

Informe del proyecto

Variaciones de pigmentos y otros metabolitos causadas por el microclima en especies clave de costras biológicas del suelo

Investigador Principal: Isabel Miralles Mellado (Estación Experimental de Zonas Áridas-CSIC (Almería); dirección actual: Georges Lemaître Centre for Earth and Climate Research, Université Catholique de Louvain-La-Neuve, Louvain-la-Neuve (Belgium)).

Colaboradores: Roberto Lázaro Suau (Estación Experimental de Zonas Áridas-CSIC, Almería); Susana Esther Jorge Villar (Universidad de Burgos, Área de Geodinámica, Facultad de Humanidades; Centro Nacional de Investigación de la Evolución Humana (CENIEH), Burgos).

Entidad Financiadora: Asociación Española de Ecología Terrestre

OBJETIVOS GENERALES DEL PROYECTO

En esta propuesta se pretendía analizar, en cuatro clases de biocostras representativas de etapas de la sucesión, las relaciones entre los pigmentos y metabolitos detectables mediante espectroscopia de Raman y las características del microclima, considerando los extremos microclimáticos dentro de cada biocostra, así como la estacionalidad y la hidratación. Los objetivos parciales de la propuesta fueron:

1. Evaluar la capacidad de la espectroscopia Raman para identificar metabolitos en organismos y microorganismos de las biocostras y en función de número de veces que han sido detectados en análisis realizados al azar, en la superficie de las biocostras, inferir la posible proporción relativa de biomoléculas.
2. Proporcionar información de base sobre las características de la pigmentación y otros metabolitos según especies o tipo de costra, en diferentes situaciones (estaciones del año contrastadas, microclimas y estados de hidratación contrastados...).
3. Analizar si existe correspondencia significativa entre los metabolitos en las biocostras y el microclima, tanto en el seno de una especie como entre especies, reuniendo información que contribuya a interpretar el espectro de metabolitos en el contexto de la ecofisiología y estrategia de supervivencia de cada especie o tipo de biocostra.

METODOLOGÍA

En el área experimental de El Cautivo (Tabernas, Almería) de la Estación Experimental de Zonas Áridas se han seleccionado cuatro clases de costras biológicas, una dominada por cianobacterias (ciano) y tres dominadas por otras tantas especies de líquenes: *Squamarina lentigera* (Squam), *Diploschistes diacapsis* (Diplos) y *Lepraria isidiata* (Lepra). Tras una prospección preliminar de la distribución espacial, para cada una de esas clases de biocostra hemos seleccionado en campo dos áreas representativas de ambos extremos de su hábitat, más favorable y más desfavorable. Hemos asumido que, en el gradiente de distribución espacial de cada una de las biocostras, el extremo más favorable del hábitat es el de orientación relativamente más al norte o este, con menor insolación y mayor humedad, y el extremo más desfavorable, el más expuesto al sol. En cada extremo del hábitat de cada especie se ha monitorizado durante un año la temperatura (T) y humedad relativa del aire (HR) a ras del suelo (justo sobre la biocostra) mediante *ibuttons* (modelo DS1923 Hygrochrom, de Embedded Data

Systems, USA) que registraban datos cada hora. Además se han obtenido las precipitaciones, T^a del aire y radiación fotosintéticamente activa (PAR) de las estaciones meteorológicas en funcionamiento en el área experimental, asignando a cada comunidad los datos de la estación más próxima, y se han tomado mensualmente datos de T^a y humedad del suelo en cada uno de los extremos del hábitat de cada tipo de biocostra mediante una sonda GS3 VWC/T/EC. Durante la primavera de 2015 la radiación fotosintéticamente activa se midió simultáneamente en cada extremo de los hábitats de cada especie o biocostra cada 15 minutos durante tres días, usando dos radiómetros (Apogee; Apogee Instruments Inc., Logan, USA, connected to data loggers EM50 of Decagon Devices Inc., Pullman, USA). Ambos radiómetros habían sido colocados al lado de los radiómetros de cada estación durante tres días para su co-calibración. Posteriormente se calculó la PAR de cada hábitat a partir de los datos de la estación meteorológica usando las ecuaciones de regresión obtenidas a partir de datos de los hábitats y estaciones.

De la biocostra de cianobacterias y de cada una de las especies clave de líquenes se recogieron muestras (tres réplicas) en ambos extremos de su hábitat (“favorable y desfavorable”), haciendo dos muestreos, en las estaciones de invierno y verano respectivamente, y recogiendo todas las muestras siempre cuando el suelo estaba seco. De cada muestra, tanto de invierno como de verano, se tomaron una serie de submuestras cada una correspondiéndose con un espectro Raman; normalmente 5 ó 6 pero el número varió de 3 a 10 en casos extremos, dependiendo de la heterogeneidad espacial de la muestra. En cada espectro, tomado con un Microscopio Raman confocal DXR Thermo Fisher, se identificaron los oxalatos y pigmentos. La realización y análisis de espectros se repitió en las mismas muestras tras humedecerlas a saturación y esperar de 2 a 4 días (generalmente 3 días). En total se han realizado 527 espectros Raman. El número de submuestras en las que aparece un determinado metabolito se ha utilizado para establecer la frecuencia relativa (%) en la que aparece dicho metabolito en cada muestra. Se han creado dos bases de datos factoriales, una con los datos de presencia-ausencia de cada metabolito (un registro por cada submuestra o espectro) y otra base de datos con los datos de las frecuencias relativas (un registro por cada muestra); ambas con los mismos factores experimentales: La especie o tipo de costra (especie, con cuatro categorías, Ciano, Diplos, Squam y Lepra), la estación de año en que se hizo el muestreo (estación; invierno y verano), el extremo del hábitat (hábitat; favorable y desfavorable), y el estado de hidratación de la muestra (hidratación; seco y húmedo).

Para buscar diferencias significativas en el efecto de los factores o sus interacciones sobre la presencia o frecuencia de metabolitos se han usado análisis clusters y Modelos lineales Generalizados (Generalized Lineal Models: GLM), en tres fases; cada metabolito considerado como una variable dependiente. En una primera fase se analizaron las frecuencias con los datos de todos los tipos de biocostra juntos y los cuatro factores y sus interacciones. En la segunda fase se realizaron los GLM dentro de cada especie, para ganar potencia estadística, con los datos originales de presencia-ausencia de cada metabolito en cada submuestra, usando la distribución de Poisson y el Akaike Information Criterion (AIC) para elegir el mejor modelo. Finalmente, se hicieron GLM dentro de cada especie pero usando los datos de frecuencia relativa. En cada fase estos análisis sólo pudieron hacerse para los metabolitos que presentaron frecuencia suficiente.

RESULTADOS

Microclima de los hábitats “favorable” vs “desfavorable” de las diferentes clases de biocostras a lo largo del año.

Biocostra dominada por cianobacterias

Las T medias mensuales sobre las costras del hábitat favorable oscilaron entre 9°C y 30°C y las HR medias mensuales sobre las costras entre 45% y 78%, alcanzándose los valores máximos absolutos mensuales de T sobre la costra en Junio (56°C) y los mínimos absolutos mensuales de T en Diciembre. En el hábitat “desfavorable” de las cianobacterias la T media mensual de la costra osciló entre 13°C y 31°C y la HR media mensual sobre la costra entre 43% y 69%,

alcanzándose una T máxima mensual en las costras de 63°C en julio y mínima mensual de -4.4°C en Diciembre. El hábitat “favorable” mostró las T medias mensuales sobre las costras inferiores durante todo el año a las del hábitat “desfavorable”; además las T máximas absolutas mensuales también fueron inferiores a las del hábitat “desfavorable” durante los meses Octubre a Mayo, pero por el contrario dicha tendencia se invierte durante los meses Junio-Septiembre (a excepción de Julio), siendo las T máximas absolutas superiores en el hábitat “favorable” de las cianobacterias frente al hábitat “desfavorable” (Tabla 1). La HR mensual sobre las costras presentó valores medios y mínimos superiores en el hábitat “favorable” de las cianobacterias durante los meses de Octubre a Mayo, si bien desde Junio a Septiembre los valores más elevados de HR mensuales se alcanzó en el hábitat “desfavorable”. La HR máxima mensual sobre las costras fue similar a lo largo del año en ambos hábitats con valores del 100% (Tabla 1).

