

UCH-FC  
Biotecnología  
A 662  
C. 1



UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE CIENCIAS - ESCUELA DE PREGRADO

**“El efecto de la cobertura arbórea predomina sobre la identidad de los simbiontes en la estructuración del bacterioma de líquenes del género *Peltigera*”**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniera en Biotecnología Molecular

**María Catalina Aranda Vásquez**

Directora del Seminario de Título: Julieta Orlando

Co-directora: Margarita Carú Marambio

Septiembre, 2016

Santiago, Chile



UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE CIENCIAS - ESCUELA DE PREGRADO

## INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, que el Seminario de Título presentado por la candidata:

**MARÍA CATALINA ARANDA VÁSQUEZ**

**“El efecto de la cobertura arbórea predomina sobre la identidad de los simbioses en la estructuración del bacterioma de líquenes del género *Peltigera*”**

Ha sido aprobado por la Comisión evaluadora y revisora, como requisito parcial, para optar al título profesional de Ingeniera en Biotecnología Molecular.

Dra. Julieta Orlando  
**Directora Seminario de Título**

Dra. Margarita Carú Marambio  
**Co-Directora Seminario de Título**



**Comisión Revisora y Evaluadora**

Dr. Francisco Chávez  
**Presidente**

Dra. Jennifer Alcaíno Gorman  
**Integrante**

Santiago de Chile, Noviembre de 2016

*Para mis hermanas,  
Coni y Maca*

## Agradecimientos

Gracias Marcela y Andrés, mamá y papá, por darme ese hogar al que siempre quiero llegar, por esas infinitas felicidades y risas. Por darme los más lindo de mi vida, mis hermanas, ese ser monstruoso y salvaje formado por tres, pero que solo es uno. Gracias por enseñarme a disfrutar del día a día, de la vida y de mis seres queridos. Gracias por enseñarme a enfrentar lo difícil con ferocidad y sin miedo, porque de alguna forma, me han criado con la seguridad, aunque a veces sin mucha lógica, de que soy capaz de hacer todo lo que me proponga.

Gracias a mis hermanas, Coni y Maca, por estar siempre conmigo, por las risas, travesuras, gritos y llantos, porque son las mejores hermanas que podrían existir. Gracias a mi familia, mis tatas, tíos y tías, primas y primos por todo el amor y apoyo. Gracias a la Señora Anita, por el cariño y los regaloneos. Gracias a Gustavo, cuyas risas y locuras siempre están presentes en mis recuerdos.

Gracias a mis amigas y amigos; las que han estado desde que éramos feas y del mismo porte, Camila, Gloria, Belén y Paulina; los que conocí en la universidad, Diego, Juanca, Necho, Jorge, Seba, Pancho, Ale, Mario, Nicos, Barby, Danini, Vale; los que abortaron misión, Andrea, Nata, Panchocho. En especial gracias a esas dos grandes mujeres con las que compartí infinitas risas y trasnochadas, mis amigas, socias y compañeras, la Eli y la Andre. Gracias a los amigos que encontré hacia el final, en el laboratorio, la Cami, el Jaime, Lauri, Steff, Lía y Vale, gracias por siempre estar disponibles a ayudar o resolver alguna de mis incontables dudas, por los ricos almuerzos y carretes, por la preocupación y las risas. Gracias a la Juanita, por esa linda sonrisa todas las mañanas, por cuidarnos como sus pollitos y ser tan acogedora. Gracias a la profe Margarita por su dedicación y preocupación. Gracias al Diego y a Julieta por la generosidad que siempre encontré en ustedes, por compartir toda su sabiduría conmigo y aguantar mis locuras, por ser un ejemplo de científicos y de personas. Por último, agradecer a ese amigo y compañero que encontré al final de este proceso, que me ha dado todo su cariño y apoyo incondicional, el Seba.

## Índice de Contenidos

Índice de Contenidos	IV
Índice de Tablas	VI
Índice de Figuras	VII
Abreviaturas	VIII
Resumen	1
Abstract	3
<b>1. Introducción</b>	<b>5</b>
1.1. La simbiosis líquénica	5
1.2. El microbioma de los líquenes	9
1.3. Planteamiento del problema	11
<b>2. Objetivos</b>	<b>13</b>
2.1. Objetivo General	13
2.2. Objetivos Específicos	13
<b>3. Métodos y materiales</b>	<b>14</b>
3.1. Toma de muestras	14
3.2. Identificación de los componentes simbióticos	15
3.2.1. <i>Extracción de DNA desde talo líquénico</i>	15
3.2.2. <i>Amplificación por PCR de los marcadores moleculares de los simbiositos</i>	15
3.2.3. <i>Análisis de los productos de PCR</i>	16
3.3. Determinación de la estructura de las comunidades bacterianas asociadas a los líquenes y a los sustratos donde ellos crecen	17

3.3.1. Extracción de DNA	17
3.3.2. Amplificación por PCR de marcadores moleculares de bacterias	18
3.3.3. Perfiles de T-RFLP	18
<b>4. Resultados</b>	<b>21</b>
4.1. Caracterización de los sitios de estudio	21
4.2. Identificación molecular de los componentes simbióticos de cianolíquenes del género <i>Peltigera</i>	22
4.2.1. Micobiontes	24
4.2.2. Cianobiontes	30
4.2.3. Asociación entre los simbiotes	34
4.3. Determinación de la estructura de la comunidad bacteriana del talo líquénico y del sustrato	35
4.3.1. Determinación de la estructura de la comunidad bacteriana asociada a los talos líquénicos	36
4.3.2. Determinación de la estructura de la comunidad bacteriana presente en el sustrato	37
4.3.3. Comparación de la estructura de la comunidad bacteriana presente en el talo líquénico y en el sustrato	39
4.3.4. Índice de diversidad de Shannon ponderado de las comunidades bacterianas de talo y sustrato	41
<b>5. Discusión</b>	<b>43</b>
5.1. Simbiontes clásicos de los líquenes	43
5.1.1. Micobiontes	45
5.1.2. Cianobiontes	48
5.1.3. Asociación entre los simbiotes	50
5.2. Comunidad bacteriana asociada a cianolíquenes y la presente en el sustrato adyacente	51
<b>6. Conclusiones</b>	<b>57</b>
<b>7. Bibliografía</b>	<b>58</b>
<b>Anexo</b>	<b>65</b>

