1243-1252.

- ASHENDEN, T.W. 1979. Effects of long-term exposures to SO₂ and NO₂ pollution on the growth of Dactylis glomerata L. and Poa pratensis L. *Environ. Pollut.* 18: 249-258.
- ASHENDEN, T.W. & MANSFIELD, T.A. 1978. Extreme pollution sensitivity of grasses when SO₂ and NO₂ are present in the atmosphere together. *Nature (London)* 273: 142-143.
- ASHENDEN, T.W. & WILLIAMS, I.A.D. 1980. Growth reductions in Lolium multiflorum Lam. and Phleum pratense L. as a result of SO₂ and NO₂ pollution. *Environ. Pollut. (Ser. A)* 21: 131-139.
- AWASTHI, G. 1986. Lichen genus Usnea in India. *Journ. Hattori Bot. Lab.* 61: 333-421.
- BADDELEY, M.S.; FERRY, B.W. & FINEGAN, E.J. 1971. A new method of measuring lichen respiration: Response of selected species to temperature, pH and sulphur dioxide. *Lichenologist* 5: 18-25.
- BALAGUER, L. & MANRIQUE, E. 1991. Interaction between sulfur dioxide and nitrate in some lichens. *Envir. Exp. Bot.* 24: 239-245.
- BARKMAN, J.J. 1958. Phytosociology and ecology of criptogamic epiphytes. Van Gorcum & Comp. N.V. Assen. Holanda.
- BARNES, J.D.; BALAGUER, L.; MANRIQUE, E.; ELVIRA, S. & DAVISON, A.W. 1992. A reappraisal of the use of DMSO for the extraction and determination of chlorophyll a and b in lichens and higher plants. *Envir. Exp. Bot.* en prensa.
- BARNES, J. & DAVISON, A. 1986. Assesment of pollution-induced injury by chlorophyll fluorescence analysis. COST-Workshop: Direct effects of dry and wet deposition on forest ecosystems in particular canopy interactions. Göteborg. Suecia.
- BARNES, J.D.; REILING, K.; DAVISON, A.W. & RENNER, C.J. 1988. Interaction between ozone and winter stress. *Environ. Poll.* 53: 235-254.

- BATES, J.W.; BELL, J.N.B. & FARMER, A.M. 1990. Epiphyte recolonization of oaks along a gradient of air pollution in South-East England, 1979-1990. *Environ. Pollut.* 68: 81-99.
- BJÖRKMAN, O. & POWLES, S.B. 1984. Inhibition of photosynthetic reactions and the water stress: interaction with light level. *Planta* 161: 490-504.
- BLUM, O.B.; NASH III, T.H. & GEBAUER, R. 1989. The effect of nitrate on CO₂ exchange in the epiphytic lichens Ramalina menziesii Tayl. and Pseudocyphellaria anthraspis (Ach.) Magn. from Central California. In: Air pollution effects on vegetation. Martin, J.L. & Jensen, K.F. Eds. U.S. Dept. of Agriculture, Broomal, PA.
- BOONPRAGOB, K. & NASH III, T.H. 1990. Seasonal variation of elemental status in the lichen Ramalina menziesii Tayl. from two sites in southern California: evidence for dry deposition accumulation. *Envir. Exp. Bot.* 30: 415-428.
- BOONPRAGOB, K. & NASH III, T.H. 1991. Physiological responses of the lichen Ramalina menziesii Tayl. to the Los Angeles urban environment. *Envir. Exp. Bot.* 31: 229-238.
- BOONPRAGOB, K.; NASH III, T.H. & FOX, C.A. 1989. Seasonal deposition patterns of acidic ions and ammonium to the lichen Ramalina menziesii Tayl. in southern California. *Envir. Exp. Bot.* 29: 187-197.
- BRIANTAIS, J.M.; VERNOTTE, C.; KRAUSE, G.H. & WEIS, E. 1986. Chlorophyll fluorescence of higher plants: chloroplasts and leaves. In: Light emission by plants and photosynthetic bacteria. Govindjee, J.A. & D.C. Fork, D.C. Eds. Academic Press. New York.
- BRODO, I.M. 1961. Transplant experiments with corticolous lichens using a new technique. *Ecology* 42: 838-841.
- BROWN, D.H. 1980. Notes on the instability of extracted chlorophyll and a reported effect of ozone on lichen algae. *Lichenologist* 12: 151-154.