Diploschistes diacapsis

Las T medias mensuales sobre las costras del hábitat favorable osciló entre 8.0°C y 31°C y las HR medias mensuales sobre las costras entre 48% y 85%, alcanzándose los valores máximos absolutos de T en Julio (59.5°C) y mínimos absolutos de -6.99°C en Diciembre. En el hábitat “desfavorable” de Diplos la T media mensual de la superficie del suelo osciló entre 12°C y 29.4°C y la HR media mensual entre 48% y 77.5%, alcanzándose una T máxima absoluta de 59.5°C en julio y mínima absoluta de -7.0°C en Diciembre. El hábitat “favorable” mostró las T medias mensuales en la superficie de las costras inferiores durante todo el año a las del hábitat “desfavorable” a excepción de los meses Junio-Agosto donde las T medias mensuales fueron superiores en el hábitat “favorable”. Tales diferencias posiblemente sean debidas a la topografía local de la zona, pues en pleno verano este hábitat está expuesto al sol desde primeras horas de la tarde prácticamente hasta que el sol se pone, mientras que el hábitat desfavorable, a pesar de presentar globalmente mayor insolación, en pleno verano está expuesto al sol durante la mañana y se queda a la sombra antes por la tarde. Las T máximas absolutas sobre las costras también fueron superiores en el hábitat “desfavorable” a lo largo de todo el año a excepción de los meses Mayo a Julio (Tabla 2). La HR media mensual sobre las costras siguió un patrón similar a las temperaturas, ya que depende mucho de ellas. El hábitat “favorable” presentó las HR medias mensuales más elevadas a lo largo del año salvo en los meses Junio-Sep), si bien las HR mínimas absolutas mensuales fueron superiores en el hábitat “favorable” de los Diplos desde Septiembre a Marzo e inferiores a las del hábitat “desfavorable” desde Abril-Agosto. La HR máxima absoluta sobre las costras fue similar a lo largo del año en ambos hábitats con valores en torno al 100% (Tabla 2).

Squamarina lentigera

Las T medias mensuales en la superficie de la costra del hábitat favorable oscilaron entre 6.8°C y 34°C y las HR medias mensuales entre 42% y 87%, alcanzándose los valores máximos absolutos mensuales de T en Julio (63°C) y mínimos absolutos de -5.4°C en Diciembre. En ambos hábitats se observa también un ciclo microclimático a lo largo del año muy similar al hallado en Diplos. El hábitat “favorable” mantiene las T medias mensuales y máximas absolutas mensuales inferiores durante todo el año a las del hábitat “desfavorable” a excepción de los meses Mayo-Agosto en los que dichas temperaturas fueron superiores en el hábitat “favorable” (Tabla 3). En el hábitat “favorable” las HR medias y mínimas absolutas a ras de la costra fueron más elevadas en los meses Octubre a Marzo e inferiores al hábitat “desfavorable” en los meses Abril a Septiembre, si bien las diferencias en las HR medias y mínimas absolutas mensuales fueron mucho más marcadas entre ambos hábitats en los meses Oct-Enero y particularmente en Enero donde en el hábitat “favorable” la HR media fue 80.8% y la mínima de 28.7%, mientras que el hábitat desfavorable la HR media fue 66.1% y la mínima fue 22.2%. Las HR máximas mensuales sobre las costras también fue similar en ambos hábitats a lo largo del año con valores del 100% (Tabla 3).

Lepraria isidiata

Las T medias mensuales sobre las costras del hábitat favorable oscilaron entre 7.4°C y 31.5°C y las HR medias mensuales entre 47% y 91%, alcanzándose los valores máximos absolutos mensuales de T en la costra en el mes de Julio (58°C) y mínimos absolutos de -5.9°C en Febrero. En el hábitat “desfavorable” de *Lepraria* la T media mensual de la costra osciló entre 7.6°C y 33°C y la HR media mensual entre 45% y 85%, alcanzándose una T máxima absoluta mensual de 57.5°C en junio y mínima absoluta de -6°C en Febrero. Las T medias y máximas mensuales fueron inferiores durante todo el año a las del hábitat “desfavorable”. La HR máxima absolutas mensuales sobre las costras fue similar a lo largo del año en ambos hábitats con valores en torno al 100% (Tabla 4). Las HR medias y mínimas mensuales fueron superiores en el hábitat favorable de *Lepraria* durante todo el año, si bien las diferencias en HR media y min absoluta entre ambos hábitats fue especialmente marcada entre Oct-Enero (Tabla 4).

La humedad del suelo (a 5 cm de profundidad bajo la costra) fue superior en los hábitats “favorables” de todas las especies a lo largo de todo el año, si bien los valores de humedad del suelo fueron muy bajos a lo largo de todo el año, ya que los días de este muestreo mensual fueron soleados (Tabla 5), incrementándose su valor en Diciembre y Enero en los hábitats “favorables”. La temperatura del suelo siguió el mismo patrón que la humedad del suelo en todas las especies.

Detección de pigmentos y otros metabolitos en diferentes especies y bajo diferentes condiciones ambientales mediante Espectroscopía Raman.

Las biomoléculas que fueron identificadas mediante espectroscopía Raman en las diferentes especies y bajo los diferentes factores: i) estaciones del año contrastadas (factor estación), ii) diferencias en orientación, temperatura y humedad (factor hábitat), iii) estados de hidratación contrastados (seco-húmedo), fueron: oxalato cálcico monohidratado (OxM), oxalato cálcico dihidratado (OxD), carotenos (Car), clorofila (Clo), ácido úsnico (UsnAc), atranorín (Atran), ácido rizocárpico (RizocAc), ácido lecanórico (LecAc) y escitonemina (Scy) y pigmentos no identificados (“Unknown”) dentro de este grupo se recogen aquellos que, aun sabiendo que se había detectado un compuesto orgánico, aún no está descrito en la bibliografía y, por lo tanto, no se sabe qué compuesto concreto es o que debido al escaso número de bandas Raman que aparecen en el espectro, no se puede asignar a una biomolécula concreta.

Biocostra dominada por cianobacterias

En todos los espectros Raman de las costras dominadas por cianobacterias se detectaron carotenos (1525-1505, 1155-1145 cm^{-1}) y Scy (1590, 1549, 1323, 1172 cm^{-1}) (Fig 1). En los espectros raman de las cianobacterias muestreadas en verano (tanto en hábitat favorable y desfavorable como en su estado hidratado y seco) se detectaron también pigmentos “unknown” (Tabla 7). Las cianobacterias muestreadas en verano (en sus dos hábitats y estados de hidratación) y las muestreadas en invierno en el hábitat “más favorable” tienen otros pigmentos que no han llegado a identificarse (“Unknown”) vía espectroscopía Raman, mientras que en las cianobacterias muestreadas en invierno en el hábitat “más desfavorable” no se han detectado. Llama la atención que no fuera identificada clorofila en las cianobacterias a pesar de que el láser usado para los análisis fuera el de 780 nm, que está demostrado que sí detecta clorofila; esto puede deberse a que presentan menor biomasa fotosintética, y más discontinua y desperdigada, con lo que podría resultar más difícil que una muestra para Raman coja cantidad suficiente de clorofila para que sea visible en el espectro entre las señales más intensas de las otras moléculas.

Diploschistes diacapsis

Los espectros raman mostraron claros patrones de bandas asignables a OxM (1629, 1490, 1463, 89 5036 cm^{-1}), siendo este compuesto el que presentó la frecuencia relativa más elevada en

todos los espectros (Tabla 7, Fig 2). También se identificaron OxD (1630, 1475, 910, 506 cm^{-1}), Car y LecAc (1627, 1324, 1283, 1221, 782, 520 cm^{-1}) en todos los factores. Tan solo se detectó Clo en un bajo porcentaje de frecuencia en los especímenes del hábitat favorable. Las muestras recogidas tanto en invierno como en verano en su hábitat más desfavorable y con un estado de hidratación seco son las que presentaron una mayor dificultad para la detección de compuestos vía espectroscopía Raman (Tabla 7).

Squamarina lentigera

La especie Squam presentó como pigmento mayoritario OxM (Figura 3) tanto en los especímenes muestreados en verano (rango de frecuencias relativas entre 83 y 93%) como en invierno (87-100%). No se detectó la variedad OxD en las muestras de invierno, si bien si que se identificó dicho compuesto en los espectros raman de las muestras de verano-hábitat favorable-estado seco y en las muestras de verano-hábitat desfavorable-estado húmedo aunque en porcentajes relativos muy pequeños (Tabla 7). El segundo pigmento más abundante fue Car (Tabla 7) detectado tanto en las muestras de invierno como verano. En todas las muestras recogidas en invierno y verano del hábitat más favorable en ambos estados (seco y húmedo) se detectó el pigmento UsnAc (1627, 1607, 1322, 1289, 602, 540 cm^{-1}) además de otros compuestos en bajas proporciones que no se pudieron identificar vía espectroscopia Raman. En las muestras recogidas en los hábitats más desfavorables no se detectó UsnAc (a excepción de la combinación invierno-hábitat desfavorable-seco con una frecuencia relativa de 37.8%, tabla 7).