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Abundancia de los haplotipos de micobionte encontrados por sitio, e índice de diversidad de Shannon ponderado ( $H'_w$ ).	<b>25</b>
<b>Tabla 2.</b> Abundancia de los haplotipos de cianobionte encontrados por sitio, e índice de diversidad de Shannon ponderado ( $H'_w$ ).	<b>31</b>
<b>Tabla 3.</b> Equivalencia sugerida entre los haplotipos de este trabajo utilizando el marcador <i>rbclX</i> con los haplotipos descritos por Zúñiga et al. (2015) con el marcador rRNA 16S.	<b>32</b>
<b>Tabla 4.</b> Análisis de similitud de los perfiles de TRFLP mediante ANOSIM de una vía ( $p$ y $R$ ) y porcentajes de disimilitud calculados por SIMPER de acuerdo a los agrupamientos por sitio, micobionte y cianobionte.	<b>41</b>
<b>Tabla 5.</b> Índice de diversidad de Shannon ponderado para cada tipo de comunidad bacteriana.	<b>42</b>

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Mapa de la región de Aysén, Chile. La estrella roja indica la zona del río Leonés desde donde se tomaron las muestras para este estudio.	<b>22</b>
<b>Figura 2.</b> DNA genómico de talo líquénico en gel de agarosa al 0,8%.	<b>23</b>
<b>Figura 3.</b> Producto de la amplificación del gen del rRNA 28S de hongo en gel de agarosa al 1,2%.	<b>23</b>
<b>Figura 4.</b> Producto de la amplificación de la región <i>rbcLX</i> de cianobacteria en gel de agarosa al 1,2%.	<b>24</b>
<b>Figura 5.</b> Morfotipos de los cianolíquenes del género <i>Peltigera</i> de acuerdo a los haplotipos identificados.	<b>26</b>
<b>Figura 6.</b> Reconstrucción filogenética del gen del rRNA 28S de los haplotipos de micobionte encontrados, junto con representantes del género <i>Peltigera</i> , obtenida por Máxima Verosimilitud (MV).	<b>29</b>
<b>Figura 7.</b> Reconstrucción filogenética de la región <i>rbcLX</i> de los haplotipos de cianobionte encontrados, junto con representantes del género <i>Nostoc</i> , obtenida por Máxima Verosimilitud (MV).	<b>33</b>
<b>Figura 8.</b> Enfrentamiento de los árboles filogenéticos obtenidos por Inferencia Bayesiana de los haplotipos identificados de micobiontes y cianobiontes.	<b>35</b>
<b>Figura 9.</b> Frecuencia relativa de los TRFs detectados usando el gen del rRNA 16S de la comunidad bacteriana proveniente de los talos en Renoval y Arenal.	<b>37</b>
<b>Figura 10.</b> Frecuencia relativa de los TRFs detectados usando el gen del rRNA 16S de la comunidad bacteriana proveniente de los sustratos en Renoval y Arenal.	<b>38</b>
<b>Figura 11.</b> Análisis de Componentes principales (PCA) de los perfiles de TRFs de las comunidades bacterianas.	<b>40</b>
<b>Figura 12.</b> Índice de diversidad de Shannon ponderado de las comunidades bacterianas de cada tipo.	<b>42</b>



## Abreviaturas

6-FAM	6-carboxifluoresceína
ANOSIM	Análisis de similitud
BLAST	Herramienta de búsqueda de alineamiento local básica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
IB	Inferencia Bayesiana
LAR1	Rizobios asociados a líquenes 1
MV	Máxima Verosimilitud
NCBI	Centro nacional para la información biotecnológica
pb	Pares de bases
PCA	Análisis de componentes principales
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
<i>rbcLX</i>	Región intergénica de la RuBisCo
rpm	Revoluciones por minuto
rRNA	Ácido ribonucleico ribosomal
SIMPER	Porcentaje de similitud
TRF	Fragmento de restricción terminal
TRFLP	Polimorfismo del largo de los fragmentos terminales de restricción

## Resumen

La asociación líquénica tradicionalmente se define como conformada por un hongo y un organismo fotosintético (alga y/o cianobacteria), sin embargo, recientemente se ha encontrado que la comunidad bacteriana asociada al talo líquénico forma una biopelícula altamente estructurada, la cual se sugiere es un nuevo componente simbiótico. Diversos estudios indican que esta comunidad está compuesta principalmente por alfaproteobacterias y que cumplen funciones particulares como fijación de nitrógeno, reciclaje de nutrientes, producción de compuestos alelopáticos, entre otras. Sin embargo, no se conocen con claridad los factores que determinan la estructura de esta comunidad, la cual se diferencia de la comunidad que se encuentra en el sustrato sobre el que crece el líquen. En este trabajo nos propusimos estudiar dos ambientes poco caracterizados para cianolíquenes terrícolas del género *Peltigera*, un bosque renoval de *Nothofagus antarctica* (referido como renoval) y un sector de tipo arenoso alledaño a un río (referido como arenal), con el fin de establecer si el contexto ambiental, en comparación al efecto de la identidad de los componentes simbióticos, influye sobre la diversidad de la comunidad bacteriana asociada a dichos cianolíquenes. Los resultados revelaron que hay una mayor diversidad de estos líquenes en el renoval, detectando 7 filotipos de micobionte y 6 de cianobionte, en comparación al sitio del arenal, en el cual solo encontramos 2 filotipos de micobionte y 1 filotipo de cianobionte. Además, al determinar la diversidad de las comunidades bacterianas mediante el análisis del rRNA 16S resuelto por TRFLP (polimorfismo en el largo de los fragmentos de restricción terminal, por sus siglas en inglés), se observó que la diversidad de las comunidades bacterianas asociadas a estos líquenes se vio igualmente afectada en

ausencia de cobertura arbórea. Mediante análisis multivariados de los perfiles de TRFLP confirmamos que las comunidades bacterianas asociadas directamente con el talo liquénico se diferenciaron de aquellas presentes en el sustrato donde éstos crecen, siendo más diversas las primeras, y que el factor que afecta en mayor medida a la estructuración de estas comunidades corresponde a la presencia o ausencia de cobertura arbórea por sobre la identidad de los componentes simbióticos.