- BROWN, D.H. & HOOKER, T.N. 1977. The significance of acidic lichen substances in the estimation of chlorophyll and phaeophytin in lichens. *New Phytol.* 78, 617-624.
- BURNISON, B.K. 1980. Modified dimethyl sulfoxide (DMSO) extraction for chlorophyll analysis of phytoplankton. *Can. J. Fisheries Aquat. Sci.* 37: 729-732.
- BÜDEL, B. 1992. Morphological adaptations to extreme environments in the lichen genus Peltula. Second International Lichenological Symposium IAL 2. Hemmeslöv, Båstad. Suecia.
- CASE, J.W. 1980. The influence of three sour gas processing plants on the ecological distribution of epiphytic lichens in the vicinity of Fox Creek and Whitecourt, Alberta, Canada. *Water, Air, Soil Pollut.* 14: 45-68.
- CHILVERS, G.A.; LING, L.M. & AHFORD, A.E. 1978. Polyphosphate in the fungi of two lichens. *New Phytol.* 81: 571-574.
- CORNIC, G., LE GOUALLEC, J.L., BRIANTAIS, J.M. & HODGES, M. 1989. Effect of dehydration and high light on photosynthesis of two C₃ plants (Phaseolus vulgaris L. and Elatostema repens (Lour.) Hall f.). *Planta* 177: 84-90.
- CRESPO, A.; BARRENO, E.; SANCHO, L.G. & BUENO, A.G. 1981. Establecimiento de una red de valoración de pureza atmosférica en la provincia de La Coruña (España) mediante bioindicadores liquénicos. *Lazaroa* 3: 289-311.
- CRESPO, A. & BUENO, A.G. 1982. Valoración de áreas isocontaminadas en la Casa de Campo de Madrid mediante el análisis de bioindicadores (Líquenes epífitos). *Collectanea Botanica* 13: 279-294.
- CRESPO, A.; MANRIQUE, E.; BARRENO, E. & SERIÑA, E. 1977. Valoración de la contaminación atmosférica del área urbana de Madrid mediante bioindicadores (líquenes epífitos). *Anal. Inst. Bot. Cavanilles* 34: 71-94.
- CULBERSON C.F. 1972. Improved conditions and new data for the identification of lichen products by standardized thin-layer chromatographic method. *J.*

Chromatog. 72: 113-125.

CULBERSON, C.F.; CULBERSON, W.L. & JOHNSON, A. 1977. Second supplement to "Chemical and Botanical Guide to Lichen Products". The American Bryological and Lichenological Society. Missouri Botanical Garden. St. Louis.

CULBERSON C.F. & KRISTINSSON H. 1970. A standardized method for the identification of lichen products. *J. Chromatog.* 46: 85-93.

DAVISON, A.W. & BARNES, J.D. 1986. Effects of winter stress on pollutant responses. In: How are the effects of air pollutants on agricultural crops influenced by the interaction with other limiting factors?. Proceedings COST-CEC Workshop. Roskilde.

DAVISON, A.W.; BARNES, J.D. & RENNER, C.J. 1988. Interactions between air pollutants and cold stress. In: Air pollution and plant metabolism. Schulte-Hostede, S.; Darrall, N.M.; Blank, L.W. & Wellburn A.R. Eds. Elsevier Applied Science. Londres. Reino Unido.

DAWSON, J.L. & NASH III, T.H. 1980. Effects of air pollution from copper smelters on a desert grassland community. *Envir. Exp. Bot.* 20: 61.

DEMMING, B. & BJÖRKMAN, O. 1987. Comparison of the effect of excessive light on chlorophyll fluorescence (77K) and photon yield of O₂ evolution in leaves of higher plants. *Planta* 171: 171-184.

DEMMIG-ADAMS, B., ADAMS III, W.W., WINTER, K., MEYER, A., SCHREIBER, U., PEREIRA, J.S., KRÜGER, A., CZYGAN, F.C. & LANGE, O.L. 1989. Photochemical efficiency of photosystem II, photon yield of O₂ evolution, photosynthetic capacity and carotenoid composition during the midday depression of net CO₂ uptake in Arbutus unedo growing in Portugal. *Planta* 177: 377-387.

DEMMIG-ADAMS, B., ADAMS III, W.W., GREEN, T.G.A., CZYGAN, F.C. & LANGE, O.L. 1990a. Differences in the susceptibility to light stress in two lichens

