



 Universidad
Rey Juan Carlos
Tesis Doctoral
Juan Luis Hidalgo Cardós – 2017

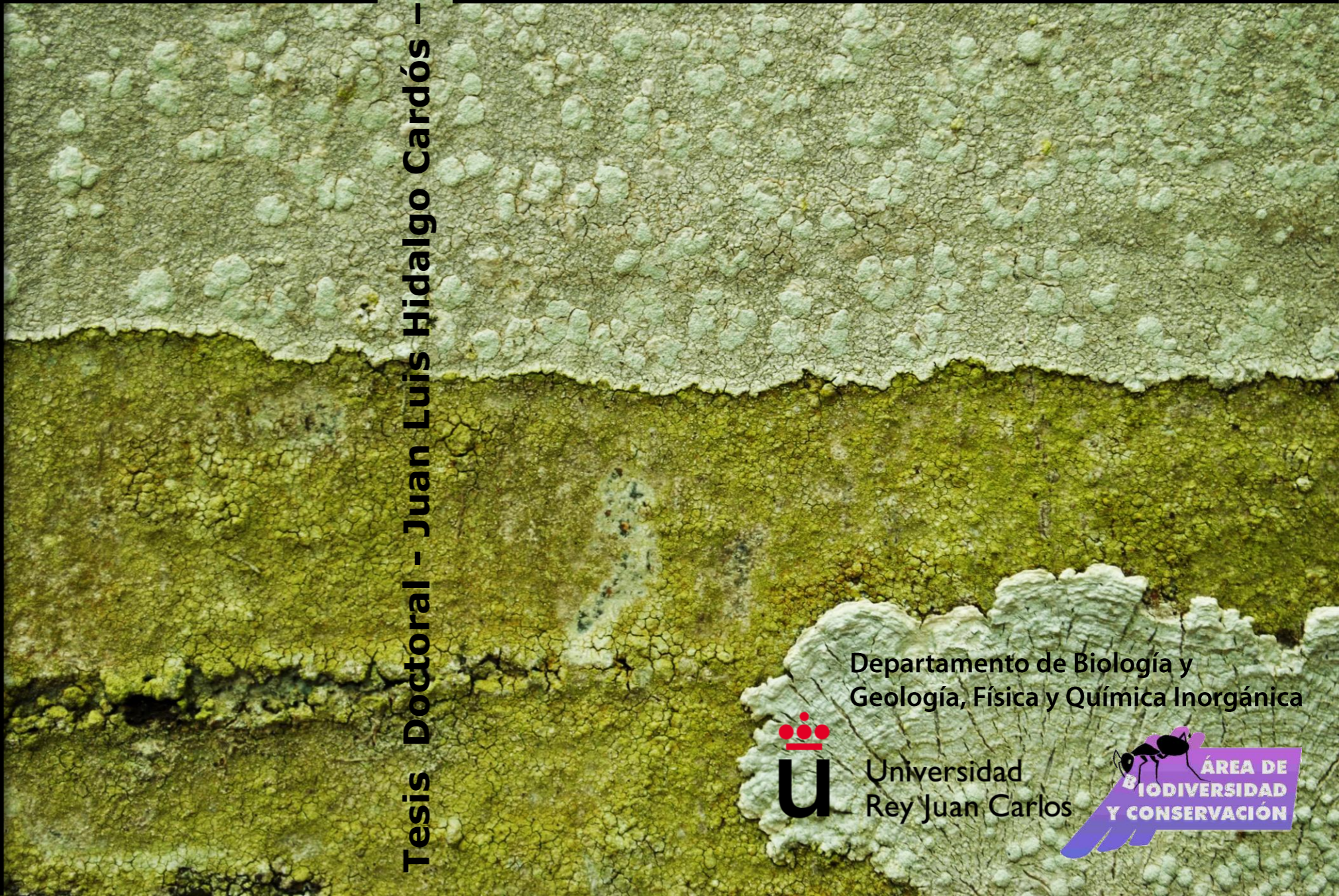
Tesis Doctoral - Juan Luis Hidalgo Cardós - 2017

Tesis doctoral

Efectos de la estructura del paisaje sobre la diversidad y conservación de organismos epífitos en bosques mediterráneos, y su influencia sobre la dispersión y el establecimiento

Juan Luis Hidalgo Cardós – 2017

Directores: Isabel Martínez Moreno y Gregorio Aragón Rubio



Departamento de Biología y Geología, Física y Química Inorgánica



Universidad
Rey Juan Carlos



La Dra. Isabel Martínez Moreno y el Dr. Gregorio Aragón Rubio, ambos Profesores Titulares del Departamento de Biología y Geología, Física y Química Inorgánica de la Universidad Rey Juan Carlos,

CERTIFICAN:

Que los trabajos de investigación desarrollados en la memoria de tesis doctoral: **“Efectos de la estructura del paisaje sobre la diversidad y conservación de organismos epífitos en bosques mediterráneos, y su influencia sobre la dispersión y el establecimiento”**, han sido realizados bajo su supervisión y son aptos para ser presentados por el licenciado Juan Luis Hidalgo Cardós ante el tribunal que en su día se consigne, para aspirar al Grado de Doctor en el Programa de Doctorado de Conservación de Recursos Naturales por la Universidad Rey Juan Carlos.

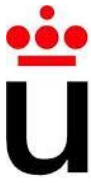
VºBº Directora de Tesis

Dra. Isabel Martínez Moreno

VºBº Director de Tesis

Dr. Gregorio Aragón Rubio

En Móstoles, enero de 2017



Universidad
Rey Juan Carlos

Departamento de Biología y Geología,
Física y Química Inorgánica

Tesis Doctoral

**Efectos de la estructura del paisaje sobre la diversidad y
conservación de organismos epífitos en bosques mediterráneos, y
su influencia sobre la dispersión y el establecimiento**

**Effects of landscape structure on the diversity and
conservation of epiphytes in Mediterranean forests, and its
influence on dispersal and establishment**

Juan Luis Hidalgo Cardós

Directores:

Isabel Martínez Moreno

Gregorio Aragón Rubio

Programa de Doctorado en Conservación de Recursos Naturales. Enero 2017

A Carolina y a mi madre.

ÍNDICE

RESUMEN

Síntesis	13
Summary (English versión)	19
Antecedentes	23
Objetivos y estructura de la tesis	35
Metodología general	37
Conclusiones	51
Lista de manuscritos. Coautores y filiación	54
Bibliografía	56

CAPÍTULOS/CHAPTERS

Capítulo 1/ Chapter 1	65
Epiphyte communities in Mediterranean fragmented forests: importance of the fragment size and the surrounding matrix	
Capítulo 2/ Chapter 2	107
Lag between the increase of species richness and habitat recovery at different spatio-temporal scales	
Capítulo 3/ Chapter 3	137
A species on a tightrope or how to find the equilibrium	
Capítulo 4/ Chapter 4	171
Reestablishing the cyanolichen symbiosis: Where do the compatible photobionts come from?	

DISCUSIÓN GENERAL	205
-------------------	-----

CONCLUSIONS	230
-------------	-----

RECONOCIMIENTOS	234
-----------------	-----

AGRADECIMIENTOS	235
-----------------	-----

RESUMEN

SUMMARY

SÍNTESIS

La transformación del paisaje es un fenómeno global que afecta de forma intensa a la biodiversidad de todos los ecosistemas. Delimitar y definir claramente los procesos que forman parte de esa modificación generalizada y conocer sus efectos sobre la biodiversidad, debe ayudar a promover una actividad antrópica más responsable y mitigar sus dañinas consecuencias. La pérdida y fragmentación de hábitats son los procesos más intensos de transformación del paisaje, y su interacción con las comunidades han demostrado ser muy evidentes y negativos. Así el objetivo de esta tesis doctoral consiste en conocer el efecto de ambos procesos sobre la ecología y la biología de organismos epífitos de bosque mediterráneo. Para ello se definieron una serie de variables descriptoras de un paisaje fragmentado, y se midió la respuesta ante ellas de líquenes y musgos epífitos, tanto a nivel de comunidad como de especie.

En el **capítulo 1** se analiza cómo y en qué medida se ven afectadas las comunidades epífitas formadas por musgos y líquenes, por la fragmentación de los encinares mediterráneos. El objetivo de este estudio consiste en conocer si el tamaño y la forma del fragmento de bosque remanente, así como el tipo de matriz que lo rodea, condicionan la riqueza y composición de especies. Para resolverlo, se han seleccionado 40 fragmentos de bosque de *Quercus ilex* subsp. *ballota* en Montes de Toledo con similar cobertura arbórea (>70%) y próximos entre sí, de distintos tamaños y formas, y rodeados por diferentes tipos de matriz. Se desarrollaron modelos lineales generalizados (GLM) a escala de fragmento, y mixtos (GLMMs) a escala de parcela. Como variables respuesta a ambos niveles se consideraron la riqueza, diversidad y similitud de las comunidades epífitas, y la presencia y abundancia de las especies más representativas. Los resultados indican que el tamaño del fragmento, la forma y la calidad de la matriz circundante son factores clave que afectan a la riqueza y diversidad de organismos epífitos. Los fragmentos más grandes y de forma más regular albergaron las comunidades más ricas y diversas, posiblemente gracias a que poseen un área central más grande que favorece la entrada de especies típicas de

interior de bosque. Una matriz de alto contraste sólo fue favorable en fragmentos pequeños, hecho posiblemente relacionado con la facilitación de la llegada de propágulos de más especies. La respuesta a nivel de especie fue altamente variable. La estructura del paisaje proporciona un valioso poder explicativo de la pérdida de riqueza y diversidad de especies epífitas. La gestión forestal debe asegurar la retención de los bosques continuos más grandes posibles. La estrategia de manejo de la matriz dependerá del tipo de enfoque conservacionista, ya que se observaron diferentes efectos relacionados con la calidad de la matriz y el tamaño de los fragmentos.

En el **capítulo 2** se compararon los resultados del capítulo 1 con otras características espacio-temporales de la estructura del paisaje. En un contexto global de modificación del paisaje, la estructura resultante de los hábitats remanentes será responsable de la configuración de la riqueza de especies que albergan. Los procesos de degradación más evidentes son la pérdida y fragmentación del hábitat, pero no es fácil demostrar sus efectos reales e independientes, ya que la mayoría de las veces se producen de forma conjunta. Además, aún hay mucho por descubrir sobre la interacción entre la dirección y la intensidad de las trayectorias temporales del paisaje con la biodiversidad. El esclarecimiento de todos estos factores nos permitirá entender cómo las comunidades se estructuran en paisajes antropizados, y esto puede ayudar a una preservación más eficiente de las mismas. En este caso elegimos la riqueza de epífitos como signo de la respuesta de la biodiversidad a la dinámica espacio-temporal de la estructura de un paisaje en recuperación, y seleccionamos 40 fragmentos de bosque mediterráneo bien conservados en un contexto de alta pérdida de hábitat (> 85%). Medimos los atributos más relevantes a escala de fragmento y comparamos su poder explicativo con la cantidad de hábitat total circundante, su grado de fragmentación y su conectividad. Todas las variables se midieron a lo largo de un marco temporal de 55 años utilizando fotografías aéreas históricas. Entre todas las variables históricas y actuales a escala de paisaje, solamente la conectividad más antigua tuvo impacto en la riqueza de especies. Además, la trayectoria del tamaño del fragmento en los últimos 29 años y el tamaño actual, resultaron ser los mejores

predictores. El efecto de una matriz de alto contraste fue consistente pero muy pequeño. Estos resultados demuestran que no sólo la simple pérdida de hábitat, sino junto su configuración espacial, son significativos para explicar los patrones de riqueza. La riqueza de epífitos muestra un desfase en relación con la estructura del paisaje actual, y la escala espacial en la que tiene lugar la dinámica del paisaje determina la rapidez con que se reorganiza la riqueza, en este caso porque los epífitos son organismos sésiles y con ciclos vitales largos. Teniendo en cuenta la dependencia de los organismos epífitos en la conectividad y la cantidad suficiente de hábitat de buena calidad para estar presentes en los fragmentos de bosque, se prevé una recuperación de las comunidades epífitas en las próximas décadas debido a la elevada riqueza regional de especies y el reciente aumento de la superficie forestal.

En el **capítulo 3** seleccionamos una especie amenazada para detectar cómo la transformación del paisaje interfiere en la dispersión y el establecimiento, dos fases críticas de su ciclo de vida. *Pectenium plumbeum* (Lightf.) P.M. Jørg. *et al.* es un cianoliquen epífito que aparece de forma puntual y más o menos discontinua desde los encinares del Atlas hasta los bosques del norte de Noruega. Su elevada sensibilidad a la influencia antrópica solo le permite desarrollarse bajo las condiciones que proporciona un bosque maduro con cierto grado de conservación. En el centro de la Península Ibérica, donde ha sido catalogada como vulnerable, se distribuye en varias decenas de poblaciones, distantes entre sí y con un número de individuos que, en ocasiones, no supera la decena. Partiendo de la existencia de un número elevado de zonas próximas a las poblaciones, con un hábitat a priori favorable para su desarrollo, pero en las que el liquen está ausente o es muy escaso, nos preguntamos acerca de las posibles limitaciones a la dispersión o al establecimiento que pudiese tener esta especie y que condicionase la expansión de sus poblaciones y la colonización de nuevas áreas. En primer lugar se modelizaron la presencia y la abundancia de la especie en 400 parcelas de 50x50 m elegidas al azar en Montes de Toledo. Variables ambientales como la altitud y la precipitación, y de fragmentación del hábitat, como la cantidad de área forestal y de borde, resultaron ser muy importantes para el

desarrollo de la especie. Los modelos fueron validados internamente de forma exitosa mediante diferentes aproximaciones ('Area under the ROC curve' para la presencia, y 'bootstrapped cross validation' para la abundancia). Posteriormente fueron extrapolados en 1200 parcelas del Parque Nacional de Cabañeros, seleccionadas al azar, abarcando una mayor superficie (42000 Ha), para las que se obtuvo un valor predicho de abundancia y de probabilidad de presencia. Los modelos fueron comprobados en campo para poder testar si las predicciones se correspondían con la realidad. Asumiendo como valor límite de probabilidad de aparición 0.44, se maximiza el acierto de las predicciones de presencia/ausencia en un valor muy alto (87,3% de los casos). La correspondencia en las abundancias, es también alta (ρ de Spearman=0,67) y significativa. Esto evidencia el elevado poder predictivo de los modelos obtenidos, y que la especie ocupa en gran medida su hábitat potencial. Por tanto, a escala de paisaje, quedan descartados los problemas dispersivos de la especie, y queda demostrado que la calidad del hábitat es la que está condicionando su presencia y abundancia. Los requisitos que *P. plumbea* requiere para su presencia en esta región son proporcionados únicamente por unas pedreras características cubiertas de bosque, derivadas del manejo histórico del territorio, que reproducen localmente unas condiciones microclimáticas propias de un ambiente oceánico. Este hábitat es escaso, pero *P. plumbea* ha colonizado con éxito todas estas áreas dispersas en el paisaje a través de su alta capacidad de dispersión.

En el **capítulo 4** se estudió la germinación de ascosporas y el patrón de asociación con distintos fotobiontes en el cianoliquen *Pectenium plumbeum* (*Pannariaceae*, *Peltigerales*) en bosques templados y mediterráneos de la Península Ibérica, para detectar posibles limitaciones de establecimiento. Con el fin de restablecer la simbiosis líquénica, las esporas del micobionte primero deben germinar y luego asociarse con un fotobionte compatible. En primer lugar, se realizaron pruebas de germinación de todas las ascosporas obtenidas a partir de 500 apotecios. Ninguna ascospora germinó tras dos meses de ensayo con 32 tratamientos diferentes. Posteriormente se obtuvieron 192 aislamientos del fotobionte (*Nostoc*) a partir de 24

talos. Mientras que el 82% de los aislamientos seguían vivos en el medio de crecimiento después de seis meses, ninguno de ellos creció significativamente ni produjo hormogonios con la capacidad de fundar nuevas colonias. Con el fin de determinar la identidad del genotipo de los cianobiontes (*Nostoc*) obtuvimos secuencias del intrón tRNA^{Leu}(UAA) de 30 talos de *P. plumbea* de una única población. También se secuenció el mismo intrón de los cianobiontes (*Nostoc*) de 41 ejemplares de otras especies de cianolíquenes del mismo hábitat, y 58 colonias de *Nostoc* de vida libre cultivadas a partir de muestras de corteza. Los resultados indican que *P. plumbea* comparte genotipos de *Nostoc* con otras dos especies de cianolíquenes y constituyen la fuente más abundante de fotobiontes compatibles. Sólo uno de ellos se reproduce asexualmente a través de pequeños fragmentos de talo, y de este modo puede considerarse como facilitador del establecimiento de *P. plumbea* dispersando cianobiontes apropiados en nuevos hábitats.

SUMMARY

Landscape transformation is a global threat for the biodiversity of all ecosystems. The clear delimitation and definition of both the processes behind of this generalized change and their effects, should help to promote a more responsible human activity and mitigate its harmful consequences on biodiversity. Habitat loss and fragmentation are the most intense processes of landscape transformation, and their interaction with communities has proven to be very evident and negative. Thus the objective of this doctoral thesis is to know the effects of both processes on the ecology and biology of epiphytic organisms of Mediterranean forest. In this regard, a series of descriptive variables of a fragmented landscape was defined, and the response of epiphyte lichens and mosses was measured, both at community and species level.

In **chapter 1** we assessed the effect of forest fragment attributes on several epiphyte community parameters. Mediterranean forests have been fragmented intensively over time, thereby yielding small and isolated forest remnants. They host a rich variety of epiphytes, which may be affected by landscape structure. Previous studies have analyzed the influence of habitat quality on these epiphytic communities, but there is little knowledge of the effects of other fragment features. We evaluated the impacts of forest loss and fragmentation on epiphytic communities (lichens and bryophytes) at plot and fragment scales after controlling the variation in forest structure and management. We considered 40 fragments of dense oak forests in a human-modified landscape. We quantified their spatial attributes (size, shape), the quality of the surrounding matrix and the forest stand structure. We modeled community traits, and the presence and abundance of species at fragment and plot scales. Fragment size, shape, and the quality of the surrounding matrix were key factors that affected epiphytic richness and diversity. Larger and more regularly shaped fragments hosted the richest and most diverse communities, possibly offering a larger core area and thus favoring the entry of typical forest species. A high-contrast matrix was only favorable in small fragments, probably allowing the arrival of

propagules. The species-level response was highly variable. Landscape structure provides powerful explanations of the richness and diversity losses among epiphytes. Forest management should ensure the retention of the largest possible continuous forests. The management strategy of the matrix will depend on the conservation goal, since we observed different effects related with quality and fragment size.

In **chapter 2** the results of the chapter 1 were compared with other spatio-temporal features of landscape structure. In a global context of landscape modification, the resulting structure of remnant habitats will be responsible for the configuration of the species richness that they host. The most evident processes of degradation are habitat loss and fragmentation, but it has not been easy to demonstrate their real and independent effects because mostly take place jointly. Furthermore, the interaction of direction and intensity of the temporal trajectories of landscapes with biodiversity is still scarcely known. The clarification of these drivers will let us to understand how communities are structured in anthropized landscapes and would help to preserve them more efficiently. We chose obligate epiphyte richness as a sign of the biodiversity response to a dynamic spatio-temporal structure of a recovering landscape, and selected 40 well-preserved Mediterranean forest fragments in a context of high habitat loss (>85%). We measure the most relevant fragment-scale attributes, and compare their explanatory power with the surrounding total habitat amount, its fragmentation degree and connectivity. All the variables were measured along a 55-years temporal frame utilizing historic orthophotos. Among all the historic and present landscape-scale variables, only the earliest connectivity had impact on species richness. Additionally, the trajectory of fragment size in the last 29 years and the present size, resulted to be the best predictors. The effect of a high-contrast matrix was consistent but very small. These results demonstrate that not only pure habitat loss, but together with the spatial configuration of the landscape, are meaningful for explaining richness patterns. The epiphyte richness shows a lag in relation to the present landscape structure, and the spatial scale at which landscape dynamics happens determines how fast the richness is organized, in this case because epiphytes

are sessile and long-lived organisms. In view of the dependence of epiphytes on connectivity and sufficient amount of good-quality habitat to occur along the landscape, the diverse species regional pool and the recent increase in forest surface ensure an amelioration of epiphyte communities in next decades.

In **chapter 3** we selected a threatened species to detect how landscape transformation interfere in two critical phases of its life cycle. Habitat loss and forest fragmentation interfere in the dispersal and establishment of species. Furthermore, populations growing far from the species optimal climate might undergo more problems, because its weak equilibrium with the environment could be more easily altered. The lichen *Pectenia plumbea* has oceanic climatic requirements, so in the Mediterranean region needs the humidity provided by old-growth forests to thrive, but most of this habitat has disappeared and the remnants are fragmented. In central Spain, this species only occupies a small proportion of the existing forests, so we aimed to determine whether this scattered distribution is due to limitations on dispersal or establishment. We selected a Mediterranean fragmented forest surface in central Spain, and extracted environmental variables from 400 plots. We modeled the presence and abundance of *P. plumbea* and developed species distribution models (SDMs) to detect all the suitable habitats inside the Cabañeros National Park area. *P. plumbea* was present in most of the habitats predicted as good quality, and generally absent from the poor quality zones (87.3% overall success). The abundance correlated fairly well with that predicted by the SDM (67%). Both models show that *P. plumbea* is linked to high temperature and precipitation. These requirements are only provided in the region by specific forested stony slopes derived from the historical land management, which reproduce oceanic conditions. This habitat is scarce but *P. plumbea* has successfully tracked all of these scattered areas via its high dispersal capacity.

In **chapter 4** we studied ascospore germination and photobiont association in the cyanolichen *Pectenium plumbeum* (Pannariaceae, Peltigerales) in temperate and Mediterranean oak forests of Spain, to detect possible establishment limitations. In order to reestablish the lichen symbiosis, fungal spores must first germinate and then associate with a compatible photobiont. Germination tests were made with ascospores from 500 apothecia. Not a single ascospore germinated within the two-month trial (with 32 different treatments). Then 192 isolates of the *Nostoc* photobiont were obtained from 24 thalli. While 82% of isolates were still alive after six months on the growth medium, none of them had grown significantly nor produced motile hormogonia. In order to determine the genotype identity of the *Nostoc* cyanobionts we obtained tRNA^{Leu}(UAA) intron sequences from 30 *P. plumbeum* thalli from 1 population. We also sequenced *Nostoc* cyanobionts of 41 specimens of other cyanolichen species from the same habitat and 58 *Nostoc* free-living colonies cultured from bark samples. The results indicated that *P. plumbeum* shares *Nostoc* genotypes with two other cyanolichen species. Only one of them reproduces asexually via small thallus fragments and is suspected to facilitate the establishment of *P. plumbeum* by dispersing appropriate cyanobionts into new habitats.

ANTECEDENTES

Pérdida y fragmentación del hábitat

Estamos siendo testigos de una **pérdida global acelerada de biodiversidad** a distintos niveles: genes, poblaciones, especies y comunidades. Este proceso ha sido denominado como la sexta extinción en masa del planeta, debido a su magnitud y a la velocidad con la que se produce (Ceballos et al. 2015). En este contexto resulta necesario delimitar los factores de amenaza más importantes y esclarecer sus efectos sobre la biodiversidad, con el fin de desarrollar planes de conservación efectivos que maximicen los escasos recursos disponibles para ello. A parte de las razones éticas que nos impiden ser responsables de esta pérdida, la biodiversidad es responsable de numerosos servicios ecosistémicos necesarios para continuar con nuestros procesos vitales, tales como el mantenimiento de la calidad del aire y del agua o la producción de alimentos (Worm et al. 2006, Nelson et al. 2009). Además, en la situación actual de cambio global, la preservación de la biodiversidad supone un abanico de respuestas ante la incertidumbre de la configuración de los escenarios futuros, que garantizan el cumplimiento de la función ecológica (Hooper et al. 2015).

La principal causa de pérdida de biodiversidad es la destrucción y fragmentación de hábitats (Hanski 1998, Fahrig 2003, IUCN 2015). Ambos procesos tienen un origen antrópico y suelen producirse simultáneamente, sin embargo analizar sus efectos por separado resulta complejo (Harrison & Bruna 1999, Fahrig 2003) y su estudio requiere el planteamiento de diseños experimentales específicos. La **pérdida de hábitat** es la simple reducción de la cantidad de lugares habitables para una parte concreta de la biodiversidad, e implica la desaparición de especies y/o biodiversidad en general (Bascompte & Rodríguez 2001), que puede aparecer con un desfase temporal conocido como deuda de extinción (Tilman et al. 1994). Las poblaciones resultantes en el hábitat remanente ven reducidos sus tamaños poblacionales, lo que puede derivar en su desaparición por fenómenos de estocasticidad ambiental o

empobrecimiento genético (Saunders et al. 1991). Asimismo, la distancia entre poblaciones aumenta, y ese aislamiento disminuye el flujo genético y la probabilidad de recolonización (Hanski 1998) (Fig. 1).

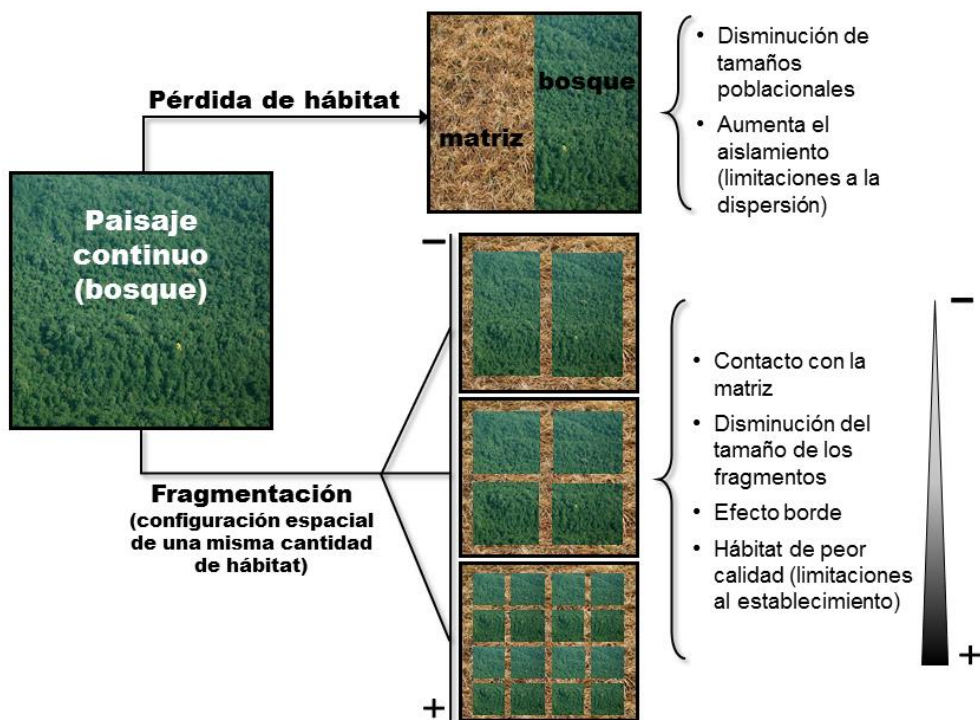


Figura 1 Modelo conceptual de la modificación del paisaje por medio de los procesos de pérdida de hábitat y fragmentación. En este caso se representan de forma separada ambos procesos, aunque en la mayoría de los casos reales acontecen de forma conjunta. Se especifican las consecuencias que son más importantes en cada proceso, aunque algunas de ellas también podrían aparecer en ambos. En el caso de la fragmentación también se representa el incremento de intensidad de las consecuencias en función del grado de fragmentación.

La **fragmentación**, a diferencia de la pérdida de hábitat, es un proceso más complejo, sin conclusiones tan claras y contundentes sobre sus efectos en la biodiversidad (Fahrig 2003), debido al mayor número de factores que intervienen. La fragmentación *per se*, concepto independiente a la pérdida de hábitat, comprende

(para una misma cantidad de hábitat) simplemente el grado de subdivisión en fragmentos más pequeños del hábitat remanente. Un paisaje más fragmentado implica una reducción del tamaño de los fragmentos de hábitat, mayor efecto borde y mayor contacto del hábitat remanente con la matriz circundante (Fig. 1).

El **tamaño del fragmento** fue originalmente postulado como un buen predictor de la riqueza de especies (MacArthur & Wilson 1967), y esta idea a día de hoy se mantiene (Bender et al. 1998, Rybicki & Hanski 2013). Una razón puede ser simplemente por puro azar, ya que una muestra más grande contendrá más elementos diferentes de entre todos los posibles (Coleman 1981). Por otro lado, siguiendo la dinámica metapoblacional, un fragmento de hábitat más grande contendrá poblaciones con mayor número de individuos, y de este modo su probabilidad de extinción se verá reducida (Hanski 1999). También ha sido demostrado que superficies mayores contienen una mayor diversidad de hábitats o heterogeneidad ambiental (Gignac & Dale 2005), y esto redundará positivamente en el número de especies (Lõhmus et al. 2007). Otra posible explicación se basa en la existencia de una zona central en el fragmento (*core area*) con condiciones microclimáticas muy diferentes a las del borde (Saunders et al. 1991). Como consecuencia, fragmentos más grandes permitirán la existencia de una mayor *core area*, y albergarán mayor diversidad de especies propias de un estado del paisaje previo a la alteración.

La **forma** es otro atributo de los fragmentos de hábitat que ha sido considerado en este tipo de estudios. Los fragmentos más irregulares exponen una mayor cantidad de su superficie al exterior, por lo que experimentan una mayor incidencia de las condiciones del borde, e interactúan en mayor medida con la matriz circundante (Yamaura et al. 2008). Por otro lado, la irregularidad, al crear mayor cantidad de borde, también es posible que confiera una superficie mayor que podría favorecer la llegada de más propágulos o individuos migrantes (Lomolino 1990). Se han demostrado efectos tanto positivos (Honnay et al. 1999) como negativos (Ewers & Didham 2007, Cabrera-Guzmán & Reynoso 2012) de la irregularidad de los

fragmentos sobre la biodiversidad, por tanto, la respuesta parece variar en función del tipo de paisaje o el grupo de organismos estudiado (Ewers & Didham 2007, Yamaura et al 2008).

En los fragmentos de hábitat, principalmente en bosques, se ha documentado ampliamente un cambio más o menos intenso y gradual en las condiciones microclimáticas en relación con la proximidad al borde (*edge effect*) (Bergès et al. 2013). En el borde, el viento sopla más rápido, disminuye la humedad, aumenta la oscilación térmica y la insolación puede ser mayor dependiendo de la orientación (Saunders et al. 1991, Murcia 1995). Este cambio supone una merma de la calidad del hábitat hacia el margen del fragmento para las especies que necesitan las condiciones de sombra, humedad y mayor estabilidad que proporciona un sistema forestal. El efecto de borde puede penetrar hacia el interior del bosque desde unos pocos metros hasta varias centenas en función de numerosos factores (Reino et al. 2009), pero resulta evidente que, si el fragmento es muy pequeño, las condiciones de borde pueden alcanzarlo en su totalidad impidiendo la existencia del *core area*.

Las condiciones bióticas y abióticas del fragmento pueden verse altamente moduladas por la estructura de la **matriz** que le rodea. La matriz puede influir sobre los fragmentos de hábitat de tres maneras (Driscoll et al. 2013): modulando la dispersión, modificando el entorno abiótico del borde y proporcionando recursos a los organismos del hábitat original. Por ejemplo, una matriz agrícola, pero estructuralmente similar a la vegetación nativa, puede ser utilizada por primates para desplazarse y obtener alimento (Anderson et al. 2007). Igualmente, una plantación de pinos exóticos en torno a parches de bosque nativo, puede mitigar el efecto borde y servir de hogar para un considerable número de epífitos forestales (Pharo & Lindenmayer 2009). En una revisión reciente, Prevedello & Vieira (2010) se preguntaron si el tipo de matriz tiene importancia sobre la biodiversidad en paisajes fragmentados, y concluyeron que de forma general, cuanto más similar fuese la estructura de la vegetación de la matriz a la del fragmento, mayores serían los

beneficios sobre la biodiversidad. De este modo resulta muy importante tener en cuenta si la matriz se compone de vegetación o no, de que tipo es y su fisonomía, y analizar de qué forma puede influir sobre los organismos objeto de estudio, para planificar adecuadamente estudios sobre fragmentación y pérdida de hábitat.

La mayoría de estudios sobre fragmentación y pérdida de hábitat han sido enfocados hacia la toma de datos en un momento puntual, sin tener en cuenta la **dinámica espacio-temporal** de la estructura del paisaje ni de las especies que lo habitan. Esto no quiere decir que una imagen instantánea a una escala muy concreta no sea útil ni valiosa, pero una aproximación a diferentes escalas espaciales y que incorpore datos de series históricas proporciona una visión más acertada de la realidad (Ewers & Didham 2006), aunque esto no siempre es posible debido a la falta de recursos, tiempo o datos. En primer lugar, la presencia de una especie en un determinado lugar es afectada por múltiples factores que operan a distintas escalas, desde factores históricos, biogeográficos o evolutivos hasta las condiciones microclimáticas inmediatas que rodean al organismo (Ellis 2012). Poniendo el foco sobre la estructura y la calidad del paisaje, resulta interesante preguntarse qué parte de responsabilidad tienen los cambios que se producen a diferentes escalas espaciales y con qué intensidad son percibidos por las especies. En cuanto a la escala temporal, algunos estudios muy originales han sido capaces de demostrar que los patrones de riqueza observados en la actualidad a lo largo de paisajes fragmentados, respondían mejor a configuraciones y composiciones pretéritas del hábitat que a las encontradas en el momento actual (Lindborg & Eriksson 2004, Helm et al. 2006, Ellis & Coppins 2007). Por tanto, la no obtención de respuestas ante un análisis de la estructura actual del paisaje, no siempre demuestra que esa interacción no exista, sino que las especies precisan de un intervalo temporal determinado para responder a los cambios (Tilman et al. 1994). Esto resulta más evidente en especies con ciclos vitales lentos o con capacidad de vivir muchos años (Adriaens et al. 2006).

Todas las características del paisaje citadas hasta aquí han demostrado ser responsables de la estructuración de la biodiversidad en hábitats fragmentados, y para ello han de influir en al menos una de todas las etapas de la vida de los organismos. Para un organismo sésil, que carece de la capacidad de desplazarse por el paisaje, la **dispersión** representa una fase crucial en su ciclo vital (Nathan & Muller-Landau 2000). En este caso la dispersión implica el desplazamiento en forma de propágulo, ya sea en forma de semilla, espora o propágulo vegetativo, que depende de factores externos al individuo para alcanzar nuevos hábitats, como son el viento, el agua o los animales (Nathan 2006). En un paisaje fragmentado las distancias a superar entre los fragmentos de hábitat son más grandes, por lo que es posible que surjan limitaciones a la presencia de las especies causadas por problemas dispersivos (Herben & Söderström 1992). Una vez que el propágulo es dispersado, este ha de **establecerse**, y para ello necesita unas condiciones ambientales adecuadas. Como ya se ha mencionado previamente, un paisaje fragmentado experimenta alteraciones de su calidad ambiental, y como consecuencia, especies que necesitan las condiciones de continuidad y estabilidad que les proporcionan paisajes no alterados, pueden sufrir limitaciones al establecimiento. Así, diversos estudios científicos se cuestionan si la causa de la ausencia de especies concretas en lugares determinados, puede deberse a limitaciones a la dispersión o al establecimiento (Ackerman et al. 1996, Sillett et al. 2000, Benner & Vitousek 2007, Valdés & García 2009, Giordani et al. 2015). Una resolución adecuada de esta cuestión puede suponer una solución eficaz para el diseño de planes de manejo del paisaje, que contribuyan a mitigar los efectos negativos que la pérdida y fragmentación de hábitat tiene sobre la biodiversidad.

Los organismos epífitos: líquenes y briófitos

Los líquenes son organismos simbióticos, que tradicionalmente han sido descritos como una asociación formada exclusivamente por un hongo (micobionte) y uno o dos organismos fotosintéticos (fotobionte), que pueden ser un alga verde y/o una cianobacteria. Sin embargo, descubrimientos recientes han demostrado que otras

formas de vida como bacterias (Aschenbrenner et al. 2016), levaduras (Spribille et al. 2016) u otros hongos (Millanes et al. 2016) también pueden formar parte de este metaorganismo complejo.

La mayoría de estudios ecológicos y de conservación han sido llevados a cabo con grupos de organismos más conspicuos tales como animales o plantas (Prevedello & Vieira 2010, Medina et al. 2014). Sin embargo, los líquenes son un componente muy importante de la biodiversidad, llegando a cubrir aproximadamente el 8% de la superficie terrestre (Nash 2008) y dominando aquellos ecosistemas que son muy fríos, secos o pobres en nutrientes como para permitir el desarrollo de comunidades vegetales (Asplund & Wardle 2016). Desempeñan funciones necesarias para la correcta actividad de los ecosistemas tales como fijar el suelo y evitar su erosión (Mottershead & Lucas 2000), regular el intercambio de nutrientes entre el suelo y la vegetación (Concostrina-Zubiri et al. 2013), y además son responsables de estructurar comunidades vegetales condicionando la germinación de muchas especies (Escudero et al. 2007). En sistemas forestales maduros y bien conservados, los líquenes acumulan elevadas proporciones de la biomasa total que compone el ecosistema (Ellis 2012), llegando a suponer hasta el 50% de la entrada de nitrógeno (Denison 1973), gracias a las especies que poseen cianobacteria como fotobionte que son capaces de fijar N_2 atmosférico. Además, los talos liquénicos sirven de refugio y alimentación a numerosos grupos de invertebrados (Gerson & Seaward 1977).

Los organismos epífitos (líquenes y briófitos) dependen del sustrato que le proporcionan los árboles para establecerse y completar su ciclo de vida. La imposibilidad de crecer en otro tipo de sustrato implica que estas comunidades están fuertemente ligadas a los bosques y les convierte en un grupo idóneo para conocer los efectos de la pérdida y fragmentación de hábitat. Además, los epífitos dependen intensamente de las condiciones ambientales del entorno inmediato en el que se desarrollan y su valencia ecológica suele ser muy estrecha. Esto se debe a que son organismos poiquilohídricos (carecen de complejos sistemas de regulación hídrica)

(Larson 1979) y poiquiloterms (no son capaces de regular la temperatura corporal), y su principal fuente de adquisición de nutrientes es la atmósfera (Nash 2008). Además, el hábitat de los líquenes con cianobacteria como fotobionte (cianolíquenes) es aún más restringido, ya que la humedad atmosférica no es suficiente para realizar la fotosíntesis y precisan agua líquida en sus tejidos para llevarla a cabo (Lange et al. 1986). Por todos estos motivos los organismos epífitos son altamente sensibles a pequeños cambios ambientales y reflejan las alteraciones que se producen en los bosques (Lesica et al. 1991, Johansson 2008, Aragón et al 2010).

Existen numerosos estudios interesantes sobre la relación de los organismos epífitos con la pérdida y fragmentación de los bosques, que demuestran que éstos se relacionan estrechamente con la estructura del paisaje y muestran una amplia diversidad de respuestas (Pharo & Zartman 2007, Johansson 2008). Se ha demostrado que fragmentos de bosque más grandes albergan un número significativamente mayor de especies (Kruys & Jonsson 1997, Zartman 2003, Gignac & Dale 2005, Oliveira et al. 2011, Cardós et al. 2016). Asimismo, ha sido confirmado que los organismos epífitos son sensibles a la composición de la matriz, ya que por ejemplo la dispersión se ve limitada si los fragmentos de bosque nativo están rodeados por plantaciones de pinos (Johansson and Ehrlén 2003, Belinchón et al. 2009), a pesar del posible beneficio de mitigación del efecto borde que una matriz boscosa pudiese aportar (Aragón et al. 2015). Los líquenes y briófitos también responden a distintos niveles al efecto del borde que produce cambios microclimáticos en el margen de los bosques (Esseen & Renhorn 1998, Kivistö & Kuusinen 2000, Coxson & Stevenson 2007). Sin embargo, estudios en la región mediterránea muestran que generalmente la comunidad no responde con una disminución en la riqueza, sino que se produce un recambio de especies dependiente de la distancia al borde (Belinchón et al. 2007, Brunialti et al. 2013) y de la orientación del borde (Aragón et al. 2015). La escala espacial también es un factor a tener cuenta, porque las comunidades de epífitos reciben la influencia del ambiente desde distintos niveles (Ellis 2012, Medina et al. 2014). En este sentido, algo muy interesante que aún debe ser explorado, es con que intensidad y a qué

velocidad perciben la variabilidad ambiental estructurada a distintas escalas, ya que existe poca evidencia al respecto. Como se ha mencionado anteriormente, los organismos epífitos responden a los cambios en la estructura del paisaje por motivos ambientales, pero lo hacen con lentitud (Ellis & Coppins 2007, Löbel et al. 2009, Ruete et al. 2014), puesto que son organismos que pueden vivir varias décadas (McCarthy 2003) y además suelen mostrar una capacidad dispersiva limitada (Sillett et al. 2000, Walser 2004, Öckinger et al. 2005; Giordani et al. 2015). Muchas veces dependen de excepcionales eventos dispersivos a larga distancia para colonizar nuevos hábitats (Muñoz et al. 2004, Lönnell et al. 2014, Barbé et al. 2016).

La reproducción tiene muchas implicaciones en el modo en el que los organismos epífitos se relacionan con un paisaje fragmentado. Tanto los briófitos como los líquenes pueden reproducirse de forma sexual o asexual, pudiendo aparecer ambos tipos de reproducción tanto en especies diferentes como sobre el talo de un mismo individuo. Cada tipo de reproducción tiene unas características diferentes que proporciona a cada especie unas ventajas e inconvenientes para vivir en hábitats fragmentados (Löbel & Rydin 2010). La reproducción sexual se lleva a cabo por medio de esporas (Scheidegger & Werth 2009). Su reducido tamaño le permite dispersarse a largas distancias, lo que supone una gran ventaja para superar condiciones de aislamiento (Ruete et al. 2014). Sin embargo, su reducido tamaño implica que la cantidad de recursos para utilizar en las etapas iniciales de la germinación sea más baja, por lo que el rango de condiciones ambientales necesario para establecerse será más estrecho (Wiklund & Rydin 2004). Además, la espora líquénica solo dispersa al micobionte por lo que está obligada a encontrar a un fotobionte compatible para establecerse como un nuevo individuo (Rikkinen et al. 2002). El proceso de restablecimiento de la simbiosis puede llegar a condicionar enormemente el éxito del establecimiento por la ausencia de fotobiontes compatibles (Belinchón et al. 2015). Por otro lado, la reproducción asexual en líquenes consiste en la producción de propágulos vegetativos que dispersan tanto al micobionte como al fotobionte. Estos pueden ser de distintas formas y tamaños, pero su tamaño es muy

superior al de las esporas. Por tanto, su capacidad dispersiva está más limitada, pero la probabilidad de establecimiento aumenta considerablemente al no requerir reestablecer la simbiosis (Löbel & Rydin 2010).

Tratar de descubrir el papel que tiene la dispersión o el establecimiento en limitar la presencia de una especie en un paisaje fragmentado supone un reto para la ecología actualmente, y su resolución puede ayudar a desarrollar medidas de manejo eficaces para la conservación de especies con áreas de distribución reducidas (Scheidegger & Werth 2009). Por ejemplo, se pueden desarrollar modelos de hábitat que nos permitan conocer el área de distribución potencial de una especie. Posteriormente, verificando si la especie ya ocupa o no su hábitat potencial, se puede inferir si sufre limitaciones a la dispersión, o si su ausencia de determinadas zonas se debe a la baja calidad del hábitat que dificulta su establecimiento (Verbyla & Litvaitis, 1989). Otra aproximación interesante consiste en determinar la diversidad genética de los fotobiontes con los que establecen la simbiosis las especies de líquenes con reproducción sexual. Al mismo tiempo, si se analiza genéticamente la disponibilidad de fotobiontes compatibles que tengan la capacidad potencial de unirse a una espora y producir la reliquenización, se pueden extraer conclusiones sobre como de limitante puede ser este proceso. En este sentido, se ha propuesto la existencia de gremios de especies liquénicas mediados por el fotobionte (Rikkinen et al 2002). En el estudio de Rikkinen et al. (2002) se demuestra la existencia de dos gremios bien diferenciados, que consisten en grupos cerrados de especies sin relación filogenética, que se establecen en simbiosis con un conjunto común de cianobiontes relacionados filogenéticamente (*Nostoc*). Dentro de cada gremio, a las especies con capacidad de reproducirse asexualmente se las denomina especies centrales (*core species*), puesto que dispersan al fotobionte en sus propágulos, mientras que las especies sexuales son nombradas como periféricas (*fringe species*). En base a esto, las especies centrales estarían poniendo a disposición de las periféricas numerosos fotobiontes compatibles que, de otra manera, al dispersarse en lugares no adecuados, no podrían establecerse y se perderían, lo que constituiría un caso de facilitación entre líquenes. Igualmente,

es posible que las especies periféricas sean suficientemente agresivas como para sustraer el fotobionte de los propágulos dispersados, y en este caso el fenómeno de facilitación no sería tan evidente.

El bosque mediterráneo

Los ecosistemas que rodean al mar Mediterráneo, comprendidos en el sur de Europa y el norte de África, albergan una gran biodiversidad y un elevado número de especies endémicas por razones biogeográficas, climáticas e históricas, en comparación con otras regiones o biomas terrestres. Sirva como ejemplo el caso de las plantas, ya que al ser un grupo muy estudiado se sabe que en la región mediterránea coexisten unas 25000 especies (un 10% de todas las especies conocidas), de las que aproximadamente un 60% solo pueden ser encontradas en la región mediterránea (Sundseth 2010).

La región mediterránea fue una de las primeras en ser poblada por el ser humano, y ha sido testigo del nacimiento y desaparición de numerosas civilizaciones (Blondel 2006). Por este motivo sus paisajes han sufrido intensas modificaciones durante un extenso periodo de tiempo, que continúa en la actualidad. Sus bosques tienen una larga historia de manejo, destrucción y fragmentación, ya que tradicionalmente han proporcionado abundantes recursos para múltiples propósitos (Thirgood 1981). Todo esto ha conducido al paisaje forestal fragmentado que observamos hoy en día, muchas veces completamente sustituido por sistemas agrícolas (Blondel & Aronson 1999) o plantaciones de coníferas (Mesa 2002). La destrucción y la fragmentación del hábitat forestal es uno de los principales factores de amenaza para los organismos epífitos de la Península Ibérica (Martínez et al. 2003). Además, los efectos del cambio climático ya son claramente visibles (Walther et al. 2002), y los modelos sobre el estado futuro del clima en esta región predicen fuertes incrementos de temperatura, disminución de las precipitaciones y un aumento de estocasticidad climática superior a otras regiones (Giorgi & Lionello 2008), con efectos claramente negativos sobre la biodiversidad (Sala et al. 2000). Todo esto

convierte al bosque mediterráneo en un hábitat apropiado para el estudio de los organismos epífitos y su relación con un paisaje altamente modificado, y las respuestas obtenidas pueden ser aplicadas de forma inmediata para la conservación de una parte muy importante de la diversidad que albergan.

En la región mediterránea ha existido un interés menor por el estudio de los organismos epífitos y su ecología, si lo comparamos con el norte de Europa, donde tradicionalmente ha habido más grupos de trabajo dedicados a su estudio. Por tanto, la mayoría de trabajos que muestran la relación de especies y comunidades epífitas con el ambiente han sido llevados a cabo en bosques de regiones templadas o boreales (Larson 1979, Lesica et al. 1991, Kruys & Jonsson 1997, Esseén & Renhorn 1998, Kivistö & Kuusinen 2000, Johansson & Ehrlén 2003, Gignac & Dale 2005, Öckinger et al. 2005, Coxson & Stevenson 2007, Ellis & Coppins 2007, Löhmus et al. 2007, Johansson 2008, Löbel et al. 2009, Ellis 2012, Ruete et al. 2014). Sin embargo, el clima de la región mediterránea es diferente, con inviernos más suaves, menor precipitación y un largo periodo de sequía estival. Por tanto, sigue siendo necesario llevar a cabo estudios en la región mediterránea ya que, a parte de las diferencias climáticas con Europa del norte, aquí la luz no es tan limitante y si lo es la humedad (Valladares et al. 2004). Esto puede traducirse en la obtención de resultados con diferentes matices en el funcionamiento de las especies. Por ejemplo, la fragmentación o el aclarado de un bosque, que supone un incremento en la cantidad de luz que llega al interior del mismo, puede tener efectos positivos sobre especies de cianolíquenes epífitos en el norte de Europa (Hazell & Gustafsson 1999, Hedenäs & Hedström 2007). Mientras, en la región mediterránea, el aumento de la entrada de luz asociada a un manejo forestal intenso, tiene efectos negativos sobre las mismas especies (Aragón et al. 2010).

OBJETIVOS Y ESTRUCTURA DE LA TESIS

El objetivo general de la tesis consiste en determinar el efecto de la pérdida y fragmentación de hábitat sobre la diversidad de epífitos en bosques mediterráneos, intentando separar la influencia de ambos efectos. También nos preguntamos qué variables de un paisaje fragmentado permiten predecir los patrones de riqueza y diversidad de las comunidades epífitas, y la presencia y la abundancia de las diferentes especies, a distintas escalas espacio-temporales. Por otro lado, queremos concretar cuál es la influencia de estos mismos procesos sobre la dispersión y el establecimiento de un líquen amenazado, dos fases críticas en el ciclo vital de cualquier especie. La intención última de este trabajo es desentrañar el funcionamiento ecológico de los organismos epífitos en relación con un paisaje alterado y dinámico, para que todo el conocimiento generado pueda ser aplicado en el desarrollo de planes de manejo efectivo para la conservación de líquenes y briófitos típicos del bosque mediterráneo.

De forma más concreta, para alcanzar los objetivos generales propuestos, se abordan los siguientes objetivos específicos a lo largo de los cuatro capítulos:

- **Capítulo 1:** Se analizan los efectos del tamaño y forma del fragmento, el tipo de matriz circundante y las variables ambientales relacionadas con la calidad del hábitat, sobre la riqueza, diversidad, y similitud de las comunidades epífitas. También se evalúa el efecto de las mismas variables sobre las especies más representativas de la comunidad, para tratar de identificar aquellas especies que son más sensibles a estos procesos fragmentación y pérdida de calidad del hábitat.
- **Capítulo 2:** Se estudia cómo y cuánto influye la estructura histórica del paisaje sobre la riqueza de especies epífitas que pueden ser encontradas en un fragmento de bosque, y se compara su importancia relativa respecto a la estructura actual. La influencia de la estructura del paisaje es abordada desde tres aproximaciones diferentes, y se analiza su efecto a través de la cantidad total de hábitat, el grado

de fragmentación y la conectividad. Además de la escala temporal, se compara la importancia de los efectos de la estructura del paisaje sobre la comunidad a distintas escalas espaciales: el paisaje inmediato que rodea al fragmento, el propio fragmento y el interior del fragmento. Con toda la información obtenida se pretende crear un modelo final con todas las variables analizadas que resulten importantes a todas las escalas espacio-temporales, para explicar de la forma más fiable los patrones de riqueza de epífitos observados en la actualidad.

- **Capítulo 3:** Se examinan las causas de la distribución tan reducida y dispersa de *Pectenía plumbea* en el centro de la Península Ibérica, donde ha sido catalogada como vulnerable. Tratamos de resolver si sufre limitaciones a la dispersión, es decir, si sus esporas llegan o no a nuevos hábitats, o bien limitaciones al establecimiento, lo que supondría que sus esporas llegan a otros hábitats pero no son capaces de prosperar en ellos debido a limitaciones ambientales. Asimismo, analizamos el efecto del clima, la topografía y la estructura del paisaje sobre la abundancia de los diferentes estados reproductivos de la especie, para ver en qué medida puede modular su limitada presencia a lo largo del paisaje.
- **Capítulo 4:** En relación a la fase de establecimiento de *P. plumbea*, se evalúan la tasa de germinación de las esporas y la capacidad del fotobionte (*Nostoc*) para crecer y reproducirse en un estado de vida aposimbótico (vida libre), para comprender en qué medida puede encontrarse disponible para ser reliquenizado por las esporas. También se analiza la diversidad genética del fotobionte de *Pectenía plumbea* en distintos lugares de la Península Ibérica para valorar en qué grado puede asociarse con distintos linajes de *Nostoc*. Por último, se escoge una comunidad concreta de cianolíquenes, en la que se encuentra *P. plumbea*, para estudiar la diversidad genética de fotobiontes (*Nostoc*) que alberga cada especie y de la comunidad de cianobacterias de vida libre, con el fin de compararlas y dilucidar donde se encuentra la fuente más significativa de fotobiontes compatibles de *P. plumbea*.

METODOLOGÍA GENERAL

En esta sección se procede a describir la metodología general empleada en la tesis doctoral. Sin embargo, cada uno de los capítulos de los que consta este documento contiene una metodología más detallada, con referencias concretas, para comprender en profundidad como se ha llevado a cabo cada uno de los estudios.

Área de estudio

Casi la práctica totalidad del trabajo de campo ha sido llevado a cabo en el Parque Nacional de Cabañeros (PNC) y su entorno, localizado en la región mediterránea entre las provincias de Toledo y Ciudad Real, en el centro de la Península Ibérica (Fig. 2). La única excepción es la inclusión en el **capítulo 4** de cuatro poblaciones de *Pecten* *plumbea* del noroeste peninsular (Asturias) y dos del sureste (Albacete y Ciudad Real), adicionalmente a 3 poblaciones del PNC. Los detalles relativos a la localización de cada área de estudio son descritos en cada capítulo, donde se incluyen las coordenadas y su representación espacial en una figura.

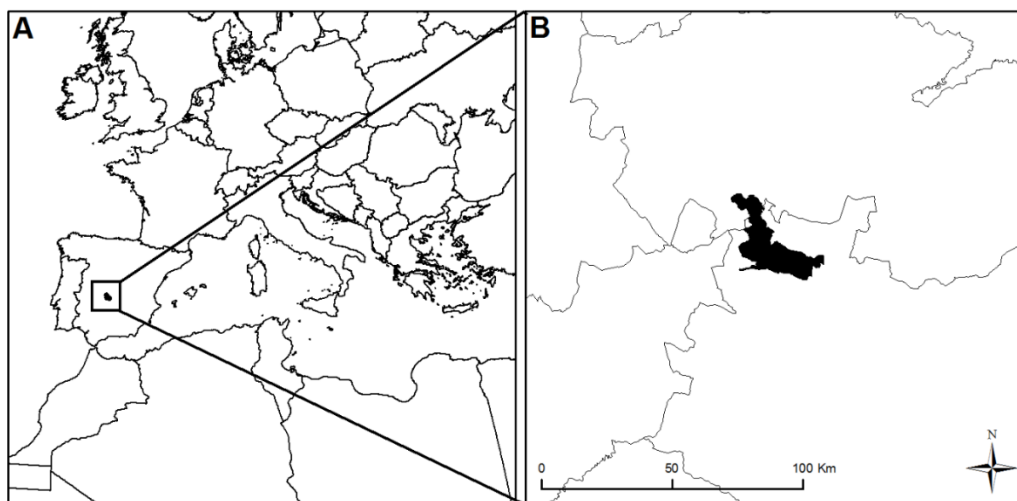


Figura 2 Situación del Parque Nacional de Cabañeros en A) el suroeste de Europa y B) en el centro de la Península Ibérica entre las provincias de Toledo (al N) y Ciudad Real (al S).

El PNC es una zona de media montaña, con alturas comprendidas entre los ~600 m s. n. m. y los 1448 m que alcanza en el Rocigalgo su punto más alto. El clima es mediterráneo continental subhúmedo, con una temperatura media anual de 13,2°C y una precipitación anual de 716 mm (AEMET 2011). En las zonas seleccionadas para desarrollar los **capítulos 1, 2 y 3**, el paisaje está formado por fragmentos de bosques bien conservados, ubicados principalmente en las laderas más inaccesibles y/o improductivas (Fig. 3). Este bosque nativo fragmentado se encuentra rodeado por una matriz compuesta por diferentes unidades del paisaje que ha experimentado distintos grados de intervención para el aprovechamiento humano: pedreras, cultivos, pastos, matorral, dehesas u bosques con baja cobertura arbórea y plantaciones de pinos (Fig. 3).