## Abstract

Traditionally, the lichen association is defined as formed by a fungus and a photosynthetic organism (algae y/o cyanobacterium); however, recently it has been found that the bacterial community associated to the lichen thallus is forming a highly structured biofilm, which is suggested as a new symbiotic component. Several studies show that this community is mainly composed by alphaproteobaterias and that they achieve particular functions as nitrogen fixing, nutrient cycling, allelopathic products, among others. Nevertheless, the factors determining the structure of this associated microbiota, which is different from the community found in the substrate where the lichen grows, have not been clearly defined. In this work, we aimed to study two poorly characterized environments for terricolous *Peltigera cyanolichens*, a *Nothofagus antarctica* young-forest (referred to as renoval) and a sandy area neighboring a river (referred to as arenal), in order to establish if the environmental context in comparison to the effect of the identity of the symbiotic components, influences the diversity of the bacterial community associated to those cyanolichens. The results revealed a higher lichen diversity in the renoval, detecting 7 mycobionts' phylotypes and 6 cyanobionts' phylotypes, compared with the arenal, where only 2 mycobionts' phylotypes and 1 cyanobionts' phylotype were found. In addition, when determining the diversity of the bacterial community through 16S rRNA analysis solved by TRFLP (terminal restriction fragment length polymorphism), it was noted that the diversity of bacterial communities associated to these lichens was also affected by the absence of tree cover. Through multivariate analysis from TRFLP profiles we confirmed that the bacterial communities directly associated to the thallus were different from those found in the substrate where they grow, the former being more

diverse, and that the main factor structuring these communities is the presence or absence of tree cover over the identity of the symbiotic components.

## 1. Introducción

### 1.1. La simbiosis líquénica

Clásicamente los líquenes se definen como asociaciones simbióticas mutualistas compuestas por un hongo (micobionte) y un organismo fotosintético (fotobionte), que puede ser un alga (clorobionte) y/o una cianobacteria (cianobionte). En el caso de estar formados por el hongo y un alga o cianobacteria, se denominan líquenes bipartitos, y cuando están presentes el hongo y ambos fotobiontes, se denominan líquenes tripartitos (Nash, 2008a). En esta interacción simbiótica, el hongo provee el soporte y la protección frente a erosión, desecación y alta intensidad lumínica al fotobionte, y el componente fotosintético contribuye con la producción de materia orgánica; además, en el caso de estar presente la cianobacteria, ésta aporta con la fijación de nitrógeno molecular permitiendo al líquen colonizar ambientes con escasez de nutrientes (Nash, 2008b). Recientemente, en julio de este año, además de los componentes clásicos, se identificó un nuevo compañero en la interacción, el cual corresponde a levaduras basidiomicetes, las cuales se proponen como un nuevo miembro de la simbiosis (Spribille *et al.*, 2016).

Microscópicamente, el componente fúngico es una red de filamentos que crecen por extensión, llamados hifas. Entre los fotobiontes hay algunos que también son filamentosos, mientras que otros están compuestos por cadenas o grupos de células parcialmente globulares. La distribución interna puede ser del tipo talo homómero, en la cual el micobionte y el fotobionte se distribuyen de igual forma en el talo; o puede ser del tipo talo heterómero, donde hay una estratificación de los componentes, existiendo al menos una capa superior formada por hifas compactas del hongo (corteza) seguida de una capa del fotobionte (Büdel y Scheidegger, 2008) y donde recientemente se

encontraron levaduras que estarían embebidas en dicha corteza (Spribille *et al.*, 2016) aunque aún son necesarios más estudios para confirmar su presencia en todas las especies de líquenes. Macroscópicamente, el talo, o cuerpo del líquen, está formado por las hifas compactas del hongo, mientras que el fotobionte se encuentra embebido entre las hifas y no se observa a simple vista. Independiente de la forma de crecimiento del líquen, el fotobionte debe funcionar como una unidad fotosintéticamente activa, recibiendo la cantidad adecuada de luz y de dióxido de carbono (Büdel y Scheidegger, 2008).

La morfología del líquen está determinada principalmente por el hongo, existiendo principalmente tres formas de crecimiento: crustosa, foliosa y fruticosa. Los líquenes crustosos se caracterizan por estar firmemente adheridos mediante su cara inferior al sustrato donde crecen y no pueden ser removidos sin destruir el soporte. La morfología foliosa, como su nombre lo indica, es similar a una hoja, plana y parcialmente unida al sustrato mientras que el líquen fruticoso tiene lóbulos que se erigen sobre la superficie del sustrato (Büdel y Scheidegger, 2008).

La reproducción y dispersión de los líquenes puede ser de tipo sexual o asexual y es un proceso complejo donde se requiere la transmisión de los dos componentes simbióticos a la siguiente generación, por lo que ambos deben estar presentes para el desarrollo del nuevo talo. Si el micobionte presenta reproducción sexual, la espora fúngica es liberada desde una estructura especializada llamada apotecio, y en cuanto germina, debe encontrar un fotobionte compatible y reconstruir la simbiosis líquénica *de novo* (transmisión horizontal del fotobionte). Cabe destacar que solo el componente fúngico presenta reproducción sexual y en el caso de que el fotobionte tenga esta capacidad en vida libre, solo ocurre excepcionalmente en simbiosis (Friedl y Büdel, 2008). Si el líquen se reproduce asexualmente, el fotobionte es generalmente transmitido

a la siguiente generación junto con el micobionte a través de propágulos vegetativos especializados (como soredios o isidios), o por fragmentación del talo (transmisión vertical del fotobionte) (Honegger, 2008).

Los líquenes, usualmente tienen una alta tolerancia a estrés abiótico como desecación, temperaturas extremas y luz UV, creciendo en condiciones en las que otros organismos no podrían sobrevivir (Beckett *et al.*, 2008). Ellos conforman los componentes fotosintéticos dominantes en ambientes extremos, constituyendo el 8% de la superficie de la Tierra, principalmente en regiones árticas y antárticas, en montañas y sectores desérticos (Ahmadjian, 1995; Büdel *et al.*, 2009). Además, los líquenes ocupan micro-nichos altamente complejos dentro de ambientes menos extremos, como por ejemplo roca desnuda, corteza de árbol o suelos perturbados. Lo anterior da cuenta del éxito de la simbiosis, donde ambos, micobionte y fotobionte, han expandido sus hábitats a sitios donde por sí solos no podrían sobrevivir. Por ejemplo, varias algas y cianobacterias liquenizables se pueden encontrar en vida libre en ambientes acuáticos o con alta humedad, pero en simbiosis pueden colonizar lugares muy secos como el desierto (Nash, 2008b). Es así como los líquenes juegan un rol importante en la colonización de la roca desnuda y contribuyen a la formación de suelo, principalmente mediante la lixiviación de minerales desde las rocas y la desintegración de las mismas (Chen *et al.*, 2000). Contrariamente, muchos líquenes también estabilizan partículas de sustrato formadas por la erosión y ayudan a retener agua (Büdel *et al.*, 2009).