- forming a phycosymbiodeme, one partner possessing and one lacking the xanthophyll cycle. *Oecologia* 84: 451-456.
- DEMMIG-ADAMS, B., MAGUAS, C., ADAMS III, W.W., MEYER, A., KILLIAN, E. & LANGE, O.L. 1990b. Effect of 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.
- DE WIT, T. 1976. Epiphytic lichens and air pollution in the Netherlands. *Biblioth. Lichenol.* 5:1-227.
- DORRIES, W. 1932. Über die Brauchbarkeit der spectroscopic Phaeophytinprobe in der Rauchshaden-Diagnostik. *Zeitschr. Pflanzenkr. Gallenk.* 42: 257-273.
- ELLIN, S.J. & SEAWARD, M.R.D. 1989. Lichens. *The Liphook Forest Fumigation Project Report*. Junio-Diciembre.
- EVERSMAN, S. 1978. Effects of low-level SO₂ on Usnea hirta and Parmelia chlorocroa. *Bryologist* 81: 368-377.
- EVERSMAN, S. 1980. Responses of two lichen species to low-level SO₂. In: The Bioenvironmental Impact of a coal-fired power-plant. Preston, E.M. & O'Guinn, D.W. Eds. Environmental Research Laboratory. Colstrip, Montana.
- EVERSMAN, S. & SIGAL, L.L. 1987. Effects of SO₂, O₃, and SO₂ and O₃ in combination on photosynthesis and ultrastructure of two lichen species. *Can. J. Bot* 65: 1806-1818.
- FERRY, B.W. & COPPINS B.J. 1979. Lichen transplant experiments and air pollution studies. *Lichenologist* 11: 63-73.
- FIELDS, R.F. 1988. Physiological responses of lichens to air pollutant fumigations. In: Lichens, Bryophytes and Air Quality. Nash III, T.H. & Wirth, V. Eds. *Bibl. Lichenol.* 30. Berlin.
- FRIEDL, T. 1989. Comparative ultrastructure of pyrenoids in Trebouxia (Microthamniales, Chlorophyta). *Pl. Syst. Evol.* 164: 145-159.

- GALUN, M. & RONEN, R. 1988. Interaction of lichens and pollutants. In: Handbook of Lichenology, Vol. 3. Galun, M. Ed. CRC Press. Boca Raton, Florida.
- GARTY, J. 1988. Comparisons between the metal content of a transplanted lichens before and after the start-up of a coal-fired power station in Israel. *Can. J. Bot.* 66: 668-671.
- GARTY, J.; RONEN, R. & GALUN, M. 1985. Correlation between chlorophyll degradation and the amount of some elements in the lichen Ramalina duriaei (De Not.) Jatta. *Envir. Exp. Bot.* 25(1): 67-74.
- GILBERT, O.L. 1970. A biological scale for the estimation of sulfur dioxide pollution. *New Phytol.* 69: 629-634.
- GILLETTE, D.G. 1984. Concern about atmospheric pollution. In: Air pollution and plant life. Treshow, M. Ed. John Wiley & Sons Ltd. Chichester. Reino Unido.
- GRACE, B.; GILLESPIE, T.J. & PUCKETT, K.J. 1985. Sulphur dioxide threshold concentration values for Cladina rangiferina in the Mackenzie Valley, N.W.T. *Can. J. Bot.* 63: 806-812.
- GREEN, T.G.A. & SNELGAR, W.P. 1982. Carbon dioxide exchange in lichens: Relationship between the diffusive resistance of carbon dioxide and water vapour. *Lichenologist* 14: 255-260.
- GREENHALGH, G.N. & ANGLESEA, D. 1979. The distribution of algal cells in lichen thalli. *Lichenologist* 11: 293-305.
- GRIES, C., SANZ, M.J., BLUM, O.B. & NASH III, T.H. 1992. Effects of trace gaseous pollutants on lichens. Second International Lichenological Symposium IAL 2. Hemmeslöv, Båstad. Suecia.
- HAGEMAN, C. & FAHSELT, D. 1990. Multiple enzyme forms as indicators of functional sexuality in the lichen Umbilicaria vellea. *Bryologist* 93: 389-394.
- HÄLLBOM, L. & BERGMAN, B. 1979. Influence of certain herbicides and a forest fertilizer on the nitrogen fixation by the lichen Peltigera praetextata. *Oecologia*

(Berl.) 40: 19-27.