Lepraria isidiata

Las especies de líquen Lepra son las que presentaron mayor número de pigmentos y compuestos en comparación con el resto de las especies. Todos los especímenes recogidos tanto en invierno como verano (en todas sus combinaciones: hábitat favorable-desfavorable y estado seco-húmedo) presentaron OxD y Car, si bien el primero presentó frecuencias relativas más elevadas (Tabla 7, Fig 4). Los espectros Raman también evidencian la presencia de Clo (1436, 1323, 1219, 987, 916, 744, 516 cm^{-1}) y Atran (1666, 1658, 1588, 1437, 1303, 1294, 1266, 901, 588 cm^{-1}) aunque con frecuencias relativas más bajas (Tabla 7). A pesar de que el pigmento clorofila ha sido identificado en los líquenes Lepra, no se observaron en los espectros de las otras dos especies de líquenes Squam y Diplos, esto podría ser debido a que si bien todos los líquenes tienen mayor biomasa fotosintética, Diplos y Squam también presentan una corteza formada por hifas de hogos de grosor específico, por el contrario los especímenes de Lepra presentan el talo más delgado, por lo que el láser puede penetrar mejor y detectar dicho pigmento.

El RizocAc (1664, 1597, 1495, 1477, 1303, 1280, 1002, 647 cm^{-1}) se observó en los espectros de las muestras recogidas de los hábitats favorable y desfavorable, tanto en invierno como en verano, pero únicamente en su estado húmedo, siendo más abundante la presencia de dicho pigmento en los hábitats más favorables (Tabla 7). A su vez los espectros raman muestran la presencia de otros pigmentos que no pudieron ser identificados en las muestras de Lepra muestreadas en invierno principalmente (Tabla 7).

Análisis Clusters.

La clasificación de las sub-muestras (espectros Raman) en cuatro grupos mediante análisis clusters se relacionó significativamente con las biomoléculas. De un total de 527 espectros, el Cluster 1 incluía 96 espectros, el Cluster 2 tenía 26, el Cluster 3 tenía 68 espectros y el Cluster 4 incluía 337 espectros.

El efecto del factor estación en la clasificación de los espectros fue marginalmente significativa (χ^2 : 7.33, $df=3$, $p=0.0621$) y estaba asociado con la frecuencia del Cluster 3 de espectros, que se redujo a la mitad durante el verano (figura 5a.). Consistente con el efecto de la estación, el Cluster 3 de espectros también disminuyó en los hábitat desfavorables en comparación con los hábitat más favorables; aunque el efecto global del factor hábitat (microclima) sobre la

clasificación no llegó a ser significativa (Fig. 5b), posiblemente debido a las importantes diferencias entre las especies.

El efecto del factor hidratación sobre la clasificación fue significativa (χ^2 : 15.98, df=3, $p=0.0011$) y se asociaba con Cluster 2. El número de sus espectros se redujo fuertemente (casi desapareciendo) cuando las biocostras estaban secas (Fig. 5c). Esto sugiere que la hidratación afecta especialmente a la producción de las biomoléculas del Cluster 2: oxalato cálcico monohidrato, escitonemina, ácido lecanórico y ácido úsnico.

El factor especie es el principal que afecta a la clasificación. Los grupos no corresponden a la especie, pero la relación entre grupos y especies fue altamente significativa (χ^2 : 360.50, df=9, $p<0.0000$). No había mucha diferencia en la composición espectral (en términos de frecuencia relativa de espectros en cada grupo) entre Diplos y Squam (Fig 5d i y ii.); sin embargo, los espectros de Lepra eran claramente diferentes, ya que Lepra fue la biocostra con la frecuencia más baja de los espectros en el grupo 4 y con la mayor frecuencia de espectros en el grupo 1 y a su vez, la única biocostra que se representa el grupo 2. Los espectros de cianobacterias fueron muy diferentes de los de los líquenes, ya que todos ellos se encontraban en el grupo 4 (Fig. 5d iv).

Frecuencias de los diferentes metabolitos en relación con los factores estudiados y sus interacciones, considerando la clase de biocostra como un factor.

El efecto de los factores considerados y sus interacciones sobre las frecuencias de las biomoléculas en cada muestra (%) se pudo analizar mediante GLZ para oxalato cálcico monohidratado (OxM), oxalato cálcico dihidratado (OxD), carotenos (Car) y pigmentos no identificados (Unknown). El resto de pigmentos identificados en los espectros Raman, a saber, clorofila (Clo), ácido úsnico (UsnAc), atranorín (Atran), ácido rizocárpico (RizocAc), ácido lecanórico (LecAc) y scytonemin (Scy) no se pudieron analizar por este procedimiento debido al bajo número de detecciones en relación con el total de espectros y el relativamente alto número de factores e interacciones.

Ningún factor ni interacción resultó significativo para el compuesto OxM. Para OxD los factores *especie* y *estación*, por este orden, resultaron muy significativos, y también la interacción *estación*hábitat*hidratación*especie*, así como dos interacciones involucrando 3 factores y otras dos involucrando 2 factores (Tabla 8). Es decir, los cuatro factores estudiados presentan interacción y la manera como la especie y la estación determinan la frecuencia de este pigmento depende del hábitat y del estado de hidratación.

Para el pigmento Car únicamente el factor especie resulta significativo (Tabla 8). Para los pigmentos 'Unknown' resultaron significativos los factores *especie* y *hábitat*, por este orden, y también las interacciones *estación*hábitat*especie* y *hábitat*especie* (Tabla 8). El análisis de los pigmentos denominados "Unknown" no es significativo ya que no podemos afirmar con certeza, a partir de los análisis Raman realizados, cuántos pigmentos diferentes se han detectado.

Las diferencias más significativas y con valores más elevados del estadístico se refieren al factor *especie*. Por otra parte, casi todos los pigmentos, incluidos aquellos no analizados mediante GLM, aparecen asociados a las distintas especies en diferentes proporciones, como puede verse en la Tabla 9.

Efectos de los factores estación, hábitat e hidratación y sus interacciones sobre la presencia de cada pigmento, en cada especie analizada por separado.

Biocostra dominada por Cianobacterias

Sólo resultó significativo el factor *hábitat* para el pigmento Scy, aunque las diferencias entre ambos extremos del hábitat (*favorable* vs *desfavorable*) no son elevadas (Wald estad. 4.5, $p=0.034$).

Las diferencias entre extremos del hábitat en el pigmento Scy, y también en el pigmento Car, se ven afectadas por la estación del año de forma marginalmente significativa (Wald 3.41 y $p=0.06$ para Car; Wald 2.83 y $p=0.09$ para Scy).

Diploschistes diacapsis

Los extremos del hábitat también resultan significativos en esta especie para el pigmento LecAc (Wald 4.08, $p=0.043$) y, marginalmente, para el pigmento OxD (Wald 3.66, $p=0.056$). La interacción *hábitat*hidratación* resultó tener efecto marginalmente significativo para el pigmento Car (Wald 3.68, $p=0.055$).

Squamarina lentigera

En esta especie la interacción *estación*hábitat* tuvo efecto significativo sobre la presencia del pigmento Car (Wald = 4.74, $p = 0.029$), y la interacción *estación*hidratación* un efecto marginalmente significativo sobre ese mismo pigmento (Wald = 3.03, $p = 0.082$).

Lepraria isidiata

Apenas se encontró un efecto: la interacción *estación*hidratación* resultó marginalmente significativa sobre el pigmento OxD (Wald = 3.09, $p = 0.079$).

Efectos de los factores estación, hábitat e hidratación y sus interacciones en la frecuencia de cada pigmento, en cada especie analizada por separado.

Biocostra dominada por Cianobacterias

La combinación de factores *estación*hábitat* resultó significativa para el pigmento Car (Wald 5.98, $p = 0.014$). *Hábitat* (Wald 9.65, $p < 0.0019$), *estación*hábitat* (Wald 5.79, $p = 0.016$) y *hábitat*hidratación* (Wald 4.97, $p = 0.026$) resultaron significativos para Scy. Ningún otro factor o interacción resultó significativo para ningún otro pigmento relevante para este tipo de biocostra. El gradiente de hábitat (*favorable* vs *desfavorable*) influyó de forma significativa en Scy pero las diferencias entre los extremos del hábitat en cuanto a ese pigmento resultaron dependientes de la estación del año y estado de hidratación. Para el pigmento Car el efecto del hábitat también dependió de la estación. Ambos pigmentos variaron de forma similar en relación con los factores e interacciones excepto para la combinación ‘verano-hábitat desfavorable-hidratado’ (Tabla 7).