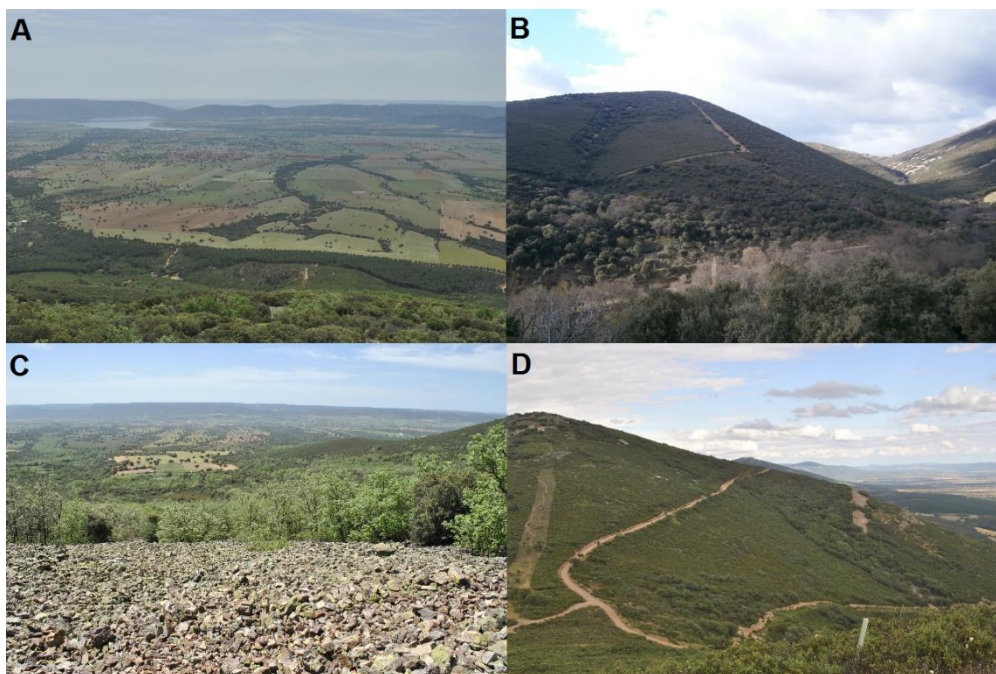


Figura 3 Ejemplos del paisaje fragmentado en el Parque Nacional de Cabañeros y su entorno. A) Vista general de uno de los valles estudiados (**capítulos 1 y 2**), con fragmentos de encinar rodeados por cultivos y plantaciones de pinos; B) Fragmentos de encinar en lugares de difícil acceso embebidos en una matriz principalmente arbustiva (**capítulos 1 y 2**); C) Bosque de melojo (*Quercus pyrenaica*) fragmentado de forma natural por una ladera de piedras (**capítulo 2**), con vista general del valle al fondo; y D) Zona de acceso a uno de los valles muestreados en el **capítulo 3**, donde se aprecia una parte del bosque nativo fragmentado.

En el **capítulo 4** seleccionamos un total de nueve poblaciones de *P. plumbea* ubicadas en distintos puntos de la Península Ibérica con el fin de conocer la diversidad genética de fotobiontes con los que se establece en simbiosis a lo largo de la región. A parte de las seis poblaciones mencionadas al inicio de esta sección, también se incluyen tres poblaciones localizadas dentro del PNC, que además son empleadas en otros experimentos y estudios observacionales desarrollados en este capítulo. La localización de las poblaciones estudiadas se puede consultar en el **capítulo 4** (Tabla S1 y Fig. S1).

Especies objeto de estudio

En los **capítulos 1 y 2** se tiene en cuenta toda la comunidad de líquenes y briófitos epífitos que aparecen en la superficie de los troncos de encina (*Quercus ilex* subsp. *ballota* (Desf.) Samp.) muestreados (Fig. 4A1 y 4A2). Las comunidades de epífitos de bosques mediterráneos son susceptibles de percibir perfectamente el paisaje binario de bosque-matriz, porque muchas de las especies no pueden vivir fuera del hábitat de bosque maduro bien conservado. Ya ha sido constatado que en aquellos sistemas forestales que experimentan algún régimen de manejo, la estructura del bosque experimenta modificaciones. Este hecho implica que la composición de la comunidad de epífitos cambie enormemente (Burgaz et al. 1994, Belinchón et al. 2007, Aragón et al. 2010, Matos et al. 2015), aunque algunas especies sean compartidas o puedan aparecer de forma puntual en distintos tipos de sistemas (e. g. dehesas). Por tanto, asumimos que la comunidad se encuentra aislada en fragmentos maduros y sin manejo, aunque la matriz contenga alguna formación boscosa con baja densidad de árboles. Adicionalmente, en el **capítulo 1** seleccionamos 40 especies que consideramos representativas de la comunidad, para conocer cómo responden de forma individualizada a la fragmentación y pérdida de hábitat. Solo pudimos escoger entre las especies que mostraron valores de presencia y abundancia suficientes para ser modeladas, y excluimos de este análisis algunas especies que muestran preferencia por ambientes antropizados.

En el **capítulo 3 y 4** la especie objeto de estudio fue el líquen *Pectenia plumbea* (Lightf.) P. M. Jørg., L. Lindblom, M. Wedin & S. Ekman. Presenta un talo grisáceo placodioides generalmente circular que crece muy próximo al sustrato, aunque puede ser desprendido con facilidad. Puede reproducirse sexualmente mediante pequeñas esporas [(18)-20-22-(25) × 6-10 μm (Carballal et al. 2007)] producidas en los apotecios rojizos (Fig. 4B1), o bien asexualmente con isidios (Fig. 4B2), apareciendo en muy raras ocasiones ambos tipos de reproducción sobre el mismo talo. (imagen de un talo juvenil sin estructuras reproductoras en Fig. 4B3). Anteriormente, esta especie estaba dividida en dos taxones diferentes en función del modo de reproducción (*Degelia plumbea* con apotecios y *Degelia atlantica* con isidios), sin embargo, tras un análisis genético exhaustivo (Otálora et al. 2016) se demostró que ambos estados reproductivos pertenecen a la misma especie. En el área de estudio abundan los talos con apotecios, y de forma más ocasional pueden ser encontrados ejemplares con isidios.

P. plumbea muestra una distribución más o menos continua a lo largo de la costa atlántica de Europa, mientras que en el centro del continente sus poblaciones se están viendo mermadas o han desaparecido drásticamente a causa de la contaminación atmosférica (COSEWIC 2010). Al sur del continente, en la costa norte del Mediterráneo, existen aún algunas poblaciones, pero están muy fragmentadas y aisladas unas de otras (COSEWIC 2010, Martínez et al. 2014). La especie también aparece en parte de la Macaronesia y puntualmente en el norte de Marruecos y la costa este de Canadá y EE.UU. (COSEWIC 2010). En el centro de la Península Ibérica, región que comprende el área de estudio, *P. plumbea* ha sido catalogada como vulnerable, principalmente a causa de la pérdida de hábitat y fragmentación (Martínez et al. 2003). Además, las poblaciones de esta zona cuentan con pocos individuos (entre 2 y 413) (Martínez et al. 2014) y su diversidad genética es baja (Otálora et al. 2013). Esta especie es un cianolíquen, con *Nostoc* como fotobionte, y esta condición implica que requieren la presencia de agua líquida en sus tejidos para poder llevar a cabo la fotosíntesis (Lange et al. 1986). Además, un exceso de radiación solar afecta



Figura 4. Comunidades y especies objeto de estudio a lo largo de los cuatro capítulos que componen la tesis doctoral. A1) y A2) Ejemplos de la comunidad de líquenes y briófitos epífitos sobre tronco de encina (**capítulos 1 y 2**). B) Talos de *Pectenium plumbeum* (**capítulos 3 y 4**) con B1) apotecios o B2) isidios, y B3) talo juvenil sin estructuras reproductoras. C1) Muestra de la comunidad de cianobacterias de vida libre creciendo en el laboratorio (**capítulo 4**), y C2) – C5): *Nephroma laevigatum* Ach., *Fuscopannaria mediterranea* (Tav.) P.M. Jørg., *Collema furfuraceum* (Arnold) Du Rietz y *Dendrocaulon umhausense* (Auersw.) Degel. (especies que conforman la comunidad de cianolíquenes analizada en el **capítulo 4**).

de forma muy negativa a la retención de agua en el talo y puede dañar sus tejidos (Gauslaa & Solhaug 1998). Por tanto, estas condiciones de elevada humedad y escasa radiación solar tan concretas que *P. plumbea* necesita, solo pueden ser proporcionadas en la región mediterránea por bosques maduros y bien conservados (Martínez et al. 2014).

Adicionalmente, en el **capítulo 4**, para revelar la disponibilidad de fotobiontes compatibles, y su posible relación con limitaciones al establecimiento de *P. plumbea*, analizamos la diversidad genética de fotobiontes que alberga la especie. Asimismo, incluimos en el estudio la comunidad de cianobacterias epífitas de vida libre, que coexisten junto a una de las poblaciones de *P. plumbea* dentro del PNC, que está compuesta por un gran número y diversidad de colonias (Fig. 4C1). Sin embargo, solo tuvimos para análisis genético las del género *Nostoc*, puesto que son las únicas que pueden ser potencialmente reliquenizadas por *P. plumbea*. En la misma localidad que analizamos la diversidad de cianobacterias, también estudiamos la diversidad genética de los fotobiontes de todos los cianolíquenes que forman la comunidad. En total cuatro especies (Fig. 4C2-4C5) a parte de *P. plumbea*.

Diseño experimental y toma de datos

En los **capítulos 1 y 2** se seleccionaron 40 fragmentos de encinar maduro en el PNC y su entorno, con elevada cobertura arbórea (> 70%) y en buen estado de conservación (Fig. 5A1 y 5A2), ya que están sometidos a un régimen de manejo muy escaso o nulo. Dentro de cada fragmento se ubicaron aleatoriamente entre 4 y 8 parcelas de 10×10 m en función del tamaño del fragmento. Para conocer el número necesario de parcelas para obtener al menos el 90% de especies de cada fragmento, se realizó una curva especies-área con datos de riqueza de especies, obtenidos en muestreos anteriores en los bosques más diversos de la zona de estudio. Dentro de cada parcela se escogieron cuatro encinas con valores intermedios de diámetro del tronco a la altura del pecho (dbh). Se trató de minimizar la disparidad del dbh de los

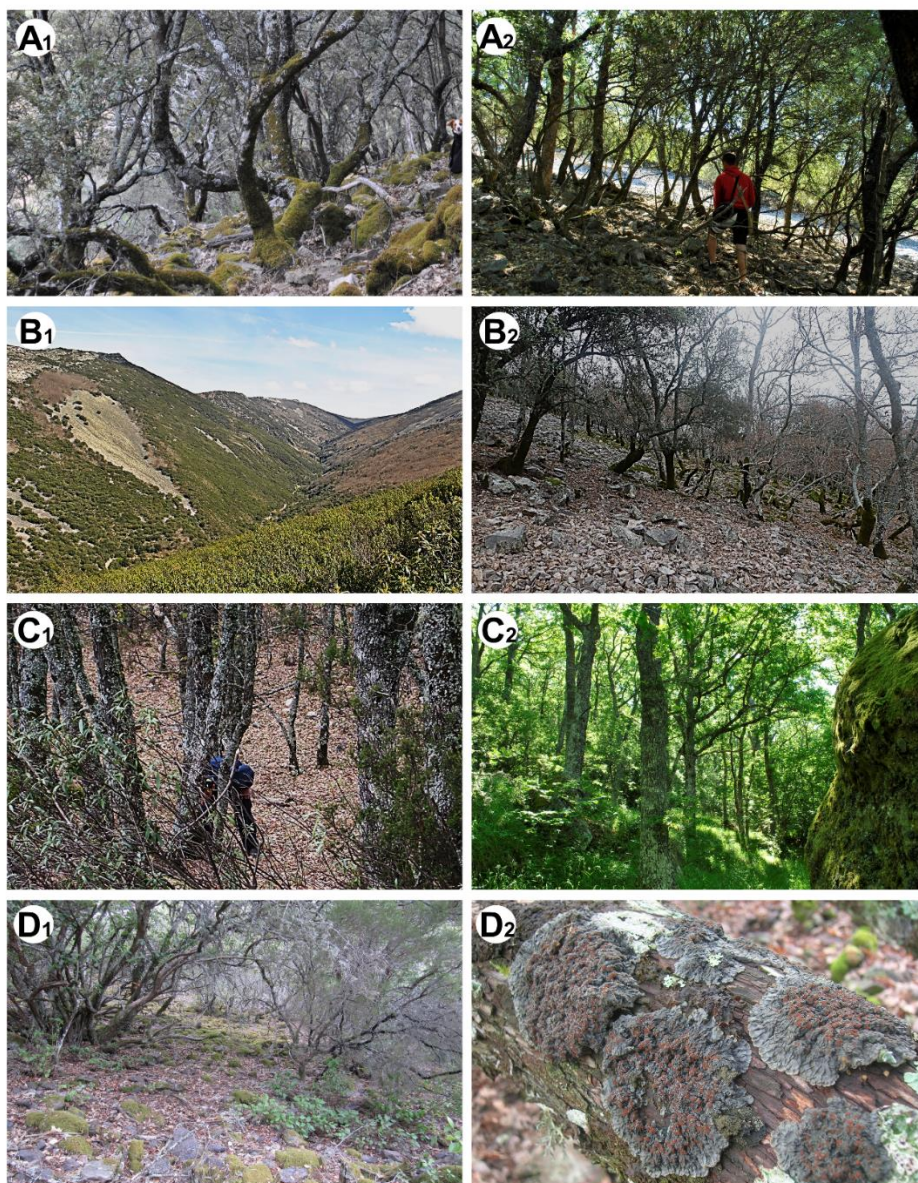


Figura 5. Aspecto de los bosques maduros y bien conservados donde se llevó a cabo la toma de datos y muestras de la tesis doctoral. A1) y A2) Ejemplo del interior de dos de los fragmentos muestreados en los **capítulos 1 y 2** que muestran la estructura del bosque. B1) Uno de los dos valles (El Chorro) muestreados en el **capítulo 3** y B2) ejemplo de la estructura interior del bosque. C1) Estructura interior de bosques bien conservados de *Quercus pyrenaica* y *Q. faginea* en el SE peninsular (S^a Madrona, Ciudad Real) y C2) de *Q. robur* en el NO (Asturias), muestreados en el **capítulo 4**. D1) Imagen del interior del bosque de Gargantilla muestreado en el **capítulo 4**, y D2) ejemplo de unos saludables ejemplares de *P. plumbea* en la misma localidad, junto a otros líquenes.

árboles muestreados, y finalmente conseguimos que todos los valores estuviesen comprendidos entre 18 y 28 cm. Así, se pretendió reducir la posible variabilidad ambiental asociada a los grandes cambios de calidad de hábitat que supone incluir árboles de distintas edades (Aragón et al. 2010). En cada árbol se colocaron cuatro cuadros de muestreo de 20 × 30 cm, considerando dos orientaciones (N y S) y dos alturas (base y dbh), hasta un total de 2976. Dentro de cada cuadro se estimó visualmente la abundancia (% de cobertura) de cada especie de líquen y briófito, y estos datos fueron empleados para calcular la riqueza de especies (total, y de líquenes y briófitos por separado), la diversidad y la similitud, tanto a nivel de parcela como de fragmento.

En cuanto a las variables ambientales, a nivel de fragmento se cuantificó el tamaño, la forma y el porcentaje de los distintos tipos de matriz en contacto con el fragmento: A) plantaciones de pinos, B) alto contraste, compuesta por cultivos, pastos, pedreras y matorrales, cuya estructura es muy diferente a la del bosque, y C) bajo contraste, formada por arbolado disperso con una fisonomía algo más parecida a la del fragmento. Para ello se utilizaron fotografías aéreas tomadas en 2011, que fueron analizadas con un sistema de información geográfica. A nivel de parcela se midió la orientación, la pendiente, la altitud, el dbh medio de todos los árboles de la parcela, la apertura del dosel arbóreo y la cobertura de matorral.

Para el desarrollo del **capítulo 2** se dispuso de fotografías aéreas de la misma zona de estudio de los años 1956 y 1982, adicionalmente a las imágenes de 2011 que muestran el estado actual del paisaje (Fig. 6). En este caso también consideramos la superficie adyacente que rodea a cada fragmento a una distancia de 1 km de su perímetro (buffer), para conocer la estructura del paisaje en sus inmediaciones en los tres años considerados. Dentro de cada buffer medimos la superficie de cada fragmento de bosque nativo de alta cobertura y su distancia al fragmento focal. Con estos valores calculamos la cantidad total de hábitat remanente, su grado de fragmentación y la conectividad con el fragmento focal. Asimismo, cuantificó el

tamaño de los fragmentos focales en los años 1956 y 1982, para obtener el porcentaje de cambio en superficie para todos los periodos posibles (1956-1982, 1982-2011 y 1956-2011).

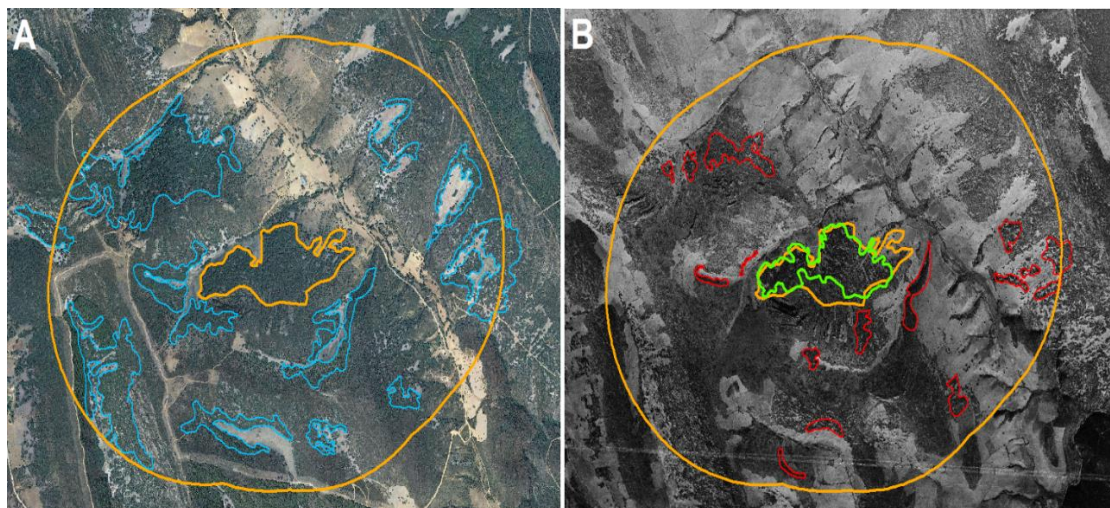


Figura 6 Fotografías aéreas del mismo marco geográfico tomadas en A) 2011 y B) 1956, en las que se muestra la delimitación (línea naranja) de uno de los 40 fragmentos focales muestreados para los **capítulos 1 y 2**, y el respectivo buffer de 1 km en torno a su perímetro (el estado del fragmento focal en 1956 ha sido destacado en verde). Dentro de cada buffer se muestra la digitalización de los fragmentos de bosque nativo de alta cobertura en A) 2011 en azul y en B) 1956 en rojo.

En el **capítulo 3** se seleccionaron dos valles separados ~30 km que albergaban poblaciones de *P. plumbea* (Fig. 5B1) en bosque maduros y bien conservados (Fig. 5B2), y cuentan con distintos grados de fragmentación del bosque rodeado por diferentes tipos de matrices. En estos valles se ubicaron de forma aleatoria un total de 400 parcelas de 50×50 m (200 en cada valle). En cada parcela examinamos los troncos de todos los árboles para contar el número total de individuos de *P. plumbea*, teniendo en cuenta su estado reproductivo (apotecios, isidios o juvenil). De este modo, para cada parcela, pudimos obtener la presencia/ausencia de la especie, su abundancia, y la abundancia de cada uno de los estados reproductivos.

En este caso consideramos, a nivel de parcela, diez variables ambientales incluidas en tres categorías diferentes: a) pérdida de hábitat y fragmentación (área de bosque, cantidad de borde de bosque, área de matriz de alto contraste, área de matriz de contraste intermedio y densidad de fragmentos, obtenida tras la división del número de fragmentos entre el área de bosque); b) clima (precipitación y temperatura media anuales); c) topografía (altitud, pendiente y orientación medias). Para obtener las diez variables utilizamos fotografías aéreas tomadas en 2013 y el modelo digital de elevación de la zona de estudio, ambos procesados con un sistema de información geográfica, y el modelo climático para la Península Ibérica CLIMOEST (Sánchez–Palomares et al. 1999). Posteriormente, analizamos que variables fueron importantes a la hora de explicar la presencia y la abundancia de *P. plumbea*, y se construyeron sus respectivos modelos predictivos que fueron aplicados en toda la superficie del PNC. En toda esta área ubicamos 1200 parcelas de 50×50 m de forma aleatoria, para las que se obtuvieron valores de predicción de presencia y abundancia. Por último, escogimos 71 de las 1200 parcelas, cubriendo todo el rango de valores de predicción entre el 0 y el 1, y sobre el terreno verificamos en ellas el cumplimiento de las predicciones de presencia y de abundancia.

En el **capítulo 4** seleccionamos nueve poblaciones de *P. plumbea* en bosques maduros y bien conservados de la Península Ibérica: 2 en el sureste (Albacete y Ciudad Real) (Fig. 5C1), 4 en el noroeste (Asturias) (Fig. 5C2) y 3 en el centro (Ciudad Real) (Fig. 5D1). En cada población escogemos entre 3 y 4 talos para analizar genéticamente la identidad de sus fotobiontes para el gen tRNA^{Leu} UAA. Posteriormente nos centramos en una de las poblaciones del centro (Gargantilla) (Fig. 5D1), y la muestreamos más intensamente. Cabe destacar que en esta localidad la especie no ha sido observada con isidios y solo se reproduce de forma sexual (Martínez et al. 2014) (Fig. 5D2), por tanto, en principio todos los individuos han sido generados a partir de esporas debiendo reestablecerse de nuevo con un fotobionte compatible. En esta localidad establecimos una parcela de 15×15 m, y en ella seleccionamos todos los árboles con presencia de *P. plumbea*. En cada uno de estos

árboles establecimos dos pequeños cuadros de muestreo de 10×10 cm, uno en la base y otro a la altura del pecho aproximadamente, en torno a un talo de *P. plumbea*, siempre que éste estuviese presente. Dentro de cada cuadro recolectamos un trozo del talo de *P. plumbea*, y de cualquier otra especie de cianoliquen que estuviese presente (ver todas las especies muestreadas en la figura 4C2-4C5), con el fin de revelar la identidad genética del fotobionte que alberga cada talo para el gen tRNA^{Leu} UAA. También recolectamos toda la superficie de corteza, briófitos y otros líquenes con alga verde contenida dentro del cuadro, con el fin de analizar la comunidad de cianobacterias allí presente. Toda esa superficie fue frotada sobre medios de cultivo Z8 (sin nitrógeno) que es excluyente para cualquier organismo que no sea una cianobacteria. Tras dos meses de crecimiento los cultivos fueron examinados para reconocer todas las colonias emergidas, seleccionando únicamente las del género *Nostoc*. De entre éstas, se recolectaron todas las colonias que cumplían con los caracteres biológicos y morfológicos para ser simbiontes potenciales de *P. plumbea*, y fueron identificadas genéticamente para el gen tRNA^{Leu} UAA.

Para analizar la capacidad del fotobionte de *P. plumbea* de crecer y de fundar nuevas colonias de forma aposimbiótica (fuera de la simbiosis), escogimos entre 2 y 4 talos de cada una de las 9 poblaciones. De forma manual, de cada talo, se extrajeron ocho pequeños aislamientos de la capa cianobacterial, que fueron depositados sobre medio de cultivo Z8. Tras seis meses de crecimiento, todos los aislamientos fueron revisados para observar la producción de hormogonios con capacidad de fundar nuevas colonias. Por otro lado, todos los aislamientos de las tres poblaciones del centro peninsular fueron utilizados para medir el crecimiento. Estos fueron fotografiados tanto en el momento de ser aislados como tras 50 días de crecimiento. Como control utilizamos dos especies de cianolíquenes (*Peltigera canina* (L.) Willd. y *Peltigera praetextata* (Flörke) Vain.), de las que fueron recolectados dos ejemplares de cada especie, en cada una de las tres localidades. Los aislamientos control fueron sometidas a las mismas condiciones de crecimiento y de medición que los de *P.*

plumbea. El tamaño inicial y final de todos los aislamientos fueron utilizados para calcular la tasa de crecimiento relativo de cada uno de ellos.

Para examinar la capacidad de germinación de las esporas de *P. plumbea*, escogimos dos de las poblaciones del centro de la Península Ibérica que presentan una mayor abundancia de individuos de la especie en la región. En total obtuvimos 250 apotecios provenientes de 25 individuos por población. Los apotecios fueron lavados y ubicados en placas Petri para permitir la descarga de esporas en los medios de cultivo en las mejores condiciones de esterilidad posibles. Para testar la germinación se utilizaron cuatro medios (Agar, MYA, LBM y BBM) realizados con cuatro preparaciones líquidas (agua destilada, extracto de corteza, extracto de cianoliquen y ciclodextrina diluida) en todas las combinaciones posibles, hasta tener un total de 16 medios de cultivo diferentes. Además, se tuvo en cuenta el efecto de la luz sobre la germinación, con dos tratamientos diferentes: oscuridad total o 16 h de luz y 8h de oscuridad. En este caso, apotecios de *Xanthoria parietina* fueron utilizados como control. La posible germinación de las esporas fue revisada hasta 60 días después del inicio del experimento.

Análisis estadísticos

En el **capítulo 1** utilizamos modelos lineales generalizados (GLMs) para analizar el efecto de las variables ambientales a nivel de fragmento, incluyendo la interacción entre el tamaño del fragmento y el porcentaje de matriz de alto contraste, sobre la riqueza (total, y de líquenes y briófitos por separado), la diversidad y la similitud de los fragmentos. Asimismo, también se emplearon GLMs para conocer el efecto de las mismas variables ambientales sobre la presencia y la abundancia de las 40 especies seleccionadas. Por otro lado, empleamos modelos lineales generalizados mixtos (GLMMs) para analizar la respuesta de las mismas variables dependientes (de toda la comunidad y de las especies por separado), pero esta vez a nivel de parcela.

En este caso se incluyeron como explicativas todas las variables medidas a nivel de parcela junto a las de fragmento.

En el **capítulo 2** solo consideramos como variable respuesta la riqueza total de especies en cada fragmento. En primer lugar, analizamos mediante GLM como la riqueza se ve influenciada por todas las variables ambientales a nivel de fragmento del año 2011, incluyendo la interacción entre el tamaño y la matriz de alto contraste. Adicionalmente incluimos una variable de heterogeneidad ambiental obtenida a través del área de “convex hulls” derivada de un análisis de componentes principales. Este GLM permitió obtener un modelo simplificado (SM) compuesto únicamente por las variables significativas de entre todas las inicialmente incluidas. El SM fue utilizado para calcular la conectividad de cada fragmento (focal) con el hábitat contenido dentro del buffer para los años 1956, 1982 y 2011. La conectividad fue definida por el área de cada fragmento circundante y su distancia al fragmento focal. Para cada uno de los años se retuvo el valor de conectividad que hizo reducir al máximo la devianza residual del modelo (SM + conectividad). Posteriormente, fueron añadidas separadamente y de una en una al SM, las tres variables a nivel de paisaje (cantidad total de hábitat remanente, su grado de fragmentación y la conectividad con el fragmento focal) en los tres años considerados (1956, 1982 y 2011), y el porcentaje de cambio de tamaño del fragmento en los tres periodos (1956-1982, 1982-2011 y 1956-2011), para testar su efecto significativo con un total de 12 GLMs. Por último, se llevaron a cabo análisis de partición de la varianza para conocer el poder explicativo de todas las variables que resultaron significativas a lo largo de todos los GLMs realizados.

En el **capítulo 3** empleamos GLMs para conocer el efecto de las variables topográficas, climáticas y de fragmentación y pérdida de hábitat, incluyendo la interacción entre el área de bosque y la cantidad de borde, sobre la presencia y la abundancia de *P. plumbea*. La selección de modelos se llevó a cabo mediante AIC (Akaike's information criterion), y se obtuvo finalmente un modelo promedio de

todos los equiprobables tanto para la presencia como para la abundancia. Para evaluar la capacidad y fiabilidad de las predicciones a llevar a cabo con los modelos promedio, utilizamos el método AUC (área bajo la curva) para la presencia, y un método de validación cruzada para la abundancia. La evaluación de la correspondencia entre las predicciones de los modelos y la realidad, fue llevada a cabo mediante porcentaje para la presencia, y con el coeficiente de correlación de Spearman (ρ) para la abundancia. El efecto de las variables ambientales sobre la abundancia de los tres estados reproductivos de la especie (apotecios, isidios y juvenil) fue analizado con GLMs.

En el **capítulo 4** se realizó una valoración cuantitativa tras la comparación de la presencia de los distintos genotipos del gen tRNA^{Leu} entre la comunidad de cianobacterias de vida libre y la comunidad de cianolíquenes. También se hizo una valoración cuantitativa de la producción de hormogonios y de la germinación de esporas. En cuanto al crecimiento aposimbiótico de los aislamientos del fotobionte de *P. plumbea*, se comparó su tasa de crecimiento relativo con el de los aislamientos de las especies control mediante un análisis de la varianza (ANOVA), incluyendo la localidad de recolección y la identidad de cada individuo como factores explicativos.

En los **capítulos 1, 2 y 3** se calcularon los coeficientes de correlación entre parejas de variables de forma previa a su inclusión en un mismo modelo. En caso de obtener un valor >0.7 , una de las variables de cada pareja correlacionada dejaba de ser considerada para su posterior análisis en los modelos. Todos los análisis estadísticos relatados en esta sección fueron llevados a cabo con el lenguaje y en el entorno de programación del software R (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

CONCLUSIONES

1. Los bosques mediterráneos fragmentados del Parque Nacional de Cabañeros y su entorno albergan comunidades de epífitos ricas y diversas, que se ven afectadas intensamente por los procesos de fragmentación y pérdida de hábitat.
2. El tamaño de fragmento de bosque demuestra ser un factor muy importante para explicar la riqueza y diversidad de especies epífitas que pueden ser encontradas en él. Un mayor tamaño implica un mayor número de especies, tanto de líquenes como de briófitos, y a la vez que sus abundancias presenten unos valores más equitativos evitando la dominancia de unas pocas especies. La trayectoria histórica de la superficie del fragmento también ha de ser tenida en cuenta, ya que los cambios muy intensos no son inmediatamente percibidos por la comunidad, y esto acarrea un ligero desfase entre el número de especies que realmente están presentes en un fragmento y las que potencialmente puede albergar.
3. La forma de los fragmentos, entendida como la incidencia del efecto borde sobre el área total del fragmento, no tiene efecto sobre la riqueza de especies. Sin embargo, un fragmento más irregular influye negativamente sobre la diversidad, es decir, que favorece la dominancia de unas pocas especies, probablemente de aquellas asociadas a un ambiente de borde de bosque.
4. La composición de la matriz circundante condiciona la riqueza de especies presentes en el fragmento. Una matriz de alto contraste hace incrementar el número de especies en fragmentos pequeño carentes de una zona central de elevada calidad ambiental, posiblemente a través de no dificultar la llegada de propágulos. Sin embargo, en fragmentos más grandes se produce el efecto contrario, que en este caso hace evidente el empeoramiento de las condiciones microclimáticas en el borde. Por otro lado, una matriz compuesta por pinos hace aumentar la riqueza de

briófitos, puesto que su tronco puede ser usado eventualmente como sustrato y su fisonomía puede mitigar el efecto borde.

5. La heterogeneidad ambiental a nivel de parcela, proporcionada por mayores valores de apertura del dosel arbóreo y cobertura de matorral, provocan un aumento de la diversidad de especies. Sin embargo, la heterogeneidad a nivel de fragmento, extraída a partir de la variabilidad encontrada en la altitud, orientación, tamaño del tronco de los árboles, apertura del dosel y cobertura de matorral, no tienen influencia en la riqueza de especies.
6. La estructura del paisaje inmediato que rodea al fragmento (1 km) tiene parte de responsabilidad en el número de especies que alberga. La composición por sí sola, medida a través de la cantidad total de hábitat tanto histórico como presente, no explica el patrón de riqueza, sino que su configuración espacial también es importante. El grado de fragmentación del hábitat histórico y presente, como medida de la estructura del paisaje, demuestra no ser válido para predecir la riqueza. Sin embargo, la estructura del paisaje descrita a través de la conectividad histórica (año 1956) explica en parte los valores de riqueza de epífitos observados en la actualidad. La conectividad presente no tiene efecto sobre la comunidad actual, sin embargo la intensa regeneración del bosque nativo observada en las últimas décadas, anticipa un posible incremento de especies por fragmento dependiente de la conectividad.
7. El líquen *Pectenium plumbeum*, catalogado como vulnerable en el centro de la Península Ibérica no presenta limitaciones a la dispersión a escala de paisaje. La especie ya ocupa todo su hábitat potencial en el Parque Nacional de Cabañeros, y no puede establecerse en más localidades debido a una baja calidad de los bosques existentes. La regeneración de superficies forestales continuas sin régimen de manejo, en los lugares más térmicos y húmedos, permitiría ampliar su área de distribución. Los dos estados reproductivos que presenta la especie le proporcionan

una aptitud ecológica más amplia, y favorecen que la especie pueda explotar una mayor diversidad de ambientes, mitigando así ligeramente los efectos de un paisaje fragmentado.

8. La identidad genética de los fotobiontes encontrados en *P. plumbea* es parcialmente compartida entre todas las poblaciones, sin embargo la frecuencia con la que aparecen los genotipos varía en función de la región geográfica, posiblemente en relación con las condiciones climáticas.

9. La identidad genética de los fotobiontes encontrada en una población de *P. plumbea*, es compartida con el resto de la comunidad de cianolíquenes de su mismo gremio, y parcialmente por la comunidad de cianobacterias de vida libre. Sin embargo *P. plumbea* muestra una preferencia muy clara por un único genotipo de fotobionte, y este solo puede ser dispersado por el líquen *Dendriscoaulon umhausense*. Dado que las esporas de *P. plumbea* no son capaces de germinar por si solas, ni el fotobionte de crecer ni multiplicarse, parece evidente que la presencia de *D. umhausense* facilitaría el establecimiento de *P. plumbea* en nuevos hábitats.

LISTA DE MANUSCRITOS

Esta tesis está basada en 4 capítulos escritos en inglés. Un artículo se encuentra ya publicado en la revista *Landscape Ecology*, otro está en proceso de revisión en *American Journal of Botany* (se han recibido ya los comentarios de los revisores y estamos en proceso de corrección) y dos más son manuscritos inéditos que serán enviados en breve a las revistas *New Phytologist* y *Ecography*. Se detalla el título de cada uno de los capítulos, los coautores y su estado actual de publicación.

- Capítulo 1 Epiphyte communities in Mediterranean fragmented forests: importance of the fragment size and the surrounding matrix (2016). Cardós JLH, Martínez I, Calvo V, Aragón G. *Landscape Ecology* 31(9):1975–1995.
- Capítulo 2 Lag between the increase of species richness and habitat recovery at different spatio-temporal scales. Cardós JLH, Martínez I, Aragón G, Ellis C. *Manuscrito inédito*.
- Capítulo 3 A species on a tightrope or how to find the equilibrium. Cardós JLH, Aragón G, Martínez I. *American Journal of Botany*, en revision.
- Capítulo 4 Reestablishing the cyanolichen symbiosis: Where do the compatible photobionts come from? Cardós JLH, Martínez I, Prieto M, Molina MC, Jylhä M, Aragón G, Rikkinen J. *Manuscrito inédito*.

COAUTORES Y FILIACIÓN

Isabel **Martínez** Moreno

Gregorio **Aragón** Rubio

María **Prieto** Álvaro

M^a Carmen **Molina** Cobos

Victoria **Calvo** Donate

Departamento de Biología y Geología, Física y Química Inorgánica, ESCET,
Universidad Rey Juan Carlos, Calle Tulipán s/n, 28933, Móstoles, Madrid,
Spain.

Christopher **Ellis**

Department of Cryptogamic Plants and Fungi, Royal Botanic Garden of
Edinburgh, 20A Inverleith Row, Edinburgh, EH3 5LR, Scotland, United
Kingdom.

Jouko **Rikkinen**^{1,2}

Maarit **Jylhä**¹

¹Department of Biosciences, University of Helsinki, Viikinkaari 1 P.O. Box 65,
00014 Helsinki, Finland.

²Finnish Museum of Natural History, University of Helsinki, Pohjoinen
Rautatiekatu 13 P.O. Box 7, 00014 Helsinki, Finland.

BIBLIOGRAFÍA

- Ackerman JD, Sabat A, Zimmerman JK (1996) Seedling establishment in an epiphytic orchid: an experimental study of seed limitation. *Oecologia* 106:192-198
- Adriaens D, Honnay O, Hermy M (2006) No evidence of a plant extinction debt in highly fragmented calcareous grasslands in Belgium. *Biological Conservation* 133:212-224
- AEMET (2011) Atlas climático Ibérico. Agencia Estatal de Meteorología, Ministerio de Medio Ambiente y Rural y Marino, Instituto de Meteorología de Portugal, Madrid
- Anderson J, Rowcliffe JM, Cowlshaw G (2007) Does the matrix matter? A forest primate in a complex agricultural landscape. *Biological Conservation* 135:212-222
- Aragón G, Abuja L, Belinchón R, Martínez I (2015) Edge type determines the intensity of forest edge effect on epiphytic communities. *European Journal of Forest Research* 134:443-451
- Aragón G, Martínez I, Izquierdo P, Belinchón R, Escudero A (2010) Effects of forest management on epiphytic lichen diversity in Mediterranean forests. *Applied Vegetation Science* 13:183-194
- Aschenbrenner IA, Cernava T, Berg G, Grube M (2016) Understanding microbial multi-species symbioses. *Frontiers in Microbiology* 7 doi:10.3389/fmicb.2016.00180
- Asplund J, Wardle DA (2016) How lichens impact on terrestrial community and ecosystem properties. *Biological Reviews* doi:10.1111/brv.12305
- Barbé M, Fenton NJ, Bergeron Y (2016) So close and yet so far away: long-distance dispersal events govern bryophyte metacommunity reassembly. *Journal of Ecology* 104:1707-1719
- Bascompte J, Rodriguez MA (2001) Habitat patchiness and plant species richness. *Ecology Letters* 4:417-420
- Belinchón R, Martínez I, Escudero A, Aragón G, Valladares F (2007) Edge effects on epiphytic communities in a Mediterranean *Quercus pyrenaica* forest. *Journal of Vegetation Science* 18:81-90
- Belinchón R, Martínez I, Otálora MAG, Aragón G, Dimas J, Escudero A (2009) Fragment quality and matrix affect epiphytic performance in a Mediterranean forest landscape. *American Journal of Botany* 96:1974-1982
- Belinchón R, Yahr R, Ellis CJ (2015) Interactions among species with contrasting dispersal modes explain distributions for epiphytic lichens. *Ecography* 38:762-768
- Benner JW, Vitousek PM (2007) Development of a diverse epiphyte community in response to phosphorus fertilization. *Ecology Letters* 10:628-636
- Bergès L, Pellissier V, Avon C, Verheyen K, Dupouey JL (2013) Unexpected long-range edge-to-forest interior environmental gradients. *Landscape Ecology* 28:439-453
- Blondel J (2006) The 'design' of Mediterranean landscapes: a millennial story of humans and ecological systems during the historic period. *Human Ecology* 34:713-729
- Blondel J, Aronson J (1999) *Biology and wildlife of the Mediterranean region*. Oxford University Press, New York
- Brunialti G, Ravera R, Frati L (2013) Mediterranean old-growth forests: the role of forest type in the conservation of epiphytic lichens. *Nova Hedwigia* 96:367-381
- Burgaz AR, Fuertes E, Escudero A (1994) Climax epiphytic communities in Mediterranean Spain. *Botanical journal of the Linnean society* 115:35-47
- Cabrera-Guzmán E, Reynoso VH (2012) Amphibian and reptile communities of rainforest fragments: minimum patch size to support high richness and abundance. *Biodiversity & Conservation* 21:3243-3265

- Carballal R, Paz-Bermúdez G, Válcárcel CP (2007) The genera *Coccocarpia* (Coccocarpiaceae, Ascomycota), *Degelia* and *Erioderma* (Pannariaceae, Ascomycota), in the Iberian Peninsula. *Nova Hedwigia* 85:51-62
- Cardós JLH, Martínez I, Calvo V, Aragón G (2016) Epiphyte communities in Mediterranean fragmented forests: importance of the fragment size and the surrounding matrix. *Landscape Ecology* 31:1975-1995
- Ceballos G, Ehrlich PR, Barnosky AD, García A, Pringle RM, Palmer TM (2015) Accelerated modern human-induced species losses: Entering the sixth mass extinction. *Science advances* 1:e1400253
- Coleman BD (1981) On random placement and species-area relations. *Mathematical Biosciences* 54:191-215
- Concostrina-Zubiri L, Martínez I, Huber-Sannwald E, Escudero A (2013) Efectos y respuestas de la Costra Biológica del Suelo en ecosistemas áridos: avances recientes a nivel de especie. *Ecosistemas* 22:95-100
- COSEWIC. 2010. COSEWIC assessment and status report on the Blue Felt Lichen *Degelia plumbea* in Canada. Committee on the Status of Endangered Wildlife in Canada. Ottawa. x + 42 pp
- Coxson DS, Stevenson SK (2007) Influence of high-contrast and low-contrast forest edges on growth rates of *Lobaria pulmonaria* in the inland rainforest, British Columbia. *Forest Ecology and Management* 253:103-111
- Denison WC (1973) Life in tall trees. *Scientific American* 228:74-80
- Driscoll DA, Banks SC, Barton PS, Lindenmayer DB, Smith AL (2013) Conceptual domain of the matrix in fragmented landscapes. *Trends in Ecology & Evolution* 28:605-613
- Ellis CJ (2012) Lichen epiphyte diversity: a species, community and trait-based review. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 14:131-152
- Ellis CJ, Coppins BJ (2007) 19th century woodland structure controls stand-scale epiphyte diversity in present-day Scotland. *Diversity and Distributions* 13:84-91
- Escudero A, Martínez I, De la Cruz A, Otálora MAG, Maestre FT (2007) Soil lichens have species-specific effects on the seedling emergence of three gypsophile plant species. *Journal of Arid Environments*, 70:18-28
- Esseen PA, Renhorn KE (1998) Edge effects on an epiphytic lichen in fragmented forests. *Conservation Biology* 12:1307-1317
- Ewers RM, Didham RK (2006) Confounding factors in the detection of species responses to habitat fragmentation. *Biological Reviews* 81:117-142
- Ewers RM, Didham RK (2007) The effect of fragment shape and species' sensitivity to habitat edges on animal population size. *Conservation Biology* 21:926-936
- Fahrig L (2003) Effects of habitat fragmentation on biodiversity. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 34:487-515
- Gauslaa Y, Solhaug KA (1998) The significance of thallus size for the water economy of the cyanobacterial old-forest lichen *Degelia plumbea*. *Oecologia* 116:76-84
- Gerson U, Seaward MRD (1977) Lichen-invertebrate associations. En *Lichen ecology* (ed. MRD Seaward), pp. 69-119. Academic Press, London
- Gignac LD, Dale MR (2005) Effects of fragment size and habitat heterogeneity on cryptogam diversity in the low-boreal forest of western Canada. *The Bryologist* 108:50-66
- Giordani P, Benesperi R, Mariotti MG (2015) Local dispersal dynamics determine the occupied niche of the red-listed lichen *Seiropora villosa* (Ach.) Frödén in a Mediterranean Juniperus shrubland. *Fungal Ecology* 13:77-82
- Giorgi F, Lionello P (2008) Climate change projections for the Mediterranean region. *Global and Planetary Change* 63:90-104

- Hanski I (1998) Metapopulation dynamics. *Nature* 396:41-49
- Hanski I (1999) *Metapopulation ecology*. Oxford University Press, Oxford.
- Harrison S, Bruna E (1999) Habitat fragmentation and large-scale conservation: what do we know for sure? *Ecography* 22:225-232
- Hazell P, Gustafsson L (1999) Retention of trees at final harvest—evaluation of a conservation technique using epiphytic bryophyte and lichen transplants. *Biological Conservation* 90:133-142
- Hedenås H, Hedström P (2007) Conservation of epiphytic lichens: significance of remnant aspen (*Populus tremula*) trees in clear-cuts. *Biological Conservation* 135:388-395
- Helm A, Hanski I, Pärtel M (2006) Slow response of plant species richness to habitat loss and fragmentation. *Ecology Letters* 9:72-77
- Herben T, Söderström L (1992) Which habitat parameters are most important for the persistence of a bryophyte species on patchy, temporary substrates? *Biological Conservation* 59:121-126
- Honnay O, Endels P, Vereecken H, Hermy M (1999) The role of patch area and habitat diversity in explaining native plant species richness in disturbed suburban forest patches in northern Belgium. *Diversity & Distributions* 5:129-141
- Hooper DU, Chapin FS, Ewel JJ, Hector A, Inchausti P, Lavorel S, Lawton JH, Lodge DM, Loreau M, Naeem S, Schmid B, Setälä H, Symstad AJ, Vandermeer J, Wardle DA (2005) Effects of biodiversity on ecosystem functioning: a consensus of current knowledge. *Ecological monographs* 75:3-35
- IUCN. 2015. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2015.1. <<http://www.iucnredlist.org>>.
- Johansson P (2008) Consequences of disturbance on epiphytic lichens in boreal and near boreal forests. *Biological Conservation* 141:1933-1944
- Johansson P, Ehrlén J (2003) Influence of habitat quantity, quality and isolation on the distribution and abundance of two epiphytic lichens. *Journal of Ecology* 91:213-221
- Kivistö L, Kuusinen M (2000) Edge effects on the epiphytic lichen flora of *Picea abies* in middle boreal Finland. *The Lichenologist* 32:387-398
- Kruys N, Jonsson BG (1997) Insular patterns of calcicoid lichens in a boreal old-growth forest-wetland mosaic. *Ecography* 20:605-613
- Lange OL, Kilian E, Ziegler H (1986) Water vapor uptake and photosynthesis of lichens: performance differences in species with green and blue-green algae as phycobionts. *Oecologia* 71:104-110
- Larson DW (1979) Lichen water relations under drying conditions. *New Phytologist* 82:713-731
- Lesica P, McCune B, Cooper SV, Hong WS (1991) Differences in lichen and bryophyte communities between old-growth and managed second-growth forests in the Swan Valley, Montana. *Canadian Journal of Botany* 69:1745-1755
- Lindborg R, Eriksson O (2004) Historical landscape connectivity affects present plant species diversity. *Ecology* 85:1840-1845
- Löbel S, Rydin H (2010) Trade-offs and habitat constraints in the establishment of epiphytic bryophytes. *Functional Ecology* 24:887-897
- Löbel S, Snäll T, Rydin H (2009) Mating system, reproduction mode and diaspore size affect metacommunity diversity. *Journal of Ecology* 97:176-185
- Löhmus A, Löhmus P, Vellak K (2007) Substratum diversity explains landscape-scale covariation in the species-richness of bryophytes and lichens. *Biological Conservation* 135:405-414

- Lomolino MV (1990) The target area hypothesis: the influence of island area on immigration rates of non-volant mammals. *Oikos* 57:297–300
- Lönnell N, Jonsson BG, Hylander K (2014) Production of diaspores at the landscape level regulates local colonization: an experiment with a spore-dispersed moss. *Ecography* 37: 591-598.
- MacArthur RH, Wilson EO (1967) *The theory of island biogeography*. Princeton University Press, Princeton
- Martínez I, Aragón G, Sarrión FJ, Escudero A, Burgaz AR, Coppins BJ (2003) Threatened lichens in central Spain (saxicolous species excluded). *Cryptogamie. Mycologie* 24:73-97
- Martínez I, Flores T, Aragón G, Otálora MAG, Rubio-Salcedo M (2014) What factors influence the occurrence of the genus *Degelia* (a threatened lichen) in central Spain? *Fungal Ecology* 11:50-59
- Matos P, Pinho P, Aragón G, Martínez I, Nunes A, Soares AM, Branquinho C (2015) Lichen traits responding to aridity. *Journal of Ecology* 103:451-458
- McCarthy DP (2003) Estimating lichenometric ages by direct and indirect measurement of radial growth: a case study of *Rhizocarpon* agg. at the Illecillewaet Glacier, British Columbia. *Arctic, Antarctic, and Alpine Research* 35:203-213
- Medina NG, Albertos B, Lara F, Mazimpaka V, Garilleti R, Draper D, Hortal J (2014) Species richness of epiphytic bryophytes: drivers across scales on the edge of the Mediterranean. *Ecography* 37:80-93
- Mesa S (2002) Historia de los bosques de la Península Ibérica. En *La regeneración natural del bosque mediterráneo en la Península Ibérica* (ed. J Charco), pp. 153–170. Arba-Ministerio de Medio Ambiente, Madrid
- Millanes AM, Diederich P, Wedin M (2016) *Cyphobasidium* gen. nov., a new lichen-inhabiting lineage in the *Cystobasidiomycetes* (*Pucciniomycotina*, *Basidiomycota*, *Fungi*). *Fungal Biology* 120:1468-1477
- Mottershead D, Lucas G (2000) The role of lichens in inhibiting erosion of a soluble rock. *The Lichenologist* 32:601-609
- Muñoz J, Felicísimo ÁM, Cabezas F, Burgaz AR, Martínez I (2004) Wind as a long-distance dispersal vehicle in the Southern Hemisphere. *Science* 304:1144-1147
- Murcia C (1995) Edge effects in fragmented forests: implications for conservation. *Trends in Ecology & Evolution* 10:58-62
- Nash TH (2008) *Lichen biology*. Cambridge University Press, Cambridge
- Nathan R (2006) Long-distance dispersal of plants. *Science* 313:786-788
- Nathan R, Muller-Landau HC (2000) Spatial patterns of seed dispersal, their determinants and consequences for recruitment. *Trends in Ecology & Evolution* 15:278-285
- Nelson E, Mendoza G, Regetz J, Polasky S, Tallis H, Cameron D, Chan KMA, Daily GC, Goldstein J, Kareiva PM, Lonsdorf E, Naidoo R, Ricketts TH, Shaw MR (2009) Modeling multiple ecosystem services, biodiversity conservation, commodity production, and tradeoffs at landscape scales. *Frontiers in Ecology and the Environment* 7:4-11
- Öckinger E, Niklasson M, Nilsson SG (2005) Is local distribution of the epiphytic lichen *Lobaria pulmonaria* limited by dispersal capacity or habitat quality? *Biodiversity & Conservation* 14:759-773
- Oliveira JR, Pôrto KC, Silva MP (2011) Richness preservation in a fragmented landscape: a study of epiphytic bryophytes in an Atlantic forest remnant in Northeast Brazil. *Journal of Bryology* 33:279-290

- Otálora MAG, Martínez I, Aragón G, Wedin M (2016) Species delimitation and phylogeography of the *Pectenía* species-complex: a misunderstood case of species-pairs in lichenized fungi, where reproduction mode does not delimit lineages. *Fungal Biology* doi:10.1016/j.funbio.2016.12.001
- Otálora MAG, Salvador C, Martínez I, Aragón G (2013) Does the reproductive strategy affect the transmission and genetic diversity of bionts in cyanolichens? A case study using two closely related species. *Microbial ecology* 65:517-530
- Pharo EJ, Lindenmayer DB (2009) Biological legacies soften pine plantation effects for bryophytes. *Biodiversity and Conservation* 18:1751-1764
- Pharo EJ, Zartman CE (2007) Bryophytes in a changing landscape: the hierarchical effects of habitat fragmentation on ecological and evolutionary processes. *Biological Conservation* 135:315-325
- Prevedello JA, Vieira MV (2010) Does the type of matrix matter? A quantitative review of the evidence. *Biodiversity and Conservation* 19:1205-1223
- Reino L, Beja P, Osborne PE, Morgado R, Fabião A, Rotenberry JT (2009) Distance to edges, edge contrast and landscape fragmentation: interactions affecting farmland birds around forest plantations. *Biological Conservation* 142:824-838
- Rikkinen J, Oksanen I, Lohtander K (2002) Lichen guilds share related cyanobacterial symbionts. *Science* 297:357-357
- Ruete A, Fritz Ö, Snäll T (2014) A model for non-equilibrium metapopulation dynamics utilizing data on species occupancy, patch ages and landscape history. *Journal of Ecology* 102:678-689
- Rybicki J, Hanski I (2013) Species–area relationships and extinctions caused by habitat loss and fragmentation. *Ecology Letters* 16:27-38
- Sala OE, Chapin III FS, Armesto JJ, Berlow E, Bloomfield J, Dirzo R, Huber-Sanwald E, Huenneke LF, Jackson RB, Kinzig A, Leemans R, Lodge DM, Mooney HA, Oesterheld M, Poff NL, Sykes MT, Walker BH, Walker M, Wall DH (2000) Global biodiversity scenarios for the year 2100. *Science* 287:1770-1774
- Sánchez-Palomares O, Sánchez-Serrano F, Carretero-Carrero MP (1999) *Modelos y cartografía de estimaciones climáticas termoplumiométricas para la España peninsular*. INIA, Madrid
- Saunders DA, Hobbs RJ, Margules CR (1991) Biological consequences of ecosystem fragmentation: a review. *Conservation Biology* 5:18-32
- Scheidegger C, Werth S (2009) Conservation strategies for lichens: insights from population biology. *Fungal Biology Reviews* 23:55-66
- Sillett SC, McCune B, Peck JE, Rambo TR, Ruchty A (2000) Dispersal limitations of epiphytic lichens result in species dependent on old-growth forests. *Ecological Applications* 10: 789-799
- Spribile T, Tuovinen V, Resl P, Vanderpool D, Wolinski H, Aime MC, Schneider K, Stabenheiner E, Toome-Heller M, Thor G, Mayrhofer H, Johannesson H, McCutcheon JP (2016). Basidiomycete yeasts in the cortex of ascomycete macrolichens. *Science* 353: 488-492
- Sundseth, K (2009) Natura 2000 en la Región Mediterránea. Oficina de publicaciones de la Unión Europea, Luxemburgo
- Thirgood JV (1981) *Man and the Mediterranean forest*. Academic Press, London
- Tilman D, May RM, Lehman CL, Nowak MA (1994) Habitat destruction and the extinction debt. *Nature* 371:65-66

- Valdés A, García D (2009) Applying a continua landscape approach to evaluate plant response to fragmentation: *Primula vulgaris* in the Cantabrian mountains. *Applied Vegetation Science* 12:504-515
- Valladares F, Camarero JJ, Pulido F, Gil-Pelegri n E (2004) El bosque mediterráneo, un sistema humanizado y dinámico. En *Ecología del bosque mediterráneo en un mundo cambiante* (ed. F Valladares), pp. 13–25. Ministerio de Medio Ambiente, Madrid
- Verbyla DL, Litvaitis JA (1989) Resampling methods for evaluating classification accuracy of wildlife habitat models. *Environmental Management* 13:783-787
- Walser JC (2004) Molecular evidence for limited dispersal of vegetative propagules in the epiphytic lichen *Lobaria pulmonaria*. *American Journal of Botany* 91:1273-1276
- Walther GR, Post E, Convey P, Menzel A, Parmesan C, Beebee TJ, Fromentin JM, Hoegh-Guldberg O, Bairlein F (2002) Ecological responses to recent climate change. *Nature* 416:389-395
- Wiklund K, Rydin H (2004) Ecophysiological constraints on spore establishment in bryophytes. *Functional Ecology* 18:907-913
- Worm B, Barbier EB, Beaumont N, Duffy JE, Folke C, Halpern BS, Jackson JBC, Lotze HK, Micheli F, Palumbi SR, Sala E, Selkoe KA, Stachowicz JJ, Watson R (2006) Impacts of biodiversity loss on ocean ecosystem services. *Science* 314:787-790
- Yamaura Y, Kawahara T, Iida S, Ozaki K (2008) Relative importance of the area and shape of patches to the diversity of multiple taxa. *Conservation Biology* 22:1513–1522
- Zartman CE (2003) Habitat fragmentation impacts on epiphyllous bryophyte communities in central Amazonia. *Ecology* 84:948-954

CAPÍTULOS

CHAPTERS

CAPÍTULO 1/CHAPTER 1

Epiphyte communities in Mediterranean fragmented forests:
importance of the fragment size and the surrounding matrix



Juan Luis H. Cardós • Isabel Martínez • Victoria Calvo • Gregorio Aragón

Manuscrito publicado en *Landscape Ecology* 31(9): 1975–1995

ABSTRACT

Context: Mediterranean forests have been fragmented intensively over time, thereby yielding small and isolated forest remnants. They host a rich variety of epiphytes, which may be affected by landscape structure. Previous studies have analyzed the influence of habitat quality on these epiphytic communities, but there is little knowledge of the effects of other fragment features.

Objectives: We evaluated the impacts of forest loss and fragmentation on epiphytic communities (lichens and bryophytes) at plot and fragment scales after controlling the variation in forest structure and management.

Methods: We considered 40 fragments of dense oak forests in a human-modified landscape. We quantified their spatial attributes (size, shape), the quality of the surrounding matrix and the forest stand structure. We modeled community traits, and the presence and abundance of species at fragment and plot scales.

Results: Fragment size, shape, and the quality of the surrounding matrix were key factors that affected epiphytic richness and diversity. Larger and more regularly shaped fragments hosted the richest and most diverse communities, possibly offering a larger core area and thus favoring the entry of typical forest species. A high-contrast matrix was only favorable in small fragments, probably allowing the arrival of propagules. The species-level response was highly variable.

Conclusions: Landscape structure provides powerful explanations of the richness and diversity losses among epiphytes. Forest management should ensure the retention of the largest possible continuous forests. The management strategy of the matrix will depend on the conservation goal, since we observed different effects related with quality and fragment size.

Keywords habitat fragmentation · habitat loss · landscape structure · fragment shape · species diversity · Mediterranean oak forest · species-area relationship · cyanolichens

INTRODUCTION

Mediterranean forests have been intensively fragmented over time and large proportions of the original landscapes have been transformed into croplands and grasslands in order to satisfy human needs (Thirgood 1981; Scarascia-Mugnozza et al 2000). These fragmentation processes have yielded small and isolated forest remnants in the human-modified landscape (Saunders et al 1991), thereby causing the decline and disappearance of numerous species linked to these habitats (Fahrig 2003).