La clasificación taxonómica de los líquenes se realiza de acuerdo al componente fúngico, con más de 18.000 especies de hongos liquenizables para los cuales se han reportado alrededor de solo 148 especies de fotobiontes (Voytsekhovich *et al.*, 2011). Nuevamente, el gran éxito de esta simbiosis queda en evidencia al notar que casi un quinto de todas las especies de hongos conocidas son especies liquenizables obligadas,



donde más del 98% de este grupo pertenecen al filo Ascomycetes y el resto se clasifica dentro del grupo de los Basidiomycetes (Lutzoni y Miadlikovska, 2009).

En el caso particular de este trabajo, se utilizaron como modelo de estudio líquenes foliosos del género *Peltigera*. A pesar de que este género de líquenes contiene especies globalmente distribuidas (Martínez *et al.*, 2003), los estudios en el sur de Chile son escasos, y los reportes se restringen a representantes bipartitos que se encuentran asociados a cianobacterias del género *Nostoc* (Quilhot *et al.*, 2012; Ramírez-Fernández *et al.*, 2013; Zúñiga *et al.*, 2015).

Existe una variedad de estudios que ahondan sobre los factores que influyen en la distribución, composición y diversidad de las comunidades de líquenes en diferentes ambientes, como, por ejemplo, líquenes creciendo en ambientes boscosos, la composición de la comunidad de plantas vasculares o el grado de perturbación de los bosques (Glew, 1997; Scutari *et al.*, 2004; St. Clair *et al.*, 2007; Rai *et al.*, 2012; Ramírez-Fernández *et al.*, 2013). Particularmente, se ha observado que bosques con abundantes especies nativas, y por lo tanto poco perturbados, tienen un efecto favorable sobre la diversidad de las comunidades liquénicas, tanto terrícolas como epífitas, conllevando las alteraciones en dichos bosques a una reducción de la disponibilidad de sustrato, aislamiento de las comunidades y cambio en las condiciones microclimáticas y produciendo una disminución de la diversidad liquénica (Kivistö y Kuusinen, 2000; Ramírez-Fernández *et al.*, 2013). Lo anterior se relacionaría, directa o indirectamente, con las condiciones abióticas que provee el bosque, como regulación de la temperatura, alta humedad del suelo y limitación de la radiación solar, que son condiciones favorables para el crecimiento de los líquenes (Barkman, 1958; Seaward, 2008; Aragón *et al.*, 2010). Sin embargo, en la mayoría de los estudios en donde se ha evaluado el efecto del hábitat sobre la diversidad de líquenes, se ha desestimado su influencia sobre los componentes

simbióticos por separado (Lättman *et al.*, 2009; Favero-Longo *et al.*, 2011; Otálora *et al.*, 2011; Ramírez-Fernández *et al.*, 2013).

## 1.2. El microbioma de los líquenes

Desde hace unos 10 años, se ha descrito que los líquenes forman un microecosistema que alberga una comunidad bacteriana muy abundante y diversa (Cardinale *et al.*, 2006, 2008; Bates *et al.*, 2011), la cual consiste en un ensamble microbiano altamente estructurado formando una biopelícula sobre el talo del liquen (Grube y Berg, 2009).

A pesar de que la presencia de bacterias asociadas al talo líquénico se conoce desde hace algún tiempo (Henckel y Yuzhakova 1936; Henckel y Plotnikova, 1973), su estudio no ha recibido mucha atención hasta ahora, aunque se les atribuye un importante papel en la simbiosis (Grube *et al.*, 2015). Muchos líquenes crecen y sobreviven sobre sustratos extremadamente pobres en nutrientes, por lo que se ha propuesto que la comunidad bacteriana asociada al talo líquénico o el bacterioma del liquen (Sigurbjörnsdóttir *et al.*, 2015) tiene un importante rol en el reciclaje de nutrientes, mediante la excreción de aminoácidos, la degradación de materia orgánica, la solubilización de fosfato y la fijación de nitrógeno, entre otras (Sigurbjörnsdóttir *et al.*, 2016). Asimismo, estas bacterias podrían participar en la producción de fitohormonas que permitirían la interacción del liquen con las plantas de su entorno (González *et al.*, 2005; Liba *et al.*, 2006; Hodkinson *et al.*, 2012), así como en la producción de compuestos antagónicos contra ciertos grupos microbianos (Grube *et al.*, 2015). Es probable que estas comunidades microbianas cumplan un rol clave en el sustento biológico de los simbioses principales, ya que existen algunos grupos de bacterias, como las alfaproteobacterias, y más particularmente los Rhizobiales, que están

presentes en altas proporciones en la gran mayoría de los líquenes estudiados hasta ahora (Cardinale *et al.*, 2008 2012b; Bates *et al.*, 2011). Además, existen bacterias de este orden que han sido descritas únicamente asociadas a este tipo de interacción simbiótica (*Lichen-Associated Rhizobiales* 1, LAR1), lo que da cuenta de la particularidad de las comunidades bacterianas asociadas a líquenes (Hodkinson y Lutzoni, 2009; Bates *et al.*, 2011; Hodkinson *et al.*, 2012).

La evidencia sugiere que las comunidades microbianas en el líquen son claramente distintas de aquellas que se encuentran en el sustrato adyacente (Bjelland *et al.*, 2011; Ramírez-Fernández *et al.*, 2014; Leiva *et al.*, 2016). Más aún, análisis de microscopía y pirosecuenciación sugieren que especies de líquen con diferentes formas de crecimiento albergan ensamblajes microbianos distintivos (Bates *et al.*, 2011; Grube y Berg, 2009). Sin embargo, existen aparentes contradicciones sobre los factores más importantes que determinan la estructura del bacterioma asociado a los líquenes, encontrándose como posibles predictores la biogeografía y el contexto ambiental (Cardinale *et al.*, 2008, 2012a; Hodkinson *et al.*, 2012; Printzen *et al.*, 2012; Ramírez-Fernández *et al.*, 2014), el tipo de fotobionte (Hodkinson *et al.*, 2012), la identidad del micobionte (Bates *et al.*, 2011; Grube y Berg, 2009), la madurez del talo (Cardinale *et al.*, 2012b), entre otros, sugiriendo que la interacción de la comunidad bacteriana con el líquen es más compleja de lo que se pensó en un inicio.