Diploschistes diacapsis

Los tres factores (individualmente) y una interacción entre factores resultaron significativos para el compuesto OxM: *Estación* (Wald 6.05, $p < 0.014$), *hábitat* (Wald 4.24, $p < 0.040$), *hidratación* (Wald 7.59, $p < 0.006$), *estación*hidratación* (Wald 6.32, $p < 0.012$). Además, la interacción *hábitat*hidratación* resultó marginalmente significativa para dicho pigmento (Wald 3.42, $p < 0.065$). Ningún otro factor o interacción resultó significativo o marginalmente significativo para ninguno de los otros pigmentos relevantes para esa especie (OxD, Car y LecAc). La diferencia más significativa corresponde al estado de hidratación, que además interactúa con la estación y, marginalmente, también con el hábitat. La Tabla 6 muestra los valores de las medias para este pigmento según los diferentes factores y combinaciones entre ellos.

Squamarina lentigera

Los resultados no mostraron ningún efecto significativo de los factores (*estación-hábitat-hidratación*) ni ninguna de sus posibles combinaciones en ningún pigmento. El pigmento UsnArc, con 12 frecuencias de 24, no pudo analizarse por la distribución de sus valores. El pigmento OxM es muy frecuente, con medias de frecuencia altas en cualquier situación y diferencias entre medias pequeñas. Las diferencias entre factores o interacciones de las frecuencias medias del pigmento Car son bastante elevadas (Tabla 7), pero sin embargo no resultaron significativas debido a la dispersión de los datos, están inconsistentemente relacionadas con los factores.

Lepraria isidiata

El factor *estación* (Wald 6.36, p 0.012) y *estación*hidratación* (Wald 15.53, p <0.0001) resultaron significativos para el compuesto OxD. Para el resto de pigmentos no resultó significativo ningún factor o interacción. La diferencia más significativa de OxD corresponde también en esta especie al estado de hidratación, cuyo efecto varía estacionalmente. La frecuencia de este pigmento es mayor en verano y particularmente cuando esta especie está seca en la estación de verano (Tabla 7).

Nótese que las frecuencias de los pigmentos Car y sobre todo Scy permiten discriminar efectos de los factores estudiados en la costra de Cianobacterias. La frecuencia de OxM resulta discriminante en *Diploschistes* y, la de OxD, en *Lepraria*. En el caso de *Squamarina* ningún pigmento permite discriminar el efecto de los factores cuando se analiza su frecuencia; pero con datos binarios (presencia-ausencia) el pigmento Car muestra efectos significativos de la interacción *estación*hábitat* y marginalmente significativos de *estación*hidratación*, como hemos visto antes.

CONCLUSIONES

La Espectroscopía Raman nos ha proporcionado una valiosa información sobre los pigmentos y metabolitos foto-protectores de las diferentes especies o tipos de biocostra analizadas en diferentes situaciones: estaciones del año contrastadas, posiciones contrastadas en el rango de condiciones microclimáticas del hábitat de cada especie y estados de hidratación contrastados. Las principales diferencias en el conjunto de biomoléculas se encontraron entre especies o biocostra. Nuestros resultados sugieren la hipótesis de que la producción diferencial de biomoléculas entre las diferentes especies podría ser uno de los instrumentos que configuran las distintas estrategias de supervivencia de los organismos de la biocostra, que les permiten dominar micro-nichos específicos.

No existe correspondencia directa entre la naturaleza y proporción de biomoléculas fotoprotectoras en los líquenes y las diferencias microclimáticas en el rango de distribución de las especies estudiadas en el área de estudio, ya que el efecto del microclima puede verse enmascarado por la interacción con otros factores ambientales tales como la estacionalidad y la hidratación. Sin embargo en el caso de las biocostras de cianobacterias, el gradiente de hábitat (favorable vs desfavorable) o más exactamente la interacción del hábitat con la estación del año y el estado de hidratación afectaron significativamente a la producción de sus biomoléculas foto-protectoras detectadas por espectroscopía Raman.

La hipótesis de que el aumento de insolación y temperatura en el extremo más desfavorable los hábitats de cada especie produciría mayor cantidad de biomoléculas foto-protectoras, no se confirmaba de forma general en líquenes ya que la producción de estas biomoléculas parecía estar fuertemente condicionada por la cantidad de actividad y rasgos ecofisiológicos de cada

especie. Esta hipótesis fue confirmada sólo en biocostras dominadas por cianobacterias durante el invierno, es decir, cuando las condiciones ambientales eran relativamente favorables. La extensión por analogía de esta hipótesis a las estaciones del año, esperando que estos organismos sinteticen mayor cantidad de biomoléculas foto-protectoras en respuesta al aumento de las tasas de insolación durante el verano, tampoco se confirmaba de forma general, ya que las cianobacterias y líquenes muestran ciclos fenológicos muy acusados en este clima, y en general, están latentes durante el verano. Sin embargo, sí que se confirmó que el estado de hidratación de los líquenes y cianobacterias influye en la síntesis de biomoléculas foto-protectores ya que estos organismos son poiquilohídricos y prácticamente cesan su producción cuando están secos.

No existe una correspondencia directa entre mayor producción de oxalatos y el hábitat desfavorable de los líquenes, donde la humedad relativa y la humedad del suelo son más bajos y las tasas de insolación y temperatura son más elevadas, ni tampoco con la estación de verano cuando las condiciones de humedad, temperatura y radiación solar son más extremas, por lo que la función de oxalatos como posible reservorio de agua, o como foto-protectores no se confirmó en este caso.

NUEVAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN A PARTIR DE LOS RESULTADOS HALLADOS EN EL PRESENTE PROYECTO

Los resultados obtenidos en el presente proyecto de investigación nos abre la posibilidad de iniciar tres nuevos trabajos de investigación:

1. Aunque otros autores han encontrado una tendencia hacia la producción de biomoléculas foto-protección por líquenes con aumento de la radiación solar (Solhaug et al., 2003; Edwards et al., 2003a, 2004; McEvoy et al., 2006; Edwards, 2007), nuestros resultados mostraron que en los hábitat desfavorables de los líquenes donde la radiación solar incidente era más elevada (Tabla 6), no había una clara tendencia a que los líquenes tuvieran una mayor producción de biomoléculas foto-protectoras en comparación con sus respectivos hábitats más favorables donde la insolación era menor (Tabla 7). Esto es particularmente notable en *L. isidiata*, porque las diferencias en mensual PAR absoluta media y máxima entre los extremos de sus hábitats eran muy elevadas (Tabla 6), por lo que cabría esperar un incremento de la producción de biomoléculas foto-protectoras en su hábitat más desfavorable. A su vez, como se ha comentado anteriormente en las conclusiones del proyecto, la producción de pigmentos de foto-protección generalmente no aumento en verano, cuando la radiación solar es mayor (Tablas 6 y 7). Nuestros resultados son consistentes con los hallados por Belnap et al. (2008), quienes tampoco hallaron un aumento en la producción de pigmentos de protección UV en respuesta a una mayor tasa de radiación solar. Estos autores atribuyen este comportamiento a que no ha habido en la costra una ganancia neta fotosintética suficiente como para asegurar el mantenimiento, reparación y producción de tejidos necesario para la adquisición de C (por ejemplo, el sistema de fotos II (PSII), clorofila a (chl-a)) y además sintetizar pigmentos foto-protectores, a pesar de que las biocostras estén expuestas a altas tasas de insolación (Belnap et al., 2004, 2007). En nuestro próximo trabajo llevaremos a cabo un nuevo diseño experimental donde analizaremos un nuevo factor influenciando la síntesis de pigmentos de protección de los líquenes, la fotosíntesis neta y respiración, junto con factores ambientales (precipitación: analizaremos diferentes tamaños de precipitación, temperatura y radiación).
2. Aunque los oxalatos tradicionalmente se han asociado con una estrategia de almacenamiento de agua (función de anti-desección) en los líquenes (Seaward and Edwards, 1997; Holder et al., 2000; Edwards et al., 2003b; Jorge-Villar et al., 2005, 2006; Jorge-Villar and Edwards, 2010). También se ha sugerido que los oxalatos podrían tener un papel foto-protector contra la insolación en líquenes (Edwards et al.,

1995; Oliveira et al., 2002). Sin embargo, en nuestro caso, el análisis de la frecuencia relativa de oxalatos en las tres especies de líquenes en ambos extremos de sus hábitats (favorable y desfavorable), no hemos observado como indicamos en la sección de conclusiones ninguna tendencia indicando mayor frecuencia relativa de oxalatos en los hábitats más desfavorables donde humedad es menor y la radiación solar y temperatura mayor, en comparación con sus hábitats favorables. Así, los líquenes, en este caso, pueden haber desarrollado otras estrategias de hidratación y los oxalatos pueden tener otra función ecofisiológica. En un nuevo trabajo pretendemos llevar a cabo un nuevo estudio para analizar adecuadamente la función de los oxalatos de calcio en líquenes.