- HALLIWELL, B. 1984. Chloroplast metabolism. Clarendon Press. Oxford.
- HAWKSWORTH, D.L. & ROSE, F. 1970. Qualitative scale for estimating sulfur dioxide air pollution in England and Wales using epiphytic lichens. *Nature* 227: 145-148.
- HEAGLE, A.S. & JOHNSON, J.W. 1979. Variable responses of soybean to the mixtures of O₃ and SO₂. *J. Air. Pollut. Control. Assn.* 29: 729-732.
- HENDERSON-SELLERS, A. & SEAWARD, M.R.D. 1979. Monitoring lichen reinvasion of ameliorating environments. *Environ. Pollut.* 19: 207-213.
- HICKS, B.B. 1989. Overview of deposition processes. In: The role of nitrogen in the acidification of soil and surface waters. Malanchuck, J.L. & Nilsson, J. Miljørapport.
- HILL, D.J. 1971. Experimental study of the effects of sulphite on lichens with reference to atmospheric pollution. *New Phytol.* 70: 831-836.
- HILL, D.J. 1985. Changes in photobiont dimensions and number during co-development of lichen symbionts. In: Lichen physiology and cell biology. Brown, D.H. Ed. Plenum Press. New York. E.E.U.U.
- HISCOX J.D. & ISRAELSTAM G.F. 1979. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. *Can. J. Bot.* 57: 1332-1334.
- HOFFMAN, G.R. 1974. The influence of a paper pulp mill in the vicinity of Lewiston, Idaho and Clarkston, Washington. *Environ. Pollut.* 7: 285-301.
- HOLOPAINEN, T.H. 1983. Ultrastructural changes in epiphytic lichens, Bryoria capilaris and Hypogymnia physodes, growing near a fertilizer plant and a pulp mill in central Finland. *Ann. Bot. Fennici* 20: 169-185.
- HOLOPAINEN, T.H. 1984a. Types and distribution of ultrastructural symptoms in epiphytic lichens in several urban and industrial environments in Finland. *Ann.*

- Bot. Fennici* 21: 213-229.
- HOLOPAINEN, T.H. 1984b. Cellular injuries in epiphytic lichens transplanted to air polluted areas. *Nord. J. Bot.* 4: 393-408.
- HOLOPAINEN, T.H. 1986. Effects of environmental factors on lichen ultrastructure with special reference to air pollution. Tesis Doctoral.
- HOLOPAINEN, T.H. & KÄRENLAMPI, L. 1984. Injuries to lichen ultrastructure caused by sulphur dioxide fumigations. *New Phytol.* 98: 285-294.
- HOLOPAINEN, T.H. & KÄRENLAMPI, L. 1985. Characteristic ultrastructural symptoms caused by experimental exposure to nitrogen compounds and fluorides. *Ann. Bot. Fennici* 22: 333-342.
- HOLOPAINEN, T.H. & KAUPPI, M. 1989. A comparison of light, fluorescence and electron microscopic observations in assessing the SO₂ injury of lichens under different moisture conditions. *Lichenologist* 21: 119-134.
- HUEBERT, D.B.; L'HIRONDELLE S.J. & ADDISON P.A. 1985. The effects of sulphur dioxide on net CO₂ assimilation in the lichen Evernia mesomorpha Nyl. *New Phytol.* 100: 643-651.
- HUR, J.S. & WELLBURN, A.R. 1991. The effects of SO₂ on Azolla-Anabaena symbiosis. *Supplement to Plant Physiology* 96(1): 173.
- JACOB, S.W.; ROSENBAUM, E.E. & WOOD, D.C. 1971. Dimethyl sulfoxide, Vol. 1. Basic concepts of DMSO. Dekker Publ. Co.
- JACOBSON, J.S. & SHOWMAN, R.E. 1984. Field surveys of vegetation during a period of rising electric power generation in the Ohio River Valley. *J. Air Pollut. Control Assoc.* 34: 48-51.
- JAMES, P. 1982. Lichens and air pollution. British Museum (Natural History). BP Educational Services.
- JENSEN, M. & FEIGE, G.B. 1991. Quantum efficiency and chlorophyll fluorescence in the lichens Hypogymnia physodes and Parmelia sulcata. *Symbiosis* 11: 179-

- JØHNSEN, I. & SØCHTING, U. 1973. Influence of air pollution on the epiphytic lichen vegetation and bark properties of deciduous trees in the Copenhagen area. *Oikos* 24: 344-351.
- JONES, T. & MANSFIELD, T.A. 1982. The effect of SO₂ on growth and development of seedlings of Phleum pratense under different light and temperature environment. *Environ. Pollut.* 27: 57-71.
- KAPPEN, L.; SCHROETER, B. & SANCHO, L.G. 1990. Carbon dioxide exchange of Antarctic crustose lichens in situ measured with a CO₂/H₂O porometer. *Oecologia* 82: 311-316.
- KAUPPI, M. 1976. Lichen transplant techniques for air pollution experiments. *Flora (Jena)* 165: 407-414.
- KAUPPI, M. 1980a. The influence of nitrogen-rich pollution components on lichens. *Acta Univ. Oulensis, A* 101: 1-25.
- KAUPPI, M. 1980b. Fluorescence microscopy and microfluorometry for the examination of pollution damage in lichens. *Ann. Bot. Fennici* 17: 163-173.
- KAUPPI, M. & HALONEN, P. 1992. Lichens as indicators of air pollution in Oulu, Northern Finland. *Ann. Bot. Fennici* 29: 1-9.
- KAUPPI, M. & MIKKONEN, A. 1980. Floristic versus single species analysis in the use of epiphytic lichens as indicators of air pollution in a boreal forest region, Northern Finland. *Flora* 169: 255-281.
- KERSHAW, K.A. 1975. Studies on lichen dominated systems XII. The ecological significance of thallus color. *Can. J. Bot.* 53: 660-667.
- KORTESHARJU, J.; SAVONEN, K. & SÄINÄTKARY, T. 1990. Element contents of raw humus forest moss and reindeer lichens around a cement works in Northern Finland. *Ann. Bot. Fennici* 27: 221-230.
- KRAUSE, G.H. 1988. Photoinhibition of photosynthesis. An evaluation damaging and