En general, los líquenes son conocidos por la gran producción de metabolitos secundarios, principalmente por las vías del polimalonato, shikimato y mevalonato (Boustie y Grube, 2005), los cuales tendrían roles antibióticos y alelopáticos (Manojlovic *et al.*, 2012; Lokajová *et al.*, 2014; Cernava *et al.*, 2015), por lo que se espera que tengan efectos sobre la estructura de las comunidades bacterianas asociadas al talo (Molnár y Farkas, 2010; Hodkinson *et al.*, 2012). Por otro lado, a pesar que las especies del género

*Peltigera* son pobres productores de estos metabolitos (Miadlikowska y Lutzoni, 2000), se ha propuesto que la actividad fenoloxidasa (como lacasas y tirosinasas) podría proveer una compensación funcional debido a la alta capacidad oxidativa de sus productos (Beckett *et al.*, 2003; Lisov *et al.*, 2012) posiblemente actuando alelopáticamente contra ciertos grupos bacterianos. En este sentido, se ha observado que los productos del líquen pueden estructurar incluso las comunidades del sustrato adyacente al talo (Leiva *et al.*, 2016), dando luces sobre su posible rol en la determinación de las condiciones micro-ambientales y contribuyendo así con la visión del líquen como una simbiosis multi-especie que selecciona los simbiosites bacterianos proporcionando condiciones favorables para ciertos grupos bacterianos (Aschenbrenner *et al.*, 2016).

### 1.3. Planteamiento del problema

Como se introdujo anteriormente, los líquenes del género *Peltigera* tienen aspecto folioso y muchos crecen usando el suelo como sustrato (terricolas). Las especies de este género se encuentran distribuidas ampliamente alrededor del mundo, siendo descrita en Norteamérica, Sudamérica y Europa (Martínez *et al.*, 2003), entre otras. Asimismo, se han descrito que ellos crecen en diversos ambientes, entre ellos bosques de lenga (*Nothofagus pumilio* (Poepp. & Endl.) Krasser 1896) y praderas del sur de Chile (Quilhot *et al.*, 2012; Ramírez-Fernández *et al.*, 2013; Zúñiga *et al.*, 2015). Sin embargo, las muestras a analizar en este estudio proceden de dos contextos ambientales poco descritos para este género, como lo son un renoval de Ñirre (*N. antarctica* (G. Forst.) Oerst. 1871) y un sector aldeaño al río Leones caracterizado por ser altamente arenoso, ambos ubicados en la Región de Aysén. Considerando que la presencia de plantas vasculares y el grado de perturbación en el ambiente tienen un

efecto sobre la diversidad de las comunidades liquénicas, tanto terrícolas como epífitas, en el presente estudio se pretende estudiar la influencia de la presencia de cobertura arbórea sobre la estructura y diversidad de las comunidades bacterianas asociadas a cianolíquenes terrícolas del género *Peltigera*, en comparación al efecto que ejercen sobre éstas la identidad y diversidad de los componentes simbióticos.

## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivo General

Determinar la influencia de la cobertura arbórea, en contraste con la identidad y diversidad de los componentes simbióticos, sobre la estructura de la comunidad bacteriana asociada a cianolíquenes terrícolas del género *Peltigera*.

### 2.2. Objetivos Específicos

1. Identificar molecularmente los componentes simbióticos de cianolíquenes del género *Peltigera* de dos contextos ambientales de la zona del río Leones, Región de Aysén.
2. Determinar la estructura de la comunidad bacteriana asociada al talo de cada cianolíquen (bacterioma).
3. Determinar la estructura de la comunidad bacteriana en el sustrato donde crece cada cianolíquen (microbiota).



### 3. Materiales y Métodos

#### 3.1. Toma de muestras

Las muestras de líquenes del género *Peltigera* se obtuvieron desde dos contextos ambientales: (i) un renoval de Ñirre y (ii) un suelo arenoso sin cobertura arbórea, ambos cercanos al río Leones en la región de Aysén. La identificación macroscópica de las muestras, mediante el reconocimiento de las principales estructuras que caracterizan a estos líquenes, se realizó utilizando como referencia una base de datos fotográfica construida desde galerías virtuales (e.g. [www.peltigera.lutzonilab.net/node/8](http://www.peltigera.lutzonilab.net/node/8); [www.stridvall.se/la/galleries.php#lichens](http://www.stridvall.se/la/galleries.php#lichens)) y usando claves taxonómicas (Brodo *et al.*, 2001). Las muestras consistieron en trozos de talo de los líquenes (25 cm<sup>2</sup> aproximadamente) y una porción del sustrato adyacente a ellos (10 mL aproximadamente). En cada zona se recolectaron 18 muestras, las cuales se colocaron en bolsas de papel para evitar su deterioro y disminuir la humedad, y se transportaron en recipientes tipo *cooler* a baja temperatura. Los líquenes y sus sitios de muestreo se fotografiaron y geo-referenciaron mediante GPS.

Previo a la extracción del DNA, se realizó la separación del sustrato adherido a la superficie del talo de los líquenes, utilizando un pincel y una espátula para remover los restos de sustrato adheridos. Las muestras de líquenes se guardaron en una bolsa de papel a temperatura ambiente mientras que las muestras de sustrato se almacenaron en tubos plásticos a 4°C.

### **3. 2. Identificación de los componentes simbióticos**

#### **3.2.1. Extracción de DNA desde el talo liquénico**

Para la extracción de DNA, una fracción de talo de aproximadamente 100 mg se fraccionó mecánicamente utilizando un mini-mortero. El DNA se extrajo utilizando el "Power soil DNA Isolation Kit" (MoBio Laboratories, Inc) según las indicaciones del fabricante. El DNA extraído se visualizó en geles de agarosa al 0,8% (p/v) en amortiguador TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) teñidos con GelRed™ (Biotium) para determinar la calidad e integridad de éste. Las muestras de DNA se almacenaron en amortiguador TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) a -20°C hasta su uso.

#### **3.2.2. Amplificación por PCR de los marcadores moleculares de los simbiotes**

Para la identificación de los micobiontes se utilizó el gen que codifica para la subunidad mayor del ribosoma de hongos (rRNA 28S) usando los partidores específicos LIC24R y LR7 (Miadlikowska y Lutzoni, 2004) y el siguiente programa: 60 s a 94°C, 30 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 52°C y 90 s a 72°C, seguido de una extensión final de 4 min a 72°C. De manera similar, para el caso de las cianobacterias, se amplificó la región que codifica para la subunidad mayor de la enzima RuBisCo junto con su secuencia promotora y una proteína chaperona hipotética (*rbcLX*) con los partidores CX y CZ (O'Brien *et al.*, 2013), mediante el siguiente programa: 4 min a 94°C, seguido de 35 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 55°C y 2 min a 72°C, con una extensión final de 7 min a 72°C.

Todas las mezclas de reacción se prepararon utilizando "GoTaq® Green Master Mix" (GoTaq® DNA polimerasa en amortiguador de reacción Green GoTaq® [pH 8,5], 200



$\mu\text{M}$  de cada dNTP y  $\text{MgCl}_2$  1,5 mM) (Promega) y todas las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador Maxygene II (Axygen).