3. El tercer trabajo que vamos a realizar se llevará a cabo con un espectrómetro Raman confocal, modelo WITec alpha300R-Confocal Raman imaging, con tres láseres (532, 633 y 785 nm). Este instrumento nos permitirá, de manera no destructiva, hacer y presentar imágenes Raman en dos y tres dimensiones, pudiendo hacer mapas de la distribución vertical de pigmentos y otras biomoléculas (p.e. oxalatos) en el talo de los líquenes estudiados del desierto de Tabernas, con detalles del orden de nanómetros, mediante microfotografías coloreadas. A su vez, buscaremos posibles relaciones entre la distribución de dichas biomoléculas en el talo de los líquenes y factores ambientales.

Referencias:

- Belnap J, Phillips SL, Miller ME. 2004. Response of desert biological soil crusts to alterations in precipitation frequency. *Oecologia* 141: 306–316.
- Belnap J, Phillips SL, Smith SD. 2007. Dynamics of cover, UV-protective pigments, and quantum yield in biological soil crust communities of an undisturbed Mojave Desert shrubland. *Flora* 202: 674–686.
- Belnap J, Phillips SL, Flint S, Money J, Caldwell M. 2008. Global change and biological soil crusts: effects of ultraviolet augmentation under altered precipitation regimes and nitrogen additions. *Global Change Biology* 14: 670–686.
- de Oliveira LFC, Edwards HGM, Feo-Manga JC, Seaward MRD, Lücking R. 2002. FT-Raman spectroscopy of three foliicolous lichens from Costa Rican rainforests. *Lichenologist* 34: 259–266.
- Edwards HGM. 2007. A novel extremophile strategy studied by Raman spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A* 68: 1126–1132.
- Edwards HGM, Russell NC, Seaward MRD, Slarke D. 1995. Lichen biodeterioration under different microclimates: an FT Raman spectroscopic study. *Spectrochimica Acta Part A* 51: 2091–2100.
- Edwards HGM, Seaward MRD, Attwood SJ, Little SJ, Oliveira LFC, Tretiach M. 2003a. FT-Raman spectroscopy of lichens on dolomitic rocks: an assessment of metal oxalate formation. *Analyst* 128:1218–1221.
- Edwards HGM, Newton EM, Wynn-Williams DD, Lewis-Smith RI. 2003b. Non-destructive analysis of pigments and other organic compounds in lichens using Fourier-transform Raman spectroscopy: a study of Antarctic epilithic lichens. *Spectrochimica Acta Part A* 59: 2301–2309.
- Edwards HGM, Cockell CS, Newton EM, Wynn-Williams DD. 2004. Protective pigmentation in UVB-screened Antarctic lichens studied by Fourier transform Raman spectroscopy: an extremophile bioresponse to radiation stress. *Journal of Raman Spectroscopy* 35: 463–469.
- Holder JM, Wynn-Williams DD, Rull-Perez F, Edwards HGM. 2000. Raman spectroscopy of pigments and oxalates in situ within epilithic lichens: *Acarospora* from the Antarctic and Mediterranean. *New Phytologist* 145: 271–280.
- Jorge-Villar SE, Edwards HGM, Seaward MRD. 2005. Raman spectroscopy of hot desert, high altitude epilithic lichens. *Analyst* 130: 730–737.
- Jorge-Villar SE, Edwards HGM, Benning LG. 2006. Raman spectroscopic and scanning electron microscopic analysis of a novel biological colonisation of volcanic rocks. *Icarus* 184: 158–169.

- Jorge-Villar SE, Edwards HGM. 2010. Lichen colonization of an active volcanic environment: a Raman spectroscopic study of extremophile biomolecular protective strategies. *Journal of Raman Spectroscopy* 41: 63–67.
- McEvoy M, Nybakken L, Solhaug KA, Gauslaa Y (2006) UV triggers the synthesis of the widely distributed secondary lichen compound usnic acid. *Mycol Prog* 5:221–229.
- Seaward MRD, Edwards HGM. 1997. Biological origin of major chemical disturbances on ecclesiastical architecture studied by Fourier transform Raman spectroscopy. *Journal of Raman Spectroscopy* 28: 691–696.
- Solhaug KA, Gauslaa Y, Nybakken L, Bilger W (2003) UV-induction of sun-screening pigments in lichens. *New Phytol* 158:91–100

RESULTADOS DEL PROYECTO. PUBLICACIONES CIENTÍFICAS.

A partir de los resultados obtenidos en el proyecto hemos hecho una publicación científica actualmente enviada a una revista internacional de alto índice de impacto (*Soil Biology and Biochemistry*) y se han presentado tres comunicaciones a Congresos Internacionales:

Miralles, I., Jorge-Villar, S.E., van Wesemael, B., Lázaro, R. 2015. Interaction between species and ecological factors drives the synthesis of photoprotective biomolecules in terricolous lichens and cyanobacteria. *Soil Biology and Biochemistry*. Submitted.

Miralles, I., Lázaro, R., Ortega, R., van Wesemael, B., Domingo, F., Jorge-Villar, S.E. 2015. Assessment of the influence of seasonal variations and microclimate in the synthesis of protective pigments in biocrusts from arid regions. 7th Congress of the European Society for Soil Conservation “Agroecological assessment and functional environmental optimization of soils and terrestrial ecosystems”. Moscow, Russian Federation. May 18-22, 2015.

Miralles, I., Ortega, R., van Wesemael, B., Lázaro, R., Domingo, F., Jorge-Villar, S.E. 2015. Variations of pigments and other metabolites in lichens colonizing habitats in opposite microclimatic extremes from a semiarid area. 6th Belgian Geography Days. Brussel, Belgium. November 13, 2015.

Miralles, I., Ortega, R., Lázaro, R., Jorge-Villar, S.E., Domingo, F., van Wesemael, B. 2015. Scytonemin and Carotene Synthesis Mechanisms in Cyanobacteria in Relation to Microclimate: Analysing Survival Strategies of Cyanobacteria in a Changing Environment. 5th Annual World Congress of Marine Biotechnology. Qingdao, China. November 6-8, 2015.

Tablas

Tabla 1. Temperaturas (°C) y humedades relativas (%) medias mensuales, máximas y mínimas absolutas mensuales a lo largo del año medidas en la superficie de la biocostra dominada por cianobacterias en sus hábitats “favorable” y “desfavorable”

	Hábitat favorable			Hábitat desfavorable			Hábitat favorable			Hábitat desfavorable		
	T med	T max	T min	T med	T max	T min	Hum med	Hum max	Hum min	Hum med	Hum max	Hum min
Enero	9,3	25,1	-2,4	13,1	39,2	-1,9	72,1	100	28,3	63,1	100	17,9
Febrero	10,9	31,6	-3,4	13,1	39,2	-2,9	70,3	100	25,9	66,4	100	19,9
Marzo	15,1	39,6	0,1	18,5	52,6	0,6	51,8	100	7,4	47,4	100	6,3
Abril	21,1	44,6	7,1	23,6	54,1	7,6	44,8	100	8,6	43,1	99,4	8,4
Mayo	23,1	44,6	9,1	24,2	52,1	8,6	49,5	100	10,4	51,8	100	10,6
Junio	27,8	56,0	11,1	28,0	54,1	11,7	50,5	100	9,6	54,5	100	16,0
Julio	30,0	53,6	14,6	30,7	63,0	15,2	51,9	97,9	13,5	56,7	100	17,5
Agosto	29,6	53,1	16,1	31,0	52,1	16,7	58,6	99,4	15,7	63,1	100	23,5
Septiembre	26,6	50,6	14,1	28,4	49,6	14,7	58,3	100	17,5	63,3	100	25,6
Octubre	20,3	38,1	9,1	24,4	56,5	9,6	71,2	100	20,8	63,8	100	15,6
Noviembre	15,2	30,1	6,1	18,3	46,6	6,1	74,9	100	39,2	68,9	100	21,4
Diciembre	9,4	24,1	-5,5	13,3	38,7	-4,5	78,0	100	27,1	69,0	100	15,5

Tabla 2. Temperaturas (°C) y humedades relativas (%) medias mensuales, máximas y mínimas absolutas mensuales a lo largo del año medidas en la superficie del líquen *Diploschistes diacapsis* en sus hábitats “favorable” y “desfavorable”