Forest fragmentation leads to changes in the core area, shape, and spatial separation of fragments, where changes in the surrounding area of the forest fragments (matrix) and human exploitation of the remnant fragments, such as selective clearing and logging, have major effects on their habitat quality (Kupfer et al 2006). Reductions in the core area due to fragmentation are associated with the loss of habitats for species that require interior forest conditions (Harrison and Bruna 1999). Fragments with irregular shapes undergo a greater incidence of the "edge effect" because the proportion of edge amount increases compared to more regular fragments (Laurance and Yensen 1991). In addition, the spatial separation of the fragments decreases the likely success of dispersal and reduces movements of organisms among fragments (Hanski 1998). However, the effects on the abundance and distribution of species due to changes in the size and shape of fragments might be mitigated or exacerbated by differences in the composition, structure, and management of the matrix (Murphy and Lovett-Doust 2004). For example, microclimatic variations that cause the "edge effect" will be reduced if the matrix is structurally similar to the forest fragment (Murcia 1995). The matrix quality might influence dispersal, resource availability, and the abiotic environment (Driscoll et al 2013). Thus, the "hard contrast" between matrix and forest fragments has been shown to be one of the main causes of species loss (Fahrig 2001). The relevance of the matrix over habitat loss and fragmentation processes has been summarized in a recent review (Prevedello and Vieira 2010), which outlines that almost all the studies showed significant effects of the matrix type. Also, the authors point out that the quality of the remnant habitat and

the matrix can be enhanced if the matrix vegetation physiognomy is similar to the fragment vegetation. However it should be noted that all these studies deal with non-sessile organisms, which can move among fragments and could somehow use the matrix.

Lichens and bryophytes are suitable organisms to assess the forest loss and fragmentation because they are highly sensitive to small environmental changes (Kranter et al 2008; Pinho et al 2012), as their physiology is strongly coupled to the humidity, solar radiation, and temperature conditions (Green et al 2008; Honegger 2009). They are important epiphytic organisms in Mediterranean forests (Coxson and Nadkarni 1995), where the diversity and composition of these communities depend on several environmental factors that operate at different scales (Ellis 2012).

Among the epiphytes, certain groups of shade species that require forest interior conditions (e.g., some cyanolichens) are more sensitive to environmental changes because they are highly dependent on water availability and they may experience photoinhibition with excessive radiation (Lange et al 2004; Kranter et al 2008). If the core area is reduced due to habitat loss and fragmentation processes, drastic changes in epiphytic composition associated to fragment size are expected. In addition, most previous studies agree that epiphytic communities are greatly influenced by the edge effect (Zartman and Nascimento 2006; Belinchón et al 2007; Hauck et al 2014); thus, we should expect higher diversity of epiphytes in fragments with a regular shape where the edge effect is lower.

Indeed, the consequences of the forest edge-effect on epiphytic lichens are well known (e.g., Hilmo and Holien 2002; Steawart and Mallik 2006; Belinchón et al 2007; Brunialti et al 2013; Aragón et al 2015). By contrast, little is known about the effects on epiphytes of other attributes of the landscape structure related to the forest loss and fragmentation, such as the fragment size and the shape or type of the surrounding matrix, which are poorly documented and still unclear. For example, some studies have indicated that the matrix of coniferous forests may function as a filter for dispersing propagules, affecting negatively the populations of certain species

linked to deciduous trees (Johansson and Ehrlén 2003; Belinchón et al 2009). Conversely, a matrix that comprises scattered deciduous trees might facilitate dispersal of some epiphytes among fragments (Löhmus et al 2006).

To the best of our knowledge, previous studies of forest loss and/or fragmentation have mainly focused on the response of a single epiphytic species (Johansson and Ehrlén 2003; Snall et al 2003; Belinchón et al 2009; Otálora et al 2011; Löbel et al 2012), or on specific spatial attributes of fragmentation (the forest fragment size or edge effect) (Kivistö and Kuusinen 2000; Belinchón et al 2007; Oliveira et al 2011; Löbel et al 2012). In addition, most studies focused on temperate or boreal forests where the humidity is not as limiting as that in Mediterranean forests (Valladares et al 2004).

In a previous study of 306 Mediterranean oak forest fragments (Aragón et al 2010b), the variables related to forest structure at the plot scale (management, canopy cover, and tree size) explained most of the variability in epiphytic communities, whereas the variables related to the habitat loss and fragmentation process (i.e., the size of fragments) did not have the expected importance (Aragón et al 2010b). It is likely that the broad forest heterogeneity related to differences in management intensity and the forest structure minimized the effects of the fragment size. Thus, given these results, our main aim in the present study was to evaluate the impacts of forest loss and fragmentation on epiphytic communities (lichens and bryophytes) at plot and fragment scales after controlling the variation in forest structure.

We selected 40 fragments of dense oak forests with similar tree cover in a human-modified landscape. We quantified several landscape structure attributes (fragment size and shape, and the quality of the surrounding matrix) and forest stand structure, which are known to affect epiphytic diversity (Gignac and Dale 2005; Löbel et al 2006; Coxson and Stevenson 2007). We hypothesized that reductions in the fragment size (i.e., loss of the core area and habitat heterogeneity), increases in irregularity (i.e., increased edge effect), and a high contrast between the matrix and

forests would have negative effects on the richness and diversity of epiphytic bryophytes and lichens.

METHODS

Study site

The study was performed in Montes de Toledo, central Spain (4°28'W, 39°32'N) (Fig. 1), where the climate is subhumid continental Mediterranean with a mean annual temperature of 13.2°C and annual precipitation of 716 mm. This area is characterized by an intense drought period during the summer (AEMET 2011). The landscape comprises Mediterranean forests fragments surrounded by different human-modified matrices, including pine plantations, shrublands (*Cistus ladanifer* and *Erica australis*), pastures, stony slopes, and crops (Perea and Perea 2008). Well-preserved forest fragments are located on unproductive stony slopes, whereas cultivated open woodlands are located in lowland areas. In the study area, forest loss and fragmentation is attributable mainly to logging activities related to charcoal production, cattle pastures, or farmlands (Perea and Perea 2008).

Experimental design and sampling

Orthophotos were taken in 2011 (provided by Centro Nacional de Información Geográfica) and used to select forest fragments with the following features: (1) fragments dominated by holm oak (*Quercus ilex* subsp. *ballota*), thereby avoiding possible changes in epiphytic communities related to different host tree species; and (2) fragments with tree cover >70%, thereby ensuring their well preserved and mature status, as well as minimizing the effects of differences in forest structure. Finally, we selected 40 fragments with different sizes and shapes (Fig. 1), which were surrounded by a wide range of matrices.

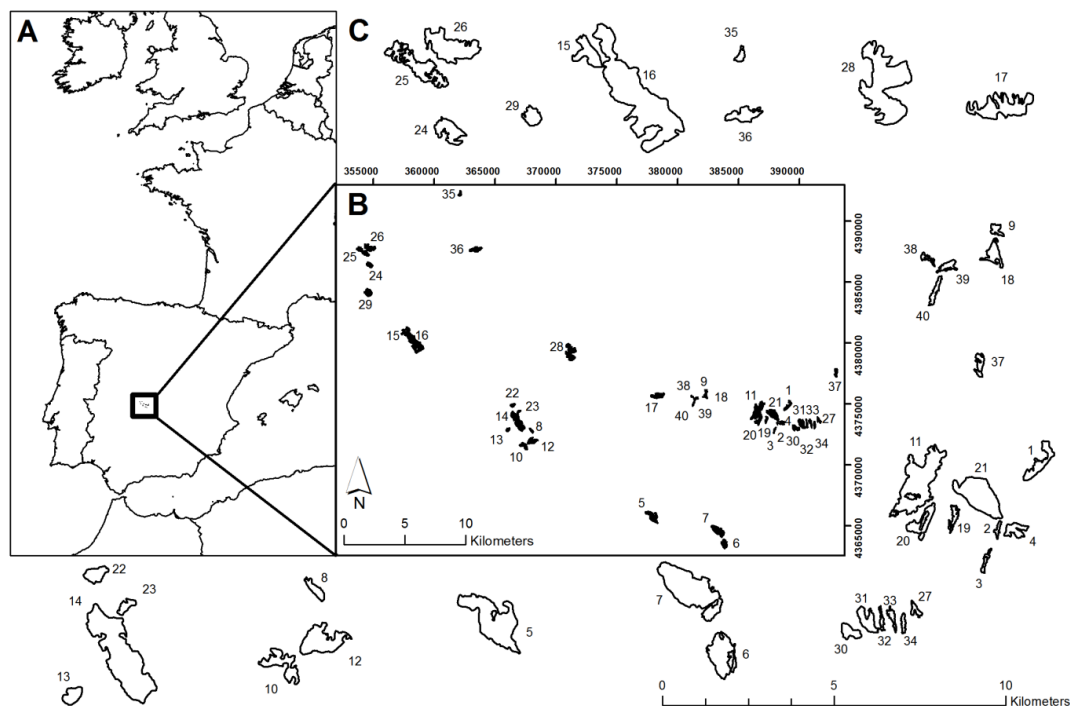


Figure 1. Geographic location of the study site in southwest Europe. Panel A: the location of the fragmented landscape in southwest Europe. Panel B: spatial relationships among the 40 fragments sampled. Panel C: enlargements of the 40 fragments surround the figure (all at the same scale) to illustrate their sizes and shapes (their spatial relationships are not maintained).

We randomly established 10×10 m plots inside each fragment. A species-area curve was calculated using EstimateS 8.2 (Colwell 2009) based on data obtained in previous surveys (Aragón, unpublished data) to determine the effective number of plots per fragment that would reliably obtain at least 90% of the species in each fragment. Consequently, the number of plots ranged from 4–8, proportionally to the fragment size. We selected four trees, always holm oaks, in each plot: two trees with the greatest and lowest diameter at breast height (dbh), and two trees with the closest dbh to the mean dbh in the plot, in order to capture all the variability in the epiphytic community at the plot level (Belinchón et al 2007). The dbh of the selected trees ranged between 18–28 cm to avoid community changes associated with younger and older trees because the dbh is a very important factor for explaining the epiphytic

community configuration (Aragón et al 2010b). In total, 744 trees (holm oaks) were surveyed.

In order to determine the occurrence of epiphytic lichens and bryophytes, we established four 20 × 30 cm grids on the bark of each selected tree: at breast height, at the tree base, and on the north and south aspects (2976 grids in total). We estimated the cover of each species (%) for every sample grid. For species identification we used mainly Aragón et al (2001), Casas et al (2006, 2009) and Smith et al (2009). For the nomenclature of the species we followed mainly Casas et al (2006, 2009) for bryophytes, and MycoBank, Ekman et al (2014) and Otálora et al (2014) for lichens. The total species richness was defined as the total number of species found at each level considered (plot and fragment). We also calculated the mean estimated cover for each species (% of the site area) in the four sites sampled on each tree, before determining the total species cover per tree (as the percentage of the grids). The same method was employed to determine the species cover at the plot and fragment levels. Simpson's diversity index was used as a measure of species diversity for a given spatial unit (plot or fragment) using: $1/S = (\sum p_i^2)$, where p_i is the proportion of abundance for species (Feinsinger 2001). This index represents the number of species in a community if the species are equally distributed. The Bray-Curtis similarity index (Bray and Curtis 1957) was also calculated as an inverse measurement of the β -diversity, which is defined as the species turnover between the sample units in an upper sample unit, i.e., between trees within a plot or plots within a fragment in the present study.

Environmental variables

Environmental variables were considered at both the fragment and plot levels (Supplementary material Table S1).

At the fragment level, we quantified the fragment size (surface), shape, and surrounding matrix. All of the forest fragments were digitized and their sizes were measured using the GIS package ArcMap 10.0 (ESRI Inc, USA). We used the shape index (SI), which was initially formulated by Patton (1975) and amended by Laurance and Yensen (1991). Higher SI values indicate greater irregularity in the fragments. We considered three different surrounding matrices: (1) pine plantations (PM), which could be unfavorable for dispersal of lichen propagules (Johansson and Ehrlén 2003; Belinchón et al 2009); (2) a high-contrast matrix (HCM) that comprised crops, stony slopes, or shrubland, which is unfavorable for microclimatic forest conditions (Fahrig 2001); and (3) a low-contrast matrix (LCM) that consisted in open forests, such as dehesas (open woodlands with a very low tree density), which is less unfavorable for dispersal and microclimatic forest conditions (Murcia 1995; Boudreault et al 2012). Next, we estimated the percentage of the perimeter around each fragment covered by PM, HCM, or LCM.

At the plot level, we measured the diameter of all trees to determine the mean plot dbh, the number of trees, altitude (m.a.s.l.), slope ($^{\circ}$), aspect (cosine transformed), shrubland layer (%), and the canopy openness. Two hemispherical photographs were used to quantify the canopy openness with a horizontally leveled digital camera (Canon EOS 5D) aimed at the zenith, where we employed a fish-eye lens with a 180° field of view (SIGMA 8mm F3.5 ex DG Fisheye). The photographs were analyzed with Gap Light Analyzer v2.0 (GLA v2) (<http://www.rem.sfu.ca/forestry/index.htm>), which estimates the canopy openness as a percentage. The value used comprised the average of the two values per plot.

Data analysis

We modeled the effects of environmental variables on the community traits (total species richness, lichen richness, bryophyte richness, inverse Simpson's diversity index, and Bray-Curtis similarity index) at the plot scale by fitting generalized linear

mixed models (GLMMs) with the Laplace approximation (Bolker et al 2009). We also tested the effects of the environmental variables on the abundance and presence of 40 species, which were selected based on their abundance and their representativeness in epiphytic forest communities (nitrophilous species were not considered). This modeling approach was selected because our data had an unbalanced and hierarchical structure where plots were nested within fragments. A hierarchical data structure implies that there is a correlation between data points at different scales. This correlation inflates the degrees of freedom, thereby increasing the likelihood of a type I error. To overcome these problems, we analyzed the data using a multilevel approach that considered independent variables as explanatory (fixed factors) and fragments as random factors by applying mixed modeling (Verbeke and Molenberghs 1997). To avoid multicollinearity problems, the variable “number of trees per plot” was excluded from the data analysis because it was correlated with the “mean plot dbh” (Spearman’s coefficient > 0.7).

At the fragment level, we analyzed the environmental variables that might affect the richness, diversity, and species similarity at the landscape scale. We also analyzed the influence of these variables on the presence and abundance of each selected species. Thus, we fitted generalized linear models (GLMs) (McCullagh and Nelder 1989), where the predictive variables comprised the fragment size, shape, percentages of HCM and PM, and the interaction between the fragment size and HCM.

For each response variable, we assumed the most appropriate error distribution, i.e., Gaussian, Poisson, quasi-Poisson, or binomial, and applied different link functions, i.e., “identity”, “log”, “log”, and “logit”, respectively. The adequacy of the models was confirmed by examining the residuals and the predicted values, which were normally distributed, or approximately normally distributed in some cases, but without clear patterns (Zuur et al 2009). The confidence levels (95%) of the predictive environmental variables were obtained from the GLMs and GLMMs (Zuur et al 2009). All of the analyses were conducted with the statistical software R v.2.15.2

(R Core Team 2012) using the lme4 package (Bates et al 2013) and the GLM function (glm []).

RESULTS

Characterization of the forest fragments

The fragment size ranged between 1.5 and 97 ha, altitude varied between 680 and 1208 m.a.s.l., the tree density was 7–28 trees per plot, and the plot mean dbh was 13–22.4 cm (Supplementary material Table S1). The SI values were 1.16–4.07, which corresponded to the highest values in the most irregular fragments. Both LCM and HCM were equally dominant in the region, whereas PM represented only 10% of the overall area sampled.

Community response

In total, 117 species were identified: 93 lichens, 20 mosses, and four liverworts (Supplementary Appendix 1). The total number of species per fragment varied from 17–73 (Supplementary material Table S1), with an average of 43.01 (SD=±10.75). The most common species were *Cladonia fimbriata*, *Parmelia tiliacea*, *Phlyctis argena*, *Physconia venusta*, *Homalothecioum sericeum* and *Hypnum cupressiforme*, which were present in all of the fragments and in over 150 plots (Supplementary Appendix 1). By contrast, 11 species were present in only one plot (e.g., *Micarea prasina*, *Mycobilimbia parvilobulosa* and *Hedwigia ciliata*).

The results obtained with the mixed models showed that fragment size and the HCM levels were the most important factors that contributed to the epiphytic communities (Table 1). The fragment size and the percentage of HCM had positive effects on the total and lichen richness and diversity, whereas the interaction between them had the opposite effect (Table 1). Species richness and diversity reached the

Table 1. Summary of the generalized linear models at the fragment level and the generalized linear mixed models at the plot level, which examined the effects of the environmental factors on the community traits. Estimate: coefficient of the variable in the model; SE: standard error; FS: fragment size; SI: shape index; HCM: high-contrast matrix (%); PM: pine matrix (%); dbh plot: the mean diameter at breast height of all the trees in a plot.

Response variables	Plot level			Fragment level		
A) Total richness						
Explanatory variables	Estimate	SE	p	Estimate	SE	p
FS	0.260	0.067	< 0.001	0.545	0.099	< 0.001
SI	-0.006	1.657	0.997	-0.650	2.243	0.772
HCM	0.109	0.039	0.005	0.162	0.054	0.003
PM	0.009	0.056	0.869	-0.045	0.078	0.565
FSxHCM	-0.004	0.002	0.029	-0.007	0.003	0.011
altitude	-0.012	0.007	0.094			
aspect	-0.609	0.859	0.478			
shrubland cover	-0.010	0.018	0.558			
canopy openness	-0.003	0.047	0.944			
dbh plot	-0.130	0.118	0.271			
B) Lichen richness						
Explanatory variables	Estimate	SE	p	Estimate	SE	p
FS	0.204	0.055	< 0.001	0.471	0.082	< 0.001
SI	-0.032	1.368	0.982	-0.413	1.854	0.824
HCM	0.071	0.032	0.026	0.130	0.044	0.003
PM	-0.037	0.046	0.423	-0.084	0.065	0.192
FSxHCM	-0.003	0.002	0.041	-0.006	0.002	0.005
altitude	-0.009	0.006	0.151			
aspect	-0.340	0.758	0.654			
shrubland cover	-0.005	0.016	0.740			
canopy openness	0.009	0.042	0.828			
dbh plot	-0.122	0.105	0.247			
C) Bryophyte richness						
Explanatory variables	Estimate	SE	p	Estimate	SE	p
FS	0.055	0.019	0.004	0.074	0.026	0.004
SI	0.022	0.477	0.963	-0.237	0.585	0.686
HCM	0.038	0.011	0.001	0.033	0.014	0.020
PM	0.047	0.016	0.003	0.039	0.020	0.054
FSxHCM	-0.001	0.001	0.078	-0.001	0.001	0.349
altitude	-0.003	0.002	0.212			
aspect	-0.147	0.333	0.659			
shrubland cover	-0.011	0.007	0.136			
canopy openness	-0.001	0.019	0.964			
dbh plot	-0.004	0.049	0.930			

Table 1. Continued.

D) Inverse Simpson Index (diversity)						
Explanatory variables	Estimate	SE	p	Estimate	SE	p
FS	0.093	0.026	< 0.001	0.140	0.031	< 0.001
SI	-0.601	0.663	0.365	-1.720	0.709	0.015
HCM	0.044	0.016	0.005	0.059	0.017	< 0.001
PM	0.028	0.022	0.204	0.026	0.025	0.301
FSxHCM	-0.002	0.001	0.006	-0.003	0.001	0.001
altitude	-0.003	0.003	0.344			
aspect	0.550	0.451	0.222			
shrubland cover	0.023	0.010	0.018			
canopy openness	0.064	0.026	0.013			
dbh plot	0.037	0.066	0.570			
E) Bray-Curtis (similarity)						
Explanatory variables	Estimate	SE	p	Estimate	SE	p
FS	-0.211	0.067	0.002	-0.179	0.059	0.003
SI	0.062	1.681	0.970	-1.067	1.346	0.428
HCM	-0.079	0.039	0.045	-0.087	0.032	0.007
PM	-0.066	0.057	0.247	-0.058	0.047	0.217
FSxHCM	0.003	0.002	0.077	0.003	0.002	0.090
altitude	-0.008	0.008	0.353			
aspect	-0.024	1.243	0.984			
shrubland cover	0.000	0.028	0.986			
canopy openness	-0.039	0.073	0.590			
dbh plot	-0.013	0.185	0.943			

highest values in the biggest fragments (Supplementary material Table S1), but relatively high values were also recorded in small fragments mainly surrounded by HCM (Figures 2 and 3). Conversely, the richness and diversity undergo a relatively intense decrease in the biggest fragments when these are surrounded by a high percentage of HCM (Figures 2 and 3). In the case of bryophyte richness, PM also had a positive effect, as well as the fragment size and HCM amount (Table 1). The species diversity also depended on the canopy openness and shrubland cover at the plot scale, with which it had a positive relationship, whereas it had a negative relationship with fragment shape at the fragment scale (Table 1). Furthermore, the similarity in the species composition was higher in small fragments but lower in those surrounded by higher percentages of HCM (Table 1).

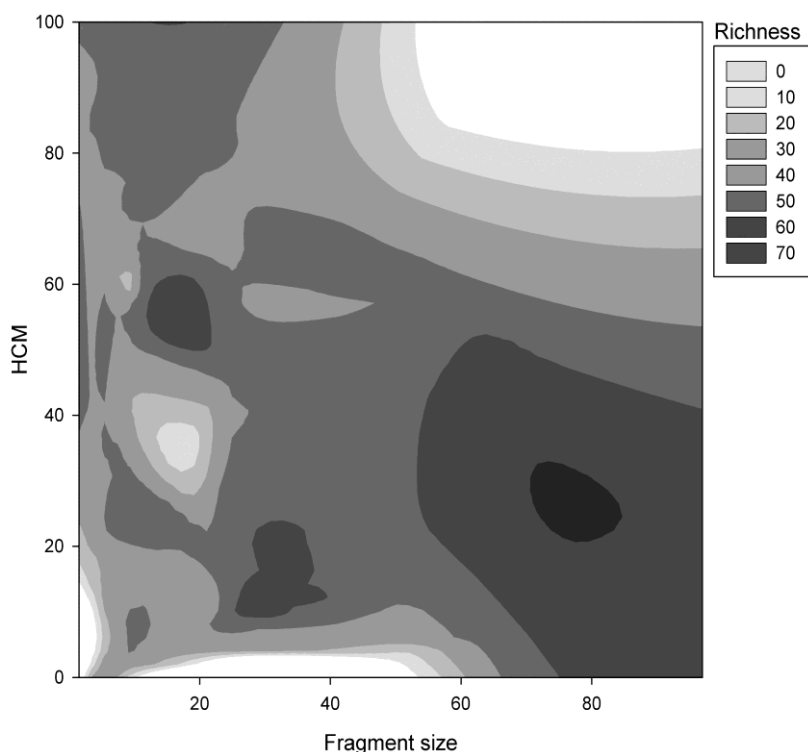


Figure 2. Distribution of species richness along the interaction between the fragment size and the high-contrast matrix (HCM) percentage contacting each fragment.

Species response

Forest loss and fragmentation had negative effects on the presence and abundance of several species. In general, the most demanding species (e.g., cyanolichens and squamulose species) were favored by large and regular fragments. In contrast to our hypothesis, HCM amount had positive effects on the abundance and presence of some lichens and bryophytes (e.g., *Lepraria incana*, *Nephroma laevigatum*, and *Fabronia pusilla*) (Tables 2, 3, and 4). At the fragment level (Table 2), FS was the most relevant factor, exerting always a positive influence on the presence and abundance of a great number of species, especially on cyanolichens (7 out of 11 cyanolichens studied). Both kinds of matrices also had a remarkable influence over the species, but the HCM always in a positive way. Fragment shape also performed the community by determining the abundance and presence of 10 out of 40, negatively in most of the

cases. At the plot level, it is noteworthy that the presence of species was mostly affected by fragment scale variables (fragment size, shape and matrix) (Table 3), whereas their abundances were largely modulated by variables at the plot scale (=microclimate) (Table 4). In this sense, lichen and bryophyte species were greatly affected in different ways by all the plot scale variables related to the forest structure (canopy cover or mean tree diameter), altitude, and aspect (Tables 3 and 4). However, after evaluating the positive or negative effects of coverage and tree diameter, we found that the range of variation was very low (10–30% for canopy openness and 13–22 cm for tree diameter) because we only considered mature forests with high coverage. In addition, some species (e.g., *Hypnum cupressiforme*, *Ochrolechia balcanica*) were only affected by the plot level variables, whereas others (*Lepraria incana* and *Pertusaria pertusa*) were influenced only by fragment scale variables (Tables 3 and 4).

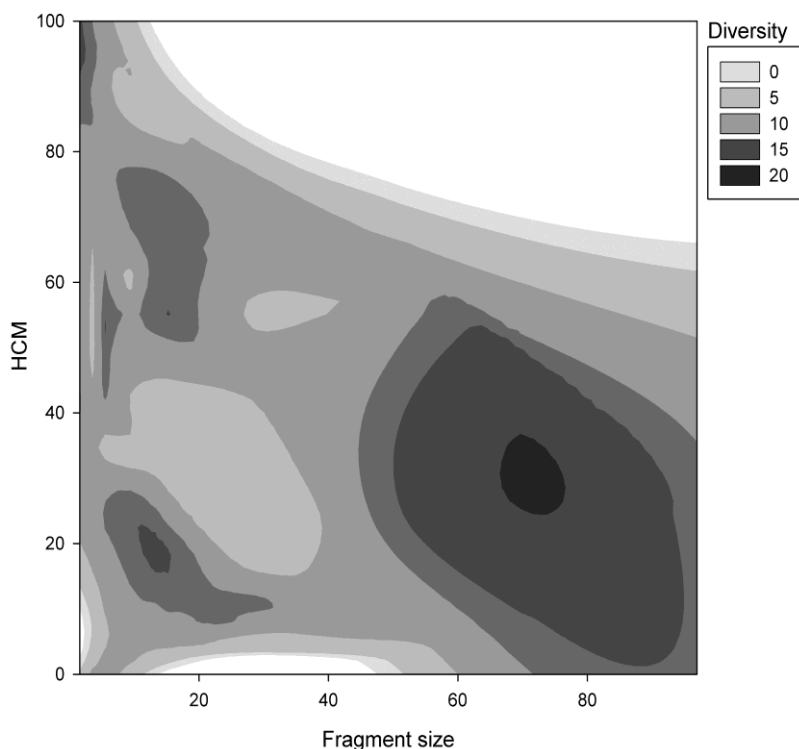


Figure 3. Distribution of species diversity along the interaction between the fragment size and the high-contrast matrix (HCM) percentage contacting each fragment.

Table 2. Summary of the generalized linear models at the fragment level based on the presence and abundance of 40 species. Only significant estimates are shown. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$. FS: fragment size; SI: shape index; HCM: high-contrast matrix (%); PM: pine matrix (%); +: cyanolichens; •: liverworts.

	Fragment level									
	Presence					Abundance				
	FS	SI	HCM	PM	FSxHCM	FS	SI	HCM	PM	FSxHCM
<u>Lichens</u>										
Anaptychia ciliaris	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bacidia rubella	-	-	-	-0.113*	-	0.094*	-	-	-	-
Cladonia coniocraea	0.092**	-	-	-	-	0.074*	-	-	-	-
Cladonia fimbriata	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+Collema furfuraceum	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+Collema subflaccidum	-	-	-	-	-	-	-2.043*	-	-	-
+Collema subnigrescens	-	-	-	-	-	-	-1.566**	-	-	-
+Degelia plumbea	0.130**	-	-	-	-	0.075***	-	-	-0.185*	-
+Dendriscoaulon umhausense	-	-	-	-0.061*	-	0.047*	-	-	-	-
+Fuscopannaria ignobilis	-	-	-	-	-	0.048**	-	-	-	-
+Fuscopannaria mediterranea	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+Fuscopannaria olivacea	0.107*	-	-	-	-	0.096***	-	-	-0.119*	-
Lepraria incana	0.112**	-	0.037*	0.047*	-	0.058**	-1.740*	-	0.031*	-
+Leptogium furfuraceum	0.208*	-6.993*	-	-	-	0.280***	-7.821***	0.161*	-	-0.004**
+Leptogium lichenoides	-	-	-	0.076**	-	-	-	-	-	-
+Nephroma laevigatum	-	-	0.044*	-	-	0.028*	-	-	-	-
Normandina pulchella	0.072*	-	-	-	-	0.057*	-	-	-	-
Ochrolechia balcanica	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ochrolechia pallescens	-	-	-	-0.132*	-	-	-	-	-	-
Parmelia sulcata	-	-	-	-0.090**	-	-	-1.420***	-	-0.037*	-
Parmotrema chinense	-	1.528*	-	-	-	-	-	-	-	-
Pertusaria albescens	-	-	-	-	-	-	-0.829**	-	-0.025*	-
Pertusaria amara	-	-	-	-	-	0.077**	-2.068*	-	-	-
Pertusaria flavida	-	-	-	-	-	-	-3.200***	-	-	-

Table 2. Continued.

	FS	SI	HCM	PM	FSxHCM	FS	SI	HCM	PM	FSxHCM
<i>Pertusaria hemisphaerica</i>	-	-	-	-	-	0.033*	-	0.019*	-	-
<i>Pertusaria pertusa</i>	0.123***	-	0.043*	-0.109*	-0.003**	0.122***	-	0.044***	-0.114**	-0.004***
<i>Phlyctis argena</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Physconia venusta</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Waynea adscendens</i>	0.133**	-	0.058**	0.067*	-0.002*	0.046**	-	0.045***	0.035**	-0.001*
<i>Waynea stoechadiana</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<u>Bryophytes</u>										
<i>Antitrichia californica</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Fabronia pusilla</i>	-	-	0.055**	-	-	-	-	0.030**	0.052***	-
• <i>Frullania dilatata</i>	0.362*	-	0.062*	-	-	-	-	-	-	-
<i>Hypnum cupressiforme</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Leucodon sciuroides</i>	-	-	-	-	-	0.035*	-	-	-	-
<i>Orthotrichum affine</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Orthotrichum diaphanum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Orthotrichum lyellii</i>	-	-	-	-	-	-	0.752**	-	0.020*	-
<i>Pterygynandrum filiforme</i>	-	-	-	-	-	-	-	0.023*	-	-
<i>Ulota crispa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Table 3. Summary of the generalized linear mixed models at the plot level based on the presence of 40 species. Only significant estimates are shown. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$. FS: fragment size; SI: shape index; HCM: high-contrast matrix (%); PM: pine matrix (%); +: cyanolichens; •: liverworts; canopy op: canopy openness; dbh plot: the mean diameter at breast height of all the trees in a plot.

	Plot level presence									
	Fragment level predictors					Plot level predictors				
	FS	SI	HCM	PM	FSxHCM	altitude	aspect	shrubland	canopy op	dbh plot
<u>Lichens</u>										
Anaptychia ciliaris	-	-	0.034*	-	-0.002*	-	-1.455*	-	0.164***	0.287**
Bacidia rubella	0.161**	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cladonia coniocraea	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cladonia fimbriata	-	-	-	-	-	-	1.301*	-	-	-
+Collema furfuraceum	-	-	-	-	-	-	-	-0.028	-	-
+Collema subflaccidum	0.099***	-	-	-	-	-	-1.950**	-	-	0.225*
+Collema subnigrescens	-	-	-	0.044**	-	-	-1.036*	-	-	0.129*
+Degelia plumbea	0.168*	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+Dendriscoaulon umhausense	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+Fuscopannaria ignobilis	0.089*	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+Fuscopannaria mediterranea	0.087**	-	0.050**	-	-0.002*	-0.008*	-1.186*	-	-	-
+Fuscopannaria olivacea	0.075*	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lepraria incana	0.039*	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+Leptogium furfuraceum	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+Leptogium lichenoides	-	-	-	0.093***	-	-	-	0.026*	-	-
+Nephroma laevigatum	0.147*	-	0.054*	-	-	-	-	-	-	-
Normandina pulchella	0.073*	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ochrolechia balcanica	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ochrolechia pallescens	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Parmelia sulcata	-	-	-	-0.048**	-	-0.005*	-	-	-	-
Parmotrema chinense	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pertusaria albescens	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pertusaria amara	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pertusaria flavida	-	-	-	-	-	-0.008*	-	-	-	-

Table 3. Continued.

	FS	SI	HCM	PM	FSxHCM	altitude	aspect	shrubland	canopy op	dbh plot
<i>Pertusaria hemisphaerica</i>										
<i>Pertusaria pertusa</i>	0.108***	-	0.032*	-0.121*	-0.003**	-	-	-	-	-
<i>Phlyctis argena</i>										
<i>Physconia venusta</i>										
<i>Waynea adscendens</i>	0.193**	-	0.119**	-	-	-	-	-	-	-
<i>Waynea stoechadiana</i>	0.101*	-	-	-	-	-	-	-	-	0.438**
<u>Bryophytes</u>										
<i>Antitrichia californica</i>	0.051*	-	-	-	-0.001*	-	-	-	-	-
<i>Fabronia pusilla</i>	-	-	0.062***	0.099***	-	-	-	-	-	-
• <i>Frullania dilatata</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Hypnum cupressiforme</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Leucodon sciuroides</i>	0.050*	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Orthotrichum affine</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Orthotrichum diaphanum</i>	-	-	-	0.050*	-	-	-	-	-	-
<i>Orthotrichum lyellii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pterygynandrum filiforme</i>	-	-	0.043***	-	-	-0.008**	-	-	-	-
<i>Ulota crispa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Table 4. Summary of the generalized linear mixed models at the plot level based on the abundance of 40 species. Only significant estimates are shown. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$. FS: fragment size; SI: shape index; HCM: high-contrast matrix (%); PM: pine matrix (%); +: cyanolichens; •: liverworts; canopy op: canopy openness; dbh plot: the mean diameter at breast height of all the trees in a plot.

	Plot level abundance									
	Fragment level predictors					Plot level predictors				
	FS	SI	HCM	PM	FSxHCM	altitude	aspect	shrubland	canopy op	dbh plot
<u>Lichens</u>										
Anaptychia ciliaris	-	-	-	-	-	-	-1.748***	-	0.247***	-
Bacidia rubella	-	-	-	-	-	-	-	-	0.033*	0.179***
Cladonia coniocraea	-	-	-	-	-	-	-	-	-0.132**	-0.641**
Cladonia fimbriata	-	-	-	-	-0.001*	-	0.576***	0.006***	-	-
+Collema furfuraceum	0.050*	-	0.030*	-	-	-0.006***	-	-0.007**	-0.024***	-
+Collema subflaccidum	-	-	-	-	-	-0.006*	-0.434**	-	-0.046***	0.033*
+Collema subnigrescens	-	-2.457*	-	-	-	-	-0.685***	-	0.058***	0.061***
+Degelia plumbea	-	-	-	-	-	0.010***	-	-	-	-
+D. umhausense	-	-	-	-	-	0.008**	-1.645***	-	-0.083***	-
+Fuscopannaria ignobilis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.058***
+Fuscopannaria mediterranea	-	-	-	-	-	-	0.425***	-0.003*	-0.024*	-
+Fuscopannaria olivacea	-	-	-	-	-	0.030***	-1.880***	-	-0.224***	0.192***
Lepraria incana	0.064*	-	-	0.046*	-	-	-	-	-	-
+Leptogium furfuraceum	-	-	-	-	-	-	-2.111*	-	0.179***	0.280***
+Leptogium lichenoides	-	-	-	0.098*	-	-	-0.933***	-	-	0.158***
+Nephroma laevigatum	0.072*	-	-	-	-	-0.0017*	0.241***	-	-0.003*	-0.026***
Normandina pulchella	-	-	-	-	-	-	1.028**	0.043**	-	-0.210*
Ochrolechia balcanica	-	-	-	-	-	-	-1.541***	-0.022***	-	0.195***
Ochrolechia pallescens	-	-	-	-	-	-	-1.196*	-0.039*	0.053**	-
Parmelia sulcata	-	-	-	-0.060***	-	-	0.380***	0.009***	0.048***	-0.067***
Parmotrema chinense	-	-	-	-	-	-0.021*	-	-	-	-0.715***
Pertusaria albescens	-	-	-	-0.033*	-	0.002**	-0.111*	0.004***	-	-
Pertusaria amara	-	-	-	-	-	-	-	-0.058***	0.056***	-0.049**
Pertusaria flavida	-	-	-	-	-	-	1.265***	-	-	-0.108***

Table 4. Continued.

	FS	SI	HCM	PM	FSxHCM	altitude	aspect	shrubland	canopy op	dbh plot
<i>Pertusaria hemisphaerica</i>	0.060***	-	0.038***	-	-0.001*	-0.008***	-0.936***	-	-	-0.058***
<i>Pertusaria pertusa</i>	0.180**	-	0.069*	-	-0.005*	-	-	-	-	-
<i>Phlyctis argena</i>	-	-	-	-	-	-0.003***	-0.130***	-0.003***	-	-0.019***
<i>Physconia venusta</i>	-	-	-	-	-	-	0.068**	0.003***	-0.007***	0.007*
<i>Waynea adscendens</i>	0.119**	-	0.086***	0.079**	-0.002*	-	-	-0.014***	-0.012**	-
<i>Waynea stoechadiana</i>	-	-	-	-	-	0.030***	-	-	-	0.176***
<u>Bryophytes</u>										
<i>Antitrichia californica</i>	0.033*	-	-	-	-0.001**	-0.003***	-0.232***	-0.007***	-0.008***	0.021***
<i>Fabronia pusilla</i>	-	-	0.080**	0.084*	-	-	-0.489***	0.021***	-0.018***	0.024*
• <i>Frullania dilatata</i>	-	-	-	-	-	-0.003***	-0.111**	-	-0.022***	-0.047***
<i>Hypnum cupressiforme</i>	-	-	-	-	-	0.004***	0.060*	-0.003***	-0.013***	-
<i>Leucodon sciuroides</i>	-	-	0.038*	-	-	-0.004***	0.305**	-	-	-
<i>Orthotrichum affine</i>	-	-	-	0.046*	-	-0.006***	0.293**	-	0.027***	-0.032*
<i>Orthotrichum diaphanum</i>	-	1.433*	-	0.056*	-	-0.012***	-	-	-	-
<i>Orthotrichum lyellii</i>	-	1.051**	0.015*	0.031**	-	-0.002***	-	-	-	-
<i>Pterygandrum filiforme</i>	-	-	0.040**	-	-	-0.004**	0.288**	-	-	-
<i>Ulota crispa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-0.089**	-

DISCUSSION

Our results demonstrate the influence of Mediterranean forest loss and fragmentation on their epiphytic communities. The fragment size and shape, and the quality of the surrounding matrix were key factors that affected epiphytic richness and diversity in this fragmented landscape. Moreover, a high number of environmental factors influenced the responses of specific species. Previous studies have determined the importance of microhabitat characteristics for epiphytic communities (Gignac and Dale 2005; Hylander and Hedderson 2007; Aragón et al 2010b; Oliveira et al 2011), but after we minimized the variation in forest structure and management, the forest loss and fragmentation process still had clear effects on epiphytic communities.

Large forest fragments had the highest epiphytic richness and diversity (lichens and bryophytes), which might be related to the greater habitat availability and heterogeneity, as well as the presence of a “core area” with a greater surface (Gignac and Dale 2005; Jonsson and Jonsell 1999; Löhmus et al 2007). Our results are consistent with those obtained in previous studies (Kruys and Jonsson 1997; Moen and Jonsson 2003; Zartman 2003; Pharo et al 2004; Gignac and Dale 2005; Löbel et al 2006; Alvarenga and Pôrto 2007; Alvarenga et al 2009; Oliveira et al 2011), but our study is the first to be conducted in Mediterranean climatic conditions. In a previous study of 306 Mediterranean oak forest fragments covering a greater area than in our study site, Aragón et al (2010b) detected a non-significant relationship between fragment size and epiphyte communities, but only the variables related to forest quality and management had significant effects. However, this study included a high level of environmental heterogeneity, and thus the effect of forest loss and fragmentation was probably obscured.

Moreover, some previous studies have shown that greater habitat availability is associated with a higher number of species, simply by pure chance (Coleman 1981; Coleman et al 1982; Carnicer et al 2007, 2008; Alexander et al 2011; Honkanen et al 2010; Kraft et al 2011). Random chance implies that more elements will be found in

a larger area than a smaller area, so randomness might play an important role when considering habitat size.

Higher species richness is also related to the presence of forest specialist species in larger fragments, presumably due to their high water demands, sensitivity to direct sunlight, and limited dispersal (Söderström 1988; Sillett et al 2000). Thus, the surface of the “core area” might play an important role due to the lifestyles of these organisms (poikilohydric and poikilothermic). Inside the core area, the environmental conditions are optimal for the development of shaded species, which are highly sensitive to excessive irradiation and they are also highly dependent on water availability (Lange et al 1986; Gauslaa and Solhaug 1996; Gauslaa and Coxson 2011). In general, a reduction of the core area in small fragments is associated with a loss of habitat for species that require forest interior conditions (Baldwin and Bradfield 2005; Crouzeilles et al 2014). In the present study, the abundance of species with higher water demands and greater sensitivity to direct solar radiation (e.g., *Collema subflaccidum*, *Pectenia plumbea*, *Fuscopannaria ignobilis*, *F. olivacea* and *Leucodon sciuroides*) was much lower in smaller fragments that lacked a core area. Therefore, the loss of higher humidity conditions and shade, which are linked to losses of the forest “core area”, lead to the disappearance of Mediterranean forest specialists, as well as an increase in the similarity of taxa that can be found in the different environments within each fragment.

The species richness and similarity were not affected significantly by the forest shape, but the epiphytic diversity was lower in more irregular fragments (Table 1). The fragment shape determines the perimeter/area relationship, and thus it can be interpreted as the incidence of the edge effect (Didham and Ewers 2012). Previous studies have demonstrated the relationships between more irregular fragments and different groups of organisms. For example, more irregular fragments are associated with lower amphibian and reptile richness (Cabrera-Guzmán and Reynoso 2012), as well as changes in the community composition of web-producing spiders (Baldissera et al 2012), while several studies have demonstrated an association with the increased

richness of understory herbs (Honnay et al 1999; De Sanctis et al 2010; Lomba et al 2011). However, the larger fragments in our landscape had higher irregularity values, and thus although there was an edge effect, the large fragments facilitated the existence of the core area. Thus, the negative effect of irregularity (forest edge) on epiphytic communities could be mitigated by the fragment size due to the presence of more shade and a more humid interior environment.

The negative effect of fragment irregularity on the species diversity appears to act via the edge effect according to previous analyses of forest species (Yamaura et al 2008). This was also the case for some interior forest lichens in the present study (Table 2, 3, and 4; e.g., *Collema subnigrescens*, *Lepraria incana*, *Leptogium furfuraceum*, and *Pertusaria amara*), which were negatively affected by the higher edge effect in the more irregular fragments. Thus, the replacement of these typical forest species by generalist species is to be expected in more irregular fragments. Few studies have analyzed the relationship between epiphyte communities and forest fragment shape but, in agreement with our results, previous studies of the edge effect in Mediterranean epiphyte communities have highlighted the major influence of microclimatic gradients perpendicular to the edge, which modify the diversity and community composition, but not the richness (Belinchón et al 2007; Brunialti et al 2013). Conversely, at the plot level, the diversity was not affected by the fragment shape, but was additionally determined by two contrasting factors: the shrubland cover, which breaks the wind flow and provides shady and humid conditions (Aragón et al 2010a), and a higher canopy openness, which allows that more solar radiation reaches the trunks and generates a higher water evaporation (Machado and Reich 1999). Regarding the wide heterogeneity of requirements of the whole community (see Results section), the creation of different microhabitats by antagonistic conditions inside the fragments could be a key factor for the increase of diversity at the plot level (Jonsson and Jonsell 1999; Gignac and Dale 2005).

The amount of HCM surrounding the fragments clearly had a positive effect on the total species richness, and on the richness of lichens and bryophytes separately

(Table 1). Similarly, the diversity and community similarity were also higher. In contrast to our expectation and to the “matrix structural similarity” hypothesis (Prevedello and Vieira 2010), the HCM appeared to have some beneficial effects on the biodiversity parameters, but only in certain cases, because its interaction with fragment size had the opposite effects on lichen richness and diversity.

The quality and spatial configuration of the matrix can enhance or mitigate the effects of forest loss and fragmentation in a pre-existing community, as reported previously (Murphy and Lovett-Doust 2004, Kupfer et al 2006). The matrix can influence the inhabitants of a forest fragment in three ways: resource availability, allowing or preventing dispersal of organisms, and modifying the microclimatic forest conditions (Driscoll et al 2013). A HCM does not improve the resource availability for epiphytic species because most are not capable of living there. In addition, this type of matrix does not mitigate the harshness of the edge conditions because of its structural configuration. Its structure lacks trees or even woody vegetation in most cases, thereby modifying the characteristic temperature, humidity, and light conditions in the forest core (Murcia 1995; Berges et al 2013; Driscoll et al 2013). However, HCM that comprises crops, stone slopes, or shrubland can have a positive effect on dispersal because these land types do not present a barrier that prevents the arrival of new propagules. Previous studies by Johansson and Ehrlén (2003) and Belinchón et al (2009) showed that pine plantations surrounding forest fragments act as filters for lichen species, thereby hindering the establishment of new individuals. Finally, the interaction between fragment size and HCM can be interpreted as a beneficial effect of matrix, which is more important when the fragment size is small because the core area is also much smaller, where this allows the arrival of new propagules, thereby significantly enhancing the richness and diversity of these small forest fragments (darkest areas in the upper left part of Figures 2 and 3). However, when the forest fragments are larger, the core area size seems to play a more important role than dispersal processes for lichens, whereas higher percentages of HCM has the opposite effect by reducing the core area and negatively affecting the richness and diversity of epiphytic communities (upper right area in Figures 2 and 3).

This result strongly contrasts with the previous findings on the effect of matrix on biodiversity patterns (Prevedello and Vieira 2010). This study showed general acceptance of the “structural similarity hypothesis” for the majority of groups of organisms, which means the more the structural contrast between the matrix and the habitat fragments, the less the richness and diversity of the communities inhabiting the fragment. But it has to be noted that this fact has been verified mostly in animals, which are able to move by themselves along the landscape and choose the “less unfavorable” matrix, while the forest epiphytes depend mostly on wind, and on the structures present along the matrix, which modulate the wind flow, to reach new localities. In the case of plants, a contrasting matrix has in general a negative effect over forest species (Murphy and Lovett-Doust 2004), but the effect of different types of matrix and its quality has been poorly explored (Jules and Shahani 2003; Prevedello and Vieira 2010). In the few cases it was tested (Mesquita et al 1999; Nascimento et al 2006), the structural similarity hypothesis was confirmed. For all those reasons, this positive effect of a greater amount of HCM can be considered as very new and can change the thinking about the matrix. It puts the dispersal process as a key factor controlling the species richness and diversity in Mediterranean fragmented forests, being modulated by the configuration of the matrix. Further studies are needed to go more deeply in the knowledge of the process, in two ways: first, the same hypothesis can be tested in other regions or with other groups of wind-dispersed organisms (e.g. fungi or pteridophytes), and second, future studies should take into account dispersal at landscape scale considering variables like fragment connectivity or total remnant habitat amount around the fragments.

Moreover, the bryophyte richness increased in those forest fragments surrounded by PM and HCM. The positive influence of PM could be related to two different causes: firstly, PM could allow the establishment of propagules therein, enlarging the effective size of the fragment; secondly, PM might increase the structural forest complexity, providing any microclimatic advantage for bryophyte species. It has been documented that, at least more than a half of the bryophyte species recorded in this study, are able to grow on pine bark (Puche et al 2006). Similarly,

Pharo et al (2004) and Pharo and Lindenmayer (2009) revealed how an exotic pine plantation surrounding non-pine native forest fragments can host a high percentage of native bryophyte flora. Moreover, the HCM increased the richness of bryophytes. The contrasting environmental conditions at the edge of the fragment compared to those inside the forest, likely increase the habitat heterogeneity inside the fragments, leading to an increase of bryophyte species differing in ecological requirements (Baldwin and Bradfield 2005; Gignac and Dale 2005).

In relation to the species response, we found that, at the plot level, the species presence is mainly determined by the fragment scale variables, and the fragment size was the most important factor. While the determination of the species abundance relied mostly on the plot scale variables, which are directly linked to the microclimatic conditions inside the fragments. Then, the structure of the landscape seems to be acting in first instance as a filter for the identity of the species inhabiting each fragment. The structure of the landscape and the fragmentation pattern have already been shown to be crucial for the composition of a wide range of species in the ecosystems (Wright et al 1998; Echevarria et al 2007), which emphasizes again the great consequences of the alteration of the landscape over the biodiversity. Subsequently, the abundance is mostly defined by the microclimate, highlighting the importance of the small scale climatic conditions for epiphytes (Gignac and Dale 2005, Belinchón et al 2007; Brunialti et al 2013), even though we searched to minimize the range of variation of the forest structure variables (mainly canopy openness and mean tree diameter). Thus, we can conclude that the epiphytes are able to detect very small changes in their close environment, responding rapidly to the anthropogenic activity.

Implications for conservation

Our results demonstrate that the structure of the current landscape, resulting from the loss and fragmentation of Mediterranean forests, provide powerful explanations of the observed losses of epiphytic species richness and diversity. At present, studies are required to facilitate the maintenance of the highest epiphyte diversity in natural communities, thereby ensuring that the role of lichens and bryophytes in the ecosystem functionality will be retained when faced with human-related environmental change. The retention of the function of epiphytes demands the maintenance of rich and diverse communities. This objective is only possible if management strategies consider the quality of forest fragments as well as an adequate forest landscape composition, thereby allowing the existence of large and regular forest fragments. The matrix quality has been shown to be very important, and also have to be taken into account when planning forest management. Our results show that, if the conservation efforts are focused on epiphyte communities, the smallest fragments should be surrounded by a HCM, which would prevent the lack of core area by favoring the arrival of propagules, but taking into account that the empirical evidence found this measure detrimental for the habitat suitability of the overall biodiversity. Its application will depend on the local conservation goals. Future studies must try to disentangle the causes behind this unexpected effect of a HCM. Further analysis should also consider the isolation of fragments and the dispersal traits of species, to be able to give more clear and specific answers, e.g., how the degree of isolation modulates the threshold fragment size above which the sign of the impact of the HCM changes.

Acknowledgments

We would thank the Spanish Government for funding this research through the project EPICON (CGL2010-22049, Ministerio de Ciencia e Innovación). We are also very grateful to Fernando Acevedo and Eduardo Fernández for their help during fieldwork, and to the Cabañeros National Park staff for their attention and kindness. Two anonymous reviewers are also thanked for their useful comments on the manuscript.