### **3.2.3. Análisis de los productos de PCR**

El tamaño de los productos de PCR se determinó en geles de agarosa al 1,2% (p/v) en amortiguador TAE 1X, y teñidos con GelRed™ (Biotium). Los amplicones se secuenciaron utilizando un Analizador Genético 3730 (Applied Biosystems; Macrogen Inc., Corea). La identidad de los simbiontes se determinó utilizando la herramienta bioinformática BLASTn (Altschul *et al.*, 1990) comparando las secuencias obtenidas con las que se encuentran depositadas en la base de datos de secuencias nucleotídicas del GenBank (Benson *et al.*, 2011) y considerando sólo secuencias fehacientemente identificadas (Miadlikowska y Lutzoni, 2000; Goffinet *et al.*, 2003; Kaasalainen *et al.*, 2012; O'Brien *et al.*, 2013).

Las secuencias obtenidas fueron revisadas y editadas manualmente utilizando el programa BioEdit (Hall, 1999) y posteriormente se identificaron los haplotipos (i.e. grupos de secuencias con 100% de identidad). Una secuencia representante de cada haplotipo se seleccionó para realizar el alineamiento mediante el programa MEGA7 (Tamura *et al.*, 2011), con una base de datos propia que incluye representantes de especies depositadas en la base de datos y haplotipos encontrados anteriormente en el sur de Chile y Antártica (Zúñiga *et al.*, 2015). Los alineamientos de las secuencias se incluyen en el anexo. Se utilizó el software JModelTest (Guindon y Gascuel, 2003; Darriba *et al.*, 2012) para determinar el mejor modelo de evolución utilizando el criterio AIC y posteriormente realizar la reconstrucción filogenética según Inferencia Bayesiana (IB) y Máxima Verosimilitud (MV) utilizando la plataforma CIPRES (MrBayes) (Miller *et al.*, 2010) y T-rex (PhyML) (Boc *et al.*, 2012) respectivamente.

La diversidad de haplotipos de micobiontes y de cianobiontes se determinó por medio del índice de Shannon ponderado. Este índice se utilizó inicialmente para medir la diversidad de hábitats en un paisaje (Casquilho *et al.*, 1997), y más tarde se propuso como una medida de la diversidad de especies (Ricotta *et al.*, 2002; Guiasu y Guiasu, 2003):

$$H'_w = -\sum w_i \cdot p_i \cdot \log p_i,$$

donde  $p_i$  es la proporción entre el número de individuos del mismo haplotipo y el número total de individuos, y  $w_i$  es un factor de ponderación que incorpora la relación de similitud entre los haplotipos; en este caso se utilizó el promedio de las distancias genéticas entre un haplotipo y los otros haplotipos presentes en cada uno de los dos contextos ambientales, determinadas con el método de Tajima-Nei (Tajima y Nei, 1984).

### **3.3. Determinación de la estructura de las comunidades bacterianas asociadas a los líquenes y a los sustratos donde ellos crecen**

La determinación de la estructura de las comunidades bacterianas asociadas a los talos liquénicos y a los sustratos donde ellos crecen se determinó utilizando la técnica del polimorfismo en el largo de los fragmentos terminales de restricción (TRFLP, por sus siglas en inglés) de la región variable V6-V9 del gen del rRNA 16S amplificada a partir del DNA extraído del talo liquénico y del sustrato asociado a cada liquen.

#### **3.3.1. Extracción de DNA**

La extracción de DNA desde líquenes para determinar la estructura de las comunidades bacterianas asociadas se realizó como se indicó en la sección 2.2.1. Para el caso de la extracción de DNA desde el sustrato (i.e. suelo), se realizó el mismo procedimiento, pero a partir de 0,10 g de muestra.

### **3.3.2. Amplificación por PCR de marcadores moleculares de bacterias**

A partir del DNA extraído, tanto desde los talos liquénicos como del sustrato asociado a cada uno de ellos, se amplificó el gen del rRNA 16S con los partidores 895F (Hodkinson y Lutzoni, 2009) y rP2 (Weisburg *et al.*, 1991) marcado con el fluoróforo FAM (carboxifluoresceína) en el extremo 5'. El partidador 895F está diseñado para excluir las secuencias de cianobacterias; esto con el objetivo de analizar a la comunidad bacteriana sin considerar la presencia del cianobionte, cuyos TRFs podrían ocultar los de la comunidad bacteriana asociada, como se ha observado en otros trabajos del laboratorio (Leiva, 2015). El programa de amplificación utilizado fue: 3 min a 94 °C, 30 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 42°C, 90 s a 72 °C, finalmente 10 min a 72°C.

Las mezclas de reacción se prepararon como se mencionó anteriormente, utilizando "GoTaq® Green Master Mix" (Promega), y las amplificaciones se llevaron a cabo en un termocilador Maxygene II (Axygen). La integridad y tamaño de los productos de amplificación se verificaron por electroforesis en geles de agarosa al 1,2% en amortiguador TAE 1X teñidos con GelRed™.

### **3.3.3. Perfiles de TRFLP**

Los amplicones se purificaron mediante el uso del kit "Clean-Up Ultra Clean PCR" (MoBio Laboratories, Inc), la concentración de los amplicones purificados se determinó mediante espectrofotometría (Epoch, Biotek) y 200 ng de DNA se digirieron por 16 h a 37 °C con 2 enzimas de restricción independientemente: *BsuRI* y *HhaI* (Fermentas) siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, se realizó una precipitación alcohólica del DNA con etanol, cuyo producto se re-suspendió en 20 µL de amortiguador TE y se analizaron los fragmentos por electroforesis capilar con el secuenciador ABI

3037XL (Applied Biosystems; Macrogen Inc, Corea). El tamaño en pares de bases (pb) de los fragmentos terminales de restricción (TRFs), y la altura y el área de los picos en los electroferogramas, se determinaron con el programa GeneMapper v3.0 (Applied Biosystems).

En el análisis de los perfiles de TRFLP se incluyeron sólo fragmentos mayores a 30 pb para descartar las señales de los partidores. Con el objetivo de normalizar y hacer comparables los electroferogramas de las distintas muestras, se realizó un procedimiento iterativo para homogenizar las unidades de fluorescencia (UF) totales (Dunbar *et al.*, 2001). Adicionalmente, los perfiles se alinearon manualmente para evitar la identificación errónea de los TRFs por el corrimiento esperable en los tamaños de los fragmentos debido a la electroforesis. Con los datos corregidos se determinó la fluorescencia relativa de cada TRF.