- protective mechanisms. *Physiol. Plant.* 74: 566-574.
- KRAUSE, G.H. & SOMERSALO, S. 1989. Fluorescence as a tool in photosynthesis research: application in studies of photoinhibition, cold acclimation and freezing stress. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 323: 281-293.
- KRAUSE, G.H. & WEIS, E. 1984. Chlorophyll fluorescence as a tool in plant physiology. II. Interpretation of the fluorescence signal. *Photosynthesis Research* 5: 139-157.
- LANGE, O.L. 1954. Einige Messungen zum Wärmehaushalt poikilohydrer Flechten und Moose. *Arch Meteorol, Geophysik Bioklimatol Ser B: Allg Biol Klimatol* 5:182-190.
- LARSON, D.W. & CAREY, C.K. 1986. Phenotypic variation within "individual" lichen thalli. *Amer. J. Bot.* 73: 214-223.
- LEBLANC, F. & DE SLOOVER, J. 1970. Relation between industrialization and the distribution and growth of epiphytic lichens and mosses in Montreal. *Can. J. Bot.* 48: 1485-1496.
- LEBLANC, F.; RAO, D.N. & COMEAU, G. 1972. The epiphytic vegetation of Populus balsamifera and its significance as an air pollution indicator in Sudbury, Ontario. *Can. J. Bot.* 50: 519-528.
- LICHTENTHALER, H.K. 1987a. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic membranes. *Meth. Enzym.* 148: 350-382.
- LICHTENTHALER, H.K. 1987b. Chlorophyll fluorescence signatures of leaves during autumnal chlorophyll breakdown, *J. Plant Physiol.* 131: 101-110.
- LICHTENTHALER, H.K. & WELLBURN, A.R. 1983. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochem. Soc. Trans.* 11: 591-592.
- LOSCOS, F. 1877. Líquenes para el Herbario de Aragón. In: Tratado de Aragón, Loscos, F.; Parte Tercera: 25-29.

- MALHOTRA, S.S. 1976. Effects of aqueous sulfur dioxide on chlorophyll destruction in Pinus contorta. *New Phytol.* 78: 101-109. MALHOTRA, S.S. & KHAN, A.A. 1983. Sensitivity to SO₂ of various metabolic processes in an epiphytic lichen, Evernia mesomorpha. *Biochem. Physiol. Pflanz.* 178: 121-130.
- MANRIQUE, E.; REDONDO, F.L.; SERIÑA, E. & IZCO, J. 1989. Estimation of chlorophyll degradation into phaeophytin in Anaptychia ciliaris as a method to detect air pollution. *Lazaroa* 11: 141-148.
- MARSH, J.E. & NASH III, T.H. 1979. Lichens in relation to the Four Corners Power Plant in New Mexico. *Bryologist* 82(1): 20-28.
- MATSUSHIMA, J. 1971. On the composite harm to plants of sulphurous acid gas and oxidant. *Sangyo Kogai* 7: 218-224.
- MCCUNE, D.C. 1984. Terrestrial vegetation air pollutant interactions: gaseous pollutants -hydrogen fluoride and sulphur dioxide. In: Air pollutants and their effects on the terrestrial ecosystems. Krupa, S.V. & Legge, A.H. Eds. Proc. internat. conference on current status and future needs of research on effects and technology. Banff. Alberta. Canada.
- METZLER, K.J. 1980. Lichens and air pollution. A study in Connecticut. *State Geological and Natural History Survey of Connecticut Report of Investigations*: 9.
- MIGUEL, G. & VILLA, S. 1990. Estudio fitoquímico de la flora líquénica de Castellón. Servei de Publicacions. Diputació de Castelló. Castellón.
- MORGAN-HUWS, D.I. & HAYNES, F.N. 1973. Distribution of some epiphytic lichens around an oil refinery at Fawley, Hampshire. In: Air pollution and lichens, Ferry, B.W.; Baddeley, M.S. & Hawksworth, D.L. Eds. The Athlone Press. London.
- NASH III, T.H. 1971. Lichen sensitivity to hydrogen fluoride. *Bull. Torrey Bot. Club* 98: 103-106.
- NASH III, T.H. 1972. Simplification of the Blue Mountain lichen communities near a