	Hábitat favorable			Hábitat desfavorable			Hábitat favorable			Hábitat desfavorable		
	T med	T max	T min	T med	T max	T min	Hum med	Hum max	Hum min	Hum med	Hum max	Hum min
Enero	8,1	26,2	-4,5	13,0	43,1	-3,5	79,9	100	27,5	70,0	100	21,7
Febrero	10,1	31,1	-5,5	13,4	40,1	-4,0	76,4	100	26,8	71,3	100	23,9
Marzo	13,6	34,6	-1,5	16,6	40,6	-1,4	55,7	100	11,8	52,9	100	10,1
Abril	20,5	47,6	5,1	22,3	48,6	5,6	48,1	100	12,2	48,0	100	15,3
Mayo	23,7	53,1	7,6	24,3	48,1	7,1	49,1	100	9,3	49,1	100	11,3
Junio	28,4	55,1	10,2	27,3	50,6	10,6	50,7	100	6,1	52,6	100	13,9
Julio	31,1	59,5	14,2	29,2	56,0	12,6	50,2	98,1	9,6	55,2	100	13,3
Agosto	29,7	51,6	15,7	29,4	51,1	14,6	58,1	100	14,1	61,2	100	14,7
Septiembre	26,1	48,6	13,2	27,2	50,6	12,6	59,6	100	20,1	61,1	100	19,4
Octubre	19,3	41,6	7,1	23,7	55,0	8,6	78,9	100	25,0	70,3	100	19,6
Noviembre	14,2	32,1	3,6	18,1	48,6	5,9	82,4	100	38,9	74,0	100	25,5
Diciembre	8,0	27,7	-7,0	12,9	40,1	-5,5	85,4	100	28,2	75,0	100	18,7

Tabla 3. Temperaturas (°C) y humedades relativas (%) medias mensuales y máximas y mínimas absolutas mensuales a lo largo del año medidas en la superficie del líquen *Squamarina lentigera* tanto en sus hábitats “favorable” y “desfavorable”

	Hábitat favorable			Hábitat desfavorable			Hábitat favorable			Hábitat desfavorable		
	T med	T max	T min	T med	T max	T min	Hum med	Hum max	Hum min	Hum med	Hum max	Hum min
Enero	7,0	22,7	-3,4	12,8	47,1	-3,9	80,8	100	28,7	66,1	100	22,2
Febrero	10,0	26,7	-5,4	13,0	40,2	-4,4	69,8	100	29,2	66,6	100	24,8
Marzo	14,9	37,6	-1,9	17,0	45,6	-1,9	53,1	100	9,9	51,7	100	9,9
Abril	22,7	48,1	5,6	22,3	52,1	5,6	44,1	100	7,5	46,5	100	11,4
Mayo	25,6	52,1	7,6	24,7	48,5	7,6	41,8	100	2,2	48,7	100	10,4
Junio	30,2	57,6	10,1	28,1	51,1	10,6	42,4	100	3,9	51,6	100	12,8
Julio	34,0	62,5	14,1	30,7	60,5	13,6	43,3	95,2	6,3	52,9	100	10,3
Agosto	33,0	55,6	15,6	31,1	54,0	15,6	50,4	98,4	9,3	59,2	100	14,4
Septiembre	27,8	49,6	13,6	28,8	50,6	13,6	53,2	100	14,7	59,4	100	20,5
Octubre	19,4	36,7	7,1	23,3	54,1	8,6	74,3	100	22,6	66,8	100	15,4
Noviembre	13,6	24,7	4,1	17,4	41,1	5,1	82,2	100	46,8	71,1	100	24,9
Diciembre	6,8	19,2	-5,4	13,1	45,1	-5,9	87,4	100	36,8	71,6	100	18,4

Tabla 4. Temperaturas (°C) y humedades relativas (%) medias mensuales, máximas y mínimas absolutas mensuales a lo largo del año medidas en la superficie del líquen *Lepraria isidiata* en sus hábitats “favorable” y “desfavorable”

	Hábitat favorable			Hábitat desfavorable			Hábitat favorable			Hábitat desfavorable		
	T med	T max	T min	T med	T max	T min	Hum med	Hum max	Hum min	Hum med	Hum max	Hum min
Enero	7,4	22,2	-5,4	7,6	23,2	-5,0	86,8	100	41,3	78,8	100	30,7
Febrero	9,7	26,2	-5,9	9,8	29,2	-6,0	82,4	100	40,3	75,1	100	29,2
Marzo	13,9	32,6	-2,0	14,3	36,2	-1,9	55,8	100	12,5	54,3	100	9,5
Abril	21,4	44,1	5,6	21,6	45,1	4,6	46,9	100	8,0	44,9	100	5,5
Mayo	23,4	45,6	7,1	24,6	52,6	7,6	47,8	100	9,3	46,3	100	6,8
Junio	28,2	50,6	9,2	30,2	57,5	9,6	49,2	100	11,1	47,4	100	7,9
Julio	31,5	58,0	13,2	33,0	61,5	13,2	48,3	99,6	8,6	47,1	99,6	7,0
Agosto	31,0	55,0	14,2	31,8	56,5	14,7	54,8	98,0	13,6	54,3	100	9,6
Septiembre	26,8	49,1	12,2	28,2	53,1	13,2	57,0	100	19,1	55,4	100	16,6
Octubre	19,4	36,7	7,1	20,3	39,2	7,6	81,5	100	30,3	72,3	100	22,1
Noviembre	13,6	24,7	4,1	13,9	25,7	4,1	88,0	100	53,9	80,3	100	42,4
Diciembre	12,6	30,7	-3,9	13,3	34,2	-4,0	91,3	100	46,9	84,9	100	34,1

Tabla 5. Humedad (%) y temperatura del suelo (°C) (media ± desviación estándar) medida a 5 cm de profundidad bajo cada especie o tipo de biocostra en un gradiente de hábitats (condiciones desfavorables vs favorables) a lo largo del año.

	Hábitat	Cianobacteria		<i>D. diacapsis</i>		<i>S. lentigera</i>		<i>L. isidiata</i>	
		Hs	Ts	Hs	Ts	Hs	Ts	Hs	Ts

Febrero	Favorable	2.5±0.7	16.5±0.2	3.3±0.2	16.4±0.3	3.6±0.5	17.6±0.3	2.4±0.7	17.1±1.3
	Desfavorable	2.3±0.6	16.0±0.2	1.8±0.5	17.3±0.5	1.5±0.5	18.6±0.1	1.4±0.2	14.3±0.1
Marzo	Favorable	3.7±0.3	24.3±0.8	5.1±0.3	29.0±0.2	5.3±0.7	28.3±0.4	3.2±0.4	29.0±0.2
	Desfavorable	3.0±0.8	24.7±0.2	2.6±0.1	32.5±0.4	2.3±0.4	32.4±0.1	1.9±0.2	30.4±0.7
Abril	Favorable	3.5±0.5	21.7±0.2	3.8±0.4	27.8±0.3	3.7±0.5	26.3±0.8	3.6±0.3	31.3±0.1
	Desfavorable	2.6±1.1	24.6±0.1	3.2±1.2	29.9±1.7	2.2±0.7	31.8±0.5	2.0±0.9	29.2±0.2
Mayo	Favorable	3.9±0.3	31.2±0.5	3.3±0.3	32.1±0.1	4.0±0.5	32.7±0.3	3.1±0.8	29.9±0.1
	Desfavorable	2.3±0.8	31.8±0.2	2.2±0.2	32.3±0.3	2.5±0.6	32.4±0.2	2.6±0.4	32.6±0.4
Junio	Favorable	4.3±0.7	27.0±0.1	3.7±0.7	28.9±0.9	4.0±0.6	31.1±0.5	3.1±0.6	39.3±0.3
	Desfavorable	4.0±0.4	27.0±0.1	3.0±0.2	36.1±0.1	3.3±0.3	36.5±0.1	2.5±0.4	37.3±0.3
Julio	Favorable	3.7±0.3	26.4±0.1	3.3±1.0	31.6±0.1	3.6±0.3	32.3±0.2	3.8±0.3	39.7±0.2
	Desfavorable	2.7±0.7	30.7±0.2	2.3±0.2	36.4±0.1	2.8±0.2	36.6±0.1	3.0±0.4	38.3±0.1
Septiembre	Favorable	3.2±0.4	22.2±0.2	3.1±0.3	22.0±0.1	3.5±0.8	21.8±0.1	3.3±0.3	25.9±0.1
	Desfavorable	2.4±0.7	23.1±0.3	2.5±0.8	24.3±0.1	2.3±0.8	23.8±0.2	2.3±0.4	24.4±0.2
Octubre	Favorable	3.2±0.3	19.8±0.8	3.3±0.3	19.4±0.2	3.7±0.6	19.3±0.1	3.6±0.3	19.9±0.1
	Desfavorable	2.3±0.6	20.4±0.2	2.2±0.4	21.4±0.2	2.2±0.6	21.9±0.1	2.4±0.3	20.3±0.2
Noviembre	Favorable	2.5±0.3	17.3±0.2	2.1±0.2	16.0±0.1	2.9±0.4	15.7±0.2	3.5±1	16.9±0.1
	Desfavorable	2.8±0.9	16.1±0.2	0.7±0.3	17±0.0	0.97±0.3	17.0±0.1	1.5±0.3	16.9±0.1
Diciembre	Favorable	4.4±0.1	17.5±0.1	6.8±0.3	14.1±0.1	5.9±0.6	13.6±0.4	5.6±1.3	20.9±0.6
	Desfavorable	1.8±0.3	17.8±0.1	1.5±0.4	21.6±0.4	2.0±0.2	20.5±0.3	1.9±0.4	24.1±0.6

Tabla 6. Radiación fotosintéticamente activa ($\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$) media y máxima absoluta mensual en los diferentes tipos de biocostras en sus hábitats favorables y desfavorables.