Con los datos normalizados, se calculó la diversidad de las comunidades bacterianas utilizando el índice de Shannon, como se indicó en la sección 2.2.3, para cada muestra de talo y sustrato, ponderando por la distancia entre TRFs calculada con el índice de Bray-Curtis (Bray y Curtis, 1957) mediante el programa Past v2.17c (Hammer *et al.*, 2001). Posteriormente, los datos de diversidad de cada tipo de muestra (i.e. talo y sustrato) se agruparon de acuerdo al sitio, considerando las 18 muestras de cada contexto ambiental como réplicas biológicas. Para determinar si existe un efecto de la presencia de cobertura arbórea, se realizó un análisis de ANOVA de una vía y un post-test de Tukey para determinar la existencia de diferencias significativas entre los grupos.

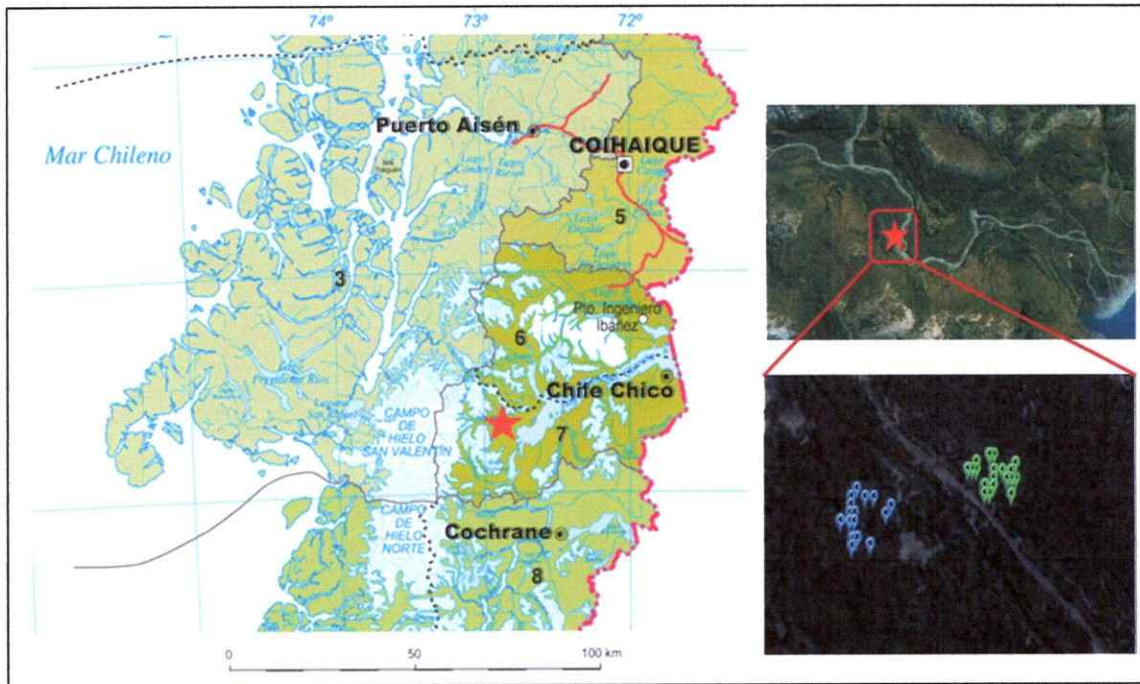
Finalmente, los perfiles de las comunidades pertenecientes al talo liquénico y al sustrato asociado se agruparon de acuerdo al sitio (presencia o ausencia de cobertura arbórea), y a la identidad del micobionte y del cianobionte de acuerdo a los haplotipos

detectados en la secuenciación de los marcadores para cada simbionte. El grado de relación de los perfiles de las comunidades bacterianas obtenidos mediante TRFLP se determinó mediante un análisis de componentes principales (PCA, por las siglas en inglés) utilizando el índice de disimilitud de Bray-Curtis (Bray y Curtis, 1957). Asimismo, se realizó un análisis de similitud (ANOSIM, por las siglas en inglés) para determinar el coeficiente R, que cuanto más grande y positivo (hasta 1) indica mayor disimilitud entre los grupos comparados. Además, se calcularon los porcentajes de similitud entre los grupos (SIMPER, por las siglas en inglés). Todos estos análisis se llevaron a cabo en el programa PAST v2.17c.

## 4. Resultados

### 4.1. Caracterización de los sitios de estudio

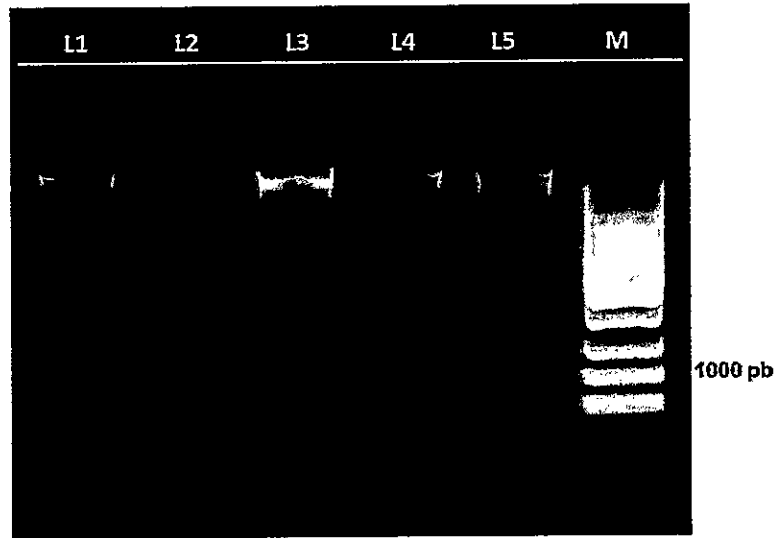
Se recolectaron 36 muestras de cianolíquenes con su respectivo sustrato desde dos contextos ambientales diferentes, 18 muestras desde un renoval de *N. antarctica* (referido de ahora en adelante como *renoval*) y 18 muestras desde una zona sin cobertura arbórea y suelo arenoso (referido de ahora en adelante como *arena*). El primer sitio corresponde a un bosque joven o secundario originado luego de una perturbación antrópica o natural y, particularmente en este trabajo, un renoval de *N. antarctica*, comúnmente conocido como Ñirre y que es una especie de árbol caducifolio nativo de la Patagonia. Por otro lado, el segundo sitio corresponde a un sector aledaño a un camino altamente perturbado, el cual corresponde a un terreno arenoso. En cada sitio se seleccionaron líquenes en cuadrantes de 25 m x 25 m, separados entre sí por 50 m, ubicados en la zona del río Leones, Región de Aysén 46°44' S y 72°54' O (Figura 1) a una altitud promedio de 224 m por sobre el nivel del mar. Dicha zona presenta un clima continental trasandino con degeneración esteparia, donde debido a la presencia del cordón montañoso de la cordillera, hay una disminución significativa de las precipitaciones, disminución general de las temperaturas y un incremento de la amplitud térmica (Cruz y Calderón, 2008).