- zinc factory. *Bryologist* 75: 315-324.
- NASH III, T.H. 1973. Sensitivity of lichens to sulfur dioxide. *Bryologist* 76(3): 333-339.
- NASH III, T.H. 1975. Influence of effluents from a zinc factory on lichens. *Ecological Monographs* 45: 183-198.
- NASH III, T.H. 1976. Sensitivity of lichens to nitrogen dioxide fumigations. *Bryologist* 79: 103-106.
- NASH III, T.H.; REINER, A.; DEMMING-ADAMS, B.; KILIAN, E.; KAISER, W.M. & LANGE, O.L. 1990. The effect of atmospheric desiccation and osmotic water stress on photosynthesis and dark respiration. *New Phytol.* 116: 269-276.
- NASH III, T.H. & SOMMERFELD, M.R. 1981. Elemental concentrations in lichens in the area of the Four Corners Power Plant, New Mexico. *Envir. Exp. Bot.* 21: 153-162.
- NEWBERRY, G. 1974. The influence of a sulphate-process paper mill on corticolous lichens. *Bryologist* 77: 561-576.
- NIMIS, P.L.; CASTELLO, M. & PEROTTI, M. 1990. Lichens as biomonitors of sulphur dioxide pollution in La Spezia (Northern Italy). *Lichenologist* 2: 333-344.
- NIMIS, P.L.; LAZZARIN, A.; LAZZARIN, G. & GASPARO, D. 1991. Lichens as bioindicators of air pollution by SO₂ in the Veneto Region (NE Italy). *Studia Geobot.* 11: 3-76.
- ÖGREN, E. & ÖQUIST, G. 1985. Effects of drought on photosynthesis, chlorophyll fluorescence and photoinhibition susceptibility in intact willow leaves. *Planta* 166: 380-388.
- ÖQUIST, G. & WASS R. 1988. A portable, microprocessor operated instrument for measuring chlorophyll fluorescence kinetics in stress physiology. *Physiol. Plant.* 73:211-217.

- PAPAGEORGIU, G. 1975. Chlorophyll fluorescence: An intrinsic probe of photosynthesis. In: *Bioenergetics of Photosynthesis*. Govindjee, R. Ed. New York.
- PEARSON, L.C. & SKYE, E. 1965. Air pollution affects pattern of photosynthesis in *Parmelia sulcata*. *Science* 148: 1600-1602.
- PORRA, R.J.; THOMPSON, W.A. & KRIEDEMANN, P.E. 1989. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochim. biophys. Acta* 975: 384-394.
- PUCKETT, K.J.; NIEBOER, E.; FLORA, W.P. & RICHARDSON, D.H.S. 1973. Sulphur dioxide: its effect on photosynthetic ¹⁴C fixation in lichens and suggested mechanisms of phytotoxicity. *New Phytol.* 72: 141-154.
- PUCKETT, K.J.; RICHARDSON, D.H.S.; FLORA, W.P. & NIEBOER, E. 1974. Photosynthetic ¹⁴C fixation by the lichen *Umbilicaria muehlenbergii* (Ach.) Tuck. following short exposures to aqueous sulfur dioxide. *New Phytol.* 73: 1183-1192.
- PYATT, F.B. 1970. Lichens as indicators of air pollution in a steel producing town in South Wales. *Environ. Pollut.* 1: 45-56.
- RAO, D.N. & LEBLANC, F. 1966. Effects of sulphur dioxide on the lichen algae with special reference to chlorophyll. *Bryologist* 69: 69-75.
- RAO, D.N. & LEBLANC, F. 1967. Influence of an iron-sintering plant on corticolous epiphytes in Wawa, Ontario. *Bryologist* 70: 141-157.
- RENGER, G. & SCHREIBER, U. 1986. Practical applications of fluorimetric methods to algae and higher plant research. In: *Light emission by plants and photosynthetic bacteria*. Govindjee, J.A. & Fork, D.C. Eds. Academic Press. New York.