REFERENCES

- AEMET (2011) Iberian climate atlas. Agencia Estatal de Meteorología, Ministerio de Medio Ambiente y Rural y Marino, Instituto de Meteorología de Portugal, Madrid
- Alexander JM, Kueffer C, Daehler CC, Edwards P J, Pauchard A, Seipel T, MIREN Consortium (2011) Assembly of nonnative floras along elevational gradients explained by directional ecological filtering. *Proc Natl Acad Sci USA* 108(2):656-661
- Alvarenga LDP, Pôrto KC (2007) Patch size and isolation effects on epiphytic and epiphyllous bryophytes in the fragmented Brazilian Atlantic forest. *Biol Conserv* 134(3):415-427
- Alvarenga LDP, Pôrto KC, Silva MP (2009) Relations between regional–local habitat loss and metapopulation properties of epiphyllous bryophytes in the Brazilian Atlantic Forest. *Biotropica* 41(6):682-691
- Aragón G, Abuja L, Belinchón R, Martínez I (2015) Edge type determines the intensity of forest edge effect on epiphytic communities. *Eur J For Res* 134:443-451
- Aragón G, López R, Martínez I (2010a) Effects of Mediterranean dehesa management on epiphytic lichens. *Sci Total Environ* 409:116-122.
- Aragón G, Martínez I, Burgaz AR (2001) *Macrolíquenes de Castilla-La Mancha*, 1st edn. Instituto de Estudios Manchegos (Consejo Superior de Investigaciones Científicas), Ciudad Real
- Aragón G, Martínez I, Izquierdo P, Belinchón R, Escudero A (2010b) Effects of forest management on epiphytic lichen diversity in Mediterranean forests. *Appl Veg Sci* 13(2):183-194
- Baldissera R, Rodrigues EN, Hartz SM (2012) Metacommunity composition of web-spiders in a fragmented neotropical forest: relative importance of environmental and spatial effects. *PLoS ONE* 7(10):e48099
- Baldwin LK, Bradfield GE (2005) Bryophyte community differences between edge and interior environments in temperate rain-forest fragments of coastal British Columbia. *Can J Forest Res* 35(3):580-592

- Bascompte J, Rodriguez MA (2001) Habitat patchiness and plant species richness. *Ecol Lett* 4(5):417-420
- Bates D, Maechler M, Bolker B (2013) lme4: Linear mixed-effects models using S4 classes. R package version 0.999999-2. Available from < <http://CRAN.R-project.org/package=lme4>>
- Belinchón R, Martínez I, Escudero A, Aragón G, Valladares F (2007) Edge effects on epiphytic communities in a Mediterranean *Quercus pyrenaica* forest. *J Veg Sci* 18(1):81-90
- Belinchón R, Martínez I, Otálora MAG, Aragón G, Dimas J, Escudero A (2009) Fragment quality and matrix affect epiphytic performance in a Mediterranean forest landscape. *Am J Bot* 96:1974-1982
- Bergès L, Pellissier V, Avon C, Verheyen K, Dupouey JL (2013) Unexpected long-range edge-to-forest interior environmental gradients. *Landscape Ecol* 28(3):439-453
- Bolker BM, Brooks ME, Clark CJ, Geange SW, Poulsen JR, Stevens MHH, White JSS (2009) Generalized linear mixed models: a practical guide for ecology and evolution. *Trends Ecol Evol* 24:127-135
- Boudreault C, Bergeron Y, Coxson D (2012) Epiphytic lichen colonization in regenerating black spruce forest stands of clearcut origin. *Forest Ecol Manag* 276:247-258
- Bray JR, Curtis JT (1957) An ordination of the upland forest communities of southern Wisconsin. *Ecol Monogr* 27(4):325-349
- Brunialti G, Frati L, Loppi S (2013) Fragmentation of Mediterranean oak forests affects the diversity of epiphytic lichens. *Nova Hedwigia* 96(1-2):265-278
- Cabrera-Guzmán E, Reynoso VH (2012) Amphibian and reptile communities of rainforest fragments: minimum patch size to support high richness and abundance. *Biodivers Conserv* 21(12):3243-3265
- Carnicer J, Brotons L, Sol D, De Cáceres M (2008) Random sampling, abundance-extinction dynamics and niche-filtering immigration constraints explain the generation of species richness gradients. *Global Ecol Biogeogr* 17(3):352-362
- Carnicer J, Brotons L, Sol D, Jordano P (2007) Community-based processes behind species richness gradients: contrasting abundance-extinction dynamics and sampling effects in areas of low and high productivity. *Global Ecol Biogeogr* 16(6):709-719
- Casas C, Brugués M, Cros RM, Sérgio C (2006) Handbook of mosses of the Iberian Peninsula and the Balearic Islands, 1st edn. Institut d'Estudis Catalans, Barcelona
- Casas C, Brugués M, Cros RM, Sérgio C, Infante M (2009) Handbook of liverworts and hornworts of the Iberian Peninsula and the Balearic Islands, 1st edn. Institut d'Estudis Catalans, Barcelona
- Coleman BD (1981) On random placement and species-area relations. *Mathematical Biosciences* 54(3):191-215
- Coleman BD, Mares MA, Willig MR, Hsieh YH (1982) Randomness, area, and species richness. *Ecology* 63(4):1121-1133
- Colwell RK (2009) EstimateS: Statistical estimation of species richness and shared species from samples. Version 8.2. User's guide and application: <http://purl.oclc.org/estimates>

- Coxson DS, Nadkarni NM (1995) Ecological roles of epiphytes in nutrient cycles of forest ecosystems. In: Lowman MD, Nadkarni NM (eds) Forest canopies, 1st edn. Academic Press Inc., San Diego, pp 495-543
- Coxson DS, Stevenson SK (2007) Influence of high-contrast and low-contrast forest edges on growth rates of *Lobaria pulmonaria* in the inland rainforest, British Columbia. *Forest Ecol Manag* 253(1):103-111.
- Crouzeilles R, Prevedello JA, Figueiredo MSL, Lorini ML, Grelle CEV (2014) The effects of the number, size and isolation of patches along a gradient of native vegetation cover: how can we increment habitat availability? *Landscape Ecol* 29(3):479-489
- De Sanctis M, Alfò M, Attorre F, Francesconi F, Bruno F (2010) Effects of habitat configuration and quality on species richness and distribution in fragmented forest patches near Rome. *J Veg Sci* 21(1):55-65
- Didham RK, Ewers RM (2012) Predicting the impacts of edge effects in fragmented habitats: Laurance and Yensen's core area model revisited. *Biol Conserv* 155:104-110
- Driscoll DA, Banks SC, Barton PS, Lindenmayer DB, Smith AL (2013) Conceptual domain of the matrix in fragmented landscapes. *Trends Ecol Evol* 28(10):605-613
- Echeverría C, Newton AC, Lara A, Benayas JMR, Coomes DA (2007) Impacts of forest fragmentation on species composition and forest structure in the temperate landscape of southern Chile. *Global Ecol Biogeogr* 16(4):426-439
- Ekman S, Wedin M, Lindblom L, Jørgensen PM (2014) Extended phylogeny and a revised generic classification of the *Pannariaceae* (*Peltigerales*, *Ascomycota*). *Lichenologist* 46(5):627-656
- Ellis CJ (2012) Lichen epiphyte diversity: a species, community and trait-based review. *Perspect Plant Ecol* 14(2):131-152
- Fahrig L (2001) How much habitat is enough? *Biol Conserv* 100(1):65-74
- Fahrig L (2003) Effects of habitat fragmentation on biodiversity. *Annu Rev Ecol Evol* S34(1):487-515
- Feinsinger P (2001) Designing field studies for biodiversity conservation. Island Press, Washington DC
- Gauslaa Y, Coxson D (2011) Interspecific and intraspecific variations in water storage in epiphytic old forest foliose lichens. *Botany* 89(11):787-798
- Gauslaa Y, Solhaug KA (1996) Differences in the susceptibility to light stress between epiphytic lichens of ancient and young boreal forest stands. *Funct Ecol* 10:344-354
- Gignac LD, Dale MR (2005) Effects of fragment size and habitat heterogeneity on cryptogam diversity in the low-boreal forest of western Canada. *Bryologist* 108(1):50-66
- Green TGA, Nash TH, Lange OL (2008) Physiological ecology of carbon dioxide exchange. In: Nash TH (ed) *Lichen biology*, 2nd edn. Cambridge University Press, New York, pp 152-181
- Hanski I (1998) Metapopulation dynamics. *Nature* 396(6706):41-49
- Harrison S, Bruna E (1999) Habitat fragmentation and large-scale conservation: what do we know for sure? *Ecography* 22(3):225-232

- Hauck M, de Bruyn U, Javkhlan S, Lkhagvadorj D (2013) Forest edge–interior differentiation in the epiphytic lichen diversity of the forest steppe in the Khangai Mountains, Mongolia. *J Plant Ecol* 7(3):287-297
- Hilmo O, Holien H (2002) Epiphytic lichen response to the edge environment in a boreal *Picea abies* forest in central Norway. *Bryologist* 105(1):48-56
- Honegger RM (2009) Lichen-forming fungi and their photobionts. In: Deising HB (ed) *The Mycota V (Plant relationships)*, 2nd edn. Springer, Berlin, pp 305–333
- Honkanen M, Roberge JM, Rajasärkkä A, Mönkkönen M (2010) Disentangling the effects of area, energy and habitat heterogeneity on boreal forest bird species richness in protected areas. *Global Ecol Biogeogr* 19(1):61-71
- Honnay O, Endels P, Vereecken H, Hermy M (1999) The role of patch area and habitat diversity in explaining native plant species richness in disturbed suburban forest patches in northern Belgium. *Divers Distrib* 5(4):129-141
- Hylander K, Hedderson TA (2007) Does the width of isolated ravine forests influence moss and liverwort diversity and composition? —A study of temperate forests in South Africa. *Biodivers Conserv* 16(5):1441-1458
- Johansson P, Ehrlén J (2003) Influence of habitat quantity, quality and isolation on the distribution and abundance of two epiphytic lichens. *J Ecol* 91(2):213-221
- Jonsson BG, Jonsell M (1999) Exploring potential biodiversity indicators in boreal forests. *Biodivers Conserv* 8(10):1417-1433
- Jules ES, Shahani P (2003) A broader ecological context to habitat fragmentation: why matrix habitat is more important than we thought. *J Veg Sci* 14(3):459-464
- Kivistö L, Kuusinen M (2000) Edge effects on the epiphytic lichen flora of *Picea abies* in middle boreal Finland. *Lichenologist* 32(4):387-398
- Kraft NJ, Comita LS, Chase JM, et al (2011) Disentangling the drivers of β diversity along latitudinal and elevational gradients. *Science* 333(6050):1755-1758
- Kranner I, Beckett R, Hochman A, Nash TH (2008) Desiccation-tolerance in lichens: a review. *Bryologist* 111(4):576-593
- Kruys N, Jonsson BG (1997) Insular patterns of calicioid lichens in a boreal old-growth forest-wetland mosaic. *Ecography* 20(6):605-613
- Kupfer JA, Malanson GP, Franklin SB (2006) Not seeing the ocean for the islands: the mediating influence of matrix-based processes on forest fragmentation effects. *Global Ecol Biogeogr* 15(1):8-20
- Lange OL, Büdel B, Meyer A, Zellner H, Zotz G (2004) Lichen carbon gain under tropical conditions: water relations and CO₂ exchange of *Lobariaceae* species of a lower montane rainforest in Panama. *Lichenologist* 36(5):329-342
- Lange OL, Kilian E, Ziegler H (1986) Water vapor uptake and photosynthesis of lichens: performance differences in species with green and blue-green algae as phycobionts. *Oecologia* 71(1):104-110
- Laurance WF, Yensen E (1991) Predicting the impacts of edge effects in fragmented habitats. *Biol Conserv* 55(1):77-92

- Löbel S, Snäll T, Rydin H (2006) Metapopulation processes in epiphytes inferred from patterns of regional distribution and local abundance in fragmented forest landscapes. *J Ecol* 94(4):856-868
- Löbel S, Snäll T, Rydin H (2012) Epiphytic bryophytes near forest edges and on retention trees: reduced growth and reproduction especially in old-growth-forest indicator species. *J Appl Ecol* 49(6):1334-1343
- Löhmus A, Löhmus P, Vellak K (2007) Substratum diversity explains landscape-scale covariation in the species-richness of bryophytes and lichens. *Biol Conserv* 135(3):405-414
- Löhmus P, Rosenvald R, Löhmus A (2006) Effectiveness of solitary retention trees for conserving epiphytes: differential short-term responses of bryophytes and lichens. *Can J Forest Res* 36(5):1319-1330
- Lomba A, Vicente J, Moreira F, Honrado J (2011) Effects of multiple factors on plant diversity of forest fragments in intensive farmland of Northern Portugal. *Forest Ecol Manag* 262(12):2219-2228
- Machado JL, Reich PB (1999) Evaluation of several measures of canopy openness as predictors of photosynthetic photon flux density in deeply shaded conifer-dominated forest understory. *Can J Forest Res* 29(9):1438-1444
- McCullagh P, Nelder JA (1989) *Generalized Linear Models*, 2nd edn. Chapman & Hall, London
- Mesquita RC, Delamônica P, Laurance WF (1999) Effect of surrounding vegetation on edge-related tree mortality in Amazonian forest fragments. *Biol Conserv* 91(2):129-134
- Moen J, Jonsson BG (2003) Edge effects on liverworts and lichens in forest patches in a mosaic of boreal forest and wetland. *Conserv Biol* 17(2):380-388
- Murcia C (1995) Edge effects in fragmented forests: implications for conservation. *Trends Ecol Evol* 10(2):58-62
- Murphy HT, Lovett-Doust J (2004) Context and connectivity in plant metapopulations and landscape mosaics: does the matrix matter? *Oikos* 105(1):3-14
- Nascimento HEM, Andrade ACS, Camargo JLC, Laurance WF, Laurance SG, Ribeiro JEL (2006) Effects of the surrounding matrix on tree recruitment in Amazonian forest fragments. *Conserv Biol* 20(3):853-860
- Oliveira JRPM, Pôrto KC, Silva MPP (2011) Richness preservation in a fragmented landscape: a study of epiphytic bryophytes in an Atlantic forest remnant in Northeast Brazil. *J Bryol* 33(4):279-290
- Otálora MAG, Jørgensen PM, Wedin M. (2014) A revised generic classification of the jelly lichens, *Collemataceae*. *Fungal Divers* 64(1):275-293
- Otálora MAG, Martínez I, Belinchón R, Widmer I, Aragón G, Escudero A, Scheidegger C (2011) Remnants fragments preserve genetic diversity of the old forest lichen *Lobaria pulmonaria* in a fragmented Mediterranean mountain forest. *Biodivers Conserv* 20(6):1239-1254
- Patton DR (1975) A diversity index for quantifying habitat "edge". *Wildlife Soc B* 3(4):171-173

- Perea DF, Perea R (2008) *Vegetación y flora de los Montes de Toledo*. Ediciones Covarrubias, Toledo
- Pharo EJ, Lindenmayer DB (2009) Biological legacies soften pine plantation effects for bryophytes. *Biodivers Conserv* 18(7):1751-1764
- Pharo EJ, Lindenmayer DB, Taws N (2004) The effects of large-scale fragmentation on bryophytes in temperate forests. *J App Ecol* 41(5):910-921
- Pinho P, Bergamini A, Carvalho P, Branquinho C, Stofer S, Scheidegger C, Maguas C (2012) Lichen functional groups as ecological indicators of the effects of land-use in Mediterranean ecosystems. *Ecol Indic* 15(1):36-42
- Prevedello JA, Vieira MV (2010) Does the type of matrix matter? A quantitative review of the evidence. *Biodivers Conserv* 19(5):1205-1223
- Puche F, Barrón A, Brugués M, et al (2006) Aportaciones al conocimiento de la flora briológica española: nóvula XVI: musgos y hepáticas del Alto Tajo (Cuenca, Guadalajara, Teruel). *Bol Soc Esp Briol* 28:87-94
- R Core Team (2012) *R: a language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna
- Saunders DA, Hobbs RJ, Margules CR (1991) Biological consequences of ecosystem fragmentation: a review. *Conserv Biol* 5(1):18-32
- Scarascia-Mugnozza G, Oswald H, Piussi P, Radoglou K (2000) Forests of the Mediterranean region: gaps in knowledge and research needs. *Forest Ecol Manag* 132(1):97-109
- Sillett SC, McCune B, Peck JE, Rambo TR (2000) Four years of epiphyte colonization in Douglas-fir forest canopies. *Bryologist* 103(4):661-669
- Smith CW, Aptroot A, Coppins BJ et al (2009) *The Lichens of Great Britain and Ireland*, 2nd edn. British Lichen Society, London
- Snäll T, Ribeiro Jr PJ, Rydin H (2003) Spatial occurrence and colonizations in patch-tracking metapopulations: local conditions versus dispersal. *Oikos* 103(3):566-578
- Söderström L (1988) The occurrence of epixylic bryophyte and lichen species in an old natural and a managed forest stand in northeast Sweden. *Biol Conserv* 45(3):169-178
- Stewart KJ, Mallik AU (2006) Bryophyte responses to microclimatic edge effects across riparian buffers. *Ecol Appl* 16:1474-1486
- Thirgood JV (1981) *Man and the Mediterranean forest*. Academic Press, London
- Valladares F, Camarero JJ, Pulido F, Gil-Pelegrín E (2004) El bosque mediterráneo, un sistema humanizado y dinámico. In: Valladares F (ed) *Ecología del bosque mediterráneo en un mundo cambiante*. Ministerio de Medio Ambiente, Madrid, pp 13–25
- Verbeke G, Molenberghs G (1997) *Linear mixed models in practice: a SAS oriented approach*. Springer, Berlin
- Wright DH, Patterson BD, Mikkelsen, GM, Cutler A, Atmar W (1997) A comparative analysis of nested subset patterns of species composition. *Oecologia*, 113:1-20
- Yamaura Y, Kawahara T, Iida S, Ozaki K (2008) Relative importance of the area and shape of patches to the diversity of multiple taxa. *Conserv Biol* 22(6):1513-1522
- Zartman CE (2003) Habitat fragmentation impacts on epiphyllous bryophyte communities in central Amazonia. *Ecology* 84(4):948-954

- Zartman CE, Nascimento HE (2006) Are habitat-tracking metacommunities dispersal limited? Inferences from abundance-occupancy patterns of epiphylls in Amazonian forest fragments. *Biol Conserv* 127(1):46-54
- Zuur AF, Ieno EN, Walker N, Saveliev AA, Smith GM (2009) *Mixed effects models and extensions in ecology with R*. Springer, New York

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Table S1. Characterization of each fragment. The fragment numbers correspond to those in Fig. 1. The coordinates (Coord.) refer to the centroid of the fragment. The high-contrast matrix (HCM), low-contrast matrix (LCM), and pine matrix (PM) values refer to the matrix perimeter surrounding each fragment. The values of the other variables correspond to the means of the environmental factors based on all the plots in each fragment. SI: shape index; Diversity index: inverse Simpson's index; Similarity index: Bray-Curtis index; Mean plot dbh: mean diameter at breast height of all the trees in a plot.

Fragment No.	Coord. N (m)	Coord. W (m)	Size (Ha)	Perim. (Km)	SI	HCM (%)	LCM (%)	PM (%)	Altitude (m.a.s.l)	Aspect	Slope (°)	Shrub cover (%)	Canopy openness (%)	Trees/ plot	Mean plot dbh (cm)	Species richness	Lichen rich.	Bryoph. rich.	Diversity index	Similarity index
1	4374836	388775	14.43	2.99	2.22	30.91	69.10	0.00	1080	SE	28	61.7	27.01	13	15.57	23	17	6	6.12	61.52
2	4373416	388177	2.06	0.96	1.88	18.30	81.70	0.00	888	E	35	32.5	12.37	11	18.73	19	12	7	7.06	56.48
3	4372782	387926	2.98	1.53	2.49	0.00	64.49	35.51	865	SE	22	6.3	9.54	16	15.73	17	11	6	7.46	64.50
4	4373525	388498	8.90	1.95	1.85	57.83	42.18	0.00	907	NW	23	50.8	8.91	10	18.41	33	26	7	9.21	54.97
5	4366066	378074	43.66	4.62	1.97	12.72	71.21	16.07	835	NE	20	36.7	24.28	13	16.29	49	37	12	9.15	53.03
6	4363924	383825	21.62	3.50	2.12	78.29	21.71	0.00	883	NE	28	30.0	29.49	18	15.05	44	34	10	9.09	50.26
7	4364980	383223	47.88	3.50	1.43	70.02	29.98	0.00	749	NE	26	2.5	30.89	15	15.12	37	24	13	5.36	54.05
8	4373023	368090	4.75	1.20	1.55	72.21	27.79	0.00	679	NE	24	11.3	22.74	16	14.24	40	26	14	9.80	54.70
9	4376211	382333	2.46	0.93	1.68	32.95	67.05	0.00	1208	SE	31	13.8	29.83	21	12.97	29	19	10	10.41	49.54
10	4372971	367676	13.83	3.30	2.50	28.57	67.92	3.51	842	NE	18	12.4	17.26	7	18.94	39	28	11	8.38	48.94
11	4375092	386991	67.34	7.52	2.59	5.19	58.96	35.84	1121	NW	27	11.7	18.52	18	14.13	52	38	14	12.97	44.57
12	4372147	368378	22.98	3.08	1.81	11.23	72.77	16.00	750	N	29	45.0	26.00	8	20.83	43	30	13	13.57	51.65
13	4373109	366164	6.44	1.05	1.16	0.00	100	0.00	846	NE	14	13.8	17.90	8	17.97	35	24	11	9.19	52.89
14	4373438	367066	73.26	5.46	1.80	22.31	77.69	0.00	712	NE	25	23.4	27.77	10	20.64	73	59	14	19.57	44.76
15	4380455	357759	11.97	2.06	1.68	57.46	42.55	0.00	790	NE	38	23.8	30.96	17	17.46	56	44	12	13.08	48.65
16	4379321	358529	96.94	7.96	2.28	27.37	72.63	0.00	918	W	26	15.0	25.21	19	15.65	66	51	15	13.73	45.37

Table S1. Continued.

Fragment No.	Coord. N (m)	Coord. W (m)	Size (Ha)	Perim. (Km)	SI	HCM (%)	LCM (%)	PM (%)	Altitude (m.a.s.l.)	Aspect	Slope (°)	Shrub cover (%)	Canopy openness (%)	Trees/ plot	Mean plot dbh (cm)	Species richness	Lichen rich.	Bryoph. rich.	Diversity index	Similarity index
17	4375900	378262	25.04	5.22	2.94	58.28	41.72	0.00	1089	S	19	21.3	23.48	7	19.25	45	33	12	8.83	49.34
18	4375960	382337	6.47	1.93	2.14	90.84	9.16	0.00	1137	SE	32	6.3	27.22	22	13.37	46	34	12	7.29	47.20
19	4374125	387286	4.74	2.18	2.83	35.05	40.04	24.91	1180	SW	16	11.8	22.73	17	15.41	43	31	12	6.86	42.39
20	4374046	386883	13.88	3.38	2.56	3.58	80.43	15.98	1138	SW	22	10.0	19.89	23	13.90	37	28	9	7.20	49.32
21	4374193	388164	46.63	3.21	1.33	24.48	75.51	0.00	961	NE	30	41.7	28.94	17	13.23	53	40	13	12.61	45.36
22	4374218	366342	7.08	1.16	1.22	47.37	45.49	7.14	832	NE	28	20.0	22.98	7	22.38	35	26	9	9.89	57.37
23	4374349	366852	3.93	1.04	1.48	0.00	100	0.00	690	NW	31	10.0	22.86	9	22.09	37	25	12	9.98	62.26
24	4386590	354540	11.85	2.39	1.96	28.40	71.59	0.00	976	SW	27	9.3	21.00	23	15.46	46	34	12	10.84	49.43
25	4387807	355270	24.02	7.06	4.07	17.51	82.50	0.00	919	NE	18	4.5	28.71	28	14.36	51	37	14	8.27	47.07
26	4388106	354450	28.13	3.68	1.96	63.94	36.05	0.00	869	N	32	8.8	18.08	13	17.72	46	34	12	11.28	45.03
27	4373761	391582	6.40	1.80	2.01	56.14	9.51	34.35	1070	E	13	17.5	29.34	20	13.35	44	30	14	14.24	54.80
28	4378827	371314	59.78	6.53	2.38	56.06	43.94	0.00	863	W	18	0.8	25.11	24	15.79	53	39	14	13.68	51.20
29	4379443	354481	25.28	2.43	1.37	10.04	89.97	0.00	817	W	20	10.0	20.32	18	12.99	57	44	13	14.49	50.55
30	4373081	389953	15.96	1.89	1.34	18.66	25.63	55.71	948	S	20	32.5	25.81	19	14.60	42	27	15	14.87	42.43
31	4373276	390313	23.59	2.91	1.69	65.72	0.00	34.28	980	SW	26	38.8	22.09	19	13.61	39	26	13	11.87	48.41
32	4373308	390727	5.05	1.87	2.34	79.94	0.00	20.06	1016	S	24	58.8	23.62	12	18.76	45	32	13	12.34	42.13
33	4373573	391033	7.19	2.01	2.12	70.58	0.00	29.42	1054	S	25	26.3	20.58	19	14.74	42	29	13	11.69	51.92
34	4373708	391322	5.48	1.43	1.72	39.52	3.97	56.52	1062	S	24	13.0	24.20	15	18.21	43	29	14	10.64	50.27
35	4392452	362136	6.39	1.39	1.55	74.85	25.15	0.00	941	N	27	18.8	25.42	22	14.54	42	30	12	11.91	49.21
36	4388051	363898	24.59	3.42	1.94	46.47	53.52	0.00	840	NE	29	1.3	22.70	19	16.90	47	34	13	8.44	50.35
37	4377850	392957	10.58	2.59	2.24	5.00	95.00	0.00	963	NW	13	19.4	16.30	7	20.22	44	32	12	9.31	53.67

Table S1. Continued.

Fragment No.	Coord. N (m)	Coord. W (m)	Size (Ha)	Perim. (Km)	SI	HCM (%)	LCM (%)	PM (%)	Altitude (m.a.s.l)	Aspect	Slope (°)	Shrub cover (%)	Canopy openness (%)	Trees/ plot	Mean plot dbh (cm)	Species richness	Lichen rich.	Bryoph. rich.	Diversity index	Similarity index
38	4375830	381257	1.54	1.19	2.69	91.49	8.51	0.00	1110	SE	27	17.0	12.91	13	16.46	40	28	12	14.89	50.18
39	4375644	381533	2.89	1.31	2.18	100.00	0.00	0.00	1077	W	24	3.8	27.69	26	15.75	49	36	13	13.41	51.79
40	4375317	381406	3.24	1.37	2.14	92.67	7.33	0.00	998	SW	24	9.0	27.61	17	16.83	42	30	12	13.72	48.27

Appendix 1. List of species showing the number of plots and fragments where each was present (N = 117). The species are separated into lichens and bryophytes. + : cyanolichens; • : liverworts.

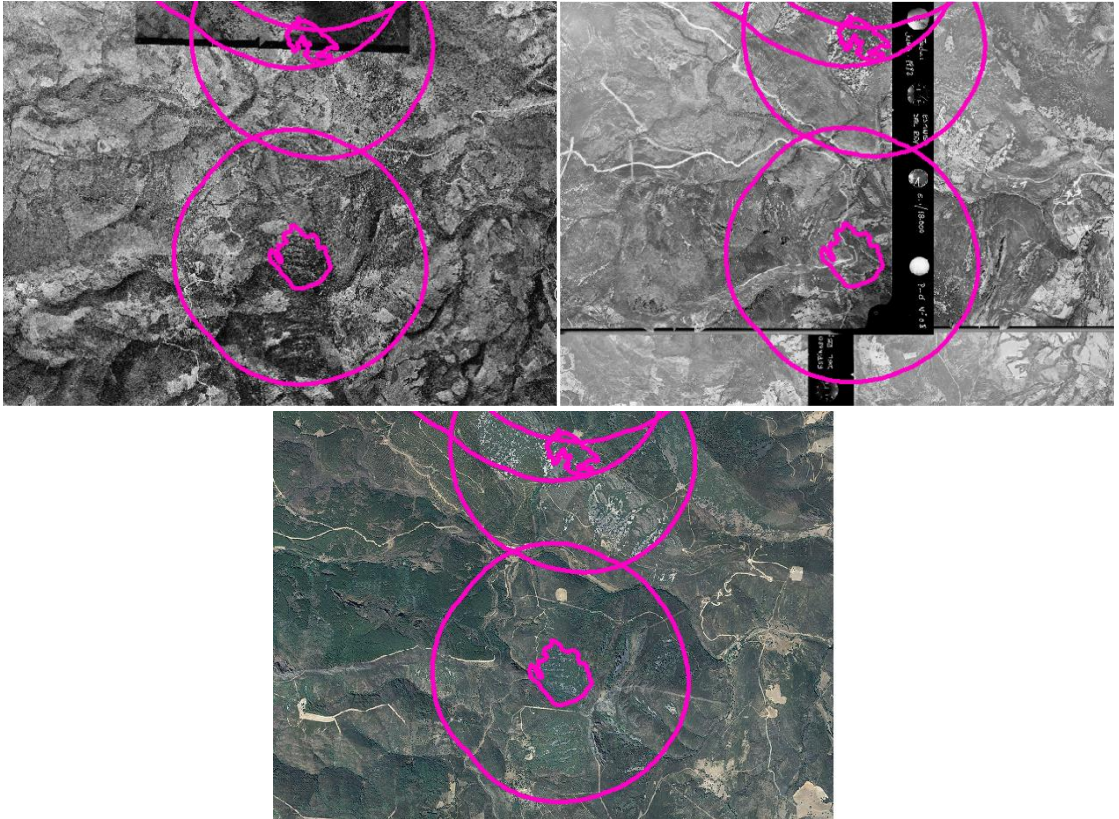
Species	Plots (n)	Fragments (n)
<u>Lichens</u>		
<i>Agonimia tristicula</i> (Nyl.) Zahlbr.	7	3
<i>Amandinea punctata</i> (Hoffm.) Coppins & Scheid.	1	1
<i>Anaptychia ciliaris</i> (L.) Körb.	24	16
+ <i>Arctomia fascicularis</i> (L.) Otálora & Wedin	11	3
<i>Bacidia circumspecta</i> (Norrl. & Nyl.) Malme	3	1
<i>Bacidia igniari</i> (Nyl.) Oxner	5	4
<i>Bacidia rosella</i> (Pers.) De Not.	4	2
<i>Bacidia rubella</i> (Hoffm.) A. Massal.	23	8
<i>Buellia disciformis</i> (Fr.) Mudd	98	35
<i>Caloplaca ferruginea</i> (Huds.) Th. Fr.	20	10
<i>Caloplaca holocarpa</i> (Hoffm. ex Ach.) M. Wade	2	2
<i>Candelaria concolor</i> (Dickson) Stein	25	14
<i>Candelariella vitellina</i> (Hoffm.) Müll. Arg.	34	12
<i>Catapyrenium psoromoides</i> (Borrer) R. Sant.	2	1
<i>Chromatochlamys muscorum</i> (Fr.) H. Mayrh. & Poelt	1	1
<i>Cladonia chlorophaea</i> (Flörke ex Sommerf.) Sprengel	4	2
<i>Cladonia coniocraea</i> (Flörke) Sprengel	8	7
<i>Cladonia fimbriata</i> (L.) Fr.	166	40
+ <i>Collema furfuraceum</i> (Arnold) Du Rietz	103	32
+ <i>Collema subflaccidum</i> Degel.	37	14
+ <i>Collema subnigrescens</i> Degel.	51	23
+ <i>Dendriscoaulon umhausense</i> (Auersw.) Degel.	39	13
<i>Diploschistes muscorum</i> (Scop.) R. Sant.	6	6
<i>Evernia prunastri</i> (L.) Ach.	153	39
<i>Flavoparmelia soledians</i> (Nyl.) Hale	30	18
+ <i>Fuscopannaria mediterranea</i> (Tav.) P.M. Jørg.	131	34
+ <i>Fuscopannaria ignobilis</i> (Anzi) P.M. Jørg.	34	13
+ <i>Fuscopannaria olivacea</i> (P.M. Jørg.) P.M. Jørg.	13	7
<i>Hypogymnia physodes</i> (L.) Nyl.	1	1
<i>Hypogymnia tubulosa</i> (Schaer.) Hav.	15	14
<i>Lasallia pustulata</i> (L.) Mérat	1	1
<i>Lecanora chlarotera</i> Nyl.	93	32
<i>Lecanora pallida</i> (Schreb.) Rabenh.	2	1
<i>Lecanora varia</i> (Hoffm.) Ach.	2	2
<i>Lepraria incana</i> (L.) Ach.	29	18
+ <i>Leptogium corniculatum</i> (Hoffm.) Minks	7	1
+ <i>Leptogium furfuraceum</i> (Harm.) Sierk	8	3
<i>Melanelixia fuliginosa</i> (Fr. ex Duby) O. Blanco <i>et al.</i>	71	28
<i>Melanelixia glabra</i> (Schaer.) O. Blanco <i>et al.</i>	167	39
<i>Micarea prasina</i> Fr.	1	1
<i>Mycobilimbia hypnorum</i> (Lib.) Kalb & Hafellner	5	2
<i>Mycobilimbia parvilobulosa</i> Sarrión, Aragón & Hafellner	1	1

<i>+Nephroma laevigatum</i> Ach.	121	32
<i>Normandina pulchella</i> (Borrer) Nyl.	15	9
<i>Ochrolechia balcanica</i> Verseggy	28	19
<i>Ochrolechia pallescens</i> (L.) A. Massal.	16	9
<i>Ochrolechia turneri</i> (Sm.) Hasselrot	1	1
<i>Parmelia saxatilis</i> (L.) Ach.	4	3
<i>Parmelia sulcata</i> Taylor	100	35
<i>Parmelina quercina</i> (Willd.) Hale	11	8
<i>Parmelina tiliacea</i> (Hoffm.) Hale	177	40
<i>Parmotrema chinense</i> (Osbeck) Hale & Ahti	13	8
<i>+Pectenaria atlantica</i> (Degel.) P.M. Jørg. <i>et al.</i>	13	4
<i>+Pectenaria plumbea</i> (Lightf.) P.M. Jørg. <i>et al.</i>	28	9
<i>+Peltigera collina</i> (Ach.) Schrad.	9	5
<i>+Peltigera neckeri</i> Hepp ex Müll. Arg.	2	1
<i>Pertusaria albescens</i> (Huds.) M. Choisy & Werner	150	39
<i>Pertusaria amara</i> (Ach.) Nyl.	23	6
<i>Pertusaria coccodes</i> (Ach.) Nyl.	6	3
<i>Pertusaria flavida</i> (DC.) J. R. Laundon	38	20
<i>Pertusaria hemisphaerica</i> (Flörke) Erichsen	98	33
<i>Pertusaria ophthalmiza</i> (Nyl.) Nyl.	6	3
<i>Pertusaria pertusa</i> (Weigel) Tuck.	22	11
<i>Phaeophyscia orbicularis</i> (Neck.) Moberg	45	19
<i>Phlyctis argena</i> (Spreng.) Flot.	179	40
<i>Physcia adscendens</i> (Fr.) H. Olivier	18	10
<i>Physcia aipolia</i> (Ehrh. ex Humb.) Fűrnr.	14	9
<i>Physcia caesia</i> (Hoffm.) Fűrnr.	45	20
<i>Physcia semipinnata</i> (J. F. Gmelin) Moberg	73	26
<i>Physcia tenella</i> (Scop.) DC.	3	1
<i>Physconia distorta</i> (With.) J. R. Laundon	74	30
<i>Physconia enteroxantha</i> (Nyl.) Poelt	135	37
<i>Physconia grisea</i> (Lam.) Poelt	2	2
<i>Physconia perisidiosa</i> (Erichsen) Moberg	46	22
<i>Physconia servitii</i> (Nádv.) Poelt	2	1
<i>Physconia venusta</i> (Ach.) Poelt	186	40
<i>Pseudevernia furfuracea</i> (L.) Zopf	1	1
<i>Punctelia subrudecta</i> (Nyl.) Krog	8	7
<i>Ramalina calicaris</i> (L.) Fr.	7	4
<i>Ramalina farinacea</i> (L.) Ach.	92	33
<i>Ramalina fastigiata</i> (Pers.) Ach.	3	2
<i>Ramalina fraxinea</i> (L.) Ach.	57	28
<i>Rinodina capensis</i> Hampe	65	27
<i>+Scytinium aragonii</i> (Otálora) Otálora, P.M. Jørg. & Wedin	17	3
<i>+Scytinium fragrans</i> (Sm.) Otálora, P.M. Jørg. & Wedin	7	5
<i>+Scytinium lichenoides</i> (L.) Otálora, P.M. Jørg. & Wedin	35	16
<i>+Scytinium subtile</i> (Schrad.) Otálora, P.M. Jørg. & Wedin	8	4
<i>+Scytinium teretiusculum</i> (Wallr.) Otálora, P.M. Jørg. & Wedin	22	12
<i>Strangospora ochrophora</i> (Nyl.) R. Anderson	1	1
<i>Usnea subfloridana</i> Stirt.	19	12

<i>Waynea adscendens</i> Rico	83	23
<i>Waynea stoechadiana</i> (Abassi & Cl. Roux) Cl. Roux & P. Clerc	12	4
<i>Xanthoria parietina</i> (L.) Th. Fr.	8	6
<u>Bryophytes</u>		
<i>Antitrichia californica</i> Sull.	150	39
<i>Antitrichia curtispindula</i> Bridel	1	1
<i>Fabronia pusilla</i> Raddi	76	24
• <i>Frullania dilatata</i> (L.) Dumort.	148	36
<i>Hedwigia ciliata</i> (Hedw.) P. Beauv.	1	1
<i>Homalothecium sericeum</i> (Hedw.) Schimp.	180	40
<i>Hypnum cupressiforme</i> Hedw.	176	40
<i>Leptodon smithii</i> (Hedw.) F. Weber & D. Mohr	1	1
<i>Leucodon sciuroides</i> Schwaegrichen	75	30
• <i>Metzgeria furcata</i> (L.) Dumort.	3	3
<i>Orthotrichum affine</i> Schrader ex Bridel	112	33
<i>Orthotrichum diaphanum</i> Brid.	67	27
<i>Orthotrichum lyellii</i> Hook. & Taylor	170	40
<i>Orthotrichum rogerii</i> Brid.	2	2
<i>Orthotrichum speciosum</i> Goffinet <i>et al.</i>	5	4
<i>Orthotrichum stramineum</i> Hornschuch <i>in</i> Bridel	159	40
<i>Orthotrichum tenellum</i> Bruch ex Brid.	2	2
• <i>Porella platyphylla</i> (L.) Pfeiff.	6	1
<i>Pterygandrum filiforme</i> Hedw.	76	30
<i>Pterogonium gracile</i> (Hedw.) Smith	3	1
• <i>Radula complanata</i> (L.) Dumort.	3	2
<i>Syntrichia laevipila</i> Brid.	138	36
<i>Ulota crispa</i> (Hedw.) Brid	11	8
<i>Zygodon rupestris</i> Schimp. ex Lor.	115	34

CAPÍTULO 2/CHAPTER 2

Lag between the increase of species richness and habitat recovery at different spatio-temporal scales



Juan Luis H. Cardós • Isabel Martínez • Gregorio Aragón • Christopher Ellis

Manuscrito inédito

ABSTRACT

In a global context of landscape modification, the resulting structure of remnant habitats will be responsible for the configuration of the species richness that they host. The most evident processes of degradation are habitat loss and fragmentation, but it has not been easy to demonstrate their real and independent effects because mostly take place jointly. Furthermore, the interaction of direction and intensity of the temporal trajectories of landscapes with biodiversity is still scarcely known. The clarification of these drivers will let us to understand how communities are structured in anthropized landscapes and would help to preserve them more efficiently. We chose obligate epiphyte richness as a sign of the biodiversity response to a dynamic spatio-temporal structure of a recovering landscape, and selected 40 well-preserved Mediterranean forest fragments in a context of high habitat loss (>85%). We measure the most relevant fragment-scale attributes, and compare their explanatory power with the surrounding total habitat amount, its fragmentation degree and connectivity. All the variables were measured along a 55-years temporal frame utilizing historic orthophotos. Among all the historic and present landscape-scale variables, only the earliest connectivity had impact on species richness. Additionally, the trajectory of fragment size in the last 29 years and the present size, resulted to be the best predictors. The effect of a high-contrast matrix was consistent but very small. These results demonstrate that not only pure habitat loss, but together with the spatial configuration of the landscape, are meaningful for explaining richness patterns. The epiphyte richness shows a lag in relation to the present landscape structure, and the spatial scale at which landscape dynamics happens determines how fast the richness is organized, in this case because epiphytes are sessile and long-lived organisms. In view of the dependence of epiphytes on connectivity and sufficient amount of good-quality habitat to occur along the landscape, the diverse species regional pool and the recent increase in forest surface ensure an amelioration of epiphyte communities in next decades.

INTRODUCTION

A process of continuous landscape transformation is causing the most rapid decline of biodiversity ever documented (Ceballos et al 2015). The consequent landscape structure of habitats will determine the persistence of species over the long-term. Given that remnant habitats become isolated within the landscape, research efforts targeted to the preservation of species-rich communities should focus on metacommunity dynamics, in which species richness is considered in the context of fragmented habitat, rather than focusing on ecological processes that are particularly relevant to pristine and continuous landscapes.

Landscape modification includes the simultaneous processes of habitat loss and fragmentation. There is intense debate about the independent and joint effects on species richness of loss or fragmentation (Bender et al. 1998, Harrison & Bruna 1999, Fahrig 2003, 2013, Koper et al. 2007, Hanski 2015), but there is a general agree that their effects should be separately considered to create effective conservation policy (Harrison & Bruna 1999, Fahrig 2003, Didham et al. 2012). Studies on habitat loss, regardless of spatial attributes in the landscape, have shown consistent detrimental effects on biodiversity (Bascompte & Rodriguez 2001, Tscharntke et al. 2012). Studies on habitat fragmentation *per se*, which consider the unique effect of spatial habitat configuration (controlling for the amount of habitat), have produced mixed results (Fahrig 2003, Bailey et al. 2010). Both habitat loss and fragmentation are shown to become effective when extant habitat is reduced by 65-80% (Bascompte & Rodriguez 2001, Fahrig 2001, Flather and Bevers 2002, With 2016). However, attempts at this type of quantification lack a consensus of overwhelming evidence, and ecological generalisations are difficult to apply owing to the high response variability among different species groups (Swift & Hannon 2010).

Hypothetically, for species that occur in discrete types of habitat, the total habitat amount at a landscape scale, as an inverse measure of habitat loss, will be the best predictor for the number of species per unit area (Fahrig 2013). If this hypothesis is confirmed, then the unique effect of fragmentation *per se* would be negligible, with

a community unaffected by the relationship of habitat edge to interior, or dispersal constraints imposed by inter-fragment distances. Conversely, there is alternative support to suggest that the spatial configuration of remnant habitat has a strong effect on communities (With 2016) additional to the actual process of habitat loss (Bender et al 1998, Hanski 2015).

The spatial configuration of the landscape can be defined by the aggregation or over-dispersion among habitat remnants (i.e. fragmentation *per se*). However, it is very difficult to isolate these effects independently of habitat loss, and only manipulative experiments that control for the amount of habitat can identify robust conclusions (Haddad et al. 2015). In the case of real-world observation, the landscape often cannot be purposefully modified at experimental landscape-scales and proxy approaches should be considered. A possible solution is to measure the spatial configuration for a given amount of habitat, asking whether there are additive effects of fragmentation, over and above the effects of habitat loss. The existence of a fragmentation effect would imply for example the impact of edge effects relative to interior, which is a main cause of declining species richness caused by fragmentation (Murcia 1995, Harrison and Bruna 1999).

An alternative integrative approach, is to use connectivity to examine the effect of spatial configuration on species richness. Connectivity is defined by the distance among habitat fragments (landscape configuration), that restricts dispersal, but also accounting for the size of habitat fragments (landscape composition), because larger fragments act as the source of more propagules for more species. Connectivity is integrated in this way by Hanski's Incidence Function Model (hereafter IFM) (1994), which relates configuration and composition by using the scaling parameter α . The IFM is a negative exponential model, where α is a constant describing how dispersal rates decline with increasing distance. In the case of the community in a focal habitat fragment, α also determines a weighting value to describe how the surrounding habitat at a predefined scale explains species richness as a function of distance (Snäll et al. 2003, Löbel et al. 2009). By testing the importance of

connectivity for fragmented landscapes, the role of the dispersal can be confirmed or refuted.

Additionally, at a smaller scale, below the effect of landscape structure, fragment attributes (i. e. size, shape, type of contact matrix and habitat heterogeneity inside the fragment) strongly affect species richness (Gignac & Dale 2005, Yamaura et al. 2008, Honkanen et al. 2010, Prevedello and Vieira 2010). These fragment-scale effects need to be integrated with landscape-scale factors (habitat connectivity), to account for their contribution in species richness patterns (Bailey et al. 2010). Furthermore, there is an important temporal dimension to the effect of habitat loss and fragmentation, though this remains obscured by a significant challenge in collecting and analyzing long-term time-series data (Ewers & Didham 2006). Nevertheless, landscapes are dynamic, with habitat fragments regenerating or being lost over time, with important implications for species ecology (del Castillo 2015). Studies that are based on a ‘snap-shot’ of landscape status can extract valuable conclusions, but a longer-term time-series perspective will add very useful information related to ecosystem trends with important consequences for conservation planning (Lindborg & Eriksson 2004). This includes the effect of extinction debt (Tilman et al. 1994), which demonstrates that species do not respond to habitat loss immediately, but might disappear only very gradually. An interesting corollary would be an opposite effect, in which there is a lag in recolonization following the process of habitat recovery.

Epiphytes provide a perfect model system to test the effects of landscape structure at different spatio-temporal scales. Their ecological dynamics are strongly linked to the connectivity of forest fragments (Snäll et al. 2003) with epiphyte richness related at landscape-scale to habitat extent (Ellis & Coppins 2007a), fragmentation (Löbel et al. 2006) and connectivity (Virtanen & Oksanen 2007), as well as including the fragment-scale factors of habitat quality (Aragón et al. 2010), matrix quality (Aragón et al. 2015; Cardós et al. 2016) and fragment size (Gignac & Dale 2005). These previous studies have showed how epiphytes interact with human-modified landscapes, but less emphasis has been placed on partitioning these effects to

understand their relative importance for epiphytic diversity. Likewise, epiphyte distribution patterns may appear to be explained by previously more continuous and connected historic landscapes (Snäll et al. 2004, Löbel et al. 2009, Johansson et al. 2013, Ruete et al. 2014), but no study to date has addressed how they will respond to habitat restoration and the landscape scales at which this restoration is most effective.

In a previous study with the same epiphyte model system (Cardós et al. 2016), there was shown to be an effect of fragment size on species richness, with the two most plausible explanations being the positive role of habitat heterogeneity or the existence of relatively more forest interior in larger fragments (weaker edge effects). In order to verify these possibilities, in this study we consider habitat heterogeneity within each forest fragment as a fragment-scale predictor of epiphyte richness. Furthermore, Cardós et al. (2016) also found a counterintuitive positive effect of low quality matrix on fragment richness, which was explained in facilitating the landscape dispersal of propagules. Here we wanted to corroborate the magnitude of this effect, by contrasting this predictor with other landscape attributes over different spatio-temporal scales. The ability of the IFM to describe the distribution of species across habitat fragments is so effective that the inclusion of habitat characteristics (fragment-scale) or the structure of the matrix (landscape-scale) is thought not to substantially improve its explanatory power (Moilanen & Hanski 1998).

We aimed to quantify the explanatory power for epiphyte species richness attributable to the structure of the landscape: its composition at fragment and landscape scales (what and how much) and its spatial configuration (where), along a time-series of 55 years that includes a period of substantial habitat loss (> 85%) impacting the richness of Mediterranean epiphytes. For that purpose, we selected 40 fragments varying in size, structural characteristics and environmental heterogeneity, of which we also know their structure in the past and of the surrounding landscape, thanks to historic aerial photographs. Finally, our goal was to create a statistical model which includes the variables that best explain epiphyte richness, applying not only the known fragment-scale predictors (Cardós et al. 2016), but a more integrative analysis

of the entire landscape, based around information from different spatio-temporal scales. We hypothesized that all the components of the landscape structure, measured in time and space, will have a potential role in determining epiphyte richness.

METHODS

Study site

The study was carried out in the Montes de Toledo range (4°28'W, 39°32'N), in central Spain. The landscape is composed of two main elements: well-preserved and unmanaged Mediterranean forests, which are located in the most inaccessible and/or unproductive sites, and a matrix transformed by human activity (crops, shrublands and open woodlands) that surrounds the surviving forest fragments (Perea and Perea 2008). The forests represent suitable habitat for Mediterranean epiphyte communities, while the matrix can be considered uninhabitable since the great majority of epiphytes do not occur there. This relationship of epiphyte communities with the fragmented landscape has been demonstrated previously (see Cardós et al 2016 for more details of the studied system).

Mediterranean landscapes have a long history of resource extraction and transformation, and their forests have traditionally provided the needs of human society and industry in a densely populated region (Thirgood 1981). The origin of the existing forest structure in the study landscape can be traced to the thirteenth century, when timber was extracted for charcoal production and forests were substituted by crops (Lancha et al 1997). Forest cover reached its low-point in the landscape between the nineteenth and the beginning of the twentieth century, but more efficient agricultural practices and the use of alternative energy sources then slowed forest destruction (López et al 2007). Thereafter, land use was progressively switching to agricultural smallholdings of low production, supported by hunting activities (Galante and Marcos-García, 2013). In 1995 a large proportion of the study area was declared a National Park, and reforestation strategies have allowed the recovery of native

forests over several decades (MAGRAMA 2014). The remnant forest fragments thus represent a patchwork of habitat ‘islands’ of different age (some ancient, some younger), connected to varying degrees within a dynamically changing landscape.

Data collection

For a detailed description of the experimental design and measurement of the variables see Cardós et al (2016). In 2011 we selected 40 forest fragments with high tree cover (>70 %), and which were not affected by an active management regime. The fragments were almost or entirely monospecifically composed of holm oak (*Quercus ilex* subsp. *ballota*). Within each fragment we randomly located between 4 and 8 plots (10 × 10 m), depending on the fragment size, in order to record at least 90 % of the species on the basis of a species-area curve previously developed for this landscape (Aragón, unpublished data). Inside each plot four holm oak trees were selected to be representative of the overall trunk size diversity. On each tree trunk we positioned four 20 × 30 cm survey grids (2 aspects × 2 heights), and recorded epiphytes in these. Finally, we obtained an estimate for the total epiphytic richness of a forest fragment, as the sum total of the different lichen and bryophyte species that occurred in all the fragment’s survey grids. This nested sampling method detected epiphyte richness at four scales (grid, tree, plot and fragment), with a plot level measurement of environmental variables used to examine the relationship between the epiphytic richness and fragment-scale environmental heterogeneity.

Environmental variables measured at the plot level (fragment-scale) were: the mean diameter at breast height (dbh) of all trees, altitude (m.a.s.l.), aspect (cosine transformed), shrubland layer (%), and the canopy openness (%). Additionally, we separately considered the dbh of each tree sampled for epiphytes. Landscape-scale variables were extracted with ArcGis v.10.2.2 (ESRI, Redlands, CA, USA) for three different years (1956, 1982 and 2011), from orthophotos provided by Centro Nacional de Información Geográfica, Spain (1982 and 2011), and Centro Cartográfico del

Ejército del Aire, Spain (1956). In the orthophotos of 1956 (lower quality, black-and-white), it was sometimes difficult to distinguish each different type of forest and matrix category. Current orthophotos were therefore transformed to create low-quality black and white images, with the purpose of understanding how to accurately digitize the different landscape categories from 1956. For each of the 40 selected forest fragments and for the year 2011, we quantified the fragment size (Ha), fragment shape (following the index by Laurance and Yensen 1991) and the percentage of contact for each category of matrix, classified as follows: (1) high-contrast matrix (HCM), composed of crops, stony slopes or shrublands, with strong structural differences compared to the forest fragment, and producing a distinct boundary in the forest microclimate; (2) low-contrast matrix (LCM), composed of open woodlands, that allow for a more gradual change in microclimate in the transition to the forest; and (3) pine plantations (PM), with similar physiognomy to native forests but which are mostly inhospitable for the lichen flora. For the years 1956 and 1982 we quantified the fragment size, which was used to calculate a shift in fragment size (%) over three possible time-series comparisons: 1956–1982, 1982–2011 and 1956–2011.

To test for the influence of the surrounding landscape on epiphyte richness, we established a 1-km buffer around the perimeter of each of the 40 forest fragments. The resulting buffer area is proportional to the fragment size, that allowing us to test the habitat amount hypothesis (Fahrig 2013), which is based on the richness per unit area (species density). We chose the relatively small scale of 1 km because it has been shown to have a role in determining biodiversity patterns of a target site, in opposition to analysis at larger scales (Lindborg and Eriksson 2004, Ellis and Coppins 2007a,b). To create the buffer, we used the fragment size in 2011, and then applied the same buffer for the other years (1956 and 1982) so as to maintain comparable woodland extents over the time. Within each buffer we digitized all the forest fragments with the same tree cover as the focal fragment (>70%), avoiding open woodlands with low tree density. We also considered not only holm oak monospecific forests, but also fragments that were mixed or monospecific of *Quercus pyrenaica*, the other dominant and forest-forming tree species in the landscape. Epiphyte community structure in

these complimentary forests may vary because of slight differences in bark characteristics or other factors, but the species composition is potentially the same (Belinchón et al 2007), and for that reason they are better considered as suitable when measuring landscape habitat availability. We quantified the total surface of any surrounding fragment, even if only a small proportion was included inside the buffer, because it is the contiguous fragment size that is important in explaining epiphyte species richness (Cardós et al. 2016). Every extant fragment wholly or partly within the buffer was weighted to reflect its possible influence as a propagule source on the focal fragment. In order to know the possible effect on epiphytic richness of the current (2011) and historic (1956 and 1982) total habitat amount, habitat fragmentation and habitat connectivity, we created one descriptive variable for each of these three factors. The surface of all the surrounding and focal fragments was summed to obtain the total habitat amount (Ha). The number of forest fragments was divided by the total habitat amount, to give the fragment density (a measure of habitat fragmentation), weighting the total habitat amount by the degree to which it is fragmented. The habitat connectivity was calculated using the equation provided by Hanski (1999, see Statistical Analysis, below), which weights the size of every surrounding fragment within the buffer by the distance to the focal fragment. Additionally, we quantified the percentage of remnant habitat, as a mere landscape descriptor, by dividing the total habitat amount by the total surveyed area within the buffers (in this case contiguous forest area but falling outside of the buffer was not considered).

Statistical analysis

To test the effect of a focal fragment's habitat heterogeneity on epiphyte species richness, we created a variable that summarized the environmental gradients. We generated a data matrix with all the environmental variables measured at both plot and tree-scale (mean plot dbh, altitude, aspect, shrubland layer, canopy openness and dbh of surveyed tree). These variables were summarized using principal components

analysis (PCA), and from six resulting axes, the first two were retained in having explained more than 50% of latent variability with the greatest explanatory power. We then plotted PCA tree scores in a two-dimensional graph using the area (convex hull) of a polygon that was delimited by the sampled trees as the measure of each fragment's habitat heterogeneity.

We tested the effect of the present (2011) fragment- and landscape-scale variables (fragment size, shape, habitat heterogeneity, percentages of HCM and PM, and the interaction between the fragment size and HCM) on epiphyte species richness, using an initial generalized linear model (GLM, McCullagh and Nelder 1989). The species richness was normally distributed so we assumed a Gaussian error distribution and an identity link function. A starting model was reduced by stepwise variable elimination, based on the probability of the slope parameters (Zuur et al. 2009). We thus obtained the simplified model (SM) that best explained the response variable using variables relating to the condition of the fragment in the present-day landscape.

The SM was then used to test the additional important of landscape-scale connectivity for each focal fragment, with its surrounding forest fragments for the years 1956, 1982 and 2011. The connectivity was defined as: $\sum \exp(-\alpha d_j) A_j$, where A_j is the area of the j th fragment located at a distance d_j (perimeter-perimeter) from the focal fragment, for $j = 1$ to n surrounding fragments within the buffer (Hanski 1999). The parameter α controls the distance-decay of propagules from source to sink in the negative exponential model. In the case of past landscape structures, for which species richness patterns are unknown, α can only be interpreted as the degree of importance of surrounding habitat when explaining the richness of a focal fragment as a function of its isolation. This means that for a greater value of α , the epiphyte community will be highly affected by small changes in the surrounding extent and configuration of habitat. The value of α for each of the three years had to be estimated for the data, and for that purpose we modelled the species richness by adding to the SM a connectivity estimate for each year separately. We let α range from 0.001–2, broadly covering the values observed for epiphytes in the previous literature (Snäll et

al 2003; Löbel et al 2009), and finally we selected the value that minimized the unexplained deviance of the expanded SM-connectivity model (Supplementary Material Figure S1). The optimized values of α were used to quantify the connectivity of every focal fragment with its surrounding habitat. The original SM's were thus expanded with optimized connectivity values, using the probability for the slope parameter to estimate significance (Zuur et al 2009).

The same procedure, adding a single variable separately to each SM, was used to test for a significant effect on species richness of (i) total habitat amount and (ii) habitat fragmentation, over each of the three time-periods, and (iii) for the shift in fragment size during the three time periods, obtaining thereby twelve expanded SMs. As previously, the significance of the variable used to expand the SM was based on the probability of the slope parameter. The expanded models in which the variable added to the SM resulted in significance at a P -value < 0.05 were examined using hierarchical partitioning of the variance (Chevan and Sutherland 1991). This allowed us to quantify the independent contribution of each explanatory variable to the total deviance explained by the model, and its unique importance in explaining epiphyte species richness. We used a final model composed of the SM plus the variables that had a significant effect when tested in the set of expanded SMs. The SM (the simplest) and the final model (SM plus additional significant variables) were each subject to hierarchical partitioning of variance, to observe the change in explanatory power of the models, and of the variables themselves, with the progressive addition of other significant effects. All the statistical analyses were conducted with the software R v.3.2.2 (R Core Team 2015).

RESULTS

A total of 117 epiphyte species (lichens, mosses and liverworts) were sampled from the 40 fragments surveyed. The size range of focal fragments was similar among each of the three time-periods (Table 1). The mean shift in focal fragment size was 55.26

% for the period 1956–1982, 209.19 % for 1982–2011 and 110.59 % for the whole period (1956–2011). For results of the variables measured in 2011, at tree (surveyed tree dbh), plot (mean plot dbh, altitude, aspect, shrubland layer and canopy openness) and fragment-scale (size, shape, HCM, LCM and PM), see Cardós et al (2016). The PCA values of habitat heterogeneity ranged from 0.1 to 4.1 (mean \pm SD: 1.4 ± 1.0).

Table 1 Values of landscape-scale parameters that describe all the factors covered in this study, for the three considered time-periods. The habitat connectivity is expressed as the mean per focal fragment. To obtain details on calculations of the α confidence limits see Supplementary Material Fig. S1.

	1956	1982	2011
Fragment (focal) size range (Ha)	0–85.36	0.14–83.23	1.54–96.94
Total habitat amount (Ha)	1417	2279	2949
Remnant habitat (%)	6.6	10.6	13.7
Habitat fragmentation			
Number of fragments	269	304	297
Fragment density	0.19	0.13	0.10
Habitat connectivity			
α	0.0002	0.8688	0.6005
(95% confidence limits)	(0.343–0.487)	(0.051–0.082)	(0.100–0.126)

In relation to the surrounding landscape, the total suitable (forest) habitat for the epiphyte community has doubled in the last 55 years (Table 1). The lowest number of forest fragments was found for the earliest time-period (1956), and since then the landscape has experienced a net regeneration of forest. Measures of habitat fragmentation have steadily decreased, i.e. the density of fragments as a function of the total habitat has diminished, which implies that extant fragments have increased in size. Habitat connectivity reached a maximum in 1982, corresponding to a stage with an intermediate amount of forest habitat. The habitat connectivity was lower in 1956 than in the other time-periods (Table 1).

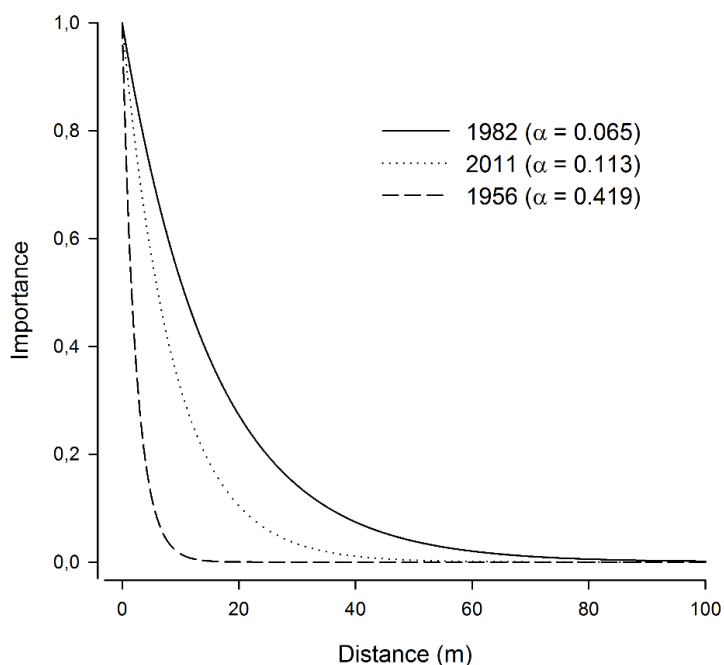


Figure 1 Importance of the surrounding habitat in explaining species richness in the focal fragment, as a function of the distance, for the three time-periods. The negative exponential curve for the year 2011 can be also interpreted as the dispersal function of the epiphyte metacommunity in the present landscape, and its importance quantifies the probability value of a dispersal event.

The values of α showed an inverse pattern related to connectivity (Table 1), which implies that the importance of the surrounding habitat on the species richness of the focal fragment decreased more rapidly with increasing distance in the earliest (also the less connected) landscape (Fig.1). The value of $\alpha = 0.113$ for the current landscape shapes the dispersal kernel for understanding the metacommunity in the year 2011.

After stepwise selection to identify an optimum model for predicting epiphyte species richness in the current landscape (2011), the SM included fragment size, HCM and their interaction. The variable heterogeneity was not retained in the SM, and its effect on species richness appeared neutral. The set of expanded models (Table 2)

showed that habitat connectivity in 1956 significantly increased the explanation of species richness, while a greater shift in fragment size for the period 1982–2011 resulted in a significantly lower number of species. Neither historic (1956 and 1982) nor present (2011) total habitat amount and habitat fragmentation showed any additional effect on species richness (Table 2).

Table 2 Expanded models. Values of the slope (\pm standard error) and significance, of the explanatory variables in each time-period, that expanded consecutively on the simplified generalized linear model (SM) of species richness. Values in bold are statistically significant ($P < 0.05$).

	Estimate	SE	<i>P</i>
Total habitat amount			
1956	4.194×10^{-15}	6.457×10^{-14}	0.949
1982	-0.005	0.021	0.777
2011	0.005	0.009	0.574
Habitat fragmentation			
1956	6.461	5.653	0.261
1982	19494	9955	0.058
2011	3160	12677	0.805
Habitat connectivity			
1956	2953.7	1351.2	0.036
1982	-0.906	0.709	0.210
2011	1241	1068	0.253
Shift in fragment size			
1956–1982	-0.019	0.011	0.080
1982–2011	-0.005	0.001	<0.001
1956–2011	-0.017	0.009	0.051

The final model was therefore composed of the three variables of the SM (fragment size, HCM and their interaction) together with habitat connectivity in 1956 and shift in fragment size from 1982–2011 (Table 3). All the variables of the final model exerted a significant effect on species richness when considered together in a single model (Table 3). The fragment size (2011), the HCM (2011) and the habitat connectivity (1956) increased epiphyte species richness, while the shift in fragment

size (1982–2011) had a negative effect on richness. The interaction between the fragment size and the HCM also had a negative effect, demonstrating that as the fragment size increases, the influence of HCM becomes negative.

Table 3 The final model with current and past fragment- and landscape-scale variables that improve the explanation of the observed species richness. This was derived by con-joining the simplified model (SM) of the present landscape (fragment size, HCM and the interaction) with two statistically-significant variables related to the past landscape that accounted for unexplained deviance in the SM. Values in bold are statistically significant ($P < 0.05$). HCM = high-contrast matrix.