	Cianobacteria				<i>D. diacapsis</i>			
	Hábitat favorable		Hábitat desfavorable		Hábitat favorable		Hábitat desfavorable	
	Media	Máxima	Media	Máxima	Media	Máxima	Media	Máxima
Enero	171,0	881,6	262,8	1455,3	95,0	861,0	105,1	1134,0
Febrero	219,2	1169,7	344,2	1967,2	167,0	1190,5	203,4	1595,8
Marzo	312,2	1408,0	503,8	2390,6	284,1	1504,7	363,9	2037,3
Abril	368,0	1483,9	597,2	2525,3	387,1	1605,6	504,7	2178,9
Mayo	439,6	1564,0	719,9	2667,7	466,1	1711,3	612,5	2327,2
Junio	454,4	1542,4	744,4	2629,2	496,5	1711,3	653,8	2327,2
Julio	471,7	1436,2	775,7	2440,6	506,3	1543,1	668,0	2091,3
Agosto	415,1	1444,9	678,8	2456,0	426,6	1468,7	558,8	1986,8
Septiembre	307,2	1353,9	493,1	2294,4	308,4	1516,7	396,9	2054,2
Octubre	258,4	1241,2	411,6	2094,2	215,8	1245,3	270,4	1673,3
Noviembre	173,7	1044,1	267,1	1744,0	119,2	993,1	138,5	1319,4
Diciembre	158,5	1009,4	242,3	1682,4	74,9	692,8	78,0	898,1
	<i>S. lentigera</i>				<i>L. isidiata</i>			
	Hábitat favorable		Hábitat desfavorable		Hábitat favorable		Hábitat desfavorable	
	Media	Máxima	Media	Máxima	Media	Máxima	Media	Máxima
Enero	184,6	1058,4	184,6	1058,4	184,6	1058,4	184,6	1058,4
Febrero	250,7	1409,7	250,7	1409,7	250,7	1409,7	250,7	1409,7
Marzo	372,7	1720,4	372,7	1720,4	372,7	1720,4	372,7	1720,4
Abril	447,2	1771,3	447,2	1771,3	447,2	1771,3	447,2	1771,3
Mayo	529,9	1860,4	529,9	1860,4	529,9	1860,4	529,9	1860,4
Junio	558,4	1837,5	558,4	1837,5	558,4	1837,5	558,4	1837,5
Julio	492,1	1677,1	492,1	1677,1	492,1	1677,1	492,1	1677,1
Agosto	564,0	1677,1	564,0	1677,1	564,0	1677,1	564,0	1677,1
Septiembre	430,8	1442,8	430,8	1442,8	430,8	1442,8	430,8	1442,8
Octubre	291,3	1241,7	291,3	1241,7	291,3	1241,7	291,3	1241,7
Noviembre	195,9	1223,9	195,9	1223,9	195,9	1223,9	195,9	1223,9
Diciembre	164,0	1183,2	164,0	1183,2	164,0	1183,2	164,0	1183,2

Tabla 7. Datos medios del tanto por ciento de veces (%) que se detectó cada pigmento o biomolécula en cada una de las especies analizadas (Se tomaron tres muestras para cada combinación de factores y de cada muestra se analizaron de 5-10 submuestras).

Estación	Hábitat	E. Hidr.	OxM	OxD	Car	Clo	LecAc	UsnAc	Atrano	RizocAc	Scy	Unknown
<i>Cyanobacteria</i>												
Invierno	Fav	Seco			55,6						55,6	44,4
Invierno	Fav	Hum			44,2						30,0	44,4
Invierno	Desf	Seco			73,3						80,0	-
Invierno	Desf	Hum			100						100	-

Verano	Fav	Seco			75,6						82,2	17,8
Verano	Fav	Hum			71,7						63,3	36,7
Verano	Desf	Seco			73,3						73,3	20,0
Verano	Desf	Hum			46,7						86,7	13,3
<i>Diploschistes diacapsis</i>												
Invierno	Fav	Seco	63,9	5,6	53,3	8,3	57,8					-
Invierno	Fav	Hum	89,7	15,9	46,0	-	47,9					-
Invierno	Desf	Seco	30,0	6,7	6,7	-	13,3					-
Invierno	Desf	Hum	83,3	4,2	31,7	-	25,0					6,7
Verano	Fav	Seco	94,4	33,3	33,3	-	20,0					-
Verano	Fav	Hum	85,0	40,0	6,7	8,3	21,7					-
Verano	Desf	Seco	73,3	6,7	13,3	-	6,7					6,7
Verano	Desf	Hum	86,7	6,7	20,0	-	20,0					-
<i>Squamarina lentijera</i>												
Invierno	Fav	Seco	90,3	-	40,0			36,9				4,2
Invierno	Fav	Hum	87,5	-	30,5			15,6				8,3
Invierno	Desf	Seco	87,8	-	37,8			37,8				-
Invierno	Desf	Hum	100	-	3,7			-				3,7
Verano	Fav	Seco	83,3	12,2	6,7			5,6				5,6
Verano	Fav	Hum	93,3		13,3			26,7				-
Verano	Desf	Seco	82,2		24,4			-				-
Verano	Desf	Hum	86,7		26,7			-				6,7
<i>Lepraria isidiata</i>												
Invierno	Fav	Seco	-	53,3	40,0	6,7		6,7	-			-
Invierno	Fav	Hum	-	80,9	42,9	9,5		38,1	38,1			-
Invierno	Desf	Seco	-	53,3	60,0	13,3		6,7	-			26,7
Invierno	Desf	Hum	-	61,1	47,8	24,8		26,7	20,0			17,4
Verano	Fav	Seco	5,6	94,4	32,2	12,2		0,0	-			31,1
Verano	Fav	Hum	-	60,0	46,7	6,7		13,3	46,67			26,7
Verano	Desf	Seco	13,3	100	40,0	13,3		6,7	-			13,3
Verano	Desf	Hum	-	63,3	33,3	12,2		43,3	24,43			-

E. Hidr.: Estado de hidratación; Fav.: Hábitat Favorable; Desf.: Hábitat desfavorable; Hum.: húmedo; OxM: oxalato cálcico monohidratado; OxD: oxalato cálcico dihidratado; Car: carotenos; Unknown: pigmentos no identificados; Clo: clorofila; UsnAc: ácido úsnico; Atran: atranorín; RizocAc: ácido rizocárpico; LecAc: ácido lecanórico; Scy: escitonemina.

Tabla 8. Resultado de los GLZs sobre las frecuencias (%) de detecciones en cada muestra de OxM, OxD, Car y Unknown..

	OxD			Car			Unknown		
	Deg. Freed.	Wald Stat.	p	Deg. Freed.	Wald Stat.	p	Deg. Freed.	Wald Stat.	p
Intercept	1	71.4	0.000	1	557.2	0.000	1	68.6	0.000
Estación	1	22.7	0.000	1	0.8	0.380	1	0.8	0.381
Hábitat	1	1.3	0.256	1	0.1	0.762	1	8.6	0.003
Hidratación	1	0.0	0.965	1	0.2	0.669	1	0.2	0.634
Especie	3	1004.8	0.000	3	28.8	0.000	3	43.5	0.000
Estación*Hábitat	1	0.3	0.600				1	0.1	0.788
Estación*Hidratación	1	0.3	0.599				1	0.2	0.685
Hábitat*Hidratación	1	12.0	0.001				1	0.6	0.428
Estación*Especie	3	39.6	0.000				3	1.5	0.679
Hábitat*Especie	3	2.6	0.466				3	21.4	0.000
Hidratación*Especie	3	0.2	0.979				3	2.6	0.461
Estación*Hábitat*Hidratación	1	17.9	0.000				1	0.1	0.756
Estación*Hábitat*Especie	3	0.7	0.865				3	30.8	0.000
Estación*Hidratación*Especie	3	0.2	0.976						
Hábitat*Hidratación*Especie	3	48.8	0.000						
Estación*Hábitat*Hidratación*Especie	3	42.8	0.000						

Deg. Freed.: Grados de libertad; OxD: oxalato cálcico dihidratado; Car: carotenos; Unknown: pigmentos no identificados.