- RENNER, C.J. 1989. Tesis Doctoral.
- REYNOLDS, S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *Cell. Biol.* 17: 200-215.
- RICHARDSON, D.H.S. & NIEBUER, E. 1983. Ecophysiological responses of lichens to sulphur dioxide. *Journ. Hattori Bot. Lab.* 54: 331-351.
- RONEN, R. & GALUN, M. 1984. Pigment extraction from lichens with dimethyl sulfoxide (DMSO) and estimation of chlorophyll degradation. *Envir. Exp. Bot.* 24: 239-245.
- RUNECKLES, V.C. 1984. Impact of air pollutant combinations on plants. In: Air pollution and plant life. Treshow, M. Ed. John Wiley & Sons Ltd. Chichester. Reino Unido.
- SANCHEZ GIMENO, B. 1988. Metodología de estudio de los efectos de la contaminación atmosférica sobre cultivos agrícolas. II Curso Internacional de Atención al Medio. Curso de control biológico de la contaminación atmosférica. Gobierno de Navarra. Pamplona.
- SANCHO, L.G. & KAPPEN, L. 1989. Photosynthesis and water relations and the role of anatomy in Umbilicariaceae (lichens) from central Spain. *Oecologia* 81: 473-480.
- SANCHO, L.G.; VALLADARES, F. & ASCASO, C. 1992. Effect of hydration on colour and temperature in thalli of Umbilicariaceae. Second International Lichenological Symposium IAL 2. Hemmeslöv, Båstad. Suecia.
- SANZ, M.J. 1991. Efectos de la contaminación atmosférica sobre los bioindicadores liquénicos y forófitos. Análisis de métodos para su cuantificación. Comarca de Els Ports (Castellón). Tesis Doctoral.
- SANZ, M.J.; GRIES, C. & NASH III, T.H. 1993. Dose-response relationships for SO₂ fumigations in the lichens Evernia prunastri (L.) Ach. and Ramalina fraxinea (L.) Ach. *New Phytol.* En prensa.

- SCHMID, A.B. 1957. Die Epixyle Flechtenvegetation von München. Thesis, Naturw. Fak. Univ. München.
- SCHÖNBECK, H. 1969. A method for determining the biological effects of air pollution by transplanted lichens. *Staub. Reinhalt. Luft* 29: 14-18.
- SCHREIBER, U. & BILGER, W. 1987. Rapid assessment of stress effects on plant leaves by chlorophyll fluorescence measurements. In: Plant response to stress. Tenhunen, J.D., Catarino, F.M., Lange, O.L. & Oechel, W.C. Eds. Springer-Verlag. Berlin.
- SCHREIBER, U., VIDAVER, W., RUNECKLES, V.C. & ROSEN, P. 1978. Chlorophyll fluorescence assay for ozone injury in intact plants. *Plant Physiol.* 61: 80-84.
- SCOTT, B.J. & ROBSON, A.D. 1991. Assessment of dimethyl sulphoxide as a chlorophyll extractant and for the partitioning of magnesium. *Commun. soil sci. plant anal.* 22: 701-711.
- SCOTT, M.G.; HUTCHINSON, T.C. & FETH, M.J. 1989. A comparison of the effects on Canadian boreal forest lichens of nitric and sulphuric acids as sources of rain acidity. *New Phytol.* 111: 663-671.
- SEELEY, G.R.; DUNCAN, M.J. & VIDAVER, W.E. 1972. Preparative and analytical extraction of pigments from brown algae with dimethyl sulfoxide. *Mar. Biol.* 12: 184-188.
- SERNANDER, R. 1926. Granskor och Fiby urskog. *Acta Phytogeogr. Suec.* 8: 1.
- SHOAF, W.T. & LIUM B.W. 1976. Improved extraction of chlorophyll a and b from algae using dimethylsulphoxide. *Limnol. Oceanog.* 21: 926-928.
- SHOWMAN, R.E. 1981. Lichen recolonization following air quality improvement. *Bryologist* 84: 492-497.
- SHOWMAN, R.E. 1985. Gavin area air quality biomonitoring studies. American Electric Power Service Corporation. Columbus. Ohio.
- SHOWMAN, R.E. 1986. Muskingum area air quality biomonitoring studies. American