	Estimate	SE	<i>P</i>
Intercept	32.9	2.303	< 0.001
Fragment size (2011)	0.510	0.076	< 0.001
HCM (2011)	0.113	0.043	0.013
Fragment size × HCM (2011)	−0.006	0.002	0.002
Habitat connectivity (1956)	2822.9	1150.2	0.019
Shift in fragment size (1982–2011)	−0.005	0.001	< 0.001

Variance partitioning analysis showed that the final model with added variables was able to explain a greater percentage of the variance in species richness than the SM (71% vs. 53.15%) (Fig. 2). The independent addition to the SM of significant variables relating to the historic landscape improved its explanatory power. The fragment size in 2011 had the strongest effect in all cases, while the HCM only explained a very small part of the unique variance (< 0.20% in the four models). Both the habitat connectivity in 1956 and the shift in fragment size in 1982–2011 were important, as implied in the expanded models, but the latter had approximately four times the explanatory power of the former (16.8% vs. 4.7% in the final model). In the final model, both historic variables together explained half of the variance compared to fragment size in 2011 (21.6% vs 43.7%). Finally, the variables related to forest fragment (fragment size in 2011 and shift in fragment size in 1982–2011) appear more important in explaining observed species richness than the forest structure of the surrounding landscape, i.e. habitat connectivity in 1956 (60.5% vs. 4.7%).

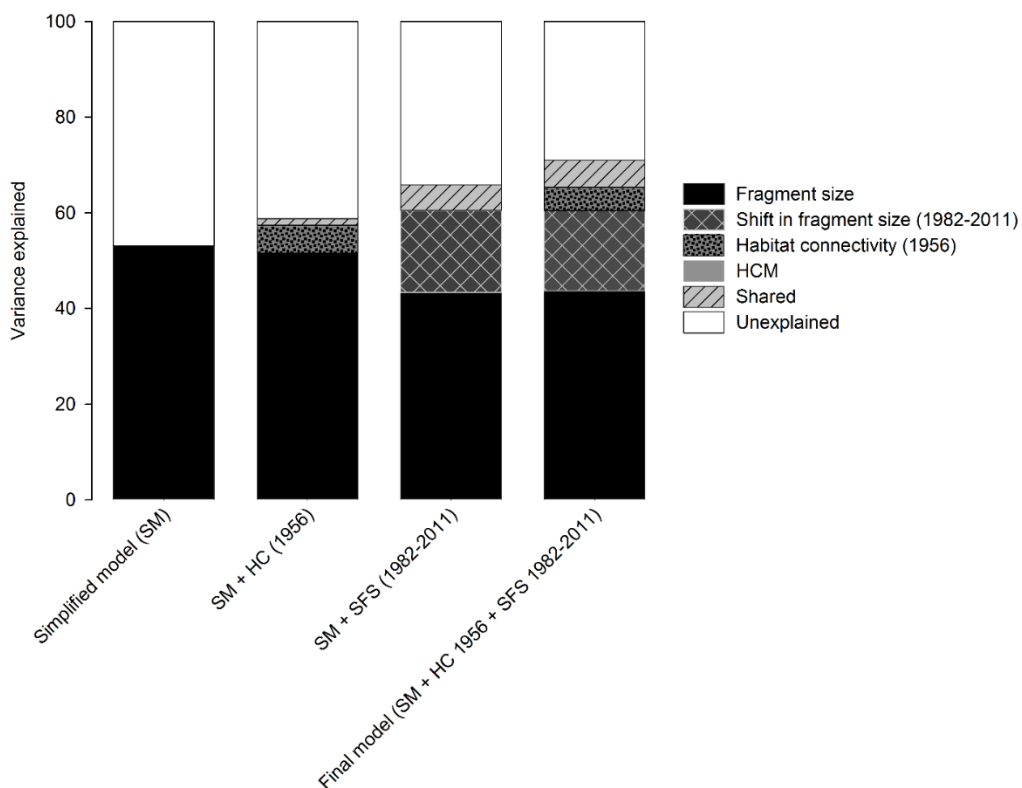


Figure 2 Percentage of variation of the response variable (species richness) uniquely explained by each independent variable in the best-fitting models. The first bar represents the simplified model (SM), composed of the variables fragment size and HCM in 2011 (the interaction is not considered in this analysis). The second and third bars represent the SM and the addition of, respectively, the habitat connectivity (HC) in 1956 and the shift in fragment size (SFS) for the period 1982–2011. The fourth bar includes the SM and both past variables HC and SFS. In the four models, the contribution of the HCM is very small (< 0.20%), and its light grey band is almost imperceptible. ‘Shared’ refers to the variance that cannot be attributable exclusively to one variable. *HCM* = high-contrast matrix

DISCUSSION

This study on epiphyte communities in relation with the structure of a highly fragmented landscape over a period of 55 years in a context of habitat recovery, demonstrates that the species richness is explained by the shift in fragment size in the last 29 years and the historic connectivity with the surrounding landscape 55 years

ago, in addition to the fragment size and surrounding matrix. However, the fragment shape, habitat heterogeneity and the historic and present habitat amount and fragmentation in the surrounding landscape did not have any effect on the species richness. The results also show that the fragment-scale effects have much greater impact on the species richness, and is perceived faster (0–29 years), than the landscape-scale habitat structure (55 years).

Fragment-scale effects

Fragment effects are mainly composed by the fragment size and its shift in size in the last 29 years (because the effect of the HCM, albeit consistent, is very small). The fragment size positive effects on species richness have been largely demonstrated for different groups of organisms (Bender et al. 1998, Hanski 1999, Fahrig 2003, Ewers & Didham 2006, Munguía-Rosas & Montiel 2014). A main argument to explain this pattern based on metapopulation dynamics is that larger fragments sustain larger populations, which are farther from stochastic extinction events (Hanski 1999, Fahrig 2003, Ewers & Didham 2006). In the case of epiphytes, it also seems to be an indirect positive relationship between fragment size and species richness through habitat heterogeneity (Gignac & Dale 2005). This was also suggested in a previous work on the same study system (Cardós et al. 2016) together with the existence of a forest ‘core area’ with very different properties than the edge that would allow the occurrence of a large number of typical forest species. In our analysis we obtained no effect of habitat heterogeneity, consequently the incidence of the ‘core area’ effect and the metapopulation dynamics seem to operate in this community.

In the case of the matrix surrounding the fragments, the HCM contributed to an increase in the number of species in the smaller fragments, while the effect became negative as the fragment size increased. We discard any positive effect of the HCM in relation with an amelioration of forest microclimate (Murcia 1995, Prevedello & Vieira 2010). The positive influence opposes to the generally accepted ‘structural

similarity' hypothesis (Prevedello & Vieira 2010), which means that a more contrasting ecotone between the habitat fragment and the matrix will reduce the number of species (Aragón et al. 2015). For epiphytes, it was already suggested that in this positive effect on small fragments lacking a significant core area, could be hypothetically based on the non-hampering of dispersal processes (Johansson et al. 2014, Cardós et al. 2016). Interestingly we have found a positive influence of the connectivity with the surrounding landscape of 55 years ago, which necessarily demonstrates the importance of dispersal in configuring this metacommunity. However, the structure of the matrix was recorded at the present day, so a direct relationship with dispersal is not attributable. It could be that the current structure of the matrix is a reflect of the stage of the past matrix, but it is improbable since the dynamics of the matrix is presumably much faster than the forest (Eriksson 1996). The most plausible explanation with the data available is that the HCM interacts with the surrounding landscape at a different scale than that considered here, e.g. long-distance dispersal events are highly responsible of the configuration of the epiphyte communities (Lönnell et al. 2014, Gjerde et al. 2015, Barbé et al. 2016).

The shift in size of the forest fragments in the last 29 years had a strong effect on species richness. The analysis showed that larger increments return a significantly lower number of species. This counterintuitive result obviously does not mean that the regeneration of forest area led to a decrease in richness, but it is related with a lag in the recolonization. Firstly, to consider this possibility we have to verify that the fragments are not saturated (Pärtel et al 1996), which is that the number of species in the forest fragments is far below the species regional pool. Along surveys we recorded 117 epiphyte species, while the richest fragment hosted 73 species (Cardós et al. 2016), so there are still a large number of species that could colonize the fragments. Furthermore, this strong relationship is enhanced by the smaller fragments, which have the lower richness values but in turn have the possibility to experience larger proportional growth. Thus the effect of this variable is related with the lack of species in those fragments that grew in size, and there is therefore a lag (~29 years) between the habitat recovery and the proportional increase in species number, that could be

working as an inverse extinction debt (Tilman et al. 1994). For better understanding one might think that contrarily, if the response had been neutral or positive, we could maintain that the community showed a quick response to the forest dynamics because the shift in fragment size is imperceptible or even is followed by a fast recolonization.

Landscape-scale effects

The epiphyte community richness is modulated by the structure of the landscape through the connectivity of the forest fragment with the surrounding landscape more than half century ago, but neither the total habitat amount (landscape composition) nor the degree of fragmentation of the remaining habitat along all the historical period had any effect.

This results demonstrate that the landscape composition by itself is not sufficient to understand the richness patterns in fragmented habitats, but its configuration also has a very important role. The ‘habitat amount hypothesis’ (Fahrig 2013) proposed that the effect of the total habitat amount around a sampling point is so strong that would override the degree of subdivision or the distance among fragments. However recent studies reject the hypothesis and show that the landscape configuration matters (Evju & Sverdrup-Thygeson 2016, Haddad et al. 2016). The functioning of animal communities seems to be different, mainly owed to their movement capacity, and the total habitat amount regardless its configuration exerts a positive influence because they show less dispersal constraints at the landscape scale in which these studies are carried out (Radford & Bennet 2007, Ryberg & Fitzgerald 2016). For this reason, the hypothesis should be different for sessile organisms, and the spatial configuration of the landscape has to be included in the models. The configuration of the landscape produces e.g. a larger proportion of edge habitats in more subdivided forests. Likewise, the spatial pattern of fragments determines the dispersal distances that a propagule has to overcome to colonize new habitats. In the case of epiphytes, as well as for other sessile organisms like plants, it has been shown

that the configuration of the landscape is very important because of reasons of habitat quality (Aragón et al. 2015, Cardós et al. 2016) or dispersal limitations (Snäll et al. 2003, Öckinger et al. 2005).

In order to test the effect of habitat quality, (i. e. the edge-core area proportion) through the subdivision degree of the surrounding habitat, we weighted the total habitat amount by the number of fragments. With this variable we are not actually testing the effects of fragmentation *per se* (Fahrig 2003), but it is a measure of the additive effects of habitat fragmentation to habitat loss, because we cannot modify the studied system to fix the habitat amount across replicates with that purpose. This landscape is in a stage of great habitat loss, because the forest surface is always below 20% of remaining habitat during the whole period of 55 years considered (most of the surface within the buffers can be potentially occupied by native forests). It has been suggested (Andrén 1994, Fahrig 1998, 2001, With 2016) that below the threshold of 20–30% remaining habitat, the effects of fragmentation would appear more intense, however we did not find this effect. In situations of low habitat availability, the number of species close to the extinction threshold increases because the population sizes are smaller (Bascompte & Rodriguez 2001, Fahrig 2001). It is possible that the strong effect of fragment size found here could be caused by this situation, but definitely we cannot corroborate this interaction at landscape scale. Either way, more habitat subdivision implies the degradation of more habitat at the fragment edge, and edge effects have been shown to exert a strong effect on epiphyte communities (Belinchón et al. 2007, Brunialti et al. 2013, Aragón et al. 2015, Cardós et al. 2016). However, this studies do not report a richness decrease, but changes in community composition as well as diversity (evenness).

Epiphyte richness was only affected at the landscape scale by habitat connectivity in 1956, which demonstrates a lag in the community response to a dynamic landscape structure. The connectivity is composed by two landscape elements (Hanski 1999, Hanski 2015): the size of habitat remnants (composition) and the distance to the focal fragment (configuration). When larger fragments, which have

been probed to contain a greater number of species, are closer, which reduce dispersal constraints, the focal fragment experiences a significant increase in the number of species. This approach to understand the effect of the landscape structure on richness patterns derived from metacommunity dynamics has received large support (Moilanen & Hanski 1998, Snäll et al. 2003, Lindborg & Eriksson 2004, Löbel et al. 2006, Virtanen & Oksanen 2007, Löbel et al. 2009, Johansson et al. 2013, Ruete et al. 2014). Metacommunity system functioning (following the IFM, Hanski 1994) is simple: larger habitat units sustain more species with populations more numerous that reduce the probability of extinction events, and shorter distances promotes the arrival of more propagules of more species increasing the rescue effect. The effect of isolation at landscape scale is important for plants (Munguía-Rosas & Montiel 2014) as well as for epiphytes (Snäll et al. 2003, Ruete et al. 2014) and animals (Moilanen & Hanski 1998, Bailey et al. 2010), although not all the animal metacommunities are shaped by these parameters (Bailey et al. 2010, Ryberg & Fitzgerald 2016). The main reason could be that not all the organisms perceive the discrete boundaries of habitat fragments as sessile specialists do, but is also reasonable that metacommunities are better explained by preterit connectivities than present ones because of a lag in the response, as we have found here and in other studies (Lindborg & Eriksson 2004, Ellis and Coppins 2007a,b, Johansson et al. 2013). Epiphyte traits like being long-lived organisms with dispersal constraints may be the cause of the delayed response to landscape modifications if compared with e.g. short-lived plants, which do not show this pattern (Adriaens et al. 2006). In view of our results, it is then possible that future richness patterns reflect the current connectivity, which means that lengthy expecting periods (e. g. several decades) could be necessary to yield the benefits of forest restoration or to attend the consequences of habitat loss.

In relation with the effects of isolation on epiphytes, we have found the expected dispersal kernel for this type of propagule-dispersed organisms. The value of α obtained for the current landscape ($\alpha = 0.113$ in 2011) is comparable to values found for spore dispersing mosses ($-0.87 < \alpha < 0.12$, Snäll et al. 2003), the lichen *Lobaria pulmonaria* ($\alpha = 0.01$, Gu et al. 2001) or mosses dispersed by stoloniferous

branchlets ($\alpha = 0.60$, Löbel et al. 2009). The epiphyte community studied by us is composed by species dispersing mainly by isidia ($N = 18$), soredia ($N = 33$) and spores ($N = 66$), in decreasing order of propagule size. This variety of dispersing modes prevent us from extracting reliable conclusions other than the community is dispersing at distances in agreement with the available data. Hence, given the large species pool present in the region, there is an interesting potential of species exchange among habitat fragments with increasing landscape connectivity. The current and historic values of α also give the measure of the importance of the surrounding habitat in relation with distance in explaining the richness within focal fragments. Thus, larger values indicate that the explanatory power of the nearby fragments decreases very fast already at short distances. This implies that in the landscape of 1956, the interchange of species among fragments was the lowest, so there was a higher level of species heterogeneity (turnover) at minor scales, and for that reason small changes in connectivity produced significant responses in species richness. Due the slow response of the epiphyte community richness that is structured by the historic connectivity, in addition to the subsequent increase of forest surface connectivity in the following years, it is expectable that the recently created forest surfaces increase in epiphyte species density in the forthcoming decades. It means that the 40 fragments surveyed can potentially host a higher number of species than those recorded in 2011, even maintaining their area constant.

Acknowledgements

The authors thank the Spanish Government for funding this research through the projects CGL2010-22049 and CGL2013-47010-P, and the PhD grant BES-2011-046139.

REFERENCES

- Adriaens, D., Honnay, O., & Hermy, M. (2006). No evidence of a plant extinction debt in highly fragmented calcareous grasslands in Belgium. *Biological Conservation*, 133(2), 212-224.
- Andren, H. (1994). Effects of habitat fragmentation on birds and mammals in landscapes with different proportions of suitable habitat: a review. *Oikos*, 71(3), 355-366.
- Aragón, G., Abuja, L., Belinchón, R., & Martínez, I. (2015). Edge type determines the intensity of forest edge effect on epiphytic communities. *European Journal of Forest Research*, 134(3), 443-451.
- Aragón, G., Martínez, I., Izquierdo, P., Belinchón, R., & Escudero, A. (2010). Effects of forest management on epiphytic lichen diversity in Mediterranean forests. *Applied Vegetation Science*, 13(2), 183-194.
- Bailey, D., Schmidt-Entling, M. H., Eberhart, P., Herrmann, J. D., Hofer, G., Kormann, U., & Herzog, F. (2010). Effects of habitat amount and isolation on biodiversity in fragmented traditional orchards. *Journal of Applied Ecology*, 47(5), 1003-1013.
- Barbé, M., Fenton, N. J., & Bergeron, Y. (2016). So close and yet so far away: long-distance dispersal events govern bryophyte metacommunity reassembly. *Journal of Ecology*, 104(6), 1707-1719.
- Bascompte, J., & Rodriguez, M. A. (2001). Habitat patchiness and plant species richness. *Ecology Letters*, 4(5), 417-420.
- Belinchón, R., Martínez, I., Escudero, A., Aragón, G., & Valladares, F. (2007). Edge effects on epiphytic communities in a Mediterranean *Quercus pyrenaica* forest. *Journal of Vegetation Science*, 18(1), 81-90.
- Bender, D. J., Contreras, T. A., & Fahrig, L. (1998). Habitat loss and population decline: a meta-analysis of the patch size effect. *Ecology*, 79(2), 517-533.
- Brunialti, G., Frati, L., & Loppi, S. (2013). Fragmentation of Mediterranean oak forests affects the diversity of epiphytic lichens. *Nova Hedwigia*, 96(1-2), 265-278.
- Cardós, J. L. H., Martínez, I., Calvo, V., & Aragón, G. Epiphyte communities in Mediterranean fragmented forests: importance of the fragment size and the surrounding matrix. *Landscape Ecology*, 31(9), 1975-1995.
- Ceballos, G., Ehrlich, P. R., Barnosky, A. D., García, A., Pringle, R. M., & Palmer, T. M. (2015). Accelerated modern human-induced species losses: Entering the sixth mass extinction. *Science advances*, 1(5), e1400253.
- Chevan, A. and Sutherland, M. 1991 Hierarchical Partitioning. *The American Statistician* 45, 90–96.
- del Castillo, R. F. (2015). A conceptual framework to describe the ecology of fragmented landscapes and implications for conservation and management. *Ecological Applications*, 25(6), 1447-1455.
- Didham, R. K., Kapos, V., & Ewers, R. M. (2012). Rethinking the conceptual foundations of habitat fragmentation research. *Oikos*, 121(2), 161-170.

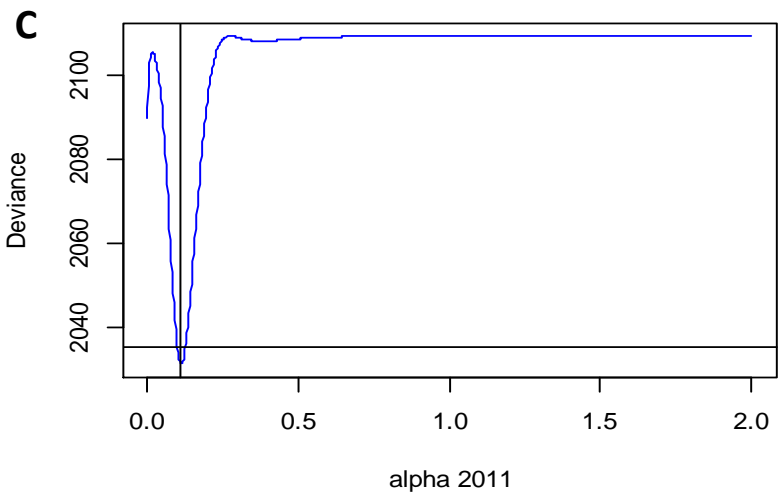
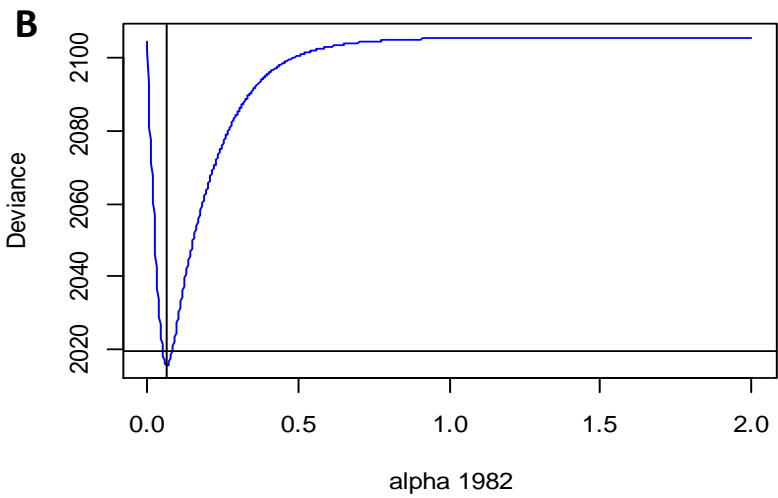
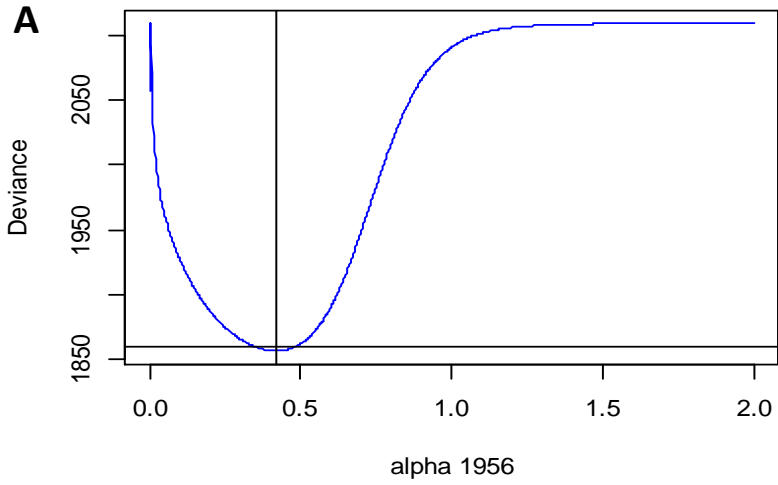
- Ellis, C. J., & Coppins, B. J. (2007a). 19th century woodland structure controls stand-scale epiphyte diversity in present-day Scotland. *Diversity and distributions*, *13*(1), 84-91.
- Ellis, C. J., & Coppins, B. J. (2007b). Changing climate and historic-woodland structure interact to control species diversity of the ‘Lobarion’ epiphyte community in Scotland. *Journal of Vegetation Science*, *18*(5), 725-734.
- Eriksson, O. (1996). Regional dynamics of plants: a review of evidence for remnant, source-sink and metapopulations. *Oikos*, *77*(2), 248-258.
- Evju, M., & Sverdrup-Thygeson, A. (2016). Spatial configuration matters: a test of the habitat amount hypothesis for plants in calcareous grasslands. *Landscape Ecology*, *31*(9), 1891-1902.
- Ewers, R. M., & Didham, R. K. (2006). Confounding factors in the detection of species responses to habitat fragmentation. *Biological Reviews*, *81*(01), 117-142.
- Fahrig, L. (1998). When does fragmentation of breeding habitat affect population survival? *Ecological Modelling*, *105*(2), 273-292.
- Fahrig, L. (2001). How much habitat is enough? *Biological conservation*, *100*(1), 65-74.
- Fahrig, L. (2003). Effects of habitat fragmentation on biodiversity. *Annual review of ecology, evolution, and systematics*, *34*, 487-515.
- Fahrig, L. (2013). Rethinking patch size and isolation effects: the habitat amount hypothesis. *Journal of Biogeography*, *40*(9), 1649-1663.
- Flather, C. H., & Bevers, M. (2002). Patchy reaction-diffusion and population abundance: the relative importance of habitat amount and arrangement. *The American Naturalist*, *159*(1), 40-56.
- Galante, E. and M. A. Marcos-García. 2013. El bosque mediterráneo ibérico: un mundo manejado y cambiante. In E. Micó, M. A. Marcos-García and E. Galante [eds.], *Los Insectos saproxílicos del Parque Nacional de Cabañeros*, 11–32. Ministerio del Medio Ambiente, Madrid, Spain.
- Gignac, L. D., & Dale, M. R. (2005). Effects of fragment size and habitat heterogeneity on cryptogam diversity in the low-boreal forest of western Canada. *The bryologist*, *108*(1), 50-66.
- Gjerde, I., Blom, H. H., Heegaard, E., & Sætersdal, M. (2015). Lichen colonization patterns show minor effects of dispersal distance at landscape scale. *Ecography*, *38*(9), 939-948.
- Gu, W. D., Kuusinen, M., Konttinen, T., & Hanski, I. (2001). Spatial pattern in the occurrence of the lichen *Lobaria pulmonaria* in managed and virgin boreal forests. *Ecography*, *24*(2), 139-150.
- Haddad, N. M., Brudvig, L. A., Clobert, J., Davies, K. F., Gonzalez, A., Holt, R. D. & Cook, W. M. (2015). Habitat fragmentation and its lasting impact on Earth’s ecosystems. *Science Advances*, *1*(2), e1500052.
- Haddad, N. M., Gonzalez, A., Brudvig, L. A., Burt, M. A., Levey, D. J., & Damschen, E. I. (2016). Experimental evidence does not support the Habitat Amount Hypothesis. *Ecography*, *40*(1), 48-55.
- Hanski, I. (1994). A practical model of metapopulation dynamics. *Journal of animal ecology*, *63*, 151-162.

- Hanski, I. (1999). *Metapopulation ecology*. Oxford University Press, Oxford.
- Hanski, I. (2015). Habitat fragmentation and species richness. *Journal of Biogeography*, 42(5), 989-993.
- Harrison, S., & Bruna, E. (1999). Habitat fragmentation and large-scale conservation: what do we know for sure? *Ecography*, 22(3), 225-232.
- Honkanen, M., Roberge, J. M., Rajasärkkä, A., & Mönkkönen, M. (2010). Disentangling the effects of area, energy and habitat heterogeneity on boreal forest bird species richness in protected areas. *Global Ecology and Biogeography*, 19(1), 61-71.
- Johansson, V., Ranius, T., & Snäll, T. (2014). Development of secondary woodland decreases epiphyte metapopulation sizes in wooded grasslands. *Biological Conservation*, 172, 49-55.
- Johansson, V., Snäll, T., & Ranius, T. (2013). Estimates of connectivity reveal non-equilibrium epiphyte occurrence patterns almost 180 years after habitat decline. *Oecologia*, 172(2), 607-615.
- Koper, N., Schmiegelow, F. K., & Merrill, E. H. (2007). Residuals cannot distinguish between ecological effects of habitat amount and fragmentation: implications for the debate. *Landscape Ecology*, 22(6), 811-820.
- Lancha M. A. S. J., J. C. Gutiérrez and I. Rábano. 1997. Geología y Paleontología. In V. García [ed.], Parque Nacional de Cabañeros, 51–76. Ecohábitat, Madrid, Spain.
- Laurance, W. F., & Yensen, E. (1991). Predicting the impacts of edge effects in fragmented habitats. *Biological conservation*, 55(1), 77-92.
- Lindborg, R., & Eriksson, O. (2004). Historical landscape connectivity affects present plant species diversity. *Ecology*, 85(7), 1840-1845.
- Löbel, S., Snäll, T., & Rydin, H. (2006). Metapopulation processes in epiphytes inferred from patterns of regional distribution and local abundance in fragmented forest landscapes. *Journal of Ecology*, 94(4), 856-868.
- Löbel, S., Snäll, T., & Rydin, H. (2009). Mating system, reproduction mode and diaspore size affect metacommunity diversity. *Journal of ecology*, 97(1), 176-185.
- Lönnell, N., Jonsson, B. G., & Hylander, K. (2014). Production of diaspores at the landscape level regulates local colonization: an experiment with a spore-dispersed moss. *Ecography*, 37(6), 591-598.
- López, F., J. Muñoz and J. Jiménez. 2007. Cabañeros: un bosque mediterráneo. Lunwerg, Madrid, Spain.
- MAGRAMA. 2014. Diagnóstico del sector forestal español. Ministerio de Medio Ambiente, Madrid.
- McCullagh, P. & Nelder, J.A. (1989) *Generalized linear models*, 2nd edn. Chapman & Hall, London
- Moilanen, A., & Hanski, I. (1998). Metapopulation dynamics: effects of habitat quality and landscape structure. *Ecology*, 79(7), 2503-2515.
- Munguía-Rosas, M. A., & Montiel, S. (2014). Patch size and isolation predict plant species density in a naturally fragmented forest. *PloS one*, 9(10), e111742.
- Murcia, C. (1995). Edge effects in fragmented forests: implications for conservation. *Trends in ecology & evolution*, 10(2), 58-62.

- Öckinger, E., Niklasson, M., & Nilsson, S. G. (2005). Is local distribution of the epiphytic lichen *Lobaria pulmonaria* limited by dispersal capacity or habitat quality? *Biodiversity & Conservation*, *14*(3), 759-773.
- Pärtel, M., Zobel, M., Zobel, K., & van der Maarel, E. (1996). The species pool and its relation to species richness: evidence from Estonian plant communities. *Oikos*, *75*:111-117.
- Perea, D. F., & Perea, R. (2008). *Vegetación y Flora de los Montes de Toledo*. Ediciones Covarrubias, Toledo.
- Prevedello, J. A., & Vieira, M. V. (2010). Does the type of matrix matter? A quantitative review of the evidence. *Biodiversity and Conservation*, *19*(5), 1205-1223.
- R Core Team (2015). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Radford, J. Q., & Bennett, A. F. (2007). The relative importance of landscape properties for woodland birds in agricultural environments. *Journal of Applied Ecology*, *44*(4), 737-747.
- Ruete, A., Fritz, Ö., & Snäll, T. (2014). A model for non-equilibrium metapopulation dynamics utilizing data on species occupancy, patch ages and landscape history. *Journal of Ecology*, *102*(3), 678-689.
- Ryberg, W. A., & Fitzgerald, L. A. (2016). Landscape composition, not connectivity, determines metacommunity structure across multiple scales. *Ecography* *39*: 932-941.
- Snäll, T., Hagström, A., Rudolphi, J., & Rydin, H. (2004). Distribution pattern of the epiphyte *Neckera pennata* on three spatial scales—importance of past landscape structure, connectivity and local conditions. *Ecography*, *27*(6), 757-766.
- Snäll, T., Ribeiro Jr, P. J., & Rydin, H. (2003). Spatial occurrence and colonisations in patch-tracking metapopulations: local conditions versus dispersal. *Oikos*, *103*(3), 566-578.
- Swift, T. L., & Hannon, S. J. (2010). Critical thresholds associated with habitat loss: a review of the concepts, evidence, and applications. *Biological reviews*, *85*(1), 35-53.
- Thirgood, J. V. (1981). *Man and the Mediterranean forest*. Acad. Press. London
- Tilman, D., May, R. M., Lehman, C. L., & Nowak, M. A. (1994). Habitat destruction and the extinction debt. *Nature*, *371*: 65-66.
- Tscharntke, T., Tylianakis, J. M., Rand, T. A., Didham, R. K., Fahrig, L., Batary, P. & Ewers, R. M. (2012). Landscape moderation of biodiversity patterns and processes-eight hypotheses. *Biological Reviews*, *87*(3), 661-685.
- Virtanen, R., & Oksanen, J. (2007). The effects of habitat connectivity on cryptogam richness in boulder metacommunity. *Biological Conservation*, *135*(3), 415-422.
- With, K. A. (2016). Are landscapes more than the sum of their patches? *Landscape Ecology*, *31*(5): 969-980.
- Yamaura, Y., Kawahara, T., Iida, S., & Ozaki, K. (2008). Relative importance of the area and shape of patches to the diversity of multiple taxa. *Conservation Biology*, *22*(6), 1513-1522.
- Zuur AF, Ieno EN, Walker N, Saveliev AA, Smith GM (2009) *Mixed effects models and extensions in ecology with R*. Springer, New York

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Figure S1 Variation of deviance for the regression model (SM + habitat connectivity) in A) 1956, B) 1982 and C) 2011, along the range of α values (0.001–2) selected based on the previous literature in epiphyte dispersal. The vertical line within the plot indicates the α value that minimize the deviance (this value was afterwards used to calculate the habitat connectivity in each year), and the horizontal line represents the critical deviance value corresponding to a $P = 0.05$ level in a Chi-square distribution. The cut-off points between the blue line and the horizontal line are then the values of the 95% confidence limits of α .



CAPÍTULO 3/CHAPTER 3

A species on a tightrope or how to find the equilibrium



Juan Luis H. Cardós • Gregorio Aragón • Isabel Martínez

Manuscrito en revisión en *American Journal of Botany*

ABSTRACT

Premise of the study: Habitat loss and forest fragmentation interfere in the dispersal and establishment of species. Furthermore, populations growing far from the species optimal climate might undergo more problems, because its weak equilibrium with the environment could be more easily altered. The lichen *Pectenia plumbea* has oceanic climatic requirements, so in the Mediterranean region needs the humidity provided by old-growth forests to thrive, but most of this habitat has disappeared and the remnants are fragmented. In central Spain, this species only occupies a small proportion of the existing forests, so we aimed to determine whether this scattered distribution is due to limitations on dispersal or establishment.

Methods: We selected a Mediterranean fragmented forest surface in central Spain, and extracted environmental variables from 400 plots. We modeled the presence and abundance of *P. plumbea* and developed species distribution models (SDMs) to detect all the suitable habitats inside the Cabañeros National Park area.

Key results: *P. plumbea* was present in most of the habitats predicted as good quality, and generally absent from the poor quality zones (87.3% overall success). The abundance correlated fairly well with that predicted by the SDM (67%). Both models show that *P. plumbea* is linked to high temperature and precipitation.

Conclusions: These requirements are only provided in the region by specific forested stony slopes derived from the historical land management, which reproduce oceanic conditions. This habitat is scarce but *P. plumbea* has successfully tracked all of these scattered areas via its high dispersal capacity.

Keywords: dispersal; epiphyte cyanolichen; edge effect; establishment; fragmentation; habitat loss; lichen reproductive stages; *Pectenia plumbea*; predictive modeling; species distribution models (SDMs)

INTRODUCTION

Habitat loss and fragmentation are two of the most important of the anthropogenic factors that are causing worldwide species decline (Young and Clarke, 2000). These factors can destroy or modify the species habitat, thereby transforming continuous distribution ranges into patchy distribution patterns. Habitat loss might decrease the number of individuals, increase the extinction probability of every subpopulation and hinder recolonization (Hanski, 1994). The effects of habitat loss and fragmentation on the distribution of a species depend on the ability of the species to spread in the available habitat (Gaston, 2003). The colonization of new areas depends on two key steps during the life cycle of sessile organisms (Nathan et al., 2008): dispersal where it is assumed that a propagule can travel distances between suitable existing habitats, and establishment where a dispersed propagule must form a new viable individual. Both of these steps are harder to complete under conditions with habitat loss and fragmentation (Herben and Södeström, 1992). Fragmentation-derived environmental factors, such as the edge effect (Murcia, 1995), matrix type (Aragón et al., 2015), and distance among fragments (Öckinger et al., 2005), play very important roles in the success of dispersal and establishment processes. It is assumed that a larger and less subdivided habitat will be more desirable for an organism inhabiting a previously continuous landscape (Hanski, 1994; Ewers and Didham, 2006).

Strong evidence suggests that the dispersal of lichens and other spore-dispersed organisms is limited at local scales (Armstrong, 1990; Walser et al., 2001; Öckinger et al., 2005; Giordani et al., 2015) mainly because of the rapid decline in the number of propagules that are dispersed with distance (Tapper, 1976; Walser et al., 2001; Werth et al., 2006). Limitations persist at larger scales (Edman et al., 2004; Palice and Printzen, 2004) but it has been shown that lichens can reach all of the existing suitable habitats if sufficient time is allowed (Lättman et al., 2009; Gjerde et al., 2015).

The process of establishment is governed by multiple factors. Symbiotic organisms such as lichens require a fungal partner (mycobiont) and an

algal/cyanobacterial partner (photobiont) (Honneger, 1998). This complex structure clearly requires a sophisticated reproduction process. Sexual reproduction generates fungal spores, which are considered useful for long-distance dispersal (Werth et al., 2006; Lönnell et al., 2014), but they need to find a compatible photobiont in order to resynthesize the symbiosis (Honneger, 1998). In lichenized fungi, asexual reproduction occurs via different vegetative propagules such as soredia, isidia, or thallus fragments. Studies have shown the advantage of this type of reproduction because both of the symbionts are dispersed together, which increases the likelihood of successful establishment (Dietrich and Scheidegger, 1997; Löbel and Rydin, 2010), although the range of dispersion is smaller (Tapper, 1976; Armstrong, 1990; Löbel et al., 2009). Finally, the production of a new individual will depend on the environment, which can filter the likelihood of establishment at different scales (Schei et al., 2012), i.e., microhabitat (solar radiation and humidity regime; Lange et al., 1988; Gauslaa and Solhaug, 1998), local (topography, habitat size and quality; Belinchón et al., 2009; Bässler et al., 2015), and regional scales (climate; Ellis et al., 2007; Merinero et al., 2014).

The epiphytic lichen *Pectenia plumbea* (Lightf.) P.M. Jørg. et al. has an oceanic distribution throughout Europe, ranging among the Macaronesian islands to Scandinavia and the Mediterranean basin, as well as occurring in adjacent areas of Africa. COSEWIC (2010) indicated that there has been a drastic decline in *P. plumbea* throughout Europe because of air pollution. There are still considerable populations along the northern side of the Mediterranean basin, but there are large distances from each other (COSEWIC, 2010; Martínez et al., 2014). The occurrence of *P. plumbea* is highly restricted in the Mediterranean region of Central Spain, where Martínez et al. (2014) found only 15 populations in five different areas and most of them were separated by hundreds of kilometers. Furthermore, the population sizes were very low, where seven populations comprised less than 15 individuals and other four had less than 100. In a study of threatened species in central Spain, Martínez et al. (2003) suggested that this scattered distribution is due mainly to habitat loss and forest fragmentation, and thus *P. plumbea* was catalogued as a vulnerable species.

In central Spain, *P. plumbea* individuals usually produce sexual reproductive structures (apothecia), whereas individuals with asexual propagules (isidia) are found more rarely (Otálora et al., 2013; Martínez et al., 2014). Traditionally, the reproductive mode of this species has been used as a key character and the asexual individuals were treated as a different taxon, but based on a deep genetic analysis, Otálora et al. (under review, 2016) confirmed that both reproductive stages belong to the same species. This species is a cyanolichen where *Nostoc* is the photobiont, which implies that it is dependent on liquid water for photosynthesis (Lange et al., 1988). Moreover, excess light has a strong negative effect on the water economy of the thalli, with greater effects in juvenile individuals (Gauslaa and Solhaug, 1998). In the Mediterranean region, which is characterized by an intense summer drought and high levels of solar radiation, the water and shade requirements of *P. plumbea* can only be satisfied in continuous and well-preserved forests. Tree characteristics such as the trunk diameter, inclination, and roughness are known to be important determinants of the performance of this species at fine scales in Mediterranean forests (Martínez et al., 2014). In addition, Otálora et al. (2013) showed that *P. plumbea* exhibits low selectivity for its photobiont, which should promote the establishment of spores. However, little is known about the effects of different variables at the landscape scale relative to habitat loss and fragmentation, topography, or climate, but they could filter the occurrence of species and modulate the abundance or reproductive capacity.

Given that *P. plumbea* is a species with sexual and asexual reproduction, which implies a high capacity for long-distance and local dispersal, and it lacks high photobiont selectivity, then it is not obvious why its distribution area is highly restricted and the populations are so small. Thus, in this study, the main aim is to determine whether the scarce and fragmented occurrence of *P. plumbea* in the center of the Iberian Peninsula is due to dispersal or establishment limitations. We try to determine whether the propagules failed to reach all of the available habitat, or if the forests where *P. plumbea* is not present lack sufficient quality to harbor this species. This objective requires the development of a potential habitat occupancy analysis, which can be implemented using a species distribution model (SDM) (Williams et al.,

2009). SDMs are employed to predict where the species might be located throughout a geographical domain as a function of its habitat preferences. Thus, by confirming the certainty of the SDM predictions in the field, we can assess whether the species is already occupying the entire suitable habitat. Previous studies lack validations of model predictions using an independent data set (Kubicek et al., 2015), even when this procedure has provided highly reliable ecological answers (Verbyla and Litvaitis, 1989). In addition, SDMs have rarely been developed using abundance data (Potts and Elith, 2006; Johnston et al., 2015), although they may provide valuable information that could help to interpret intricate patterns (Howard et al., 2014), e.g., the abundance pattern could contradict or support the occurrence pattern (Schei et al., 2012). Thus, we hypothesize that if *P. plumbea* occurs mostly in the areas predicted as good quality zones, then dispersal limitations may be ignored and thus establishment limitations can be assumed due to low habitat quality. By contrast, we could infer dispersal problems if a high proportion of habitat is predicted as good and the species is not present. In addition, we assess the effects of habitat loss and fragmentation on the observed presence and abundance patterns by analyzing the influence of the environmental variables derived from these processes, as well as climate and topography. We also model the habitat preferences for the three different reproductive stages (juvenile, asexual and sexual) of the study species, searching for complementary information regarding limitations throughout the life cycle relative to the environmental factors.

METHODS

Study site

This study was conducted in an area located at the southern side of the Montes de Toledo mountain range (~41.000 Ha) in the center of the Iberian Peninsula (4°21' to 4°23'W and 35 to 39°N) (Fig. 1). Most of the study area is included in the Cabañeros National Park. The climate is subhumid continental Mediterranean with a mean

annual temperature of 13.7°C and annual precipitation of 669 mm (Sánchez-Palomares et al., 1999), which is characterized by a ca three-month drought period during the summer. The landscape comprises medium-sized mountains (650–1400 m a.s.l.) occupied by fragmented Mediterranean forests. All of the forest fragments are surrounded by human-modified matrices, mainly shrubland (*Cistus ladanifer* and *Erica australis*) and pasture, as well as crops, stony slopes, and pine plantations to a lesser extent (Perea and Perea, 2008). The main drivers of fragmentation in this area are charcoal production, logging activities, livestock grazing, and farming (Perea and Perea, 2008). *P. plumbea* usually occurs in monospecific or mixed Mediterranean forests of *Quercus ilex* subsp. *ballota* and *Quercus pyrenaica*, which are characterized by a non-management regime and they are located mainly on the most inaccessible slopes.

History of the study site

The Montes de Toledo received their name because they were owned by the City of Toledo from 1246 to 1835. In their “Order of Use” which was compiled in the sixteenth century to ensure the conservation of natural resources, activities related to agriculture, livestock, beekeeping, charcoal, firewood, and timber were regulated in order to ensure the conservation of forests (López et al., 2007). In addition, a strict tax system was imposed on residents and this coupled with the difficulty of obtaining benefits from the terrain led to a decrease in the population in the region. Thus, many villages disappeared between the thirteenth and nineteenth centuries. In 1835, the farms fell into the hands of large land-owners, which is still the case at present in the Montes de Toledo (López et al., 2007). More recently, Cabañeros National Park was established in 1995. Traditional activities such as cork manufacture and beekeeping continue in some parts of the National Park, where they are coordinated with nature conservation practices (López et al., 2007).

The landscape of Cabañeros National Park exhibits great contrasts and it is structured into the following two large units, which are highly representative of the

Montes de Toledo area (Jiménez, 2004). (1) The lowland area is a great plain of approximately 8,000 ha located in the southeast. In the 1960s, parts of the forests and shrubland covering the lowland area were removed to grow cereal crops, which generated the current landscape comprising wooded grassland, where some areas preserve the original vegetation. (2) The mountainous area occupies the remaining area to the north, center, and west of the park, where the altitude ranges from 650 to 1448 m a.s.l.

One of the most important habitats in the Cabañeros landscape is located in the mountainous area, where the stony slopes comprise quartzite rock fragments (Aragón et al., 2006). These colluvial deposits occurred during cold climate periods in the Quaternary Era due to tectonic movements and environmental factors, such as ice-thaw cycles, water erosion, and strong temperature oscillations (Sánchez, 1991). Most of the stony slopes are virtually devoid of any vegetation cover because of their mobility and the absence of the necessary elements required to support soil formation (Lancha et al., 1997; Muñoz, 1997). However, on some gentle slopes, the quartzites are wrapped in a sandy-clay matrix, which supports the mountain vegetation. These stony areas are covered by Mediterranean oak forests, including *Quercus ilex* subsp. *ballota*, *Q. faginea*, and *Q. pyrenaica* (Aragón et al., 2006).

Data collection

We selected two nearby valleys (30 km apart) covering an area of ca 840 ha: one inside the National Park limits and the other outside (modeled area in Fig. 1), which contained a great variety of natural and non-managed forests surrounded by different types of matrices. We randomly selected 400 plots (50 × 50 m) with 200 in each valley, and during the summer of 2013, each plot was visited to record the presence and total number of *P. plumbea* individuals. Every trunk was carefully examined inside the plot up to 2 m above the ground (Martínez et al., 2014). Finally, we determined the presence of *P. plumbea* (0 or 1) and the total abundance of individuals per plot. The reproductive stage of every individual was also recorded, so we could

determine the abundance of sexual, asexual, and juvenile individuals per plot. We considered individuals as juveniles if they lacked any reproductive structure.

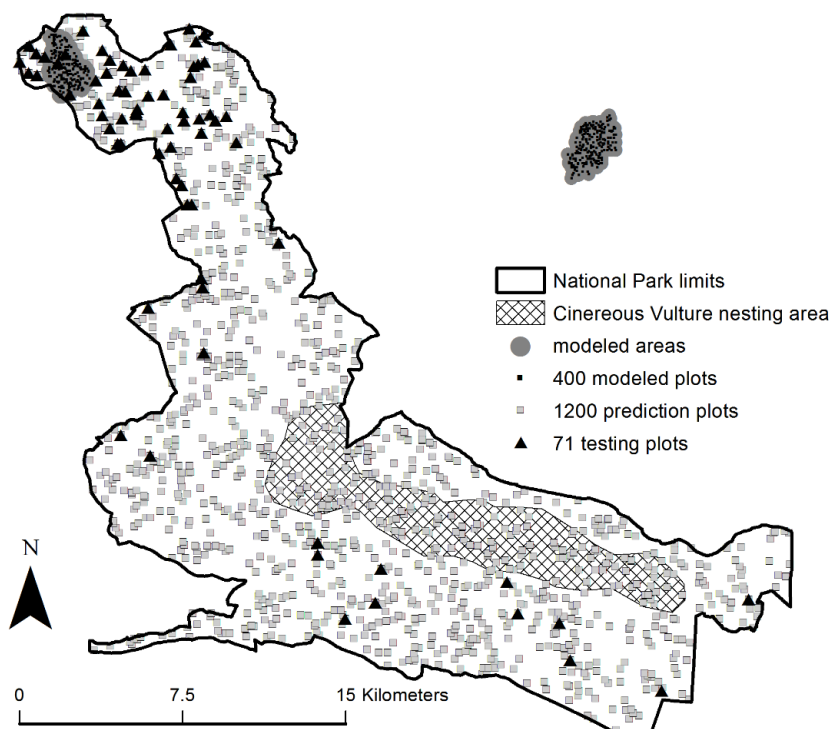


Fig. 1 Spatial locations of the three types of sample plots and modeled valleys throughout the study area located in central Spain.

At the plot level, the habitat was characterized by recording variables related to the landscape (forest loss and fragmentation), climate, and topography. The landscape variables were obtained from orthophotos produced in 2013 (provided by CNIG, Spain) using ArcGis v.10.2.2 (ESRI, Redlands, CA, USA). Climatic variables were taken from a climate model of the Iberian Peninsula (CLIMOEST; Sánchez-Palomares et al., 1999). Topographic variables were derived from a LIDAR digital elevation model of the Iberian Peninsula (pixel resolution = 5 m; CNIG, Spain 2009). Finally, 10 explanatory variables in three categories were extracted at the plot level (Table 1), as follows. A) Habitat loss and fragmentation: (1) forest area (m^2) as an inverse measure of habitat loss; (2) forest edge (m) as the incidence of the edge effect;

(3) fragment density obtained from the quotient between the number of forest fragments and the forest area as an indicator of habitat subdivision; (4) area (m²) of the high contrast matrix, i.e., pastures or stony slopes, with an unfavorable forest fragment microclimate (Ewers and Didham, 2006); (5) area (m²) of the intermediate contrast matrix, i.e., shrubland, with less unfavorable microclimatic forest conditions (Murcia, 1995). B) Climate: (6) annual precipitation (mm); (7) mean annual temperature (°C). C) Topography: (8) mean altitude (m a.s.l.); (9) mean slope (°); (10) mean aspect (cosine transformed).

Table 1. Values of the environmental variables (mean ± SD, minimum, and maximum) measured in the 400 modeled plots. The values of the response variables are also shown (values for the three sexual stages are expressed as the number of individuals). The mean presence is the percentage of plots in which *Pectenía plumbea* is present. HCM, high contrast matrix; ICM, intermediate contrast matrix; Fragment density units: number of forest fragments•m⁻².

Explanatory variable	Mean ± SD	Minimum	Maximum
Forest area (m ²)	1183.09 ± 810.46	0.00	2500.00
Forest edge (m)	153.23 ± 87.00	0.00	380.14
Fragment density	0.01 ± 0.01	0.00	0.12
HCM (m ²)	463.51 ± 641.68	0.00	2500.00
ICM (m ²)	842.02 ± 841.13	0.00	2500.00
Precipitation (mm)	707.65 ± 43.84	622.00	805.00
Temperature (°C)	12.01 ± 0.83	10.30	13.80
Altitude (m.a.s.l.)	1045.23 ± 130.18	754.12	1305.58
Slope (°)	23.37 ± 4.81	6.64	37.91
Aspect (°)	179.60 ± 104.70	10.82	348.35
Response variable			
Presence	0.47	0	1
Abundance	49.86 ± 167.72	0	1609
Sexual	36.41 ± 132.59	0	1357
Asexual	3.07 ± 14.03	0	204
Juvenile	10.38 ± 32.82	0	321

Modeling the presence and abundance of *P. plumbea*

We used a generalized linear model (McCullagh and Nelder, 1989) to model the presence of *P. plumbea* with a binomial error distribution and a “logit” link function. Overdispersion was detected when modeling the abundance (total, sexual, asexual, and juvenile individuals), so we used negative binomial generalized linear models to correct for overdispersion in all cases (Zuur et al., 2009) by using a “log” link function because our abundance data were counts. The residuals were normalized and no patterns were observed in the fitness of the predicted vs. real values (Zuur et al., 2009).

Before modeling, all of the plots without forest area ($N = 26$) were removed from the dataset due to their inability to host *P. plumbea*. Moreover, three plots considered as outliers were not included and thus modeling was performed based on 371 of the 400 plots selected originally. In addition, all of the explanatory variables were analyzed to search for correlations. To avoid multicollinearity (Zuur et al., 2009) and problems with model averaging, the area of the intermediate contrast matrix was omitted from the explanatory variables because of its high correlation with forest area (Spearman’s $\rho > 0.7$; $P < 0.0001$). To model the abundances of the three reproductive stages, the total abundance was treated as an explanatory variable when it had a strong correlation with the response variable (Spearman’s $\rho > 0.7$; $P < 0.0001$), and it was included first in the models. Thus, the final models of the reproductive stages explained the abundance of sexual, asexual, and juvenile individuals independently of the effect of the total abundance. Total abundance was included in models of the abundance of juvenile and sexual individuals, but not asexual individuals.

Model selection was performed using Akaike’s information criterion corrected for small sample size (AIC_c) (Burnham and Anderson, 2002). AIC_c values were calculated for all of the models constructed from all possible combinations of the explanatory variables, including only one interaction (“forest area” \times “forest edge”). Only the models with the smallest values within a range of $\Delta AIC_c < 2$ were retained, and it was assumed that they were equiprobable in terms of explanatory power (Burnham and Anderson, 2002). R^2 values were calculated for each model

included in every set of equiprobable models in order to estimate the explanatory power according to the variability of the response variable. Akaike weights (w_i) were also used to interpret the relative likelihood of every model. No best model ($w_i > 0.9$) appeared to explain any of the response variables, so we determined the model average for every set of models and the estimates were averaged using the Akaike weights (Arnold, 2010). Only variables that had estimates with 95% confidence intervals that did not contain zero were used to make predictions, and they were considered for further analysis (Arnold, 2010; Galipaud et al., 2014). All of the analyses were conducted using the statistical software R v.3.2.2 (R Core Team, 2015) and model selection was performed with the additional package “MuMIn” v.1.15.1 (Barton, 2015).

Model in-sample evaluation and in situ testing

First, we tested the predictive ability of the presence and abundance models, but not the models of the reproductive stages. To test the predictive performance of the presence model, we calculated the area under the curve (AUC) of the receiver operator characteristic, which is used widely as a measure of the discriminatory power of SDMs (Lobo et al., 2008). The AUC internally verified the predictions made with the same data used to construct the model. The sensitivity (true positive rate) was then plotted against 1-specificity (false positive rate) for all of the possible probability thresholds (Fielding and Bell, 1997). Thus, a higher AUC in the graph indicated the greater accuracy of the predictive model, where a value of 1 denotes the best performance possible with no prediction errors, whereas 0.5 do not differ from a random guess. We used a bootstrapped cross-validation technique to test the reliability of the abundance model (Efron and Tibshirani, 1997). We separated the data set into two parts: 80% of the original 400 plots were sampled randomly and used to build the model, and the remaining 20% were then used to make predictions with the model obtained. This process was repeated 100 times and the predicted values were compared with the observed values in each iteration, thereby obtaining a bootstrapped

estimate of the model's predictive accuracy. The goodness of fit was assessed using Spearman's rank correlation coefficient (ρ) (Potts and Elith, 2006). The correlation was considered to be weak for $0 < \rho < 0.25$, fair for $0.25 < \rho < 0.5$, moderate for $0.50 < \rho < 0.75$, and strong for $\rho > 0.75$ (Colton, 1974).

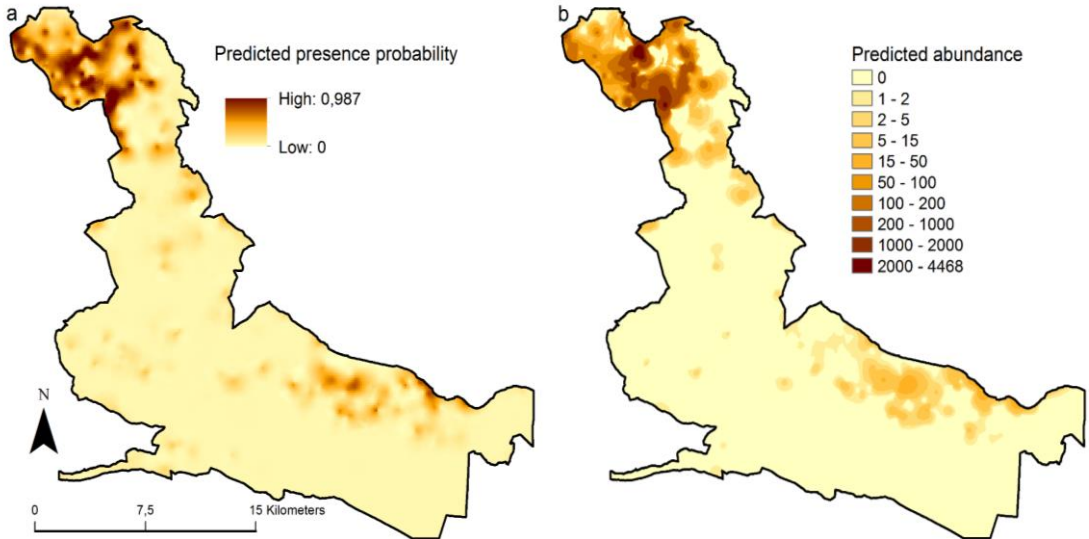


Fig. 2 Distribution models of (a) the presence probability and (b) the predicted abundance of *Pectenia plumbea* in Cabañeros National Park based on the habitat suitability model.

Predictions were made for the whole of Cabañeros National Park (40.828 ha), where we randomly established 1200 plots (50 × 50 m) in the region (Fig. 1) and extracted the same variables used to model the presence and abundance of the species. Thus, by substituting the real values of the variables in the averaged models, we obtained predicted values for the presence probability and abundance in every plot. For the averaged presence model, an inverse logistic transformation was applied: $p = e^Y / 1 + e^Y$, where Y is the linear predictor obtained from the model, in order to transform the predictions from the logit scale to the probability scale (Gibson et al., 2004). Using these values, we obtained two corresponding maps for the predicted presence probability and abundance (Fig. 2), where the gaps among plots were filled with

intermediate averaged values from the records obtained. Interpolation was performed using the Kriging technique for spatial data with a spherical semivariogram model in ArcGis v.10.2.2 (ESRI, Redlands, CA, USA).

To address the main question in this study, we had to verify the correspondence between the predictions made for the 1200 plots and reality. Clearly, it was not possible to visit all of them due to logistic reasons, so we initially aimed to survey 80 plots, which corresponded to 20% of those selected to validate in-sample the abundance model. Thus, due to an excess of zeros in the predictions obtained, we established three cut-off values for the presence probability (0.2, 0.5, and 0.8), and randomly selected plots inside each rank: 0–0.2: 20 plots, 0.2–0.5: 18, 0.5–0.8: 18, and 0.8–1: 15. One of the two zones with intermediate and high predicted probabilities and abundances in the National Park (Fig. 2) was an area where entry was prohibited because it was a nesting site for the cinereous vulture (Fig. 1), so it had to be excluded. Finally, we visited 71 plots due to logistic reasons and a lack of high probability ($p > 0.8$) plots. Every tree was examined inside each plot to determine the presence of *P. plumbea* and to estimate its abundance per plot. Again, we used Spearman's rank correlation coefficient (ρ) to test the similarity between the predicted and observed abundance values (Potts and Elith, 2006). In the presence of *P. plumbea*, the amount of similarity was treated as a percentage.