Tabla 9. Distribución de frecuencias de pigmentos según especies: porcentaje de veces que se ha detectado el pigmento en relación con todos los espectros que se han realizado en esa especie (entre 126 y 138 espectros por especie).

	OxM	OxD	Car	Clo	LecAc	UsnAc	Atrano	RizocAc	Scy	Unknown
Cianobacterias	0	0	65.5	0	0	0	0	0	71.4	22.1

<i>Diploschistes</i>	75.8	14.9	26.4	2.1	26.5	0	0	0	0	1.7
<i>Lepraria</i>	2.4	70.8	42.8	12.4	0	0	17.7	16.2	0	14.4
<i>Squamarina</i>	88.9	2.36	22.9	0	0	15.3	0	0	0	3.6

OxM: oxalato cálcico monohidratado; OxD: oxalato cálcico dihidratado; Car: carotenos; Unknown: pigmentos no identificados; Clo: clorofila; UsnAc: ácido úsnico; Atran: atranorín; RizocAc: ácido rizocárpico; LecAc: ácido lecanórico; Scy: escitonemina.

Figuras

Figura 1. Espectro Raman tomado sobre cianobacterias. Las bandas marcadas con una estrella indican la presencia de caroteno; las demás bandas son características de escitonemina.

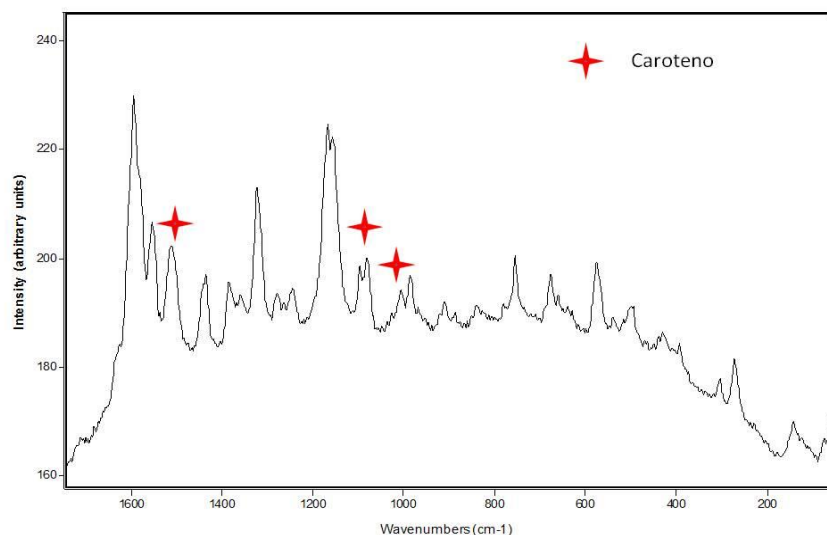


Figura 2. Espectro Raman de *Diploschistes diacapsis* con bandas de oxalato cálcico monohidratado, caroteno y ácido lecanórico.

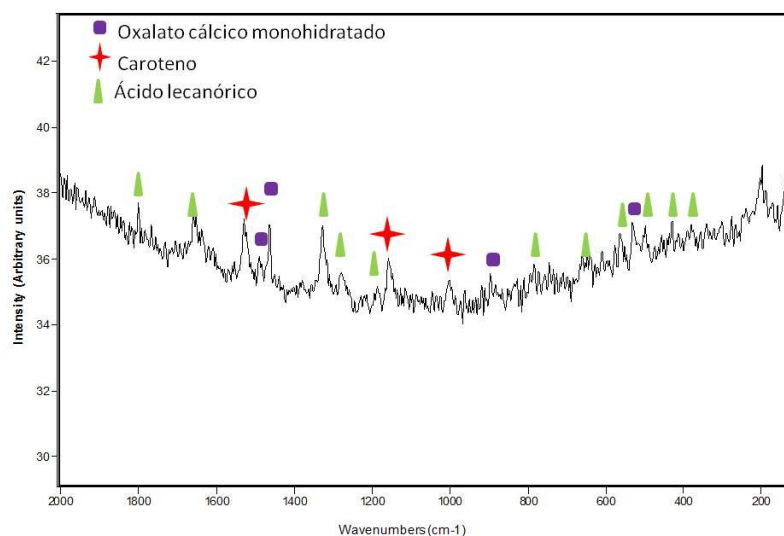


Figura 3. Espectro Raman característico de *Squamarina lentigera* con las bandas del caroteno, oxalato cálcico monohidratado y ácido úsnico.

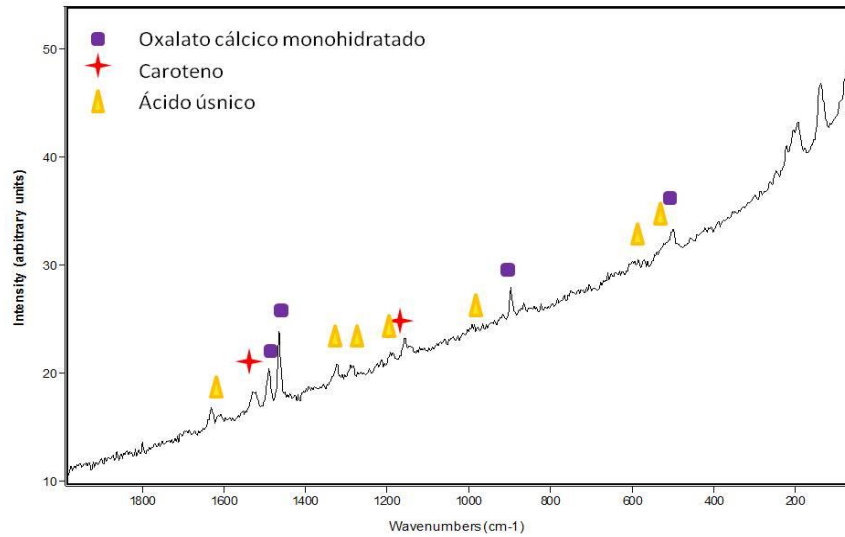


Figura 4. Espectros Raman de *Lepraria isidiata* con las bandas características de carotenos, atranorina y oxalato cálcico dihidratado.

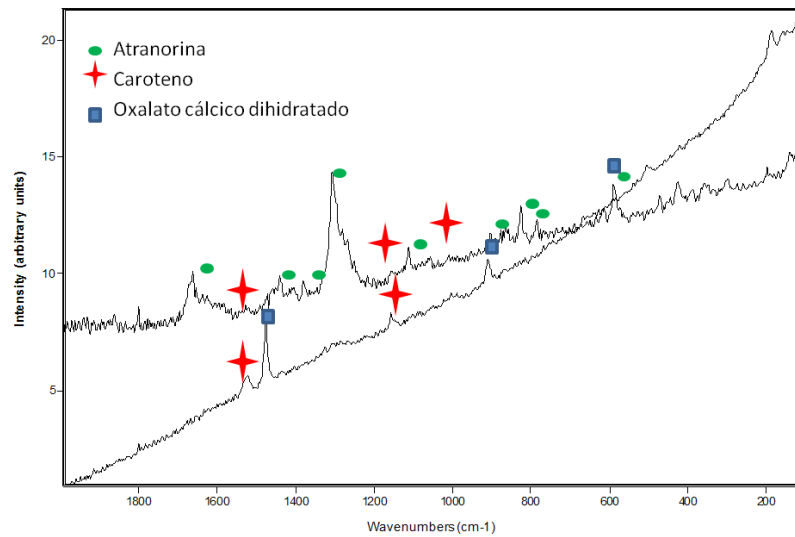


Figura 5. Análisis Cluster de: a) Estación (invierno y verano), b) hábitats (favorable y desfavorable), c) hidratación (seco y húmedo), y d) Especies (*Diploschistes diacapsis* (Diplos), *Squamarina lentigera* (Squam), *Lepraria isidiata* (Lepra), cianobacterias (Ciano)).