- Electric Power Service Corporation. Columbus, Ohio.
- SIDHU, S.S. & ZAKREVSKY, J.G. 1982. A standardized method for determining buffering capacity of plant foliage. *Plant & Soil* 66: 173-179.
- SILBERSTEIN, L. & GALUN, M. 1988. Spectrophotometric estimation of chlorophyll in lichens containing anthraquinones in relation to air pollution assessments. *Envir. Exp. Bot.* 28:145-150.
- SILVA-PANDO, F.J. & ASCASO, C. 1982. Modificaciones ultraestructurales de líquenes epífitos transplantados a zonas urbanas de Madrid. *Collectanea Botanica* 13: 351-374.
- SKOREPA, A.C. & VITT, D.H. 1976. A quantitative study of epiphytic lichen vegetation in relation to SO₂ pollution in western Alberta. *Northern Forest Research Centre Information Report: NOR-X-161*.
- SOIKKELI, S. 1981. Comparison of cytological injuries in conifer needles from several polluted industrial environments in Finland. *Ann. Bot. Fennici* 18: 47-61.
- SOIKKELI, S. & KÄRENLAMPI, L. 1984. Cellular and ultrastructure effects. In: Air pollution and plant life. Treshow, M. Ed. John Wiley & Sons Ltd. Chichester. Reino Unido.
- STATISTICAL GRAPHICS CORPORATION. 1987. Statgraphic statistical graphics system Version 2.6. STSC Inc., Rockville, MD.
- SUNDBOND, E. & ÖQUIST G. 1982. Temperature-induced changes of variable fluorescence-yield in intact leaves. *Plant & Cell Physiol.* 23: 1161-1167.
- SURFER. 1989. Golden Software Inc. Golden Version 4.07. Colorado.
- TARHANEN, S.; OKSANEN, J. & HOLOPAINEN, T. 1992. Ultrastructure and membrane permeability of epiphytic lichens -The effects of Kola emissions in Finnish Lapland. Second International Lichenological Symposium IAL 2. Hemmeslöv, Båstad. Suecia.

- TAYLOR, R.J. & BELL, M.A. 1983. Effects of SO₂ on lichen flora in an industrial area northwest Whatcom County, Washington. *Northw. Sci.* 57: 157-166.
- TINGEY, D.T.; REINERT, R.A.; DUNNING, J.A. & HECK W.W. 1971. Vegetation injury from the interaction of nitrogen dioxide. *Phytopathology* 61: 1506-1511.
- TINGEY, D.T.; REINERT, R.A.; DUNNING, J.A. & HECK W.W. 1973. Foliar injury responses of eleven plant species to ozone-sulphur dioxide mixtures. *Atmos. Environ.* 7: 201-208.
- THOMSON, W.W. 1975. Effects of air pollutants on plant ultrastructure. In: Responses of plants to air pollution. Mudd, J.B. & Kozlowski, T.T. Eds. Academic Press. New York. E.E.U.U.
- TRASS, H. 1973. Lichen sensitivity to the air pollution and index of poleotolerance (I.P.). *Fol. Crypt. Est.* 3: 17-24.
- TÜRK, R. & WIRTH, V. 1975. The pH dependence of SO₂ damage to lichens. *Oecol. Berlin* 19: 285-291.
- UK RGAR. 1987. Acid deposition in the United Kingdom 1981-1985, UK Review Group on Acid Rain. Second Report. Warren Spring Laboratory, Stevenage.
- UK TERG. 1988. The effects of acid deposition on the terrestrial environments. UK Terrestrial Effects Review Group. First Report. HMSO. Londres.
- VAN DOBBEN, H.F. 1992. Effects of atmospheric acidification, alkalization and nitrogen enrichment on epiphytic lichens in The Netherlands. Second International Lichenological Symposium IAL 2. Hemmeslöv, Båstad. Suecia.
- WEAST, R.C. & ASTLE, M.J. 1980. CRC Handbook of chemistry & physics. CRC Press Inc. Florida. E.E.U.U.
- WEIS, E. 1985. Light- and temperature-induced changes in the distribution of excitation energy between photosystem I and photosystem II in spinach leaves. *Biophys. Acta* 807: 118-126.
- WELLBURN, A.R. 1990. Why are atmospheric oxides of nitrogen usually phytotoxic

and not alternative fertilizers?. *New Phytol.* 115: 395-429.

WELLBURN, A.R.; HIGGINSON, C.; ROBINSON, D. & WALMSLEY, C. 1981.

Biochemical explanations of more than additive inhibitory effects of low atmospheric levels of sulfur dioxide plus nitrogen dioxide upon plants. *New Phytol.* 88: 223-237.

WELLBURN, A.R.; MAJERNIK, O. & WELLBURN, F.A.M. 1972. Effects of SO₂ and

NO₂ polluted air upon the ultrastructure of chloroplasts. *Environ. Pollut.* 3: 37-49.

WILL-WOLF, S. 1980. Effects of a "clean" coal-fired power generating station on four common Wisconsin lichen species. *Bryologist* 83: 296-300.

WOOD, C.W. & NASH III, T.H. 1976. Copper smelter effluences effects on Sonoran desert vegetation. *Ecology* 57: 1311.

ZÜST, S. 1977. Die Epiphytenvegetation in Raume Zürich als Indicator der Umweltbelastung. Heft 62, Veröffentlichungen des Geobotanischen Institutes der Eidg. Techn. Hochschule, Stiftung Rubel. Zürich.