RESULTS

Environmental variables

The 400 modeled plots comprised a wide range of different environmental conditions, which represented the heterogeneity of the study area (Table 1). For example, in terms of the topographic and climate variables, there were very high variations in altitude (754 to 1305 m a.s.l.), slope (6% to more than 37%), annual precipitation (622 to 805 mm), and mean annual temperature (10.3°C to 13.8°C). For the habitat loss and fragmentation variables (Table 1), the study area also exhibited high variability,

including plots with forest area, high contrast matrix, and intermediate contrast matrix ranging from 0% to 100% (2500 m²) of the total cover. The number of forest fragments varied from 1–9 per plot. The environmental range considered for modeling was generally covered by the 1200 prediction plots (Table 2).

Presence and abundance of *P. plumbea*

P. plumbea was present in 188 out of the 400 initially selected plots and 19943 individuals were recorded in total. The abundance per plot was highly variable, ranging from zero individuals to over 1600 in one plot (Table 1).

The model selection process (Table 3) showed that both the presence and abundance of *P. plumbea* were explained by very similar models, with reasonably good explanatory power ($R^2 = 0.41$ and 0.52 , respectively). According to model averaging (Table 4), the species presence and abundance increased with temperature, precipitation, and altitude. The forest area and edge also had positive effects, but the negative effect of the interaction between them showed that the edge effect became undesirable as the amount of habitat increased. In addition, the abundance was positively influenced by increases in the slope. Excluding the forest edge, the variables included in the models with direct relationships with the fragmentation process did not influence the presence and abundance of *P. plumbea*.

We used the AUC to evaluate the predictive power of the models where the value was 0.878, and thus a priori, we would be correct 87.8% of the time when validating the species presence/absence in a prediction plot. The sensitivity (true positive rate) was 79.46%, and the specificity (true negative rate) was 79.57% with a standard cut-off value of 0.5. The reliability of the predictions made by the abundance model was 72.6% ($\rho = 0.726$) according to the correspondence between the observed and in-sample predicted values.

Maps of the predicted presence and abundance throughout the National Park (Fig. 2) showed that most of the area contained low quality habitat for *P. plumbea* (presence probability < 0.1), and only 15 out of 1200 prediction plots had recorded

presence probabilities > 0.8 . Two zones were predicted with favorable habitats for *P. plumbea*: (1) the northwestern area, with a very high presence probability close to one and the highest predicted abundance values; and (2) the mid-eastern area of the park, with a medium to high presence probability and intermediate predicted abundance values.

Field validations of the predictions yielded a success rate of 80.3% for presence using a cut-off value of 0.5. However, the cut-off value that maximized the success (87.3%) was 0.44 (Appendix S1), which was very similar to the success rate predicted by the AUC. The validation of the abundance predictions yielded a correlation of $\rho = 0.67$ (Appendix S2), which was very similar to the rate predicted by the cross-validation technique, although smaller. The presence and abundance model predictions agreed, but it should be noted that the field observations of the abundance had a weaker fit with the predicted values.

Reproductive stages

In total, 14563 individuals exhibited sexual reproduction (= apothecia), 1228 exhibited asexual reproduction (= isidia), and 4152 were in the juvenile stage, which corresponded to a ratio of ~12:1:3.5 (Table 1).

Both sets of models for the sexual and juvenile stages had high explanatory power ($R^2 = 0.75$ and 0.67 respectively), but that for the abundance of the asexual stage was low ($R^2 = 0.18$) (Table 3). For the model-averaged estimates (Table 5), the abundance of the sexual stage was positively affected by forest area, temperature, precipitation, altitude, and slope, with a negative influence only for the interaction between forest area and edge. The asexual stage was favored by the altitude, forest area, and edge, but the interaction between these two variables had a negative effect. Finally, the only negative factor for juveniles was a northern aspect, whereas temperature, precipitation, and altitude favored their abundance.

Table 2 Values of the environmental variables (mean \pm SD, minimum, and maximum) extracted from the 1200 prediction plots ranked by presence probability ranges. Probability values were obtained after extrapolating the real values of the variables in the presence model. Only variables with statistical relevance after model averaging are shown.

Presence probability	$0 < P < 0.44$			$0.44 < P < 0.80$			$0.80 < P < 1$		
	Mean \pm SD	Min.	Max.	Mean \pm SD	Min.	Max.	Mean \pm SD	Min.	Max.
Forest area (m ²)	230.46 \pm 431.51	0.00	2500.00	1279.94 \pm 694.12	153.56	2500.00	1497.92 \pm 563.76	163.40	2500.00
Forest edge (m)	150.96 \pm 77.10	0.00	437.78	198.98 \pm 79.37	0.00	385.91	172.62 \pm 93.08	0.00	323.84
Temperature (°C)	13.98 \pm 0.71	9.70	15.10	12.50 \pm 0.95	10.20	13.80	11.99 \pm 0.75	10.30	13.10
Precipitation (mm)	635.90 \pm 54.94	537.00	860.00	739.6 \pm 50.3	655.00	832.00	791.30 \pm 30.71	739.00	866.00
Altitude (m.a.s.l.)	784.09 \pm 130.84	537.51	1391.76	1025.65 \pm 138.20	817.60	1319.48	1144.05 \pm 112.64	956.01	1406.04
Slope (°)	11.56 \pm 7.92	0.47	38.33	22.67 \pm 5.44	9.40	34.72	23.13 \pm 5.64	12.30	29.78

Table 3 Best fit models for each of the response variables (a–e) after AIC_c-based model selection. Only models where $\Delta\text{AIC}_c < 2$ are presented and they are considered to be equiprobable. Response variables relative to sexual stages (c–e) as the abundances in each stage. R^2 : percentage of variance explained, AIC_c: relative goodness of fit, w_i : Akaike weight (relative importance). FA: forest area, E: forest edge, FD: fragment density, HCM: high contrast matrix, Temp: mean annual temperature, Prec: annual precipitation, Alt: altitude, Asp: aspect. *The total abundance was included in the analysis of the (c) and (e) response variables because of statistical issues.

Chapter 3: Dispersal vs. establishment limitations in *Pectenia plumbea*

Response variable	Explanatory variable											R^2	AIC _c	Δ AIC _c	w_i
	Habitat loss and fragmentation					Climatic		Topographic							
	FA	E	FAxE	FD	HCM	Temp	Prec	Alt	Slope	Asp	Abun*				
a) Presence	x	x	x			x	x	x	x		-	0.415	331.9	0	0.32
	x	x	x			x	x	x			-	0.410	332.9	1.02	0.19
	x	x	x		x	x	x	x	x		-	0.416	333.4	1.51	0.15
	x	x	x	x		x	x	x	x		-	0.415	333.8	1.91	0.12
b) Abundance	x	x	x			x	x	x	x		-	0.522	2146	0	0.49
	x	x	x	x		x	x	x	x		-	0.524	2147	0.93	0.31
	x	x	x		x	x	x	x	x		-	0.523	2148	1.78	0.20
c) Sexual	x					x	x	x	x		x	0.742	1581	0	0.27
	x	x	x			x	x	x	x		x	0.748	1581	0.14	0.25
	x	x	x	x		x	x	x	x		x	0.749	1582	1.28	0.14
	x			x		x	x	x	x		x	0.743	1582	1.66	0.12
	x					x	x	x			x	0.737	1582	1.70	0.11
	x	x				x	x	x	x		x	0.743	1583	1.85	0.11
d) Asexual	x	x	x					x			-	0.175	726.8	0	0.32
	x	x	x			x		x			-	0.178	728.2	1.35	0.16
	x	x	x					x		x	-	0.177	728.6	1.74	0.14
	x	x	x				x	x			-	0.176	728.7	1.84	0.13
	x	x	x					x	x		-	0.176	728.7	1.86	0.13
	x	x	x			x	x	x			-	0.185	728.8	1.98	0.12
e) Juvenile	x					x	x	x		x	x	0.672	1204	0	0.56
	x					x	x	x	x	x	x	0.673	1206	1.83	0.22
	x	x	x			x	x	x		x	x	0.677	1206	1.84	0.22

Table 4 Model-averaged estimates of the best fit models for the presence and abundance of *Pectenía plumbea*. Statistics include the standard errors (SE) and 95% confidence intervals. Bold indicates the estimates with confidence intervals that did not include zero. FA: forest area, E: forest edge, FD: fragment density, HCM: high contrast matrix, Temp: mean annual temperature, Prec: annual precipitation, Alt: altitude.

	Presence				Abundance			
	Estimate	SE	Upper 95%	Lower 95%	Estimate	SE	Upper 95%	Lower 95%
Intercept	-50.645	7.282	-36.446	-64.845	-64.019	4.061	-56.100	-71.938
FA	0.003	4.31×10^{-4}	3.60×10^{-3}	1.91×10^{-3}	2.69×10^{-3}	2.91×10^{-4}	3.26×10^{-3}	2.12×10^{-3}
E	0.015	0.004	0.023	0.006	0.014	0.003	0.020	0.008
FA × E	-6.27×10^{-6}	2.72×10^{-6}	-9.76×10^{-7}	-1.16×10^{-5}	-6.13×10^{-6}	1.90×10^{-6}	9.84×10^{-6}	2.41×10^{-6}
FD	-15.098	36.190	55.472	-85.669	-25.086	23.170	20.096	-70.267
HCM	2.27×10^{-4}	2.95×10^{-4}	8.01×10^{-4}	-3.48×10^{-4}	1.32×10^{-4}	2.15×10^{-4}	5.51×10^{-4}	-2.87×10^{-4}
Temp	1.430	0.249	1.915	0.945	1.900	0.154	2.201	1.599
Prec	0.025	0.005	0.035	0.014	0.035	0.003	0.041	0.029
Alt	0.010	0.002	0.013	0.006	0.012	0.001	0.014	0.010
Slope	0.059	0.034	0.125	-0.008	0.060	0.025	0.109	0.011

Table 5 Model-averaged estimates of the best fit models for the three sexual stages of *P. plumbea*. Statistics include the standard errors (SE) and 95% confidence intervals. Bold indicates the estimates with confidence intervals that did not include zero. FA: forest area, E: forest edge, FD: fragment density, Temp: mean annual temperature, Prec: annual precipitation, Alt: altitude, Asp: Aspect. Abun*: The total abundance was included in the analysis because of statistical issues.

	Sexual				Asexual				Juvenile			
	Estimate	SE	Upper 95%	Lower 95%	Estimate	SE	Upper 95%	Lower 95%	Estimate	SE	Upper 95%	Lower 95%
Intercept	-26.506	3.144	-20.375	-32.637	-9.103	16.590	23.247	-41.454	-31.378	3.303	-24.937	-37.819
FA	0.001	2.96×10^{-4}	0.001	7.52×10^{-5}	0.003	0.001	0.004	0.002	4.73×10^{-4}	2.44×10^{-4}	0.001	-2.83×10^{-6}
E	0.005	0.003	0.011	-0.002	0.022	0.007	0.035	0.010	0.005	0.003	0.010	-0.001
FA × E	-3.10×10^{-6}	1.47×10^{-6}	-2.37×10^{-6}	-5.96×10^{-6}	-1.12×10^{-5}	3.81×10^{-6}	-3.76×10^{-6}	-1.86×10^{-5}	-2.56×10^{-6}	1.53×10^{-6}	4.28×10^{-7}	-5.55×10^{-6}
FD	-28.598	30.220	30.331	-87.527	-	-	-	-	-	-	-	-
Temp	0.964	0.110	1.179	0.749	-0.832	0.997	1.112	-2.775	1.149	0.118	1.379	0.919
Prec	0.015	0.002	0.019	0.010	-0.011	0.020	0.029	-0.051	0.019	0.002	0.024	0.015
Alt	0.005	0.001	0.006	0.003	0.010	0.002	0.013	0.006	0.004	0.001	0.006	0.003
Slope	0.035	0.018	0.071	3.60×10^{-4}	0.024	0.044	0.110	-0.061	0.011	0.018	0.046	-0.025
Asp	-	-	-	-	0.271	0.360	0.973	-0.431	-0.296	0.129	-0.045	-0.547
Abun*	0.005	3.61×10^{-4}	0.005	0.004					0.004	3.49×10^{-4}	0.005	0.003

DISCUSSION

Our results indicate that the scarce presence and abundance of *P. plumbea* in the center of the Iberian Peninsula depends on human factors related mainly to habitat loss, as well as a specific combination of environmental conditions that favor the growth of *P. plumbea*. This species is a cyanolichen with an oceanic world distribution, but it can live in the middle of the Spanish Mediterranean region, which is an area dominated by a severe summer drought and very distant from the oceanic conditions characterized by a narrow annual temperature range and more constant humidity throughout the year. Thus, in our study area, *P. plumbea* needs to grow in locations with warmer temperatures and higher annual precipitation. In the Montes de Toledo range, this combination of characteristics is found in the mid-slopes and higher zones of the deep valleys with steep slopes, where the forests grow on stony ground. Stony slopes are mainly a good thermal insulator and they also reduce water loss by direct evaporation from the ground because the discontinuities among the loose stones act as air chambers to prevent the ground water from rising via capillarity (Sánchez, 1991). Moreover, during the winter and colder months of the autumn and spring, the mean temperature in the valley bottoms is often lower than that in the mid-slopes and sometimes even at the tops of the mountains because cold air accumulates in the valley bottoms during the night (typical of thermal inversion) (Anquetin et al., 1998; Leukauf et al., 2015).

In addition, due to the long history of land use in this area, the best-preserved forests are situated on the steeper slopes of the mountains because these areas have always been treated as unproductive land (Galante and Marcos-García, 2013). These forests are located in the steeper areas of the mountains and they have not been subjected to any type of exploitation for hundreds of years. Therefore, *P. plumbea* is more abundant in areas with steep slopes and high altitudes in deep valleys, where greater forest continuity occurs at a spatio-temporal scale. *P. plumbea* requires low light conditions and liquid water for photosynthesis (Lange et al., 1988; Gauslaa and Solhaug, 1998), which are found in well-preserved forests in the Mediterranean region (Martínez et al., 2014). Thus, the positive effects of the slope and altitude on the

presence and abundance of *P. plumbea* demonstrate the importance of forest stability for *P. plumbea*. This indicates that the inaccessibility of forest stands and environmental continuity under stressful climatic conditions in the Mediterranean region could provide the environmental quality required for colonization by *P. plumbea*.

We also showed that *P. plumbea* is not limited by dispersal because it could colonize most (87.3%) of the good quality forests predicted by the SDM in the vast area studied. The abundance predictions were similar to the presence predictions, but the match between the predicted and real abundance values was weaker (67% correspondence). Abundance is usually more difficult to predict (Howard et al., 2014) because it includes more variance than the presence alone (0 or 1), and more factors generally affect its final value. Variables related to habitat fragmentation (number of fragments or different types of matrix) did not affect the presence and abundance of *P. plumbea*, except the forest edge had a positive effect. This may be related to the high ability of *P. plumbea* to disperse among forest fragments and pass through different matrices, which is associated with its high capacity to reproduce via sexual spores. Ascospores are much smaller than asexual isidia, and thus they can travel much further on wind currents (Norros et al., 2014; Ruete et al., 2014). The production of a large amount of spores is also related to the effective colonization of suitable scattered substrata over long distances throughout the landscape (Lönnell et al., 2014). This may also apply to *P. plumbea*, which can produce apothecia from a relatively small thallus size (Martínez et al., 2014). Clearly, the colonization process is easier when the connectivity is higher (Snäll et al., 2005) and the exposure period of forests to colonization is longer (Gjerde et al., 2015). However, with low habitat availability over space and time, the particular traits of species may allow them to overcome these problems, so their occurrence may depend almost exclusively on the amount and quality of forests.

Thus, based on the habitat occupancy pattern of *P. plumbea*, we elucidated its establishment limitations and confirmed that they are due mainly to a lack of environmental quality in the non-colonized forests. We assumed that the propagules

are dispersed throughout the landscape and that they have sufficient germination capacity to colonize all of the medium and high quality forests. Previously, it was demonstrated that *P. plumbea* exhibits low photobiont selectivity (Otálora et al., 2013), which should facilitate the establishment of the dispersed spores. However, the low presence detected in the study region can only be due to problems during establishment, as found for other lichen species that are not limited by dispersal (Lättman et al., 2009; Gjerde et al., 2015). Given the restricted environmental requirements identified for *P. plumbea* in this study, small changes in the environmental conditions might hinder the critical phases during establishment, i.e., spore germination or finding a compatible photobiont strain, which requires further study.

The analysis of fragmentation *per se* (*sensu* Fahrig, 2003), i.e., the exclusive effects of habitat fragmentation after controlling for effects caused purely by habitat loss, generally had no influence on the presence and abundance of *P. plumbea*. In practice, it is rather difficult to elucidate the effects of both processes separately (see Didham et al., 2012 for examples and possible solutions). We included forest area in the models as an inverse measure of habitat loss to control for this effect and we included variables related to the edge effect, habitat subdivision, and matrix quality in order to determine the actual response of *P. plumbea* to the fragmentation process. Habitat subdivision (measured as the fragment density) and matrix quality had no effects on the performance of *P. plumbea* throughout the landscape. Thus, our results are in agreement with the habitat amount hypothesis (Fahrig, 2013), which emphasizes the importance of the habitat amount rather than its spatial configuration in the landscape. We also determined a positive effect of the forest edge amount on the presence and abundance of *P. plumbea*, but a negative interaction between the edge and forest area. Thus, in a situation with a critically low habitat amount, the edge provides an advantage, and we suggest that it could act by facilitating the movement of propagules from/to forest. A more open landscape is thought to facilitate long-distance dispersal events for typical forest species (Nathan et al., 2008), as well as presenting a larger landing surface to increase the probability of capturing a dispersed

propagule (Lomolino, 1990). However, when the habitat amount increases, any positive effect of the edge is diluted by the greater benefits provided by the forest core area, as demonstrated in Mediterranean epiphyte communities (Cardós et al., 2016).

Studying dispersal by tracking single spores is logistically difficult at present. However, producing SDMs and assessing their suitability using an independent data set is a reliable method for examining dispersal limitations in any species. SDMs are useful if they are robust (Guisan and Thuiller, 2005), which means that they must explain a high proportion of the variance found when considering the habitat occupancy of a species. In our study, excluding the abundance of asexual individuals ($R^2 = 0.18$), all of the models accounted for a high percentage of the variance ($0.41 < R^2 < 0.75$), which allowed us to extract reliable conclusions from the study system. The most critical feature of our method was selecting a cut-off point that differed from the standard value of 0.5 in order to assess whether a prediction should be accepted as presence or absence. Jiménez-Valverde and Lobo (2007) recommended not setting a threshold that might lack biological meaning, so we preferred to choose a cut-off point that maximized success (0.44). Thus, this was the most meaningful value for this species, model, and territory, and it must be reconsidered when predicting the presence of this species in new regions close to the study area when conducting future conservation studies of *P. plumbea*.

Reproductive stages

The three reproductive stages of *P. plumbea* were affected differently by the environmental factors, which may be an advantage for exploiting different niches and the successful colonization of scarce habitats. The abundance of the sexual and asexual stages was favored by a greater amount of forest because the optimal conditions for reproduction by *P. plumbea* are found inside forests (Martínez et al., 2014) and obviously the number of reproductive individuals will increase when more habitat is available. In addition, sexual individuals were more frequent with a favorable climate and steeper slope, where both factors are connected to the

requirement for environmental stability. Sexual apothecia take a longer time to appear for the first time than asexual isidia in juvenile individuals (Löbel et al., 2009; Martínez et al., 2014), which could explain the demand for continuity. This is not the case for asexual individuals, so they were not affected by the climate or slope, and they only preferred forest edges. It is possible that the production of isidia may be preferred in a more unfavorable environment when growing close to the forest edge. Asexual propagules are large and thus they disperse less well, but they have the benefits of carrying the photobiont and a larger quantity of resources, which allows them to establish much more easily in adverse conditions (Löbel and Rydin, 2010). Matos et al. (2015) found that epiphyte species with isidia were more frequent in the most arid part of a gradient in the Iberian Peninsula. Moreover, Martínez et al. (2012) detected a higher frequency and abundance of isidia in *Lobaria pulmonaria* individuals on tree trunk portions closer to the canopy where the radiation and temperature were higher but the humidity was lower. The forest edge satisfies these requirements better, so this may explain why the more adverse forest edge environment favored the presence of asexual *P. plumbea* individuals. The abundance of juvenile individuals was only affected by abiotic factors, rather than the forest area or edge. In epiphytic lichens, the juvenile stage is more susceptible to environmental conditions, even very small changes (Ott, 1987), so it is assumed that even the forest cover could not mitigate the unfavorable climatic conditions in our study. Moreover, counterintuitively, the juveniles were more numerous in southern oriented plots, and thus development to the subsequent mature stages may have been prevented by the drier and sunnier south-facing plots decreasing the growth rate.

Conclusions

Based on the results of this study, the most plausible explanation for the habitat occupation pattern of *P. plumbea* in Cabañeros National Park is attributable to the period of forest stability during recent decades, without the creation or destruction of large forest areas. This may have allowed *P. plumbea* to reach the balanced occupation

level recorded throughout the entire available habitat in this study. However, *P. plumbea* is a cyanolichen with an oceanic distribution and it is in a critical condition in the center of the Iberian Peninsula despite its lack of dispersal limitations. Its presence in an adverse area depends on its ability to find a narrow environmental equilibrium with warm temperatures, high precipitation, and low continental conditions. These requirements only occur in the dense and well-preserved forests located in the mid-slopes of the deep valleys in the Mediterranean mountain ranges, and all of these areas can be tracked throughout the landscape due to its dispersal ability via spores.

Acknowledgments

The authors thank the Spanish Government for funding this research through the projects CGL2010-22049 and CGL2013-47010-P, and the PhD grant BES-2011-046139. We acknowledge the great efforts of Manuel Rojo Valencia throughout the fieldwork campaign and we thank Miguel Villatoro Fraile for his unconditional help. We also thank Marcos Méndez Iglesias for his insightful comments on an early version of the manuscript, Jon Starkweather for much appreciated online statistical tutorials, and the staff of Cabañeros National Park for their valuable logistical support.

REFERENCES

- Anquetin, S., C. Guilbaud and J. P. Chollet. 1998. The formation and destruction of inversion layers within a deep valley. *Journal of Applied Meteorology* 37: 1547–1560.
- Aragón, G., L. Abuja, R. Belinchón and I. Martínez. 2015. Edge type determines the intensity of forest edge effect on epiphytic communities. *European Journal of Forest Research* 134: 443–451.
- Aragón, G., A. García and R. López. 2006. Aportación al conocimiento de los líquenes rupícolas que colonizan las pedrizas del Parque Nacional de Cabañeros. *Botanica Complutensis* 30: 53–59.
- Armstrong, R. A. 1990. Dispersal, establishment and survival of soredia and fragments of the lichen, *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl. *New Phytologist* 114: 239–245.

- Arnold, T. W. 2010. Uninformative parameters and model selection using Akaike's Information Criterion. *Journal of Wildlife Management* 74: 1175–1178.
- Barton, K. 2015. MuMIn: Multi-Model Inference. R package version 1.15.1. Website <http://CRAN.R-project.org/package=MuMIn>.
- Bässler, C., M. W. Cadotte, B. Beudert, C. Heibl, M. Blaschke, J. H. Bradtka, T. Langbehn, et al. 2015. Contrasting patterns of lichen functional diversity and species richness across an elevation gradient. *Ecography* 39: 689–698.
- Belinchón, R., I. Martínez, M. A. G. Otálora, G. Aragón, J. Dimas and A. Escudero. 2009. Fragment quality and matrix affect epiphytic performance in a Mediterranean forest landscape. *American Journal of Botany* 96: 1974–1982.
- Burnham, K. P. and D. R. Anderson. 2002. Model selection and multimodel inference. A practical information-theoretic approach, 2nd ed. Springer, New York, New York USA.
- Cardós, J. L. H., I. Martínez, V. Calvo and G. Aragón. 2016. Epiphyte communities in Mediterranean fragmented forests: importance of the fragment size and the surrounding matrix. *Landscape Ecology* 31: 1975–1995.
- Colton, T. 1974. *Statistics in Medicine*. Little Brown and Company, Boston, Massachusetts, USA.
- COSEWIC. 2010. COSEWIC assessment and status report on the Blue Felt Lichen *Degelia plumbea* in Canada. Committee on the Status of Endangered Wildlife in Canada. Ottawa. x + 42 pp.
- Didham, R. K., V. Kapos and R. M. Ewers. 2012. Rethinking the conceptual foundations of habitat fragmentation research. *Oikos* 121: 161–170.
- Dietrich, M. and C. Scheidegger. 1997. Frequency, diversity and ecological strategies of epiphytic lichens in the Swiss central plateau and the pre-alps. *Lichenologist* 29: 237–258.
- Edman, M., M. Gustafsson, J. Stenlid and L. Ericson. 2004. Abundance and viability of fungal spores along a forestry gradient—responses to habitat loss and isolation? *Oikos* 104: 35–42.
- Efron, B. and R. Tibshirani. 1997. Improvements on cross-validation: the 632+ bootstrap method. *Journal of the American Statistical Association* 92: 548–560.
- Ellis, C. J., B. J. Coppins, T. P. Dawson and M. R. Seaward. 2007. Response of British lichens to climate change scenarios: trends and uncertainties in the projected impact for contrasting biogeographic groups. *Biological Conservation* 140: 217–235.
- Ewers, R. M. and R. K. Didham. 2006. Confounding factors in the detection of species responses to habitat fragmentation. *Biological Reviews* 81: 117–142.
- Fahrig, L. 2003. Effects of habitat fragmentation on biodiversity. *Annual Review Ecology, Evolution and Systematics* 34: 487–515.
- Fahrig, L. 2013. Rethinking patch size and isolation effects: the habitat amount hypothesis. *Journal of Biogeography* 40: 1649–1663.
- Fielding, A. H. and J. F. Bell. 1997. A review of methods for the assessment of prediction errors in conservation presence/absence models. *Environmental Conservation* 24: 38–49.

- Galante, E. and M. A. Marcos-García. 2013. El bosque mediterráneo ibérico: un mundo manejado y cambiante. In E. Micó, M. A. Marcos-García and E. Galante [eds.], Los Insectos saproxílicos del Parque Nacional de Cabañeros, 11–32. Ministerio del Medio Ambiente, Madrid, Spain.
- Galipaud, M., M. A. F. Gillingham, M. David and F. X. Dechaume-Moncharmont. 2014. Ecologists overestimate the importance of predictor variables in model averaging: a plea for cautious interpretations. *Methods in Ecology and Evolution* 5: 983–991.
- Gaston, K. J. 2003. The structure and dynamics of geographic ranges. Oxford University Press, New York, New York, USA.
- Gauslaa, Y. and K. A. Solhaug. 1998. The significance of thallus size for the water economy of the cyanobacterial old-forest lichen *Degelia plumbea*. *Oecologia* 116: 76–84.
- Gibson, L. A., B. A. Wilson, D. M. Cahill and J. Hill. 2004. Spatial prediction of rufous bristlebird habitat in a coastal heathland: a GIS-based approach. *Journal of Applied Ecology* 41: 213–223.
- Giordani P., R. Benesperi and M. G. Mariotti. 2015. Local dispersal dynamics determine the occupied niche of the red-listed lichen *Seirophora villosa* (Ach.) Frödén in a Mediterranean *Juniperus* shrubland. *Fungal Ecology* 13: 77–82.
- Gjerde, I., H. H. Blom, E. Heegaard and M. Sætersdal. 2015. Lichen colonization patterns show minor effects of dispersal distance at landscape scale. *Ecography* 38: 939–948.
- Guisan, A. and W. Thuiller. 2005. Predicting species distribution: offering more than simple habitat models. *Ecology Letters* 8: 993–1009.
- Hanski, I. 1994. Patch-occupancy dynamics in fragmented landscapes. *Trends in Ecology and Evolution* 9: 131–135.
- Herben, T. and L. Söderström. 1992. Which habitat parameters are most important for the persistence of a bryophyte species on patchy, temporary substrates? *Biological Conservation* 59: 121–126.
- Honegger, R. 1998. The lichen symbiosis—what is so spectacular about it? *Lichenologist* 30: 193–212.
- Howard, C., P. A. Stephens, J. W. Pearce-Higgins, R. D. Gregory and S. G. Willis. 2014. Improving species distribution models: the value of data on abundance. *Methods in Ecology and Evolution* 5: 506–513.
- Jiménez, J. 2004. Parque Nacional de Cabañeros. In VVAA [eds.], La Red de Parques Nacionales de España, 90–93. Organismo Autónomo de Parques Nacionales, Madrid, Spain.
- Jiménez-Valverde, A and J. M. Lobo. 2007. Threshold criteria for conversion of probability of species presence to either–or presence–absence. *Acta Oecologica* 31: 361–369.
- Johnston, A., D. Fink, M. D. Reynolds, W. M. Hochachka, B. L. Sullivan, N. E. Bruns, E. Hallstein, et al. 2015. Abundance models improve spatial and temporal prioritization of conservation resources. *Ecological Applications* 25: 1749–1756.
- Kubicek, A., F. Jopp, B. Breckling, C. Lange and H. Reuter. 2015. Context-oriented model validation of individual-based models in ecology: A hierarchically structured approach to validate qualitative, compositional and quantitative characteristics. *Ecological Complexity* 22: 178–191.

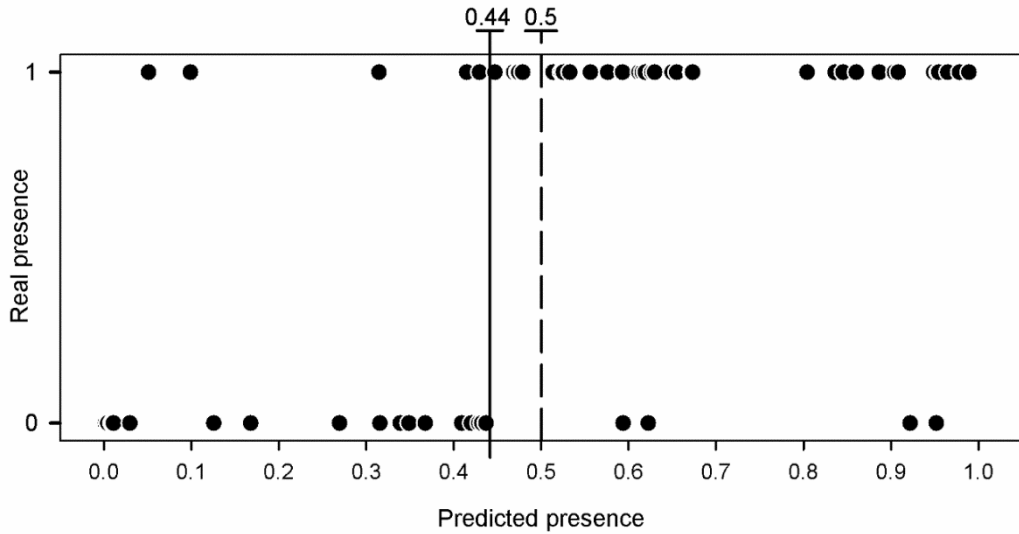
- Lancha M. A. S. J., J. C. Gutiérrez and I. Rábano. 1997. Geología y Paleontología. In V. García [ed.], Parque Nacional de Cabañeros, 51–76. Ecohábitat, Madrid, Spain.
- Lange, O. L., T. A. G. Green and H. Ziegler. 1988. Water status related photosynthesis and carbon isotope discrimination in species of the lichen genus *Pseudocyphellaria* with green or blue-green photobionts and in photosymbiodemes. *Oecologia* 75: 494–501.
- Lättman, H., L. Lindblom, J. E. Mattsson, P. Milberg, M. Skage and S. Ekman. 2009. Estimating the dispersal capacity of the rare lichen *Cliostomum corrugatum*. *Biological Conservation* 142: 1870–1878.
- Leukauf, D., A. Gohm, M. W. Rotach and J. S. Wagner. 2015. The impact of the temperature inversion breakup on the exchange of heat and mass in an idealized valley: Sensitivity to the radiative forcing. *Journal of Applied Meteorology and Climatology* 54: 2199–2216.
- Löbel, S. and H. Rydin. 2010. Trade-offs and habitat constraints in the establishment of epiphytic bryophytes. *Functional Ecology* 24: 887–897.
- Löbel, S., T. Snäll and H. Rydin. 2009. Mating system, reproduction mode and diaspore size affect metacommunity diversity. *Journal of Ecology* 97: 176–185.
- Lobo, J. M., A. Jiménez-Valverde and R. Real. 2008. AUC: a misleading measure of the performance of predictive distribution models. *Global Ecology and Biogeography* 17: 145–151.
- Lomolino, M.V. 1990. The target area hypothesis: the influence of island area on immigration rates of non-volant mammals. *Oikos* 57: 297–300.
- Lönnell, N., B. G. Jonsson and K. Hylander. 2014. Production of diaspores at the landscape level regulates local colonization: an experiment with a spore-dispersed moss. *Ecography* 37: 591–598.
- López, F., J. Muñoz and J. Jiménez. 2007. Cabañeros: un bosque mediterráneo. Lunwerg, Madrid, Spain.
- Martínez, I., G. Aragón, F. J. Sarrión, A. Escudero, A. R. Burgaz and B. J. Coppins. 2003. Threatened lichens in central Spain (saxicolous species excluded). *Cryptogamie, Mycologie* 24: 73–97.
- Martínez, I., T. Flores, G. Aragón, M. A. G. Otálora and M. Rubio-Salcedo. 2014. What factors influence the occurrence of the genus *Degelia* (a threatened lichen) in central Spain? *Fungal Ecology* 11: 50–59.
- Martínez, I., T. Flores, M. A. G. Otálora, R. Belinchón, M. Prieto, G. Aragón and A. Escudero. 2012. Multiple-scale environmental modulation of lichen reproduction. *Fungal Biology* 116: 1192–1201.
- Matos P., P. Pinho, G. Aragón, I. Martínez, A. Nunes, A. M. Soares and C. Branquinho. 2015. Lichen traits responding to aridity. *Journal of Ecology* 103: 451–458.
- McCullagh, P. and J. A. Nelder. 1989. Generalized Linear Models, 2nd edn. Chapman & Hall, London, UK.
- Merinero, S., M. Rubio-Salcedo, G. Aragón and I. Martínez. 2014. Environmental factors that drive the distribution and abundance of a threatened cyanolichen in Southern Europe: A multi-scale approach. *American Journal of Botany* 101: 1876–1885.

- Muñoz, J. 1997. El Parque Nacional de Cabañeros. In F. Márquez, F. López, J. Muñoz, J. Jiménez and R. Duro [eds.], Cabañeros Parque Nacional, 1–11. La Naturaleza en España, Ministerio del Medio Ambiente, Madrid, Spain.
- Murcia, C. 1995. Edge effects in fragmented forests: implications for conservation. *Trends in Ecology and Evolution* 10: 58–62.
- Nathan, R., F. M. Schur, O. Spiegel, O. Steinitz, A. Trakhtenbrot and A. Tsoar. 2008. Mechanisms of long-distance seed dispersal. *Trends in Ecology and Evolution* 23: 638–647.
- Norros, V., Ü. Rannik, T. Hussein, T. Petäjä, T. Vesala, O. Ovaskainen. 2014. Do small spores disperse further than large spores? *Ecology* 95: 1612–1621.
- Öckinger, E., M. Niklasson and SG Nilsson. 2005. Is local distribution of the epiphytic lichen *Lobaria pulmonaria* limited by dispersal capacity or habitat quality? *Biodiversity and Conservation* 14: 759–773.
- Otálora, M. A. G., C. Salvador, I. Martínez and G. Aragón. 2013. Does the reproductive strategy affect the transmission and genetic diversity of bionts in cyanolichens? A case study using two closely related species. *Microbial Ecology* 65: 517–530.
- Ott, S. 1987. Differences in the developmental rates of lichens. *Annales Botanici Fennici* 24: 385–393.
- Palice, Z. and C. Printzen. 2004. Genetic variability in tropical and temperate populations of *Trapeliopsis glaucolepidea*: evidence against long range dispersal in a lichen with disjunct distribution. *Mycotaxon* 90: 43–54.
- Perea, D. F. and R. Perea. 2008. Vegetación y flora de los Montes de Toledo. Ediciones Covarrubias, Toledo, Spain.
- Potts, J. M. and J. Elith. 2006. Comparing species abundance models. *Ecological Modelling* 199: 153–163.
- R Core Team. 2015. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Website <https://www.R-project.org/>.
- Ruete, A., Ö. Fritz and T. Snäll. 2014. A model for non-equilibrium metapopulation dynamics utilizing data on species occupancy, patch ages and landscape history. *Journal of Ecology* 102: 678–689.
- Sánchez, T. 1991. Estudio morfoclimático del Cabeçó d’Or. Universidad de Alicante, Alicante, Spain.
- Sánchez-Palomares, O., F. Sánchez-Serrano, M. P. Carretero-Carrero. 1999. Modelos y cartografía de estimaciones climáticas termoplumiométricas para la España peninsular. INIA, Madrid, Spain.
- Schei, F. H., H. H. Blom, I. Gjerde, J. A. Grytnes, E. Heegaard and M. Sætersdal. 2012. Fine-scale distribution and abundance of epiphytic lichens: environmental filtering or local dispersal dynamics? *Journal of Vegetation Science* 23: 459–470.
- Snäll, T., J. Ehrlén and H. Rydin. 2005. Colonization-extinction dynamics of an epiphyte metapopulation in a dynamic landscape. *Ecology* 86: 106–115.
- Tapper, R. 1976. Dispersal and changes in the local distributions of *Evernia prunastri* and *Ramalina farinacea*. *New Phytologist* 77: 725–734.
- Verbyla1, D. L. and J. A. Litvaitis. 1989. Resampling methods for evaluating classification accuracy of wildlife habitat models. *Environmental Management* 13: 783–787.

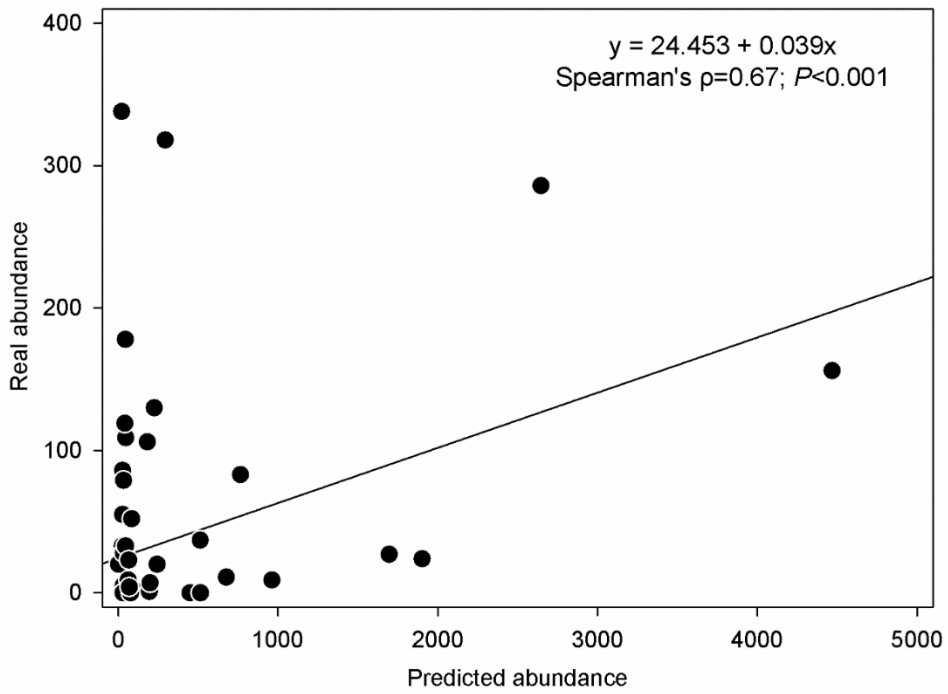
- Walser, J. C., S. Zoller, U. Büchler and C. Scheidegger. 2001. Species-specific detection of *Lobaria pulmonaria* (lichenized ascomycete) diaspores in litter samples trapped in snow cover. *Molecular Ecology* 10: 2129–2138.
- Werth, S., H. H. Wagner, F. Gugerli, R. Holderegger, D. Csencsics, J. M. Kalwij and C. Scheidegger. 2006. Quantifying dispersal and establishment limitation in a population of an epiphytic lichen. *Ecology* 87: 2037–2046.
- Williams, J. N., C. Seo, J. Thorne, J. K. Nelson, S. Erwin, J. M. O'Brien and M. W. Schwartz. 2009. Using species distribution models to predict new occurrences for rare plants. *Diversity and Distributions* 15: 565–576.
- Young, A. G. and G. M. Clarke. 2000. Genetics, demography and viability of fragmented populations, Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Zuur, A. F., E. N. Ieno, N. Walker, A. A. Saveliev and G. M. Smith. 2009. Mixed effects models and extensions in ecology with R. Springer, New York, New York, USA.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Appendix S1. Real (= observed) versus predicted presence of *Pectenia plumbea* in Cabañeros National Park, 0.5 and 0.44 cut-off probability values are marked by dashed and solid lines, respectively (n = 71 plots).

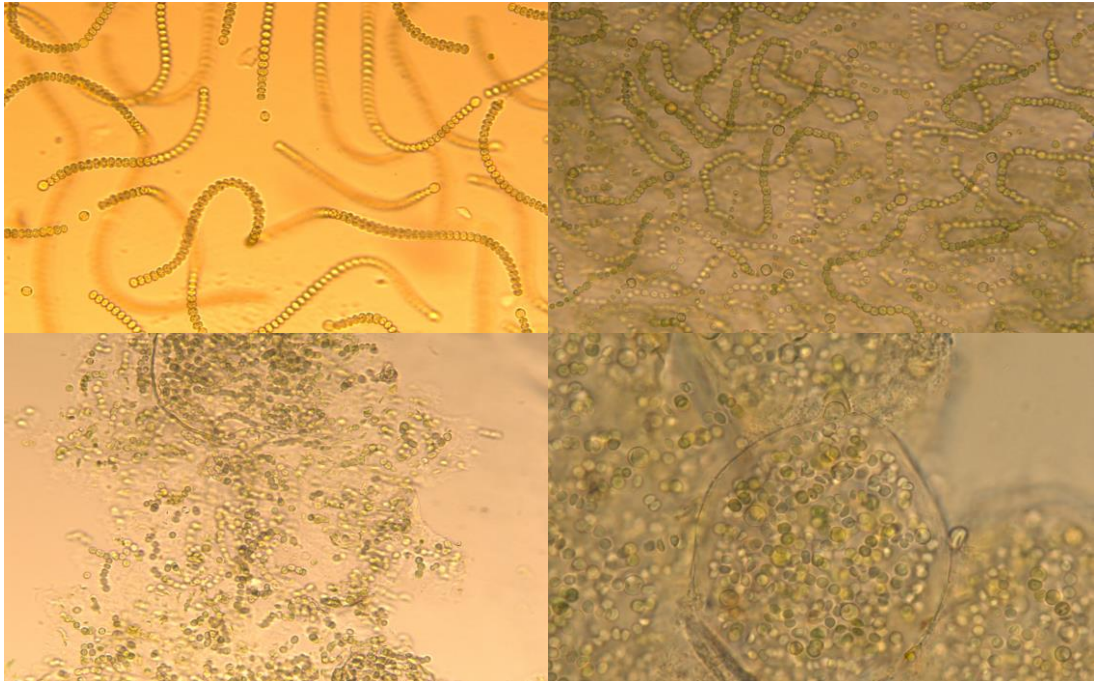


Appendix S2. Real (= observed) versus predicted abundance values of *Pectenia plumbea* in Cabañeros National Park (n = 71 plots).



CAPÍTULO 4/CHAPTER 4

Reestablishing the cyanolichen symbiosis: Where do the compatible photobionts come from?



Juan Luis H. Cardós • Isabel Martínez • María Prieto • M^a Carmen Molina • Maarit Jylhä • Gregorio Aragón • Jouko Rikkinen

Manuscrito inédito

ABSTRACT

To detect possible establishment limitations, we studied ascospore germination and photobiont association in the cyanolichen *Pectenیا plumbea* (Pannariaceae, Peltigerales) in temperate and Mediterranean oak forests of Spain. In order to reestablish the lichen symbiosis, fungal spores must first germinate and then associate with a compatible photobiont. Germination tests were made with ascospores from 500 apothecia. Not a single ascospore germinated within the two-month trial (with 32 different treatments). Then 192 isolates of the *Nostoc* photobiont were obtained from 24 thalli. While 82% of isolates were still alive after six months on the growth medium, none of them had grown significantly nor produced motile hormogonia. In order to determine the genotype identity of the *Nostoc* cyanobionts we obtained tRNA^{Leu}(UAA) intron sequences from 30 *P. plumbea* thalli from 1 population. We also sequenced *Nostoc* cyanobionts of 41 specimens of other cyanolichen species from the same habitat and 58 *Nostoc* free-living colonies cultured from bark samples. The results indicated that *P. plumbea* shares *Nostoc* genotypes with two other cyanolichen species. Only one of them reproduces asexually via small thallus fragments and is suspected to facilitate the establishment of *P. plumbea* by dispersing appropriate cyanobionts into new habitats.

INTRODUCTION

Lichens are symbiotic consortia composed of one primary fungal partner (mycobiont) and one or more photosynthetic partners (photobionts), either cyanobacteria or green algae or sometimes both. Also many other fungal and/or bacterial symbionts can take part in the symbiotic consortium (U'Ren *et al.* 2012; Werth *et al.* 2013; Aschenbrenner *et al.* 2016; Spribille *et al.*, 2016). In sexually reproducing lichens the associations between different symbionts must be reestablished after reproduction. Thus, each germinating fungal spore must associate with a compatible photobiont in order to initiate thallus morphogenesis. This is not the case in symbiotically reproducing lichens, which can disperse all partners of the symbiosis into new habitats within specialized vegetative propagules.

In some cyanolichen species, the mycobiont only associates with one specific cyanobacterial genotype. In most cases, the mycobionts are more promiscuous but generally still only rely on a rather restricted pool of closely related photobionts, some of which may be shared by several other mycobiont species. Lichen photobionts are usually much less selective, with individual photobiont genotypes commonly associating with several fungal taxa (see Rikkinen 2013 for detailed review).

Rikkinen *et al.* (2002) proposed that cyanolichen mycobionts that share the same photobiont may commonly obtain compatible photobionts from each other thus forming photobiont-mediated guilds. Within such ecological communities, all fungal species are horizontally linked by shared photobiont specificity, but can have different roles in function of their reproductive strategy (Rikkinen, 2003; Belinchón *et al.*, 2015; Cornejo & Scheidegger, 2016). Some lichens may function as 'core species' by producing large quantities of symbiotic propagules with photobionts that are potentially available also to 'fringe species', which only produce fungal spores and do not disperse photobionts themselves (Rikkinen *et al.*, 2002; Rikkinen 2003). Core species have the potential to effectively modulate the occurrence of fringe species (Belinchón *et al.*, 2015), and their facilitative role is expected to be especially

important in cases where the photobionts are not able to establish free-living populations. While a wide diversity of free-living cyanobacteria occurs in terrestrial habitats, most free-living forms do not establish symbiotic associations with lichen-forming fungi (Rikkinen *et al.*, 2002; Hedenås *et al.*, 2007; Rikkinen & Virtanen, 2008; Rikkinen, 2013).

Pectenia plumbea (Lightf.) P.M. Jørg.*et al.* is an oceanic cyanolichen species with a continuous but very scattered range along Europe. In the Atlantic coast the species is more frequent, although lately has declined drastically due to human activity, while in the southern margin there are still good populations but they are very distanced from each other (COSEWIC 2010). In central Spain, the species has been listed as vulnerable due to loss and fragmentation of habitat during the past decades (Martínez *et al.*, 2003). Most Spanish populations are small (Martínez *et al.*, 2014) and exhibit low genetic diversity (Otálora *et al.*, 2013), and the lichen has not been found from many seemingly suitable forest habitats prospected during recent field surveys. Reasons for this absence are not well understood as the lichen produces ascospores which should have a high dispersal ability – and the mycobiont is not believed to be extremely restricted in its cyanobiont choice (Otálora *et al.*, 2013).

Based on high reciprocal genetic differentiation and low genetic diversity of *Pectenia plumbea* in central Spain, Otálora *et al.* (2013) suggested that the long distance dispersal of the lichen might be limited. Still, the abundant production of ascospores suggests that the mycobiont should be able to effectively reach suitable habitats within the forest landscape (Cardós *et al.* in review), and that the lichen might rather experience difficulties in ascospore germination and/or finding a compatible photobiont. Ascospores of most cyanolichens do not readily germinate under laboratory conditions (Crittenden *et al.*, 1995; McDonald *et al.*, 2013), and may require the presence of compatible photobionts to induce germination and further growth.

The cyanobionts of *Pectenia plumbea* belong to a monophyletic lineage of *Nostoc* found in all cyanolichens of the *Nephroma* guild (Rikkinen *et al.* 2002; Myllys *et al.*, 2007; Kaasalainen *et al.* 2015). Although widespread in *Nephroma* guild cyanolichens these cyanobionts have not been observed to establish free-living populations (Rikkinen, 2013). Attempts to bring them into pure culture have been unsuccessful (Jordan & Rickson, 1971; Kardish *et al.*, 1989), and the cyanobionts do not appear to produce hormogonia, i.e., short, small-celled filaments that move by gliding, are attracted to certain sugars, and can play a central role in the establishment of many cyanobacterial symbioses (Adams *et al.* 2013; Rikkinen 2016).

In this study we determine cyanobiont diversity of *Pectenia plumbea* and several associated epiphytic cyanolichen species in the Iberian Peninsula and focus on two critical phases of the lichen life cycle: ascospore germination and photobiont recruitment. We analyze A) photobiont diversity of nine *Pectenia* populations in different parts of Spain, B) photobiont diversity of other epiphytic cyanolichen species sharing the same habitat, C) germination of *Pectenia* ascospores, and D) diversity and growth of *Nostoc* cyanobionts isolated from *Pectenia* thalli and their epiphytic substrates. The study is done to identify the factors that most likely limit the establishment of the threatened lichen species in the Spanish forest landscape.

MATERIAL AND METHODS

Study sites

Nine Spanish forest sites with *Pectenia plumbea* populations were studied, four (I–IV) in the northwestern part, three (V–VII) in the central part, and two (VIII–IX) in the southeastern part of the country (Supplementary Fig. S1). All studied forests are unmanaged and have a closed canopy of native old-growth trees (Otálora *et al.* 2013, Martínez *et al.* 2014, Otálora *et al.* 2015, Cardós *et al.* 2016).

Diversity and growth of lichen-symbiotic and free-living cyanobacteria

To determine the overall level of cyanobacterial diversity in *Pectenia plumbea* in the Iberian Peninsula we first sampled 3–4 *Pectenia* thalli collected from each of the nine forest sites (Table S1). After this we sampled intensively on one 15x15 m study plot established at site V (Gargantilla) in Central Spain (Fig. S1). The study plot had 21 standing trees, 17 of which had *Pectenia plumbea* and/or other epiphytic cyanolichens growing on the trunk. Two 10x10 cm grids were placed on each tree: one at breast height (130 cm) and the second close to the trunk base, but avoiding the lowermost section with terricolous lichens and bryophytes. One specimen of each cyanolichen species present on each grid was collected for DNA analysis, adding up to a total of 71 cyanolichen specimens from 31 grids on 17 trees (Table 1). After sampling we checked that the sampling had indeed captured all epiphytic cyanolichen species present on the study plot and its immediate surroundings.

To determine cyanobacterial diversity in the substrates of the epiphytic cyanolichens we isolated cyanobacteria into culture from substrate samples collected from each of the 42 grids. A mixed sample of exposed bark, epiphytic bryophytes, and/or green algal lichens was collected from each grid. Cyanobacteria within the substrate were brought into culture by touching the sterile surface of solid growth medium (nitrogen-free Z8) with small pieces of substrate. The cultures from each grid were incubated at room temperature and indirect daylight for 68 days. The emerged cyanobacterial colonies were first classified according to shape, size, and color under the dissecting microscope. Only colonies corresponding to *Nostoc* (with non-branched isopolar trichomes, spherical or cylindrical cells, and heterocysts) were studied further. From these colonies, 17 isolates that had not produced hormogonia but rather formed dark green, pearl-shaped colonies (*'Nostoc punctiforme'*) were first selected for DNA extraction. After this, DNA was extracted from 41 other colonies that represented other *Nostoc*-like colony morphologies that had developed on the plates.

Table 1. Genetic identity (tRNA^{Leu} UAA intron) of the symbiotic *Nostoc* from all the lichen species of the community at site V (Gargantilla). Files represent the place on each tree (base or bole) where the specimen of each species (columns) was sampled. The underlined species reproduce sexually, and the not underlined reproduce asexually (the photobiont is dispersed within the propagule). The abbreviated species are: *Pectenia plumbea*, *Nephroma laevigatum*, *Fuscopannaria mediterranea*, *Collema furfuraceum* and *Dendriscoaulon umhausense*. The short dash represents that the species was not present at that sample unit.

Genotype legend: □ A1, ▲ A2, ○ A3, ◇ B1

		<u><i>P. plumbea</i></u>	<u><i>N. laevigatum</i></u>	<i>F. mediterranea</i>	<i>C. furfuraceum</i>	<i>D. umhausense</i>
Tree 1	Base	▲	○	-	-	-
	Bole	▲	▲	○	-	-
Tree 2	Base	▲	-	-	-	-
	Bole	▲	-	-	-	-
Tree 3	Base	□	▲	○	-	▲
	Bole	▲	-	○	-	-
Tree 4	Base	▲	▲	-	-	-
	Bole	▲	□	-	-	▲
Tree 5	Base	▲	▲	-	-	▲
	Bole	▲	-	-	-	-
Tree 6	Base	▲	▲	-	-	-
	Bole	▲	▲	○	-	-
Tree 7	Base	▲	▲	-	-	-
	Bole	▲	-	○	-	▲
Tree 8	Base	▲	-	-	◇	-
	Bole	▲	○	○	◇	-
Tree 9	Base	-	-	-	-	-
	Bole	▲	▲	-	-	-
Tree 10	Base	▲	-	-	-	-
	Bole	-	-	-	-	▲
Tree 11	Base	▲	○	-	◇	-
	Bole	▲	-	○	-	-
Tree 12	Base	▲	▲	-	-	-
	Bole	▲	○	-	-	-
Tree 13	Base	▲	▲	-	-	-
	Bole	-	-	-	-	-
Tree 14	Base	▲	▲	-	-	-
	Bole	□	□	-	◇	▲
Tree 15	Base	○	▲	-	-	-
	Bole	□	-	○	-	-
Tree 16	Base	▲	▲	-	-	-
	Bole	▲	○	○	◇	-
Tree 17	Base	▲	▲	-	-	-
	Bole	-	-	-	-	-

To determine photobiont growth, we again used the wider geographic sampling and collected 24 fresh *Pectenia plumbea* thalli from the nine populations (2–4 specimens per population). In the laboratory cyanobacterial photobionts were isolated after carefully removing the upper cortex of the dry lichen specimens with a sterile needle. From each thallus, eight minute fragments of the photobiont layer (0.01–0.04 mm²) were placed separately on petri dishes with nitrogen-free Z8 medium. The isolates were kept at room temperature under indirect daylight and periodically checked for photobiont growth and/or production hormogonia during the following six months. To document growth, all cyanobacterial isolates from studied sites V, VI, and VII (16 isolates obtained from two *Pectenia* thalli from each site) were photographed on the day of isolation and again after 50 days of culture. As a growth control we repeated the same isolation procedure for two terricolous cyanolichen species, *Peltigera canina* (L.) Willd. and *Peltigera praetextata* (Flörke) Vain., collected from localities V, VI and VII. The eight cyanobacterial isolates from six specimens of each *Peltigera* species were placed into the same growth conditions as those from *Pectenia* isolates.

The initial and final size of the photobiont isolates was quantified using ImageJ v.1.49 (Rasband, 1997–2015), and the relative area growth rate (RAGR) was calculated using: $RAGR (\text{mm}^2 \text{ cm}^{-2} \text{ day}^{-1}) = \ln (A_f / A_i) / \Delta t \times 100$, where A_f is the final area, A_i the initial area and Δt is the experiment duration (Evans, 1972). To determine the statistical significance of differences in the RAGR between cyanobacterial isolates from *P. plumbea* and the *Peltigera* species, we used ANOVA and included collection site and lichen thallus as explanatory factors.

Germination of fungal ascospores

To determine ascospore germination we obtained fresh ascospores from two *Pectenia plumbea* populations (VI and VII) in central Spain. These sites have the greatest abundance of the species of all known localities in the Mediterranean region (Martínez

et al., 2014). From each population, small thallus pieces including apothecia were collected from 25 lichen thalli. A total of 500 apothecia (10 from each lichen specimen) were cleaned and washed following Yoshimura *et al.* (2002). Seven apothecia per petri dish were attached with petroleum jelly to the lid under sterile conditions. The distance from the apothecial surface to the culture medium was 1–2 mm. The petri dishes were then inverted, and stored in the dark at 20°C, and apothecia were let to discharge ascospores upwards to the medium.

We used four different media for the germination experiments: Agar, MYA, LBM, and BBM (Yoshimura *et al.*, 2002), and each medium was used to make four different liquid preparations as follows. A) Preparation with bark extract of bark collected from the same tree on which the lichen specimen had grown. The extract was prepared following the protocol of Stocker-Wörgötter & Türk (1991), but substituting the 500 g soil with 250 g bark. B) Preparation with lichen extract made by crushing and boiling *Pectenia plumbea* thallus fragments. The concentration of *Nostoc* cells in the extract was adjusted to 0.2 g l⁻¹, which was previously found to promote ascospore germination in some cyanolichens (Scott, 1964). C) Preparation with the absorbent cyclodextrin (10 g l⁻¹), which was previously found to induce ascospore germination in some cyanolichens (Denison, 2003). D) Preparation with distilled water as control.

The quantity of discharged ascospores was registered every 24 h. After 72 h no new discharges occurred and the lids with apothecia were replaced by sterile lids. All ascospore cultures were kept in sterile conditions at 18–21° C, and the dishes were checked every 72 h for 60 days for any evidence of spore germination. The possible effect of light on germination was studied by exposing the cultures to two contrasting light regimes: half of the plates were kept in total darkness and the other half exposed to normal daylight cycle (16 h photoperiod, 100 µmol photons m⁻² s⁻¹). As a germination control, we placed four *Xanthoria parietina* (L.) Th. Fr. apothecia on four different petri dishes and exposed them to the same growth conditions as the dishes with *Pectenia* apothecia.

Molecular data

We used the cyanobacterial intron (*trnL*) disrupting the *tRNA^{Leu} UAA* gene for determining genetic diversity of cyanobacteria in lichen thalli and cyanobacterial cultures (Paulsrud & Lindblad 1998; Costa et al. 2002; Olsson et al. 2012; Kaasalainen et al. 2015).

DNA from cyanolichen specimens was extracted using GeneJET™ genomic purification kit (Fermentas, Helsinki). The *trnL* genes from lichen specimens were amplified using the primers *tRNA^{Leu} outF* and *outR* (Paulsrud & Lindblad 1998). PCR amplifications were performed using Master Mix (Qiagen) in a 50 µl volume, containing 4 µl of diluted genomic DNA, 1 µl of each primer (50 µM), 10× buffer, 10 mM dNTPs (Fermentas, Helsinki), 20 mg/ml BSA (Fermentas, Helsinki), and 2U/µl Dynazyme II (Fermentas, Helsinki). Amplifications were performed as follows: initial denaturation at 94°C for 3 min, followed by 4 cycles of 94°C for 30 sec, 55°C for 30 sec, 72°C for 2 min, followed by 26 cycles of 94°C for 30 sec, 60°C for 30 sec, and 72°C for 2 min, with final extension of at 72°C for 10 min. The PCR products were purified using GeneJet™ PCR Purification Kit (Fermentas, Helsinki). After sequencing the chromatograms of all sequences were checked using EbioX (version 1.5.1) and aligned by MAFFT (version 7).

The *trnL* genes from cyanobacterial cultures were amplified as described in Paulsrud & Lindblad (1998). PCR amplifications were performed using Master Mix (Qiagen) in a 25 µl volume, containing 3 µl of diluted genomic DNA, 1 µl of each primer (10 µM), and 20 µl of distilled water. Amplifications were performed using the program described in Schultz et al. (2015). The PCR products were purified using Exo-sap-IT (USB Corporation, Santa Clara, California, USA). The purified PCR products were sequenced using the same amplification primers. The sequences from cyanobacterial cultures were assembled and edited using Sequencher v. 4.10.1. (Genes Codes Corporation, Ann Arbor).

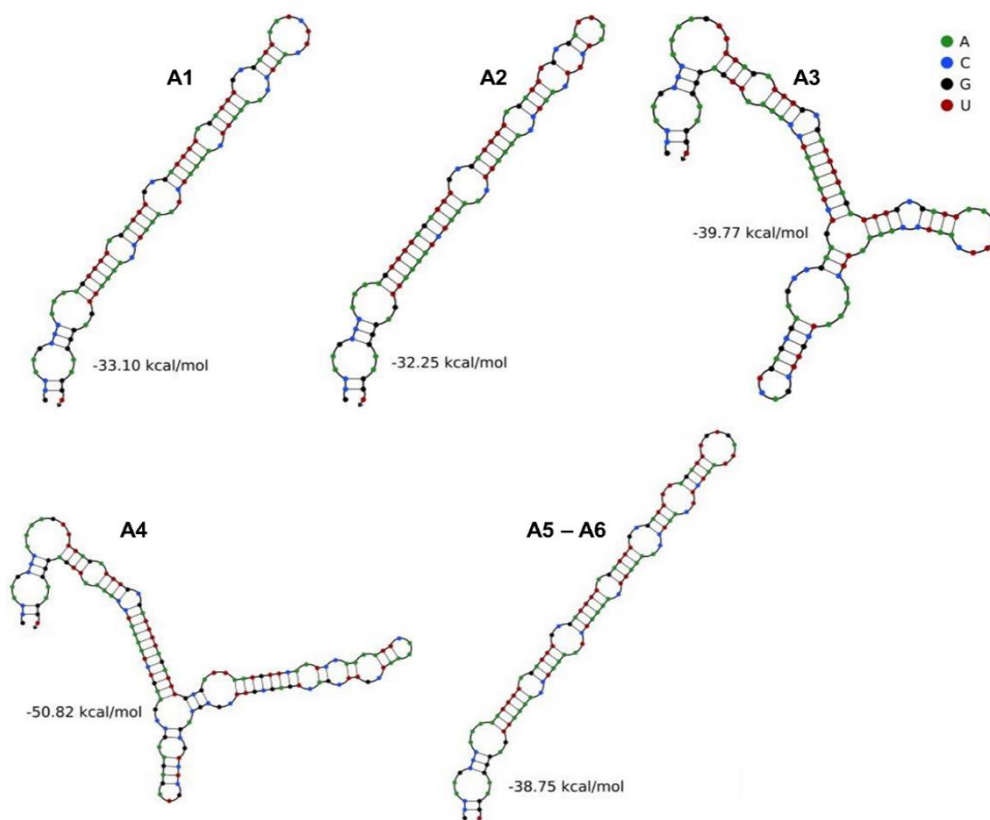


Figure 1. Folding of the 'Nephroma guild'-type P6b regions for the genotypes A1-A6. The genotypes A5 and A6 differ in one nucleotide but the folding yielded is identical. The genotype A4 was only found as free-living. The nucleotide sequences were folded with NUPACK at 20°C, and below each stable structure is indicated the Gibbs free energy (ΔG).

RESULTS

Cyanobacterial diversity in cyanolichens

A total of 6 cyanobacterial tRNA^{Leu} (UAA) intron sequences were obtained (Fig. 1) from 101 epiphytic cyanolichen thalli collected from the nine study sites (Tables 1 & 2). The length of the sequences was 350–380 bp, and a comparison with sequences previously deposited in GenBank identified those amplified from *Nostoc* photobionts of various cyanolichens as the most similar sequences, thus confirming the generic

identity of the lichen cyanobionts. The sequences obtained from the 60 *Pectenia plumbea* specimens from the nine forest sites represented five closely related *Nostoc* genotypes (Tables 1 & 2). They all had a *Nephroma*-type Class I repeat motif in the P6b region, and two of the genotypes (A1, A3) have been previously found from other *Nephroma* guild cyanolichens (Kaasalainen *et al.* 2015). The sequences obtained from 71 cyanolichen specimens from the sample plot in Central Spain (Gargantilla) included four *Nostoc* genotypes (Table 1 & Fig. 2). The cyanobionts of all *Pectenia* thalli belonged to only three *Nostoc* genotypes (A1–A3), two of which were also found in the regional sampling across the Iberian Peninsula. One of these genotypes (the most abundant A2) was also found in all *Dendriscoaulon umhausense* specimens analyzed, other (A3) in all the *Fuscopannaria mediterranea*, and the three (A1–A3) were also found in all the *Nephroma laevigatum* specimens analyzed (Table 1). The cyanobionts of the six *Collema furfuraceum* specimens belonged to a distinct *Nostoc* genotype (B1) that had a *Collema*-type Class I repeat motif in the P6b region (Table 1 & Fig. 2). Sequence identical cyanobionts have previously been found from some *Collema* guild cyanolichens (Kaasalainen *et al.* 2015).

Diversity of cultured cyanobacteria

A total of 58 cyanobacterial tRNA^{Leu} (UAA) intron sequences were obtained from the cyanobacterial isolates that developed from cultured substrate samples (Fig. 2 & Table S2). Only three of these (one isolate with *Nostoc* genotype A2 and two with A3) were sequence identical to the *Nostoc* genotypes that were identified from thalli of *Pectenia* and other *Nephroma* guild cyanolichens. Six cultured isolates were sequence identical to the *Nostoc* cyanobiont of *Collema furfuraceum*. The remaining 49 isolates represented 22 different genotypes (Fig. 2) of *Nostoc* or other nostocalean cyanobacteria mostly previously unknown, and none of which have been reported to occur as photobionts in epiphytic cyanolichens (Table S2), with the exception of one isolate with the *Nephroma*-type genotype A4. They had either Class II or *Collema*-type Class I repeat motifs in the P6b region and were distantly related to the

monophyletic group of *Nostoc* genotypes that occurs in all *Nephroma* guild cyanolichens (Kaasalainen *et al.* 2015).

Table 2. Genetic identity (tRNA^{Leu} UAA intron) of the symbiotic *Nostoc* from 3–4 *Pectenía plumbea* thalli sampled in each studied site, to document the overall photobiont diversity in the Spanish populations. Files are the different studied populations and columns represent the different thalli sampled at each site.

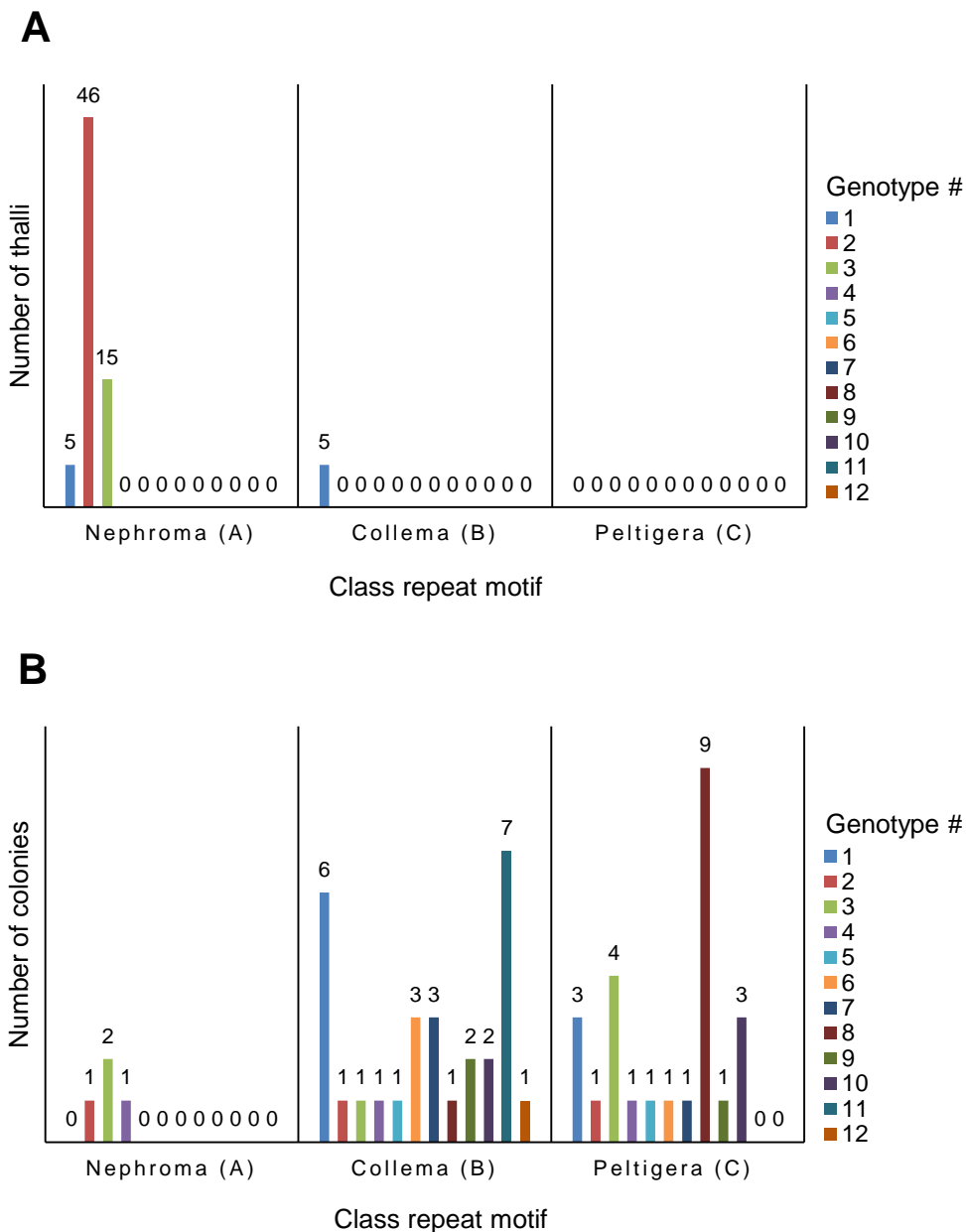
Genotype legend: □ A1, ▲ A2, ◇ A5, ◇ A6

Population	Locality name	<i>Pectenía plumbea</i> thallus #			
		1	2	3	4
Northwest					
I	Muniellos	□	□	◇	-
II	Moal	□	◇	◇	-
III	Monasterio de Hermo	□	□	◇	-
IV	Rebollar	□	□	□	-
Center					
V	Gargantilla	□	▲	▲	▲
VI	El Chorro	▲	▲	▲	▲
VII	Navas de Estena	▲	▲	▲	▲
Southeast					
VIII	Sierra Madrona	▲	▲	◇	-
IX	Sierra de Alcaraz	□	□	□	-

Ascospore discharge and germination

In *Pectenía plumbea* 34.82% of all apothecia discharged ascospores into the culture medium. The mean production of spores per apothecium was: 29.21 (SD ± 30.15, *min* = 1, *max* = 135). While spore discharge occurred in all but two treatments and 30 different treatments could be tested, none of the 1461 studied spores germinated during 60 days of culture. Each of the *Xanthoria parietina* apothecia that were used as control discharged 100–200 spores. Over 95% of these spores had germinated after the first seven days of culture.

Figure 2. Frequency with which each cyanobacterial genotype has been found, as (A) symbiotic (i. e. within a lichen), and (B) as free-living. The capital letter beside the name of each “Class repeat motif” match with that used in Results section to group all the genotypes of the same class. All the genotypes correspond to *Nostoc*, except B5-B12 in the graphic B. Genotype #, refers only to the nomenclature used in the study, i. e., genotypes within different classes are distinct, in spite of having the same color.



Photobiont growth and reproduction

All 192 *Nostoc* cultures isolated from *Pectenia plumbea* thalli were alive after the first 50 days of culture, but none of them had produced hormogonia (Fig. S2). Their mean growth rate (RAGR \pm SD) was $0.685 \pm 0.696 \text{ mm}^2 \text{ cm}^{-2} \text{ day}^{-1}$. The growth rates of *Nostoc* cyanobionts isolated from *Peltigera canina* and *P. praetextata* (controls) were 4.515 ± 2.623 and $2.777 \pm 1.390 \text{ mm}^2 \text{ cm}^{-2} \text{ day}^{-1}$, respectively. The observed difference in the growth of *Nostoc* cyanobionts isolated from *Pectenia plumbea* and the two *Peltigera* species was statistically significant ($F=278.07$, $P<0.001$, $R^2_{\text{adj}}=0.82$). The rapid growth of *Peltigera* cyanobionts was attributed to the abundant production of hormogonia (Fig. S2), which was observed in 57.14% of their isolates. After 6 months of culture, most *Nostoc* isolates from *Pectenia plumbea* remained alive (a few had succumbed to fungal contamination), but none of them had still produced hormogonia.

DISCUSSION

With all the evidence collected in this study in relation to key phases of the lichens life cycle, we have obtained revealing insights to understand why and how constraining may be the steps for a cyanolichen spore to establish as a new thallus, since it is dispersed.

After dispersal, the spore first must germinate to reestablish the symbiosis with the cyanobacterial partner. We have found no evidence of spore germination under any of the 32 culture conditions tested. Firstly, the spores were discharged properly in a fairly normal amount (Crittenden *et al.*, 1995). To carry out the germination experiments we selected the most abundant (Martínez *et al.*, 2014) and genetically diverse (Otálora *et al.*, 2013) populations of all known in the Mediterranean region, in order to discard possible inbreeding problems that could interfere with the germination, but the spores have been completely unable to

germinate. In general, attempts to germinate cyanolichen spores have been rather unproductive (Crittenden *et al.*, 1995; McDonald *et al.*, 2013). The germ tube seldom appears, but in these cases the growth is not maintained (Crittenden *et al.*, 1995; Sangvichien *et al.*, 2011). In *Peltigera* spp. the germination triggers when the photobiont is added to the spores (Scott, 1964), and even in some cases the symbiosis has been successfully reestablished with this technique (Ahmadjian, 1989; Stocker-Wörgötter & Türk, 1991). Conversely, as we have shown here, the lack of reproduction and the slow growth of the photobiont of the *Nephroma* guild cyanolichens like *P. plumbea*, make difficult to achieve it in laboratory conditions. In our case it is impossible to assume that all the *P. plumbea* spores are inviable, what suggests that *P. plumbea* requires the presence of compatible photobionts in sufficient amount in its habitat to be found by the spores and begin the germination process.

The *P. plumbea* photobiont (*Nostoc*) was attempted to be isolated and grown for two reasons: to be added to the spores to observe their germination capacity, and to know the own ability of the photobiont to spread as free-living, which should be directly linked with its availability in the community. The photobiont isolates showed a positive RAGR and were able to survive after the long period of culture, however none of them produced any sign of reproduction. The *Peltigera* isolates used as control also mostly survived but conversely produced hormogonia. There are no similar studies to compare the RAGR recorded, but it is significantly much less than the expected for a symbiotic *Nostoc*, if we take the *Nostoc* isolates of *Peltigera* as a reference. The cause behind such a slow growth, and the lack of reproduction to found new colonies, seem to be a process of genome erosion that prevent to some symbiotic cyanobacteria to have a “normal lifestyle” (Ran *et al.*, 2010). This phenomenon has led along the evolution of the symbiosis, to generate *Nostoc* strains that have lost autonomous growth and other capabilities for an aposymbiotic way of life. This is in accordance with the great phenotypical changes that *Nostoc* cells experience in lichen symbiosis, respect to their free-living relatives (Honegger, 1991; Rikkinen, 2002; Sarma, 2013). The failure to complete a whole life cycle, necessarily impede to these symbiotic *Nostoc* strains to spread out of the symbiosis. Consequently, they cannot

constitute a quantitatively significant source of photobionts for the establishment of the *P. plumbea* spores, nor of other lichen species that also house a *Nephroma* guild *Nostoc*.

An adequate quantity of compatible photobionts, that would enable the establishment of new thalli, should however be located somewhere in the community. This is the first study to reveal at a genetic level the composition of a free-living cyanobacterial community, in order to be compared with the lichen-symbiotic *Nostoc*, to obtain conclusions on the hypothesis about facilitation in lichens. Among the huge amount of free-living colonies, we did not expect to find symbiotic strains, thus our sampling effort was focused on collecting all the seemingly *Nephroma* guild colonies for genetic identification. Finally, even with this highly selective method, only three out of the hundreds of colonies appeared on the culture plates, were symbiotic strains (i. e. found also within a lichen). Based on the dependence of lichen establishment on the density of propagules dispersed (Dettki *et al.*, 2000), and similarly to the results in relation to the photobiont growth, this extremely small representation of *Nostoc* colonies available to be found by a spore, cannot produce the establishment of a great number of new thalli, and presumably might not be enough for the long-term persistence of the lichen population. These three colonies could come from some *Nostoc* cells escaped from any cyanolichen thallus wound, but to do so it is required a motile phase (hormogonia) (Boissière *et al.*, 1987), which is lacking in *Nephroma* guild *Nostoc*. The most probable origin could be on the degradation of the fungal partner of a dispersed asexual propagule (in our community *F. mediterranea* or *D. umhausense*) or a small thallus fragment (*P. plumbea* or *N. laevigatum*, along with the other two) of other cyanolichens (Rikkinen *et al.*, 2002; Nelsen & Gargas, 2008; Wornik & Grube, 2010). Once this type of colonies establishes aposymbiotically they could remain as an epiphyte for long periods, thanks to the gelatinous sheath surrounding the colonies, that confer a great desiccation tolerance and minimize the damage produced by the UV radiation (Potts, 1996). The other 55 free-living colonies sampled corresponded to one '*Nephroma*-type' *Nostoc* that was not found as symbiont in this community, 29 '*Collema*-type' *Nostoc* (9 *Nostoc* and 20 to other cyanobacterial

genera), and 25 ‘*Peltigera*-type’, that can be summarized in 23 different genotypes. These results evidence that tree bark hosts a great hidden cyanobacterial diversity, and therefore studies about lichen photobiont diversity (Hedenås *et al.*, 2007) and lichen facilitation (Svensson *et al.*, 2016), should identify the colonies at a genetic level to quantify the real availability of compatible strains, to avoid drawing unclear conclusions.

The most plausible source of compatible photobionts should be finally found within the lichen community, once we revealed great differences in genetic composition between the symbiotic and free-living *Nostoc*. Firstly, cyanolichens are too selective with the photobiont at a community scale, because in spite of all the diversity registered (18 different *Nostoc* genotypes), only 4 different genotypes were encountered within all the four cyanolichen species. Grouping the genotypes in function of the Class repeat motif of the P6b region of the *trnL*, we can appreciate different selectivity pattern within each guild. The lichen community is composed by four *Nephroma* guild species, and they basically exploit what is available, excluding the genotype A4 that could not be located as symbiotic. The case of *C. furfuraceum*, and hence of the *Collema* guild, is different because it uses only one *Nostoc* genotype in spite of the enormous diversity thriving in its surroundings, so it can be considered as very highly selective (Beck *et al.*, 2002). This results underscore the importance of taking into account the photobiont-mediated guilds when talking about mycobiont-cyanobiont association patterns, and gives support to a high selectivity in lichen symbiosis at a community scale (Myllys *et al.*, 2007; Fedrowitz *et al.*, 2011).

Regarding species selectivity individually, we found different patterns in function of the reproductive mode. The species reproducing sexually (*N. laevigatum* and *P. plumbea*) are promiscuous in their cyanobiont choice, and both can utilize the same three *Nostoc* genotypes. The other three asexual species (*F. mediterranea*, *C. furfuraceum* and *D. umhausense*), showed no evidence of photobiont switch or horizontal transmission, since each of them harbored their own photobiont. A lower selectivity in sexual species could constitute an adaptive trait to enable the

establishment (Wirtz *et al.*, 2003; Fedrowitz *et al.*, 2011), since they need to reencounter the photobiont in each generation. Although it could merely be a consequence of an obligate random recombination. The sexual species showed a clear preference for one genotype (A2, 87% and 71% of cases respectively), which demonstrates that one out of all the possible combinations is conferring to the symbiotic consortium the best performance in this habitat (Werth & Sork, 2014). It is possible that symbiotic combinations with the less frequent *Nostoc* genotypes (A1 or A3) might even constitute a temporal solution, until the most adequate strain can be acquired (Ott, 1987; Beck *et al.*, 1998). Interestingly, the genotype A2 is only dispersed and supplied by *D. umhausense*, which is a species much less abundant regionally (see the Online Appendix 1 in Cardós *et al.*, 2016), and locally (personal observation), than *F. mediterranea*, which uniquely disperses the genotype A1. Presumably, the number of propagules dispersed with the genotype A1 is greater than A2, nevertheless, sexual species actively seek to associate with A2 in spite of its lower availability. This demonstrates that the role of *D. umhausense* seems to be crucial for the establishment of the sexual species and hence for the configuration of the cyanolichen community. The influence of *D. umhausense* on *N. laevigatum* should be lower because it is more able to steal cyanobionts from *F. mediterranea* propagules than *P. plumbea* (with only one thallus with genotype A3), that would promote the establishment of a greater number of thalli. The greater dependence of *P. plumbea* (a vulnerable species) on the propagules of only one species, which in turn is a species regionally rare, could be behind its threat status. Thus, *P. plumbea* could be exclusively dependent on the occurrence of *D. umhausense* regionally, that can be treated as a pioneer for sexual species, to colonize new habitats in central Spain. Looking for additional evidence to support this idea, we revised the data obtained from 588 plots prospected during previous abundance surveys in the Spanish Mediterranean region (Aragón, unpublished results) and *D. umhausense* occurred in 111 out of the 588 plots. *P. plumbea* occurred only in 26, but the most illustrative is that in 25 out of those 26 *D. umhausense* was also present (Table S3), which

demonstrates that the occurrence of the first is linked to the asexually reproducing cyanolichen.

Thus, the photobiont-mediated lichen guilds receive an important support with all this evidence. In this case the establishment of the two “fringe species” is quantitatively dependent on the propagules produced by a unique “core species”, that distributes its photobiont (*Nostoc*) strain effectively via its asexual propagules (isidia). The “core species” also takes advantage of this situation because a proportion of the dispersed photobionts do not disappear at all. In opposition to species competition, it constitutes a clear case of lichen facilitation. Here we have focused on one species (*P. plumbeum*) for logistic reasons, but all the conclusions can be also extrapolated to the cyanolichen species from the *Nephroma* guild, because the available empirical evidence points in the same direction (no spore germination and no photobiont reproduction). In the case of the *Peltigera* guild, whose *Nostoc* strains indeed present a normal growth and reproduction, these conclusions are not applicable. In view of the possible strong influence of facilitation on lichen communities, future research as well as conservation studies, should consider the influence of this phenomenon.

Acknowledgements

The authors thank the Spanish Government for funding this research through the projects CGL2010-22049 and CGL2013-47010-P, and the PhD grant BES-2011-046139.

REFERENCES

- Adams DG, Bergman B, Nierzwicki-Bauer SA, Duggan PS, Rai AN, Schüßler A. 2013. Cyanobacterial-plant symbioses. In: Rosenberg E, DeLong E, Lory S, Stackebrandt E, eds. *The Prokaryotes*. Berlin, Germany: Springer, 359–400.
- Ahmadjian V. 1989. Studies on the isolation and synthesis of bionts of the cyanolichen *Peltigera canina* (Peltigeraceae). *Plant Systematics and Evolution* 165: 29–38.

- Aschenbrenner IA, Cernava T, Berg G, Grube M. 2016. Understanding microbial multi-species symbioses. *Frontiers in microbiology* 7: 180.
- Beck A, Friedl T, Rambold G. 1998. Selectivity of photobiont choice in a defined lichen community: inferences from cultural and molecular studies. *New Phytologist* 139: 709–720.
- Beck A, Kasalicky T, Rambold G. 2002. Myco-photobiontal selection in a Mediterranean cryptogam community with *Fulgensia fulgida*. *New Phytologist* 153: 317–326.
- Belinchón R, Yahr R, Ellis CJ. 2015. Interactions among species with contrasting dispersal modes explain distributions for epiphytic lichens. *Ecography* 38: 762–768.
- Boissière JC, Boissière MC, Champion-Arnaud P, Lallemand R, Wagner J. 1987. Le cycle des *Nostoc* des genres *Peltigera* et *Collema* en cultures *in vitro* et dans le thalle lichénique. *Canadian Journal of Botany* 65: 1468–1477.
- Cardós JLH, Martínez I, Calvo V, Aragón G. 2016. Epiphyte communities in Mediterranean fragmented forests: importance of the fragment size and the surrounding matrix. *Landscape Ecology* 31: 1975–1995.
- Cornejo C, Scheidegger C. 2016. Cyanobacterial gardens: the liverwort *Frullania asagrayana* acts as a reservoir of lichen photobionts. *Environmental Microbiology Reports* 8: 352–357.
- COSEWIC. 2010. COSEWIC assessment and status report on the Blue Felt Lichen *Degelia plumbea* in Canada. Committee on the Status of Endangered Wildlife in Canada. Ottawa. x + 42 pp.
- Costa JL, Paulsrud P, Lindblad P. 2002. The cyanobacterial tRNA^{Leu} (UAA) intron: evolutionary patterns in a genetic marker. *Molecular Biology and Evolution* 19: 850–857.
- Crittenden PD, David JC, Hawksworth DL, Campbell FS. 1995. Attempted isolation and success in the culturing of a broad spectrum of lichen-forming and lichenicolous fungi. *New Phytologist* 130: 267–297.
- Denison WC. 2003. Apothecia and ascospores of *Lobaria oregana* and *Lobaria pulmonaria* investigated. *Mycologia* 95: 513–518.
- Dettki H, Klintberg P, Esseen PA. 2000. Are epiphytic lichens in young forests limited by local dispersal? *Ecoscience* 7: 317–325.
- Evans GC. 1972. *The quantitative analysis of plant growth*. Oxford, UK: Blackwell Scientific Publications.
- Fedrowitz K, Kaasalainen U, Rikkinen J. 2011. Genotype variability of *Nostoc* symbionts associated with three epiphytic *Nephroma* species in a boreal forest landscape. *The Bryologist* 114: 220–230.
- Hedenås H, Blomberg P, Ericson L. 2007. Significance of old aspen (*Populus tremula*) trees for the occurrence of lichen photobionts. *Biological Conservation* 135: 380–387.
- Honegger R. 1991. Functional aspects of the lichen symbiosis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 42: 553–578.
- Jordan WP, Rickson FR. 1971. Cyanophyte cephalodia in the lichen genus *Nephroma*. *American Journal of Botany* 58: 562–568.

- Kaasalainen U, Olsson S, Rikkinen J. 2015. Evolution of the tRNA^{Leu} (UAA) intron and congruence of genetic markers in lichen-symbiotic *Nostoc*. *PLoS ONE* 10: e0131223.
- Kardish N, Kessel M, Galun M. 1989. Characterization of symbiotic and cultured *Nostoc* of the lichen *Nephroma laevigatum* Ach. *Symbiosis* 7: 257–266.
- Martínez I, Aragón G, Sarrión FJ, Escudero A, Burgaz AR, Coppins BJ. 2003. Threatened lichens in central Spain (saxicolous species excluded). *Cryptogamie, Mycologie* 24: 73–97.
- Martínez I, Flores T, Aragón G, Otálora MAG, Rubio-Salcedo M. 2014. What factors influence the occurrence of the genus *Degelia* (a threatened lichen) in central Spain? *Fungal Ecology* 11: 50–59.
- McDonald TR, Gaya E, Lutzoni F. 2013. Twenty-five cultures of lichenizing fungi available for experimental studies on symbiotic systems. *Symbiosis* 59: 165–171.
- Myllys L, Stenroos S, Thell A, Kuusinen M. 2007. High cyanobiont selectivity of epiphytic lichens in old growth boreal forest of Finland. *New Phytologist* 173: 621–629.
- Nelsen MP, Gargas A. 2008. Dissociation and horizontal transmission of codispersing lichen symbionts in the genus *Lepraria* (Lecanorales: Stereocaulaceae). *New Phytologist* 177: 264–275.
- Olsson S, Kaasalainen U, Rikkinen J. 2012. Reconstruction of structural evolution in the trnL intron P6b loop of symbiotic *Nostoc* (Cyanobacteria). *Current genetics* 58: 49–58.
- Otálora MAG, Belinchón R, Prieto M, Aragón G, Izquierdo P, Martínez I. 2015. The threatened epiphytic lichen *Lobaria pulmonaria* in the Iberian Peninsula: Genetic diversity and structure across a latitudinal gradient. *Fungal Biology* 119: 802–811.
- Otálora MAG, Salvador C, Martínez I, Aragón G. 2013. Does the reproductive strategy affect the transmission and genetic diversity of bionts in cyanolichens? A case study using two closely related species. *Microbial Ecology* 65: 517–530.
- Ott S. 1987. Reproductive strategies in lichens. *Bibliotheca Lichenologica* 25: 81–93.
- Paulsrud P, Lindblad P. 1998. Sequence variation of the tRNA^{Leu} intron as a marker for genetic diversity and specificity of symbiotic cyanobacteria in some lichens. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 310–315.
- Potts M. 1996. The anhydrobiotic cyanobacterial cell. *Physiologia Plantarum* 97: 788–794.
- Ran L, Larsson J, Vigil-Stenman T, Nylander JA, Ininbergs K, Zheng WW, Lapidus A, Lowry S, Haselkorn R, Bergman B. 2010. Genome erosion in a nitrogen-fixing vertically transmitted endosymbiotic multicellular cyanobacterium. *PLoS One* 5: e11486.
- Rasband WS. 1997–2015. ImageJ. Bethesda, MD, USA: US National Institutes of Health. <http://imagej.nih.gov/ij>.
- Rikkinen J. 2002. Cyanolichens: an evolutionary overview. In: Rai AN, Bergman B, Rasmussen U, eds. *Cyanobacteria in symbiosis*. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Press, 31–72.
- Rikkinen J. 2003. Ecological and evolutionary role of photobiont-mediated guilds in lichens. *Symbiosis* 34: 99–110.

- Rikkinen J. 2013. Molecular studies on cyanobacterial diversity in lichen symbioses. *MycKeys* 6: 3–32.
- Rikkinen J. 2016. Cyanobacteria in terrestrial symbiotic systems. In: Hallenbeck P, ed. *Modern topics in the Phototrophic Prokaryotes – Environmental and Applied Aspects*. Berlin, Germany: Springer (In press).
- Rikkinen J, Oksanen I, Lohtander K. 2002. Lichen guilds share related cyanobacterial symbionts. *Science* 297: 357.
- Rikkinen J, Virtanen V. 2008. Genetic diversity in cyanobacterial symbionts of thalloid bryophytes. *Journal of Experimental Botany* 59: 1013–1021.
- Sangvichien E, Hawksworth DI, Whalley AJ. 2011. Ascospore discharge, germination and culture of fungal partners of tropical lichens, including the use of a novel culture technique. *IMA Fungus* 2: 143–153.
- Sarma TA. 2013. *Handbook of cyanobacteria*. London, UK: CRC Press.
- Schultz M, Wedin M, Diel H, Prieto M. 2015. *Epiphloea* belongs to *Collematataceae* (Lecanoromycetes, lichenized Ascomycota). *The Lichenologist* 47: 369–378.
- Scott GD. 1964. Studies of the lichen symbiosis 2. Ascospore germination in the genus *Peltigera*. *Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie* 4: 326–336.
- Spribille T, Tuovinen V, Resl P, Vanderpool D, Wolinski H, Aime MC, Schneider K, Stabentheiner E, Toome-Heller M, Thor G *et al.* 2016. Basidiomycete yeasts in the cortex of ascomycete macrolichens. *Science* 353: 488–492.
- Stocker-Wörgötter E, Türk R. 1991. Artificial resynthesis of thalli of the cyanobacterial lichen *Peltigera praetextata* under laboratory conditions. *The Lichenologist* 23: 127–138.
- Svensson M, Caruso A, Yahr R, Ellis C, Thor G, Snäll T. 2016. Combined observational and experimental data provide limited support for facilitation in lichens. *Oikos* 125: 278–283.
- U'Ren JM, Lutzoni F, Miadlikowska J, Laetsch AD, Arnold AE. 2012. Host- and geographic structure of endophytic and endolichenic fungi at a continental scale. *American Journal of Botany* 99: 898–914.
- Werth S, Millanes AM, Wedin M, Scheidegger C. 2013. Lichenicolous fungi show population subdivision by host species but do not share population history with their hosts. *Fungal Biology* 117: 71–84.
- Werth S, Sork VL. 2014. Ecological specialization in *Trebouxia* (Trebouxiophyceae) photobionts of *Ramalina menziesii* (Ramalinaceae) across six range-covering ecoregions of western North America. *American Journal of Botany* 101: 1127–1140.
- Wirtz N, Lumbsch HT, Green TG, Türk R, Pintado A, Sancho L, Schroeter B. 2003. Lichen fungi have low cyanobiont selectivity in maritime Antarctica. *New Phytologist* 160: 177–183.
- Wornik S, Grube M. 2010. Joint dispersal does not imply maintenance of partnerships in lichen symbioses. *Microbial Ecology* 59: 150–157.

Yoshimura I, Yamamoto Y, Nakano T, Finnie J. 2002. Isolation and culture of lichen photobionts and mycobionts. In: Kranner I, Beckett R, Varma A, eds. *Protocols in Lichenology*. Berlin, Germany: Springer, 3–33.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Figure S1. A) Location of the nine studied *Pecteniam plumbea* populations in Spain (southwestern Europe). B) Location of the study plot at site V (Gargantilla) where the cyanolichen and free-living cyanobacterial communities were sampled intensively (plot side = 15 m). C) Image inside the *Arbutus unedo* forest at site V. D) Detail of an *Arbutus unedo* trunk at site V, showing the great development of some *Pecteniam plumbea* thalli surrounded by the typical epiphyte lichen community.

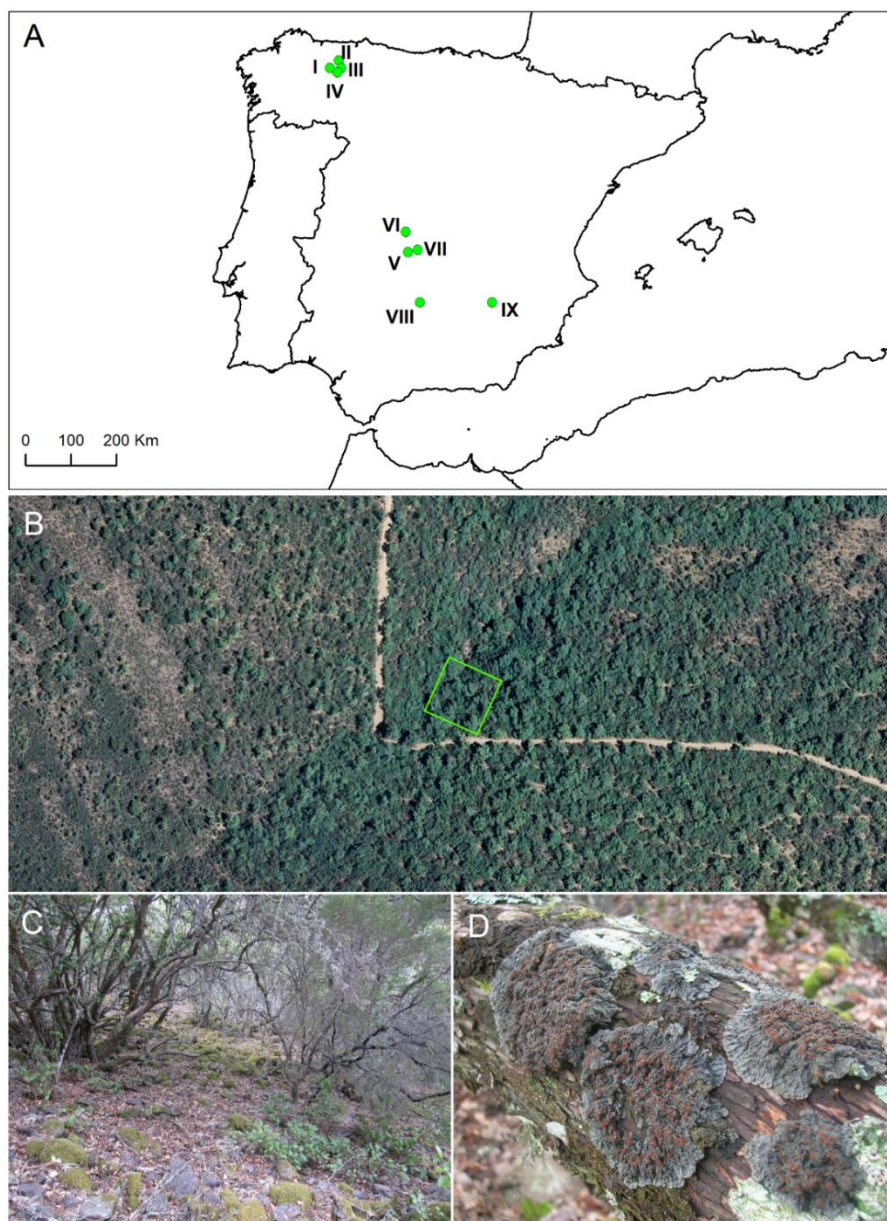


Figure S2. A–D) Representative examples of the growth of the cyanobacterial photobionts isolated from lichen thalli. Left picture was taken at the beginning of the experiment just after the isolation, and right picture was taken 50 days after the isolation. The photobionts were isolated from *Pectenia plumbea* (A and B), *Peltigera canina* (C) and *Peltigera praetextata* (D). It is noticeable the scarce growth in A) and B) and the enormous growth and production of hormogonia in C) and D). E) and F) Detail at different scale of the profuse production of hormogonia in *Peltigera canina*. Scale bar in all pictures = 5 mm.

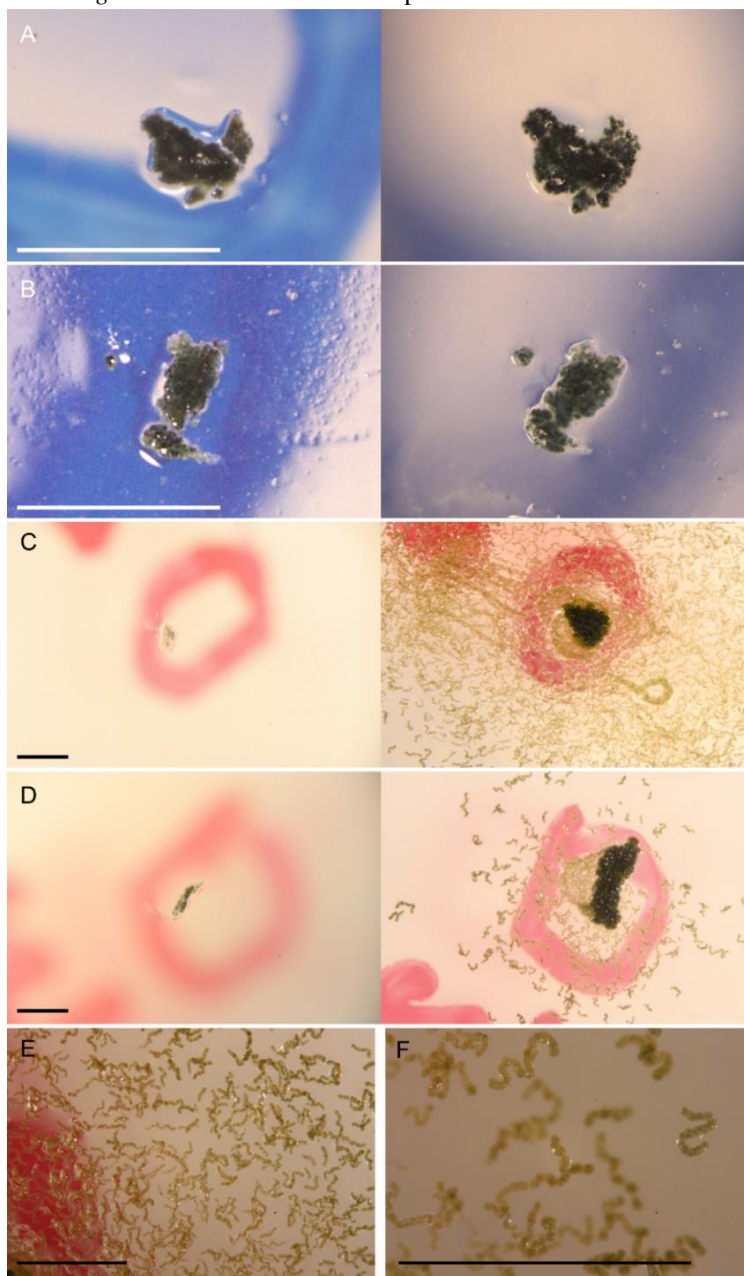


Table S1. Collecting localities and the experiments in which each *Pectenía plumbea* population took part.

Pop. No.	Locality name	Host tree	Coord. N (m)	Coord. W (m)	Experiments
Northwest					
I	Muniellos, Asturias	<i>C. avellana</i>	4767227	688741	1, 4
II	Moal, Asturias	<i>Q. robur</i>	4768894	690894	1, 4
III	Monasterio de Hermo, Asturias	<i>F. excelsior</i>	4761881	698987	1, 4
IV	Rebollar, Asturias	<i>F. excelsior</i> mixed	4768471	692074	1, 4
Center					
V	Gargantilla, Ciudad Real, Cabañeros National Park	<i>A. unedo</i>	4367010	363513	1, 2, 3, 4
VI	El Chorro, Ciudad Real, Cabañeros National Park	<i>Q. ilex</i> spp. <i>ballota</i>	4379334	358474	1, 3, 4, 5
VII	Navas de Estena, Ciudad Real, Cabañeros National Park	<i>Q. ilex</i> spp. <i>ballota</i>	4373385	367094	1, 3, 4, 5
Southeast					
VIII	Sierra Madrona, Ciudad Real, Natural Park	<i>Q. pyrenaica</i>	4256065	389760	1, 4
IX	Sierra de Alcaraz, Albacete, Natural Park	<i>Q. ilex</i> spp. <i>ballota</i>	4256629	549190	1, 4

Coordinates correspond to the system ETRS89.

Experiments: 1: Overall level of cyanobacterial diversity in *Pectenía plumbea*; 2: Free-living and symbiotic cyanobacterial diversity in a cyanolichen community; 3: Quantification of photobiont growth; 4: Production of hormogonia by photobionts; 5: Ascospore discharge and germination

Table S2. Nucleotide sequence of the P6b region of the tRNA^{Leu} (UAA) intron of all the different *Nostoc* and cyanobacterial genotypes identified in the study, classified by the type of repeat motif. Colors highlight insertions, deletions or substitutions: fuchsia was chosen for insertions or deletions of groups of nucleotides; yellow, green, and blue indicates two, three or four different alternatives, respectively, for the same nucleotide position.

Nephroma-type Class I repeat motif

Nostoc genotype A1	CAAAAGTT TTAGATT TGCGATT TTAGATT TGCGATT AATCTTC AATCCAA AATTCAA AATCTAA AATCCAA AATTGAG
Nostoc genotype A2	CAAAAGTT TTAGATT TGCGATT TTAGATT TGCGATT AATCTTC AATCCAA AATTCAA AATCTAA ----- AATTGAG
Nostoc genotype A3	CAAAAGTT TTAGATT TGCGATT TTAGATT TGCGATT AATCTTC AATCCAA AATTCAA AATCTAA AATCCAA AATTGAG GTTGACTGAGCGAAGCCGAAGTC
Nostoc genotype A4	CAAAAGTT TTAGATT TGCGATT TTAGATT TGCGATT AATGTTT AATCCAA AATTCAA AATCTAA AATCCAA AATTGAG GTTGACTGAGCGTTGCGCGAGCGTCTCGTAGAGAAGCCGAAGTC
Nostoc genotype A5	CAAAAATT TTAGATT TGCGATT TTAGATT TGCGATT AATCTTC AATCCAA AATTCAA AATCTAA AATCCAA AATTGAG TTAGATTGTGATT
Nostoc genotype A6	CAAAAATT TTAGATT TGCGATT TTAGATT TGCGATT AATCTTC AATCCAA AATTCAA AATCTAA AATCCAA AATTGAG TTAGATTGTGATT

Collema-type Class I repeat motif

Nostoc genotype B1 GAAAAAAGT CCTGAGT CATGAGT GTTGAGT GCTGAGT AAATTTAA AACTCAT AACTCCT AACTCCT AACTCATT AACTGTTC

Nostoc genotype B2 GAAAAAAGT CCTGAGT CATGAGT GTTGAGT GCTGAAT AAATTTAA AACTCAT AACTCCT AACTCCT AACTCATT AACTGTTC

Nostoc genotype B3 GAAGAAAGT CCTGAGT CATGAGT GTTGAGT GCTGAGT AAATTTAA AACTCTT AACTCCT AACTCCT AACTCCT; AACTGTTC

Nostoc genotype B4 GAAGAAAGT CTTGAGT CATGAGT GTTGAGT GCTGAGT AAATTTAA AACTCTT AACTCCT AACTCCT AACTCCT; AACTGTTC

Cyano genotype B5 GAAGAAAGT AGTAAGT GCTGAGT CATGAGT CTGAGT AAATTTAA AACTCAT AACTCCT AACTCCT AACTCCT; AAAAATTC

Cyano genotype B6 GAAGAAAGT AGTAAGT GCTGAGT CATGAGT CTGAGT AAATTTAA AACTCAT AACTCAT; AACTCCT; AAAAATTC

Cyano genotype B7 GAAAAAAGT CGTGAGT GCTGAGT GCCAGT GTTGAGT AAATTTAA AACTCTT AACTCTT AACTCCT AACTCCT; AACTATTC

Cyano genotype B8 GAAAAAAGT CGTGAGT AATGAGT ACTGAGT ACTGAGT AAATTTAA AACTCTT AACTCTT AACTCCT AACTCCT; AACTATTC

Cyano genotype B9 GAAAAAAGT CGTGAGT AATGAGT ACTGAGT ACTGAGT AAATTTAA AACTCTT AACTCCT ACACCTCT AACTCCT; AACTATTC

Cyano genotype B10 GATTAAGAGT CTGAGT GCTGAGT GATGAGT GATGAGT TAAAGTT AACTCTT AACTCTT ACTTTG -TCTCCT- AACTCTTC

Cyano genotype B11 GAAGAAAGT CTGAGT AGTGAGT; GGTGAGT AAACCAA AACTCTT AACTCCT; AACTCTT AACCAATC

Cyano genotype B12 CAAA; AATG TCCGAGT CATGAGT GTTGAGT GCTCAA AAATTTAA AACTCAT AACTCCT AACTCCT AACTCATT AACTGTGC

Peltigera-type Class II repeat motif

Nostoc genotype C1	CAAAAATT TTAGATT TG T GATT TTAGATT TGCGATT AGTCTTC AATCCAA -----	-----	AATCCAA AATTGCG
Nostoc genotype C2	CAAAAATT TTAGATT TGCGATT TTAGATT T A CGATT AGTCTTC AATCCAA AATTCAA	-----	----- AATTG A G
Nostoc genotype C3	CAG A AAATT TTAGATT TGCGATT TTAGATT T A CGATT AGTCTTC AATCCAA AATTCAA	AATCTAA	AATC A AA AATTG A G
Nostoc genotype C4	CAAAAATT TTAGATT TG T GATT TTAGATT T A CGATT AGTCTTC AATCCAA AAT C CAA	AATC T TAA	AATCCAA AATTGCG G TTCGACTGAGCA AAGCCGAAG T C
Nostoc genotype C5	CAAAAATT TTAGATT TGCGATT TTAGATT TGCGATT AGTCTT A -----	AATCCAA AATC T TAA	AATCCG G AATTG A G G TTCGACTGAGCGTTC CGCGCAGCG TCTC C T AGAGAAGCCGAAG T C
Nostoc genotype C6	CAAAAATT TTAGATT TG T GATT -----	-----	AGT G TTC AATCCAA AAT C CAA AATC T TAA AATCCAA AATTGCG G TTCGACTGAGCCAAGCT GAAG T C
Nostoc genotype C7	CAAAAATT TTATATT TGCGATT -----	-----	AGTCTT T AAACCAA AATTC T A AATC T TAA AATCCAA AATTG A G G TTCGACTGACCG AAGCCGAAG T C
Nostoc genotype C8	CAAAAATT TTAGATT TG T GATT -----	-----	AGT G TT T AATCCAA AATTCAA AATC T TAA AATCCAA AATTG A G G TTCGACTGAGCG AAGCCGAAG T C
Nostoc genotype C9	CAAAA - TT T G AGATT TGCGA TT T G AGATT TGCGATTAGTCTTC AATCCAA AAT C CAA	AATC T TAA	AATCCAA AATTGCG T AGCGTAGCGTTAGCGACGAAGGAGCGTC G TTCGACTGAGCCAAGCCGAAGTC
Nostoc genotype C10	CAAAA - TT T A AGATT TGCGA TT T G AGATT TGCGATTAGTCTTC AATCCAA AAT C CAA	AATC T TAA	AATCCAA AATTGCG T AGCGTAGCGTTAGCGACGAAGGAGCGTC G TTCGACTGAGCCAAGCT GAAG T C

Table S3. Summary of a previous survey (Aragón, unpublished results) of 588 plots along the Spanish Mediterranean region, that shows the 26 plots where *Pectenía plumbea* was present. The values of abundance of *Pectenía plumbea* and *Dendriscoaulon umhausense* are expressed in the percentage of surface occupied in the sample grids. Phorophyte is the tree species where the lichen inventory was carried out.

Phorophyte	Forest fragment code	Plot number	<i>P. plumbea</i> abundance	<i>D. umhausense</i> abundance
<i>Quercus pyrenaica</i>	AY-15	1	15	13
<i>Quercus pyrenaica</i>	MT-01	1	5	15
<i>Quercus pyrenaica</i>	MT-01	2	4	15
<i>Quercus pyrenaica</i>	MT-08	1	2	0
<i>Quercus pyrenaica</i>	SM-01	1	5	13
<i>Quercus pyrenaica</i>	SM-04	1	6	11
<i>Quercus pyrenaica</i>	SM-06	1	8	9
<i>Quercus pyrenaica</i>	SM-06	2	9	12
<i>Quercus pyrenaica</i>	SM-09	1	5	9
<i>Quercus pyrenaica</i>	SM-10	1	8	9
<i>Quercus pyrenaica</i>	SB-01	1	7	10
<i>Quercus pyrenaica</i>	SC-1	1	2	2
<i>Quercus pyrenaica</i>	SC-2	1	1	3
<i>Quercus faginea</i> subsp. <i>broteroi</i>	SM-11	1	2	7
<i>Quercus faginea</i> subsp. <i>broteroi</i>	SM-15	1	5	9
<i>Quercus faginea</i> subsp. <i>broteroi</i>	SM-19	1	7	13
<i>Quercus faginea</i> subsp. <i>broteroi</i>	MT-19	1	9	12
<i>Quercus faginea</i> subsp. <i>broteroi</i>	MT-21	1	7	14
<i>Quercus faginea</i> subsp. <i>broteroi</i>	MT-21	2	9	12

Chapter 4: Photobiont selectivity patterns in *Pectenia plumbea*

<i>Quercus ilex</i> subsp. <i>ballota</i>	59	1	6	8
<i>Quercus ilex</i> subsp. <i>ballota</i>	78	1	4	7
<i>Quercus ilex</i> subsp. <i>ballota</i>	82	1	3	7
<i>Quercus ilex</i> subsp. <i>ballota</i>	92	1	3	7
<i>Quercus ilex</i> subsp. <i>ballota</i>	94	1	10	10
<i>Quercus ilex</i> subsp. <i>ballota</i>	97	1	8	11
<i>Quercus ilex</i> subsp. <i>ballota</i>	102	1	7	9

DISCUSIÓN GENERAL

DISCUSIÓN GENERAL

Nuestros resultados demuestran la influencia de la pérdida y fragmentación del bosque mediterráneo en sus comunidades epífitas. El tamaño y forma de los fragmentos, y la calidad de la matriz circundante fueron factores clave que afectaron a la riqueza y diversidad de especies epífitas en este paisaje fragmentado. Además, un gran número de factores ambientales influyeron en las respuestas de las especies individualmente. Estudios anteriores han determinado la importancia de las características microclimáticas para las comunidades epífitas (Gignac & Dale 2005, Hylander & Hedderson 2007, Aragón et al. 2010, Oliveira et al. 2011), pero después de minimizar la variación en la estructura y manejo forestal, el proceso de fragmentación mostró de forma clara sus efectos en las comunidades epífitas.

Los fragmentos forestales más grandes tuvieron la mayor riqueza y diversidad de especies epífitas (líquenes y briófitos), lo que podría estar relacionado con la mayor disponibilidad y heterogeneidad de hábitat, así como la presencia de un "área central" con mayor superficie (Gignac & Dale 2005; Jonsson & Jonsell 1999, Löhmus et al 2007). Nuestros resultados son consistentes con los obtenidos en estudios previos (Kruys & Jonsson 1997, Moar & Jonsson 2003, Zartman 2003, Pharo et al 2004, Gignac & Dale 2005 Löbel et al. 2006 Alvarenga & Pôrto 2007 Alvarenga et al. 2009 Oliveira et al. 2011), pero nuestro estudio es el primero en ser realizado en condiciones climáticas mediterráneas. En un estudio previo de 306 fragmentos de encinar cubriendo un área mayor que en nuestro sitio de estudio, Aragón et al. (2010) detectaron una relación no significativa entre el tamaño de fragmento y las comunidades de epífitos, y sólo las variables relacionadas con la calidad y manejo del bosque tuvieron efectos significativos. Sin embargo, este estudio incluyó un alto nivel de heterogeneidad ambiental, y por lo tanto el efecto de la pérdida de bosque y la fragmentación probablemente quedó oculto.

Por otra parte, algunos estudios previos han demostrado que una mayor disponibilidad de hábitat está asociada con un mayor número de especies, simplemente por pura casualidad (Coleman et al. 1982, Carnicer et al. 2007, Honkanen et al. 2010, Alexander et al. 2011, Kraft et al. 2011). La probabilidad aleatoria implica que se encontrarán más elementos en un área mayor que en un área más pequeña, por lo que la aleatoriedad podría desempeñar un papel importante al considerar el tamaño del hábitat.

Una mayor riqueza de especies también está relacionada con la presencia de especies forestales especialistas en fragmentos más grandes, presumiblemente debido a sus altos requerimientos hídricos y elevada sensibilidad a la luz directa del sol (Söderström 1988; Sillett et al. 2000). Por lo tanto, la superficie del "área central" podría desempeñar un papel importante debido a los estilos de vida de estos organismos (poiquilohídricos y poiquilotermos). Dentro del área central, las condiciones ambientales son óptimas para el desarrollo de especies de sombra, que son altamente sensibles a la irradiación excesiva y también son altamente dependientes de la disponibilidad de agua (Lange et al. 1986, Gauslaa & Coxson 2011). En general, una reducción del área central en fragmentos pequeños se asocia con una pérdida de hábitat para especies que requieren condiciones interiores del bosque (Baldwin & Bradfield 2005; Crouzeilles et al. 2014). En el presente estudio, la abundancia de especies con mayores demandas de agua y una mayor sensibilidad a la radiación solar directa (por ejemplo, *Collema subflaccidum*, *Pectenium plumbeum*, *Fuscopannaria ignobilis*, *F. olivacea* y *Leucodon sciuroides*) fue mucho menor en fragmentos más pequeños, que carecen de esta área central. Por lo tanto, la pérdida de condiciones de humedad y sombra, que están ligadas a las pérdidas del "área central" del bosque, lleva a la desaparición de especialistas forestales, así como a un aumento en la similitud de taxones que pueden encontrarse en los diferentes ambientes dentro de cada fragmento.

La riqueza y similitud de especies no fueron afectadas significativamente por la forma del fragmento, pero la diversidad fue menor en fragmentos más irregulares. La forma del fragmento determina la relación perímetro/área, y por lo tanto puede interpretarse como la incidencia del efecto de borde (Didham & Ewers 2012). Estudios previos han demostrado la relación entre fragmentos más irregulares y diferentes grupos de organismos. Por ejemplo, fragmentos más irregulares están asociados con una menor riqueza de anfibios y reptiles (Cabrera-Guzmán & Reynoso 2012), así como cambios en la composición en la comunidad de las arañas productoras de telas (Baldissera et al. 2012), mientras que varios estudios han demostrado una asociación con el aumento de la riqueza de plantas de sotobosque (Honnay et al. 1999, De Sanctis et al. 2010, Lomba et al. 2011). Sin embargo, los fragmentos más grandes en nuestro paisaje tuvieron valores más altos de irregularidad y, aunque había un efecto de borde, los fragmentos grandes facilitaron la existencia del "área central". Por lo tanto, el efecto negativo de la irregularidad (borde del bosque) en las

comunidades epífitas podría ser mitigado por el tamaño del fragmento debido a la presencia de más sombra y un ambiente interior más húmedo.

El efecto negativo de la irregularidad del fragmento sobre la diversidad de especies parece actuar a través del efecto de borde según análisis previos en especies forestales (Yamaura et al. 2008). Este fue también el caso de algunos líquenes de interior de bosque en el presente estudio (por ejemplo, *Collema subnigrescens*, *Lepraria incana*, *Leptogium furfuraceum*, y *Pertusaria amara*), que se vieron afectados negativamente por el mayor efecto de borde en los fragmentos más irregulares. Por lo tanto, la sustitución de estas especies forestales típicas por especies generalistas, es esperable en fragmentos más irregulares. Pocos estudios han analizado la relación entre las comunidades de epífitos y la forma de los fragmentos forestales, pero de acuerdo con nuestros resultados, estudios previos del efecto de borde en las comunidades de epífitos mediterráneas han puesto de manifiesto una gran influencia de gradientes microclimáticos perpendiculares al borde que modifican la diversidad y la composición de la comunidad, pero no la riqueza (Belinchón et al. 2007, Brunialti et al. 2013). Por el contrario, a nivel de la parcela, la diversidad no fue afectada por la forma del fragmento, sino que fue determinada adicionalmente por dos factores contrastantes: la cubierta de matorral, que rompe el flujo del viento y proporciona condiciones sombreadas y húmedas (Aragón et al. 2010), y una mayor apertura del dosel, lo que permite que más radiación solar alcance los troncos y genere una mayor evaporación de agua (Machado & Reich 1999). En cuanto a la amplia heterogeneidad en los requerimientos de toda la comunidad, la creación de diferentes microhábitats por condiciones antagónicas dentro de los fragmentos, podría ser un factor clave para el aumento de la diversidad a nivel de parcela (Jonsson & Jonsell 1999; Gignac & Dale 2005).

La cantidad de matriz de alto contraste (HCM) que rodea los fragmentos claramente tuvo un efecto positivo en la riqueza total de especies y en la riqueza de líquenes y briófitos por separado. Igualmente, la diversidad y la similitud de la comunidad también fueron mayores. En contraste con nuestra expectativa y con la hipótesis de la "similitud estructural de la matriz" (Prevedello & Vieira 2010), la HCM parece tener algunos efectos beneficiosos sobre los parámetros de biodiversidad, pero sólo en ciertos casos, porque su interacción con el tamaño del fragmento tuvo efectos opuestos sobre la riqueza y diversidad de líquenes.

La calidad y la configuración espacial de la matriz pueden mejorar o mitigar los efectos de la pérdida y fragmentación de los bosques en una comunidad preexistente, tal como ya ha sido documentado (Murphy & Lovett-Doust 2004, Kupfer et al. 2006). La matriz puede influir en los organismos existentes en un fragmento forestal de tres maneras: disponibilidad de recursos, permitiendo o dificultando la dispersión de organismos, y modificando las condiciones microclimáticas del bosque (Driscoll et al. 2013). Una HCM no mejora la disponibilidad de recursos para las especies epífitas porque la mayoría no son capaces de vivir allí. Además, este tipo de matriz no mitiga la dureza de las condiciones de borde debido a su configuración estructural. Su estructura carece de árboles o incluso de vegetación leñosa en la mayoría de los casos, modificando así la temperatura, la humedad y las condiciones de luz en el núcleo forestal (Berges et al. 2013, Driscoll et al. 2013). Sin embargo, la HCM que comprende cultivos, pedreras o matorrales puede tener un efecto positivo en la dispersión, porque estas unidades del paisaje no presentan una barrera que impida la llegada de nuevos propágulos. Los estudios previos de Johansson & Ehrlén (2003) y Belinchón et al. (2009) mostraron que las plantaciones de pinos que rodean a los fragmentos forestales, actúan como filtros para algunas especies de líquenes, lo que dificulta el establecimiento de nuevos individuos. Finalmente, la interacción entre tamaño de fragmento y HCM puede ser interpretada como un efecto beneficioso de la matriz, el cual es más importante cuando el tamaño del fragmento es pequeño debido a que el área central es también mucho menor, y esto permite la llegada de nuevos propágulos aumentando la riqueza y diversidad de los fragmentos forestales más pequeños. Sin embargo, cuando los fragmentos del bosque son más grandes, el tamaño del área central parece desempeñar un papel más importante que los procesos de dispersión de los líquenes, ya que porcentajes mayores de HCM tienen el efecto opuesto al reducir el área central y afectar negativamente la riqueza y diversidad de las comunidades epífitas.

Este resultado contrasta en gran medida con los hallazgos previos sobre el efecto de la matriz sobre los patrones de biodiversidad (Prevedello & Vieira 2010). Este estudio demostró una aceptación general de la "hipótesis de la similitud estructural" para la mayoría de los grupos de organismos, lo que significa que cuanto más grande el contraste estructural entre la matriz y los fragmentos de hábitat, menor es la riqueza y la diversidad de las comunidades que habitan el fragmento. Pero hay que señalar que este hecho se ha verificado principalmente en animales, que son capaces de moverse por sí mismos por el paisaje y

elegir la matriz "menos desfavorable", mientras que los epífitos forestales dependen principalmente del viento y de las estructuras presentes a lo largo la matriz, que modula el flujo del viento, para llegar a nuevas localidades. En el caso de las plantas, una matriz de alto contraste tiene en general un efecto negativo sobre las especies forestales (Murphy & Lovett-Doust, 2004), pero el efecto de diferentes tipos de matriz y su calidad ha sido poco explorado (Jules & Shahani 2003; Vieira 2010). En los pocos casos que se comprobó (Mesquita et al. 1999, Nascimento et al. 2006), se confirmó la hipótesis de similitud estructural. Por todas estas razones, este efecto positivo de una mayor cantidad de HCM puede ser considerado como novedoso y puede cambiar el pensamiento sobre la matriz. Pone el proceso de dispersión como un factor clave para controlar la riqueza y diversidad de especies en los bosques mediterráneos fragmentados, viéndose modulado por la configuración de la matriz. Se necesitan más estudios para profundizar en el conocimiento del proceso, de dos maneras: en primer lugar, se puede probar la misma hipótesis en otras regiones o con otros grupos de organismos dispersados por el viento (por ejemplo, hongos o pteridófitos) y, en segundo lugar, futuros estudios deben tener en cuenta la dispersión a escala de paisaje, considerando variables como la conectividad de los fragmentos o la cantidad total de hábitat remanente alrededor de los fragmentos.

Por otra parte, la riqueza de briófitos aumentó en los fragmentos rodeados por una matriz de pinos (PM) y HCM. La influencia positiva de la PM podría estar relacionada con dos causas diferentes: en primer lugar, la PM podría permitir el establecimiento de propágulos en la misma, aumentando el tamaño efectivo del fragmento; en segundo lugar, la PM podría aumentar la complejidad del estructural bosque, proporcionando ventajas microclimáticas para las especies de briófitos. Se ha documentado que, al menos más de la mitad de las especies de briófitos registradas en este estudio, son capaces de crecer en la corteza de pino (Puche et al 2006). De manera similar, Pharo et al. (2004) y Pharo & Lindenmayer (2009) revelaron cómo una plantación de pinos exóticos que rodea fragmentos de bosque nativo que no era pinar, puede albergar un alto porcentaje de flora nativa de briófitos. Además, la HCM aumentó la riqueza de briófitos. Las condiciones ambientales contrastantes en el borde del fragmento comparadas con las del interior del bosque, probablemente aumentan la heterogeneidad del hábitat dentro de los fragmentos, lo que conduce a un aumento de las especies de briófitos que difieren en los requisitos ecológicos (Baldwin & Bradfield 2005; Gignac & Dale 2005).

En relación con la respuesta a nivel especie, se encontró que, a nivel de parcela, la presencia de especies está determinada principalmente por las variables a escala de fragmentos, y el tamaño de fragmento fue el factor más importante. Si bien la modulación de la abundancia de las especies se basó principalmente en las variables a escala de la parcela, las cuales están directamente relacionadas con las condiciones microclimáticas dentro de los fragmentos. Entonces, la estructura del paisaje parece actuar en primera instancia como un filtro para la identidad de las especies que habitan cada fragmento. La estructura del paisaje y el patrón de fragmentación ya han demostrado ser cruciales para la composición de una amplia gama de especies en diferentes ecosistemas (Wright et al. 1998, Echevarría et al. 2007), que enfatiza nuevamente las grandes consecuencias de la alteración del paisaje sobre la biodiversidad. Posteriormente, la abundancia aparece definida principalmente por el microclima, destacando la importancia de las condiciones climáticas a pequeña escala para los epífitos (Gignac & Dale 2005, Belinchón et al. 2007, Brunialti et al. 2013), incluso a pesar de que buscamos minimizar el rango de variación de las variables relacionadas con la estructura forestal (principalmente la apertura del dosel y el diámetro medio del árbol). Así, podemos concluir que las epífitos son capaces de detectar cambios muy pequeños en su entorno cercano, respondiendo rápidamente a la actividad antropogénica.

Los resultados del capítulo 2 sobre las comunidades de epífitos en relación con la estructura de un paisaje altamente fragmentado durante un período de 55 años, en un contexto de recuperación del hábitat, demuestran que la riqueza de especies se explica por el cambio en el tamaño de los fragmentos en los últimos 29 años, y la conectividad histórica con el paisaje circundante hace 55 años, además del tamaño del fragmento y la matriz circundante. Sin embargo, la forma del fragmento, la heterogeneidad del hábitat, la cantidad de hábitat histórica y actual y la fragmentación en el paisaje circundante no tuvieron ningún efecto sobre la riqueza de especies. Los resultados también muestran que los efectos a escala de fragmento tienen un impacto mucho mayor en la riqueza de especies, y se perciben más rápido (0-29 años) que la estructura del hábitat a escala del paisaje (55 años).

Los efectos a escala de fragmento se componen principalmente del tamaño del fragmento y su cambio de tamaño en los últimos 29 años (debido a que el efecto de la HCM, aunque consistente, es muy pequeño). Los efectos positivos del tamaño de los fragmentos

sobre la riqueza de especies se han demostrado en gran medida para diferentes grupos de organismos (Bender y col., 1998, Hanski 1999, Fahrig 2003, Ewers & Didham 2006, Munguía-Rosas & Montiel 2014). Un argumento principal para explicar este patrón basado en la dinámica metapoblacional es que los fragmentos más grandes sostienen poblaciones más grandes, que se verán menos afectadas por eventos estocásticos de extinción (Hanski 1999, Fahrig 2003, Ewers & Didham 2006). En el caso de los epífitos, también parece existir una relación positiva indirecta entre el tamaño del fragmento y la riqueza de especies a través de la heterogeneidad del hábitat (Gignac & Dale 2005). Esta relación también fue sugerida en un trabajo previo sobre el mismo sistema de estudio (Cardós et al. 2016), junto con la existencia de un 'área central' del bosque, con características muy diferentes al borde, que permitiría la aparición de un gran número especies típicas de bosque. En nuestro análisis no se obtuvo ningún efecto de la heterogeneidad del hábitat, por lo tanto, la incidencia del efecto del "área central" y la dinámica metapoblacional parecen operar en esta comunidad.

En el caso de la matriz que rodea los fragmentos, la HCM contribuyó a un aumento en el número de especies en los fragmentos más pequeños, mientras que el efecto se hizo negativo a medida que aumentaba el tamaño del fragmento. Descartamos cualquier efecto positivo de la HCM en relación con una mejora del microclima forestal (Murcia 1995, Prevedello & Vieira 2010). La influencia positiva se opone a la hipótesis de "similitud estructural" con gran aceptación (Prevedello & Vieira 2010), lo que significa que una transición más contrastante entre el fragmento de hábitat y la matriz reducirá el número de especies (Aragón et al., 2015). En el caso de los epífitos, ya se ha sugerido que este efecto positivo sobre fragmentos pequeños que carecen de un área central significativa, podría estar hipotéticamente basado en la no obstaculización de los procesos de dispersión (Johansson et al. 2014, Cardós et al., 2016). Curiosamente, hemos encontrado una influencia positiva de la conectividad con el paisaje circundante de hace 55 años, lo que demuestra necesariamente la importancia de la dispersión en la configuración de esta metacomunidad. Sin embargo, la estructura de la matriz fue registrada en la actualidad, por lo que no podemos atribuirle una relación directa con la dispersión. Puede ser que la estructura actual de la matriz sea un reflejo su estado pasado, pero es improbable, ya que la dinámica de la matriz es presumiblemente mucho más rápida que la del bosque (Eriksson 1996). La explicación más plausible con los datos disponibles es que la HCM interactúa con el paisaje circundante a una escala diferente a la considerada aquí, ya que, por ejemplo, los

eventos de dispersión a larga distancia son altamente responsables de la configuración de las comunidades de epífitos (Lönnell et al. 2014, Gjerde et al. 2015, Barbé et al. 2016).

El cambio en el tamaño de los fragmentos de bosque en los últimos 29 años tuvo un fuerte efecto sobre la riqueza de especies. Nuestro análisis mostró que los incrementos más grandes devuelven un número significativamente menor de especies. Este resultado contraintuitivo no significa obviamente que la regeneración del área forestal conlleve una disminución de la riqueza, sino que se relaciona con un retraso en la recolonización. En primer lugar, para considerar esta posibilidad debemos comprobar que los fragmentos no están saturados (Pärtel et al. 1996), es decir, que el número de especies en los fragmentos forestales está muy por debajo del nivel regional de la especie. A lo largo de los muestreos se registraron 117 especies de epífitos, mientras que el fragmento más rico contenía 73 especies (Cardós et al. 2016), por lo que todavía hay un gran número de especies que podrían colonizar los fragmentos. Además, esta fuerte relación se ve reforzada por los fragmentos más pequeños, que tienen los valores de riqueza más bajos, pero a su vez tienen la posibilidad de experimentar un mayor crecimiento proporcional. Por lo tanto, el efecto de esta variable está relacionado con la falta de especies en los fragmentos que crecieron en tamaño, y por lo tanto hay un retraso (~ 29 años) entre la recuperación del hábitat y el aumento proporcional del número de especies, que podría funcionar como una deuda de extinción inversa (Tilman et al. 1994). Para una mejor comprensión se podría pensar que si la respuesta hubiera sido neutra o positiva, podríamos afirmar que la comunidad mostró una respuesta rápida a la dinámica del bosque porque el cambio en el tamaño del fragmento es imperceptible, o incluso es seguido por una rápida recolonización.

La riqueza de la comunidad epífita es modulada por la estructura del paisaje a través de la conectividad del fragmento forestal con el paisaje circundante hace más de medio siglo, pero ni la cantidad total de hábitat (composición del paisaje) ni el grado de fragmentación del hábitat circundante, a lo largo de todo el período histórico analizado tuvo algún efecto.

Estos resultados demuestran que la composición paisajística por sí sola no es suficiente para comprender los patrones de riqueza en hábitats fragmentados, sino que su configuración también tiene un papel muy importante. La "hipótesis de la cantidad de hábitat" (Fahrig 2013) propone que el efecto de la cantidad total de hábitat alrededor de un

punto de muestreo es tan fuerte que anularía el grado de subdivisión o la distancia entre fragmentos. Sin embargo, estudios recientes rechazan la hipótesis y muestran que la configuración del paisaje es importante (Evju & Sverdrup-Thygeson 2016, Haddad et al. 2016). El funcionamiento de las comunidades animales parece ser diferente, debido principalmente a su capacidad de movimiento, y la cantidad total de hábitat, independientemente de su configuración, ejerce una influencia positiva porque los animales muestran menos restricciones dispersivas a escala del paisaje en que se realizan estos estudios (Radford & Bennet 2007, Ryberg & Fitzgerald 2016). Por esta razón, la hipótesis debe ser diferente para los organismos sésiles, y la configuración espacial del paisaje debe ser incluida en los modelos. La configuración del paisaje produce, por ejemplo, una mayor proporción de hábitats de borde en bosques más subdivididos. Del mismo modo, el patrón espacial de fragmentos determina las distancias de dispersión que un propágulo tiene que superar para colonizar nuevos hábitats. En el caso de los epífitos, así como de otros organismos sésiles como las plantas, se ha demostrado que la configuración del paisaje es muy importante por razones de calidad del hábitat (Aragón et al. 2015, Cardós et al. 2016) o limitaciones a la dispersión (Snäll et al. 2003, Öckinger et al. 2005).

Para probar el efecto de la calidad del hábitat (es decir, la proporción de área de borde/ área central) a través del grado de subdivisión del hábitat circundante, ponderamos la cantidad total de hábitat por el número de fragmentos. Con esta variable no estamos en realidad testando los efectos de la fragmentación *per se* (Fahrig 2003), sino que en realidad es una medida de los efectos aditivos de la fragmentación de hábitat sobre la pérdida de hábitat, ya que no podemos modificar el sistema estudiado para fijar la cantidad de hábitat en distintas réplicas con ese propósito. Este paisaje se encuentra en un estado de gran pérdida de hábitat, ya que la superficie del bosque está siempre por debajo del 20% durante todo el período de 55 años considerado (la mayor parte de la superficie dentro de los buffer podría ser potencialmente ocupada por bosques nativos). Se ha sugerido (Andrén 1994, Fahrig 1998, 2001, With 2016) que por debajo del umbral del 20-30% de hábitat remanente, los efectos de la fragmentación aparecen más intensamente, sin embargo no encontramos este efecto. En situaciones de baja disponibilidad de hábitat, el número de especies cercanas al umbral de extinción aumenta debido a que los tamaños de población son menores (Bascompte & Rodriguez 2001, Fahrig 2001). Es posible que el fuerte efecto del tamaño de fragmento encontrado aquí pueda ser causado por este fenómeno, pero definitivamente no

podemos corroborar esta interacción a escala de paisaje. De cualquier manera, más subdivisión del hábitat implica la degradación de más hábitat en el borde del fragmento y se ha demostrado que las condiciones del borde ejercen un fuerte efecto en las comunidades de epífitos (Belinchón et al. 2007, Brunialti et al. Aragón et al. 2015, Cardós et al. 2016). Sin embargo, estos estudios no documentan una disminución de la riqueza, sino cambios en la composición de la comunidad, así como la diversidad (equitatividad).

La riqueza de epífitos sólo se vio afectada a escala del paisaje por la conectividad del hábitat en 1956, lo que demuestra un retraso en la respuesta de la comunidad a los cambios en la estructura de un paisaje dinámico. La conectividad está compuesta por dos elementos del paisaje (Hanski 1999, Hanski 2015): el tamaño de los fragmentos de hábitat (composición) y la distancia al fragmento focal (configuración). Cuando los fragmentos más grandes, que se ha demostrado que contienen un mayor número de especies, están más cerca, las restricciones a la dispersión se reducen y el fragmento focal experimenta un aumento significativo en el número de especies. Este enfoque para entender el efecto de la estructura del paisaje sobre los patrones de riqueza, derivados de la dinámica de la metacomunidad, ha recibido gran apoyo (Moilanen & Hanski 1998, Lindberg & Eriksson 2004, Löbel et al. 2006, Virtanen & Oksanen 2007, Löbel et al. 2009, Johansson et al. 2013, Ruete et al. 2014). El funcionamiento del sistema de metacomunidades (siguiendo el IFM, Hanski 1994) es simple: unidades de hábitat más grandes sostienen más especies con poblaciones más numerosas, lo que reduce la probabilidad de eventos de extinción, y a su vez distancias más cortas promueven la llegada de más propágulos de más especies aumentando el efecto rescate. El efecto del aislamiento a escala del paisaje es importante para las plantas (Munguía-Rosas & Montiel 2014), así como para los organismos epífitos (Snäll et al. 2003, Ruete et al. 2014) y los animales (Moilanen & Hanski 1998, Bailey et al. 2010), aunque no todas las metacomunidades animales son moldeadas por estos parámetros (Bailey et al. 2010, Ryberg & Fitzgerald 2016). La razón principal podría ser que no todos los organismos perciben los límites discretos de los fragmentos de hábitat como si lo hacen los especialistas sésiles, pero también es razonable que las metacomunidades se expliquen mejor por las conectividades pretéritas que las presentes, debido a un retraso en la respuesta, como si hemos encontrado en este trabajo, y en otros estudios (Lindborg & Eriksson 2004, Ellis & Coppins 2007, Johansson et al. 2013). Algunas características de los organismos epífitos como tener largos ciclos de vida y presentar restricciones a la dispersión, pueden

ser la causa de la respuesta tardía a las modificaciones del paisaje si se comparan con, por ejemplo, las plantas de vida corta, que no muestran este patrón (Adriaens et al. 2006). En vista de nuestros resultados, es posible que los patrones de riqueza futuros reflejen la conectividad actual, lo que significa que podrían requerirse largos períodos de espera (por ejemplo, varias décadas) para observar los beneficios de la restauración forestal o para asumir las consecuencias de la pérdida del hábitat.

En relación con los efectos del aislamiento sobre las especies epífitas, se ha encontrado el kernel de dispersión esperado para este tipo de organismos dispersados por propágulos. El valor de α obtenido para el paisaje actual ($\alpha = 0.113$ en 2011) es comparable a los valores encontrados para la dispersión de esporas de musgos ($-0.87 < \alpha < 0.12$, Snäll et al. 2003), el líquen *Lobaria pulmonaria* ($\alpha = 0.01$, Gu et al. 2001) o musgos dispersados por ramificaciones estoloníferas ($= 0.60$, Löbel et al. 2009). La comunidad de epífitos estudiada por nosotros está compuesta por especies que se dispersan principalmente por isidios ($N = 18$), soredios ($N = 33$) y esporas ($N = 66$), en orden decreciente de tamaño del propágulo. Esta variedad de modos de dispersión nos impide extraer conclusiones fiables más allá de que la comunidad se está dispersando a distancias acordes con los datos disponibles. Por lo tanto, dada el tamaño del pool de especies presentes en la región, existe un interesante potencial de intercambio de especies entre fragmentos de hábitat al incrementar la conectividad paisajística. Los valores actuales e históricos de α también dan la medida de la importancia del hábitat circundante en relación con la distancia, para explicar la riqueza dentro de los fragmentos focales. Así, valores más grandes indican que el poder explicativo de los fragmentos cercanos disminuye muy rápido, incluso a distancias cortas. Esto implica que en el paisaje de 1956 el intercambio de especies entre los fragmentos fue el más bajo, por lo que hubo un mayor nivel de heterogeneidad de las especies a escalas menores y por ello pequeños cambios en la conectividad produjeron respuestas significativas en la riqueza de especies. Debido a la lenta respuesta de la riqueza de la comunidad de epífitos, que está estructurada por la conectividad histórica, además del subsiguiente aumento de la conectividad de la superficie forestal en los años siguientes, es de esperar que las superficies forestales recién aparecidas aumenten la densidad de especies epífitas en las próximas décadas. Esto significa que los 40 fragmentos estudiados pueden potencialmente albergar un mayor número de especies que las registradas en 2011, manteniendo incluso su área constante.

Nuestros resultados indican que la escasa presencia y abundancia de *P. plumbea* en el centro de la Península Ibérica depende de factores humanos relacionados principalmente con la pérdida de hábitat, así como una combinación específica de condiciones ambientales que favorecen el crecimiento de *P. plumbea*. Esta especie es un cianoliquen con una distribución mundial oceánica, pero puede vivir en medio de la región mediterráneo española, que es un área dominada por una fuerte sequía estival y muy distante de las condiciones oceánicas caracterizadas por un estrecho rango de temperatura anual y humedad constante durante todo el año. Por lo tanto, en nuestra área de estudio, *P. plumbea* necesita crecer en lugares con temperaturas más cálidas y una mayor precipitación anual. En la cordillera de los Montes de Toledo, esta combinación de características se encuentra en las zonas más altas de media pendiente de los valles más profundos, donde los bosques crecen en terreno pedregoso. Las pendientes pedregosas son principalmente un buen aislante térmico y también reducen la pérdida de agua por evaporación directa del suelo, porque las discontinuidades entre las piedras sueltas actúan como cámaras de aire para evitar que el agua subterránea salga por capilaridad (Sánchez, 1991). Por otra parte, durante los meses de invierno y los más frío del otoño, la temperatura media en los fondos de los valles es a menudo más baja que en las laderas, y a veces incluso más que en las cumbres de las montañas, porque el aire frío se acumula en los fondos del valle durante la noche (típico fenómeno de inversión térmica) (Anquetin et al., 1998, Leukauf et al., 2015).

Además, debido a la larga historia de uso de la tierra en esta zona, los bosques mejor conservados están situados en las laderas más escarpadas de las montañas debido a que estas áreas siempre han sido consideradas tierras improductivas (Galante & Marcos-García, 2013). Estos bosques se encuentran en las zonas más escarpadas de las montañas y no han sido sometidos a ningún tipo de explotación durante cientos de años. Por lo tanto, *P. plumbea* es más abundante en zonas con pendientes pronunciadas y las zonas altas de los valles profundos, en los que se produce una mayor continuidad de bosque en una escala espacio-temporal. *P. plumbea* requiere condiciones de poca luz y agua líquida para la fotosíntesis (Lange et al., 1988; Gauslaa & Solhaug, 1998) (Martínez et al., 2014), condiciones que se encuentran en los bosques bien conservados en de la región mediterránea. Por lo tanto, los efectos positivos de la pendiente y la altitud en la presencia y abundancia de *P. plumbea* demuestran la importancia de la estabilidad del bosque. Esto indica que la inaccesibilidad de las masas forestales y la continuidad ambiental, en

condiciones climáticas estresantes en la región mediterránea, puede proporcionar la calidad ambiental requerida para la colonización de *P. plumbea*.

También se demuestra que *P. plumbea* no presenta limitaciones a la dispersión, ya que ha podido colonizar la mayoría (87,3%) de los bosques de buena calidad predichos por el SDM en la gran superficie estudiada. Las predicciones de abundancia fueron similares a las predicciones de presencia, pero la coincidencia entre los valores de abundancia predichos y reales fue más débil (67% de correspondencia). La abundancia suele ser más difícil de predecir (Howard et al., 2014) porque incluye más varianza que la presencia sola (0 o 1), y su valor final es generalmente afectado por más factores. Las variables relacionadas con la fragmentación del hábitat (número de fragmentos o diferentes tipos de matriz) no afectó a la presencia ni la abundancia de *P. plumbea*, excepto el borde del bosque que tuvo un efecto positivo. Esto puede estar relacionado con la alta capacidad de *P. plumbea* para dispersarse entre los fragmentos de bosque y pasar a través de diferentes matrices, lo que se asocia con su alta capacidad de reproducirse por medio de esporas sexuales. Las ascosporas son mucho más pequeños que los isidios asexuales, y por lo tanto pueden viajar mucho más lejos con las corrientes de aire (Norros et al., 2014; Ruete et al., 2014). La producción de una gran cantidad de esporas también está relacionada con la colonización eficaz de sustratos adecuados ubicados a largas distancias a través del paisaje (Lönnell et al., 2014). Esto también puede aplicarse a *P. plumbea*, que puede producir apotecios desde tamaños relativamente pequeños del talo (Martínez et al., 2014). Es evidente que el proceso de colonización es más fácil cuando la conectividad es más alta (Snäll et al., 2005) y el período de exposición de los bosques a la colonización es más largo (Gjerde et al., 2015). Sin embargo, con condiciones de baja disponibilidad de hábitat en el espacio y el tiempo, rasgos particulares de las especies pueden permitirles superar estos problemas, por lo que su presencia puede depender casi exclusivamente de la cantidad y calidad de los bosques.

Por lo tanto, basados en el patrón de ocupación del hábitat de *P. plumbea*, hemos dilucidado la presencia de limitaciones durante su establecimiento y hemos confirmado que principalmente se deben a la falta de calidad ambiental en los bosques no colonizados. Asumimos que los propágulos se dispersan por todo el paisaje y que cuentan con suficiente capacidad de germinación para colonizar todos los bosques de media y alta

calidad. Previamente, se demostró que *P. plumbea* exhibe baja selectividad por el fotobionte (Otálora et al., 2013), lo que debería facilitar el establecimiento de las esporas dispersas. Sin embargo, la baja presencia detectada en la región de estudio sólo puede ser debido a problemas durante el establecimiento, tal como se encuentra para otras especies de líquenes que no están limitadas por la dispersión (Lattman et al., 2009; Gjerde et al., 2015). Teniendo en cuenta los restringidos requisitos medioambientales que hemos identificado para *P. plumbea* en este estudio, pequeños cambios en las condiciones ambientales podrían obstaculizar las fases más críticas durante el establecimiento, que pueden ser la germinación de esporas o la búsqueda de fotobiontes compatibles, lo que requiere un mayor estudio.

El análisis de la fragmentación *per se* (*sensu* Fahrig, 2003), es decir, los efectos exclusivos de la fragmentación del hábitat, tras de controlar los efectos causados por pura pérdida de hábitat, por lo general no tuvieron ninguna influencia sobre la presencia y abundancia de *P. plumbea*. En la práctica, es difícil dilucidar los efectos de ambos procesos por separado (ver Didham et al., 2012 para ejemplos y posibles soluciones). Se incluyó la superficie forestal en los modelos como una medida inversa de la pérdida de hábitat para el control de este efecto y se incluyeron variables relacionadas con el efecto de borde, la subdivisión del hábitat, y la calidad de la matriz, con el fin de determinar la respuesta real de *P. plumbea* al proceso de fragmentación. La subdivisión del hábitat (medida como la densidad fragmentos) y la calidad de la matriz, no tuvieron ningún efecto sobre la situación de *P. plumbea* en todo el paisaje. Por lo tanto, nuestros resultados están de acuerdo con la “hipótesis de la cantidad de hábitat” (Fahrig, 2013), que hace hincapié en la importancia de la cantidad total de hábitat en lugar de su configuración espacial en el paisaje. También se determinó un efecto positivo de la cantidad de borde de bosque sobre la presencia y la abundancia de *P. plumbea*, pero una interacción negativa entre el borde y la superficie forestal. Por lo tanto, en una situación con una cantidad excesivamente baja de hábitat, el borde proporciona una ventaja, y sugerimos que puede consistir en facilitar la llegada de propágulos desde/hasta el bosque. Un paisaje más abierto posiblemente facilita los eventos de dispersión a larga distancia para las especies típicas de bosque (Nathan et al., 2008), además de presentar una mayor superficie de aterrizaje que aumentar la probabilidad de capturar un propágulo dispersado (Lomolino, 1990). Sin embargo, cuando aumenta la cantidad de hábitat, cualquier efecto positivo del borde se diluye entre los mayores

beneficios proporcionados por un área forestal mayor, como se demuestra en las comunidades de epífitos mediterráneos (Cardós et al., 2016).

El estudio de la dispersión mediante el seguimiento de las esporas de forma individual es en la actualidad logísticamente difícil. Sin embargo, la producción de modelos de distribución y evaluar su idoneidad mediante un conjunto de datos independiente, es un método fiable para examinar las limitaciones a la dispersión de cualquier especie. Los modelos de distribución de especies (SDM) son útiles si son robustos (Guisan & Thuiller, 2005), lo que significa que deben explicar una alta proporción de la varianza encontrada, cuando se considera la ocupación del hábitat de una especie. En nuestro estudio, con excepción de la abundancia de individuos asexuales ($R^2 = 0.18$), todos los modelos explicaron un alto porcentaje de la varianza ($0.41 < R^2 < 0.75$), lo que nos permitió extraer conclusiones fiables a partir del sistema estudiado. El paso más crítico en nuestro método, consistió en seleccionar un punto de corte que difería del valor estándar de 0.5, con el fin de evaluar si una predicción debe ser aceptada como presencia o ausencia. Jiménez-Valverde & Lobo (2007) recomiendan no establecer un umbral que pueda carecer de significado biológico, por lo que proponen elegir un punto de corte que maximice el éxito (0.44). Por lo tanto, este fue el valor más significativo para esta especie, el modelo y el territorio, y debe ser considerado de nuevo a la hora de predecir la presencia de esta especie en nuevas regiones cercanas a la zona de estudio, cuando se realizan estudios futuros de conservación de *P. plumbea*.

Los tres estados reproductivos de *P. plumbea* se vieron afectados de manera diferente por los factores ambientales, lo que puede constituir una ventaja a la hora de explotar diferentes nichos y de la colonización exitosa de un hábitat escaso. La abundancia de los estados asexual y sexual se vio favorecida por una mayor cantidad de bosque, debido a que las condiciones óptimas para la reproducción de *P. plumbea* se encuentran dentro de los bosques (Martínez et al., 2014), y obviamente, el número de individuos reproductivos aumentará cuanto más hábitat esté disponible. Además, los individuos sexuales fueron más frecuentes con un clima favorable y pendiente más pronunciada, ya que ambos factores están conectados a los requerimientos de estabilidad ambiental. Los apotecios sexuales necesitan tiempos mayores para aparecer por primera vez en individuos juveniles que los isidios asexuales (Löbel et al, 2009; Martínez et al., 2014), lo que podría explicar la

demanda de continuidad. Este no es el caso de los individuos asexuales, por lo que no se vieron afectados por el clima o la pendiente, y sólo se vieron afectados positivamente por el borde del bosque. Es posible que la producción de isidios se vea favorecida al crecer cerca del borde del bosque. Los propágulos asexuales son grandes y por lo tanto se dispersan peor, pero tienen la ventaja de transportar al fotobionte en su interior y poseer una mayor cantidad de recursos, lo que les permite establecerse con mucha más facilidad en condiciones adversas (Löbel & Rydin, 2010). Matos et al. (2015) encontraron que las especies epífitas con isidios eran más frecuentes en la parte más árida de un gradiente climático en la Península Ibérica. Por otra parte, Martínez et al. (2012) detectaron una mayor frecuencia y abundancia de isidios en individuos de *Lobaria pulmonaria* ubicados en las partes del tronco cercanas a la copa, donde la radiación y la temperatura son mayores pero la humedad es inferior. El borde del bosque satisface mejor estos requisitos, así que esto puede explicar por qué el entorno más adverso de borde de bosque favoreció la presencia de individuos asexuales de *P. plumbea*. La abundancia de individuos juveniles solamente se ve afectado por factores abióticos, en lugar del área de bosque o el borde. En líquenes epífitos, la etapa juvenil es la más susceptible a las condiciones ambientales, incluso a cambios muy pequeños (Ott, 1987), por lo que se supone que incluso la cubierta forestal no puede mitigar unas condiciones climáticas desfavorables. Por otra parte, contraintuitivamente, los juveniles fueron más numerosos en parcelas orientadas al sur, y de este modo el desarrollo de los estados maduros posteriores puede verse dificultado en las parcelas más secas y soleadas orientadas al sur, porque la tasa de crecimiento se ve disminuida.

Con todas las pruebas recogidas en el capítulo 4 en relación con las fases clave del ciclo de vida de los líquenes, hemos obtenido ideas reveladoras para entender por qué y cómo de restrictivos pueden ser los pasos para que una espora de cianoliquen pueda establecerse como un nuevo talo, una vez que finaliza el proceso dispersivo.

Después de la dispersión, la espora primero debe germinar para restablecer la simbiosis con un compañero fotosintético. No hemos encontrado ni un evento de germinación en las esporas estudiadas en cualquiera de las 32 condiciones de cultivo ensayados. En primer lugar, las esporas fueron descargadas adecuadamente, en una cantidad normal (Crittenden et al., 1995). Para llevar a cabo los experimentos de germinación se seleccionaron las poblaciones más abundantes (Martínez et al., 2014) y genéticamente

diversas (Otálora et al., 2013) de todas las conocidas en la región del Mediterráneo, con el fin de descartar posibles problemas de endogamia que pudiesen interferir con la germinación, pero las esporas han sido totalmente incapaces de germinar. En general, los intentos de germinar esporas de cianolíquen han sido más bien improductivos (Crittenden et al., 1995; McDonald et al., 2013). A veces aparece el tubo germinal, pero en estos casos el crecimiento no se mantiene (Crittenden et al., 1995; Sangvichien et al., 2011). En *Peltigera* spp. la germinación se dispara cuando el fotobionte es añadido a las esporas (Scott, 1964), e incluso en algunos casos la simbiosis se ha restablecido con éxito con esta técnica (Ahmadjian, 1989; Stocker-Wörgötter & Türk, 1991). Por el contrario, como hemos demostrado aquí, la falta de reproducción y el lento crecimiento de la fotobionte de los cianolíquenes del gremio *Nephroma*, como *P. plumbea*, hacen difícil de lograr su germinación en condiciones de laboratorio. En nuestro caso, es imposible suponer que todas las esporas de *P. plumbea* son inviables, lo que sugiere que *P. plumbea* requiere la presencia de fotobiontes compatibles en cantidad suficiente en su hábitat, para ser encontrados por las esporas y comenzar el proceso de germinación.

El fotobionte de *P. plumbea* (*Nostoc*) se trató aislar y hacer crecer por dos razones: para ser añadido a las esporas y observar su capacidad de germinación, y conocer la propia capacidad del fotobionte de propagarse en vida libre, lo que debe estar directamente relacionado con su disponibilidad en la comunidad. Los aislamientos mostraron una tasa de crecimiento relativo (RAGR) positiva y fueron capaces de sobrevivir tras el largo periodo cultivo, sin embargo ninguno de ellos produjo ningún signo de reproducción. Los aislamientos de *Peltigera* utilizados como control también fueron capaces de sobrevivir, pero por el contrario si produjeron hormogonios. No existen estudios similares para comparar la RAGR registrada, pero es significativamente mucho menor que la esperada para un *Nostoc* simbiote, si tomamos el *Nostoc* aislado de *Peltigera* como referencia. La causa de un crecimiento tan lento y la falta de reproducción para fundar nuevas colonias, parece ser un proceso de erosión del genoma que impide que algunas cianobacterias simbióticas tengan una "vida normal" (Ran et al., 2010). Este fenómeno ha llevado a lo largo de la evolución de la simbiosis, a generar linajes de *Nostoc* que han perdido el crecimiento autónomo y otras capacidades para un modo de vida aposimbiótico. Esto se relaciona con los grandes cambios fenotípicos que las células *Nostoc* experimenta en simbiosis, respecto a sus parientes de vida libre (Honegger, 1991; Rikkinen, 2002; Sarma, 2013). Si no son

capaces de completar un ciclo de vida entero, necesariamente esto impide que los linajes simbióticos de *Nostoc* puedan propagarse fuera de la simbiosis. En consecuencia, no pueden constituir una fuente cuantitativamente significativa de fotobiontes para el establecimiento de las esporas *P. plumbea*, ni de otras especies de líquenes que también albergan *Nostoc* del gremio *Nephroma*.

Sin embargo, una cantidad adecuada de fotobiontes compatibles, que permitirían la creación de nuevos talos, debe estar ubicada en algún lugar la comunidad. Este es el primer estudio que revela a nivel genético la composición de una comunidad de cianobacterias de vida libre, con el fin de ser comparada con el *Nostoc* en simbiosis con líquenes, para obtener conclusiones sobre la hipótesis sobre la facilitación en líquenes. Entre la gran cantidad de colonias de vida libre, no esperábamos encontrar linajes simbióticos, así nuestro esfuerzo de muestreo se centró en la recopilación de todas las colonias aparentemente del gremio *Nephroma* para su identificación genética. Finalmente, incluso con este método altamente selectivo, sólo tres de los cientos de colonias que aparecieron en las placas de cultivo, eran cepas simbióticas (es decir, encontradas también dentro de un líquen). En base a la dependencia del establecimiento del líquen en la densidad de propágulos dispersados (Dettki et al., 2000), y de manera similar a los resultados en relación con el crecimiento del fotobionte, esta pequeña representación de colonias de *Nostoc* disponibles para ser encontradas por una espora, no puede producir el establecimiento de un gran número de nuevos talos, y presumiblemente podría no ser suficiente para la persistencia a largo plazo de la población del líquen. Estas tres colonias podrían provenir de algunas células de *Nostoc* escapadas de cualquier herida del talo de un cianolíquen, pero para ello se requiere una fase con movilidad autónoma (hormogonios) (Boissière et al., 1987), que está ausente en *Nostoc* del gremio *Nephroma*. El origen más probable podría estar en la degradación del micobionte de un propágulo asexual dispersado (en nuestra comunidad *F. mediterranea* o *D. umhausense*) o un fragmento pequeño de talo (*P. plumbea* o *N. laevigatum*, junto con los otros dos) de otros cianolíquenes (Rikkinen et al., 2002; Nelsen & Gargas, 2008; Wornik & Grube, 2010). Una vez que este tipo de colonias se establece aposimbióticamente, podría permanecer como epífita por largos períodos, gracias a la envoltura gelatinosa que rodea a las colonias, que le confieren una gran tolerancia a la desecación y minimizan el daño producido por la radiación UV (Potts, 1996). Las otras 54 colonias encontradas en vida libre, correspondieron a un *Nostoc* del gremio *Nephroma* que

no se encontró como simbiote en esta comunidad, 25 *Nostoc* del gremio *Collema*, y 29 colonias del gremio *Peltigera* (9 *Nostoc* y 20 de otros géneros de cianobacterias), que se pueden resumir en 22 genotipos diferentes. Estos resultados evidencian que la corteza de los árboles alberga una gran diversidad oculta de cianobacterias, y por lo tanto los estudios sobre diversidad de fotobiontes de líquenes (Hedenäs et al., 2007), y la facilitación entre líquenes (Svensson et al., 2016), debe identificar las colonias a nivel genético para cuantificar la disponibilidad real de linajes compatibles, para evitar llegar a conclusiones confusas.

La fuente más plausible de fotobiontes compatibles debe estar finalmente dentro de la comunidad de cianolíquenes, una vez que se revelaron las grandes diferencias en la composición genética entre los *Nostoc* simbióticos y de vida libre. En primer lugar, los cianolíquenes son demasiado selectivo con el fotobionte a escala comunitaria, porque a pesar de toda la diversidad registrada (18 genotipos diferentes de *Nostoc*), sólo 4 genotipos diferentes se encontraron dentro de todas las cuatro especies de cianolíquen. La agrupación de los genotipos en función de la repetición de motivos de la región P6b del trnL, permitió apreciar diferente patrón de selectividad dentro de cada gremio. La comunidad líquénica está compuesta por cuatro especies del gremio *Nephroma*, quienes básicamente explotan lo que está disponible, excluyendo el genotipo A4 que no pudo ser ubicado como simbiótico. El caso de *C. furfuraceum*, y por lo tanto del gremio de *Collema*, es diferente, ya que utiliza sólo un genotipo de *Nostoc* a pesar de la enorme diversidad que prospera en su entorno, por lo que se puede considerar como muy altamente selectivo (Beck et al., 2002). Estos resultados subrayan la importancia de tener en cuenta los gremios mediada fotobionte cuando se habla de patrones de asociación micobionte-cianobionte, y supone una prueba de la alta selectividad que existe en simbiosis líquénica a escala de comunidad (Myllys et al., 2007; Fedrowitz et al., 2011).

En cuanto a la selectividad de especies individualmente, encontramos diferentes patrones en función del modo de reproducción. Las especies que se reproducen sexualmente (*N. laevigatum* y *P. plumbea*) son promiscuos en su elección cianobionte, y ambos pueden utilizar los mismos tres genotipos de *Nostoc*. Las otras tres especies asexuales (*F. Mediterranea*, *C. furfuraceum* y *D. umhausense*), no mostraron evidencia de intercambio de fotobiontes o transmisión horizontal, ya que cada uno de ellos albergaba su propio

fotobionte. Una menor selectividad en especies sexuales podría constituir un rasgo de adaptación para permitir el establecimiento (Wirtz et al., 2003; Fedrowitz et al., 2011), ya que necesitan reencontrar el fotobionte en cada generación. Aunque podría simplemente ser una consecuencia de una recombinación aleatoria obligada. Las especies sexuales mostraron una clara preferencia por un genotipo (A2, el 87% y el 71% de los casos, respectivamente), lo que demuestra que uno de entre todas las posibles combinaciones está confiriendo al consorcio simbiótico el mejor rendimiento en este hábitat (Werth & Sork, 2014). Es posible que las combinaciones simbióticas con los genotipos de *Nostoc* menos frecuentes (A1 o A3), incluso podrían constituir una solución temporal, hasta que la cepa más adecuada pueda ser adquirido (Ott, 1987; Beck et al., 1998). Curiosamente, el genotipo A2 solamente se dispersa y es puesto a disposición por *D. umhausense*, que es una especie mucho menos abundante regionalmente (véase el Apéndice 1 en Cardós et al., 2016), y localmente (observación personal), que *F. mediterranea*, que dispersa de forma exclusiva el genotipo A1. Presumiblemente, el número de propágulos dispersados con el genotipo A1 es mayor que A2, sin embargo, las especies sexuales buscar activamente asociarse con A2 a pesar de su menor disponibilidad. Esto demuestra que el papel de *D. umhausense* parece ser crucial para el establecimiento de las especies sexuales y por lo tanto para la configuración de la comunidad de cianolíquenes. La influencia de *D. umhausense* sobre *N. laevigatum* debe ser menor, porque este es capaz de robar cianobiontes de propágulos de *F. mediterranea* con mayor facilidad que *P. plumbea* (con sólo un talo con genotipo A3), que promovería el establecimiento de un mayor número de talos. La mayor dependencia de *P. plumbea* (una especie vulnerable) sobre los propágulos de una sola especie, que a su vez es una especie regionalmente rara, podría estar detrás de su estado de amenaza. Por lo tanto, *P. plumbea* podría depender exclusivamente de la presencia de *D. umhausense* a escala regional, que a su vez puede ser considerado como pionero de especies sexuales para colonizar nuevos hábitats en el centro de España. En búsqueda de evidencia adicional para apoyar esta idea, hemos revisado los datos obtenidos a partir de 588 parcelas prospectadas durante estudios anteriores sobre la abundancia de especies en la región mediterránea española (resultados no publicados) y *D. umhausense* estuvo presente en 111 de las 588 parcelas. *P. plumbea* estuvo presente sólo en 26, pero la más ilustrativo es que en 25 de esas 26, *D. umhausense* también estaba presente, lo que demuestra que la aparición de la primera está vinculada a la aparición del líquen con reproducción asexual.

Por lo tanto, los gremios liquénicos mediados por fotobionte reciben un apoyo importante con toda esta evidencia. En este caso, el establecimiento de las dos especies "periféricas" depende cuantitativamente de los propágulos producidos por una única especie "central", que distribuye sus fotobiontes (*Nostoc*) de manera eficaz a través de sus propágulos asexuales (isidios). Las especies "centrales" también se aprovechan de esta situación debido a que una proporción de los fotobiontes dispersados no desaparecen del todo. En oposición a la competencia de especies, esto constituye un claro caso de la facilitación entre líquenes. Aquí nos hemos centrado en una especie (*P. plumbea*) por razones logísticas, pero todas las conclusiones también se pueden extrapolar a las especies de cianolíquenes del gremio *Nephroma*, debido a que toda la evidencia empírica disponible apunta en la misma dirección. En el caso del gremio *Peltigera*, cuyos linajes de *Nostoc* presentan un crecimiento y reproducción normales, estas conclusiones no son aplicables. En vista a la posible influencia de la facilitación en comunidades de líquenes, futuras investigaciones y estudios de conservación, deben tener en cuenta la influencia de este fenómeno.

Implicaciones para la gestión forestal y la Conservación de Organismos epífitos

Nuestros resultados demuestran que la estructura del paisaje actual, resultante de la pérdida y la fragmentación de los bosques mediterráneos, proporcionan explicaciones fiables sobre las pérdidas observadas de la riqueza y la diversidad de especies epífitas. En la actualidad, se requieren estudios para facilitar el mantenimiento de la mayor diversidad de epífitas en las comunidades naturales, asegurando con ello que el papel de líquenes y briófitos en la funcionalidad del ecosistema sea mantenido, cuando se produzcan cambios ambientales de origen antrópico. La retención de la función de los epífitos exige el mantenimiento de las comunidades más ricas y diversas. Este objetivo sólo es posible si las estrategias de gestión consideran la calidad de los fragmentos de bosque, así como una composición adecuada del paisaje forestal, permitiendo de este modo la existencia de fragmentos grandes y regulares de bosque. La calidad de la matriz se ha demostrado que es muy importante, y también tienen que ha de ser tenida en cuenta en la planificación de la gestión forestal. Nuestros resultados muestran que, si los esfuerzos de conservación se centran en las comunidades de epífitos, los fragmentos más pequeños deben estar rodeados por una HCM, lo que impediría la existencia de un "área central" de alta calidad, pero

favorecería la llegada de propágulos. Pero teniendo en cuenta que la evidencia empírica encontró esta medida perjudicial para la adecuación del hábitat de la biodiversidad en general, su aplicación dependerá de los objetivos de conservación locales. Estudios futuros deben tratar de desentrañar las causas detrás de este efecto positivo e inesperado de la HCM. Un análisis más detallado también debe tener en cuenta el aislamiento de los fragmentos y las características de dispersión de las especies, para ser capaces de dar respuestas más claras y específicas. Por ejemplo, sería interesante averiguar cómo el grado de aislamiento modula el tamaño umbral de los fragmentos por encima del cual el signo del impacto de la HCM cambia.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

1. Mediterranean fragmented forests of the Cabañeros National Park and its surroundings, harbor rich and diverse epiphytes communities, which are strongly affected by habitat loss and fragmentation processes.
2. Fragment size is a very important factor that explain the richness and diversity of epiphyte species. A larger size implies a greater number of species, of both lichens and bryophytes, with a more even distribution of their abundances. An intense shift in fragment size is not immediately perceived by the community, and this leads to a slight lag between the number of species actually present in a fragment and those that can be potentially housed.
3. Fragment shape, as the edge-effect incidence of the on the total area of the fragment, has no effect on species richness. However, a more irregular fragment has a negative influence on diversity, which means that favors the dominance of a few species, probably associated to the forest edge microclimate.
4. The composition of the surrounding matrix conditions the species richness of a fragment. A high-contrast matrix increases the number of species in small fragments lacking a core area with high environmental quality, possibly not hindering the arrival of propagules. However, in larger fragments, it exerts the opposite effect, which means that the microclimatic conditions get worse at the edge. On the other hand, a pine matrix increases the richness of bryophytes, since its trunk can be used eventually as substrate and its physiognomy could mitigate edge effects.
5. Environmental heterogeneity at the plot level, provided by higher values of tree canopy openness and shrubland cover, lead to an increase in species diversity. However, heterogeneity at the fragment level, extracted from the variability found

in altitude, orientation, tree trunk size, canopy openness and shrubland cover, have no influence on species richness.

6. The structure of the immediate landscape that surrounds the fragment (1 km), is partially responsible for the number of species that occur in a forest fragment. Landscape composition by itself, measured through both historical and present total habitat amount, does not explain richness patterns, but its spatial configuration is also important. Fragmentation degree of the historical and present habitat, as a measure of landscape structure, is not valid for predicting richness. However, landscape structure described through historical connectivity (year 1956), partly explains the epiphyte richness observed in the present. The present connectivity has no effect on the community, however the intense regeneration of the native forest observed in the last decades, forecast a possible increase of species in more connected fragments.
7. The lichen *Pectenia plumbea*, catalogued as vulnerable in the center of the Iberian Peninsula, does not present dispersal limitations at landscape scale. The species already occupies all the potential habitat in the Cabañeros National Park, and cannot establish in more forests due to a low habitat quality. The regeneration of continuous forests without a management regime, in the warmer and more humid localities, would allow to extend the distribution area. The two reproductive stages provide the species a broader ecological suitability and helps to exploit a greater environment diversity, which slightly mitigates the effects of landscape fragmentation.
8. Genetic identity of the photobionts found in *P. plumbea* is partially shared among all populations, however the frequency with which the genotypes appear varies according to the geographical region, possibly in relation to climatic conditions.
9. Genetic identity of the photobionts found in a *P. plumbea* population is shared with the rest of the cyanolichen community of the same guild, and partly by the free-

living cyanobacterial community. However, *P. plumbea* shows a very clear preference for a single photobiont genotype, which can only be dispersed by the lichen *Dendriscoaulon umhausense*. Since *P. plumbea* spores are not able to germinate by themselves, nor the photobiont to grow or multiply, it is quite clear that the presence of *D. umhausense* would facilitate the establishment of *P. plumbea* in new habitats.

RECONOCIMIENTOS

La consecución de todo este trabajo ha sido posible gracias a la concesión de la beca predoctoral para la Formación de Personal Investigador (FPI) BES-2011-043799 del desaparecido Ministerio de Innovación y Ciencia. También he de reconocer la obtención de financiación por parte de los proyectos EPICON (CGL2010-22049) del Ministerio de Innovación y Ciencia, y EPIDIVERSITY (CGL2013-47010-P) del Ministerio de Economía y Competitividad, ambos concedidos a nuestro grupo de investigación, siendo Isabel Martínez la investigadora principal.

La estancia de 89 días en el Departamento de Biociencias de la Universidad de Helsinki (Finlandia) supervisado por el Profesor Jouko Rikkinen, fue posible gracias a la obtención en 2014 de la ayuda a la movilidad predoctoral para la realización de estancias breves en centros I + D número EEBB-I-2014-09089, del Ministerio de Economía y Competitividad. Allí fui muy bien acogido, y obtuve una formación impagable por parte de Jouko Rikkinen y sus colaboradores/as. Jouko Rikkinen y la Profesora Kaarina Sivonen financiaron con sus proyectos de investigación todo el material que necesité para llevar a cabo mis investigaciones. Asimismo, me alojé en una habitación en un piso de alquiler público para estudiantes, subvencionado por el Gobierno de Finlandia.

La estancia de 68 días en el Departamento de Criptogamia y Micología del Real Jardín Botánico de Edimburgo (Reino Unido) supervisado por el Doctor Christopher Ellis, pude realizarla gracias a la concesión en 2015 de la ayuda a la movilidad predoctoral para la realización de estancias breves en centros I + D con referencia EEBB-I-2015-09971, por parte del Ministerio de Economía y Competitividad. Allí obtuve grandes aportaciones intelectuales para mi trabajo de Christopher Ellis, siempre con una gran simpatía y disponibilidad.

Por último, he de agradecer a la Universidad Rey Juan Carlos por concederme un lugar en el que trabajar, rodeado de un ambiente académico agradable y adecuado, y aportando numerosos servicios de todo tipo para que todo esto haya salido adelante.

AGRADECIMIENTOS

En todos estos años me han pasado muchas cosas que me han transformado irreversiblemente. Aunque no hubiese tenido la gran oportunidad que supone desarrollar mi propia tesis doctoral, también me habrían pasado un montón de cosas que nada tienen que ver con este trabajo. Sin embargo, lo que he vivido toda esta actividad no creo que se experimente en muchos otros sitios, y los valores y la formación que aporta creo que son impagables. Esto es duro, y todas esas cosas que se dicen, claro que sí, hay mucha incertidumbre y unos cuantos momentos de tensión interior, pero pasar por todo esto elimina definitivamente el “yo no voy a poder con eso” de tu vocabulario. Por todo esto, gracias tesis, que a parte de las cosas que hayamos vivido, lo que ahora queda es una fuerza enorme para continuar por cualquier camino que me tenga preparado la vida.

Gracias a Isabel y Goyo, que me dieron esta oportunidad y me guiaron durante todo el camino. Con ellos he aprendido unas cuantas cosas de los líquenes de entre todas las que se saben y otras tantas que ni siquiera imaginamos. Que sigáis averiguándolas y mostrándoselas a los demás con el mismo entusiasmo que me las habéis enseñado a mí, y con la misma curiosidad que me habéis transmitido por estos espectaculares seres ocultos.

Gracias mamá por permitirme que fuera curioso, y responderme sin rechistar y con paciencia todas las preguntas que te hacía y te sigo haciendo. Sin las ganas de aprender que provocaste en mí, posiblemente no me habría dado por meterme en esta aventura.

Gracias a las liquenólogas Marta, Sonia y María, como hermanas mayores que abren el camino a los hermanos pequeños, me mostraron su experiencia y me ayudaron a solventar todo tipo de problemas. También un saludo a la gente tan simpática de la SEL.

Gracias a Carolina porque ser mi compañera todo este tiempo.

Juanlu

Madrid, 17 de enero de 2017