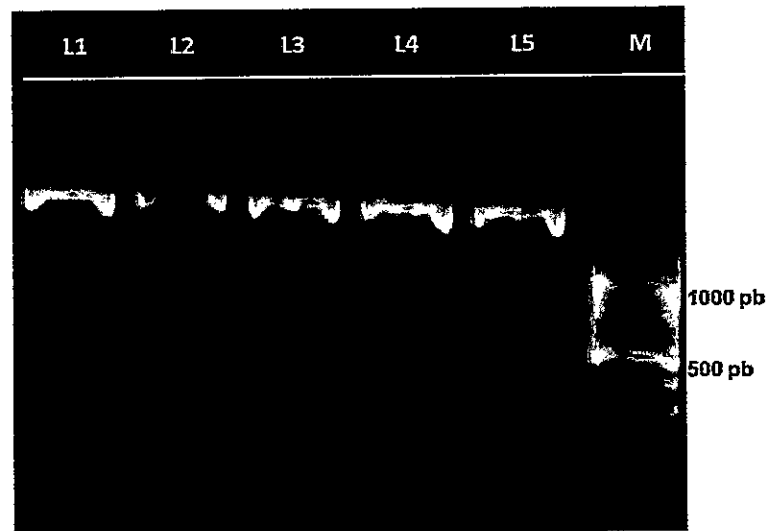
**Figura 1.** Mapa de la región de Aysén, Chile. La estrella roja indica la zona del río Leones desde donde se tomaron las muestras para este estudio. En azul, muestras del renoval; en verde, muestras del arenal.

#### 4.2. Identificación molecular de los componentes simbióticos de cianolíquenes del género *Peltigera*

Para realizar la identificación molecular de los simbiontes, se extrajo DNA desde los talos de cada muestra. Luego de verificar la integridad del DNA genómico (Figura 2), se realizó la amplificación de los marcadores moleculares de cada componente simbiótico, gen del rRNA 28S para micobionte y la región *rbcLX* para cianobionte, y luego se verificó la correcta amplificación mediante un gel de agarosa al 1,2% obteniéndose en cada caso una banda única de los tamaños esperados, 1200 pb (Figura 3) y 700 pb (Figura 4), respectivamente.

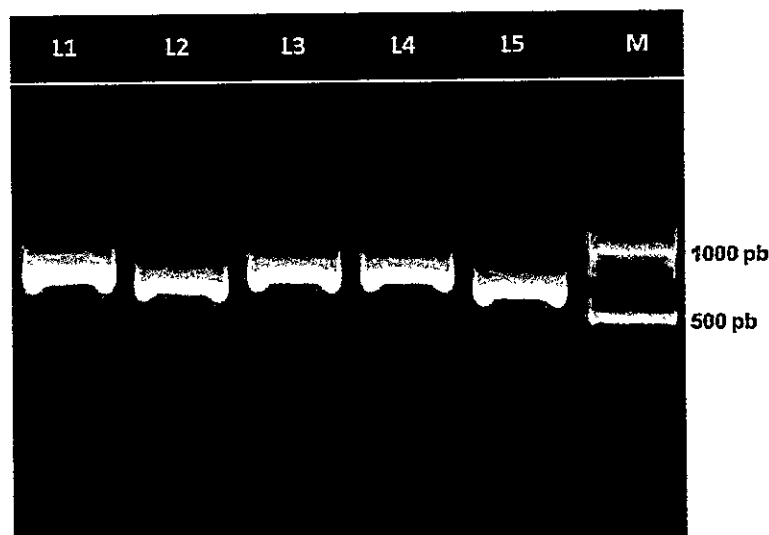


**Figura 2.** DNA genómico de talo líquénico en gel de agarosa al 0,8%. M, marcador de peso molecular 1 kb (Thermo Fisher).



**Figura 3.** Producto de la amplificación del gen del rRNA 28S de hongo en gel de agarosa al 1,2%. M, marcador de peso molecular 100 bp plus (Thermo Fisher).





**Figura 4.** Producto de la amplificación de la región *rbcLX* de cianobacteria en gel de agarosa al 1,2%. M, marcador de peso molecular 100 bp plus (Thermo Fisher).

Para determinar la identidad de los componentes simbióticos, se analizaron 72 secuencias, considerando los dos marcadores moleculares secuenciados desde cada muestra. En el caso del micobionte, todas las secuencias se asociaron con secuencias de representantes del género de hongo *Peltigera*, y en el del cianobionte, todas se relacionaron con secuencias del género de cianobacteria *Nostoc*. Para el posterior análisis se determinaron los haplotipos, que por definición corresponden a secuencias 100% idénticas, encontrándose 7 haplotipos de micobionte y 6 de cianobionte.

#### **4.2.1. Micobiontes**

De los 7 haplotipos de micobionte identificados, 6 ya habían sido descritos para otras regiones del sur de Chile (M1, M2, M4, M5, M7 y M8) en trabajos previos del laboratorio (Zúñiga *et al.* 2015), por lo que se mantuvo la nomenclatura utilizada en el artículo. Además, en este Seminario de Título se identificó un nuevo haplotipo, el cual se denominó M9 para continuar la numeración consecutiva. En la Figura 5 se muestran

los morfotipos de los representantes de cada cianoliquen recolectado, de acuerdo a los haplotipos de los micobiontes identificados. Comparando ambos sitios, del total de haplotipos encontrados, solo dos se encontraron tanto en el renoval como en el arenal, M1 y M4, siendo los demás únicos para el renoval. Los haplotipos más abundantes correspondieron a M4 (n = 20) y M5 (n = 6), mientras que de tres de los micobiontes (M7, M8 y M9) solo se encontró un único representante (Tabla 1). Lo anterior, junto con los índices de diversidad (Tabla 1), indica que en el renoval hay una mayor diversidad de haplotipos de micobionte que en el arenal.

**Tabla 1.** Abundancia de los haplotipos de micobionte encontrados por sitio, e índice de diversidad de Shannon ponderado ( $H'_w$ ).

Haplotipo	N° de muestras	
	Renoval	Arenal
M1	2	2
M2	3	0
M4	4	16
M5	6	0
M7	1	0
M8	1	0
M9	1	0
Diversidad ( $H'_w$ )	0,045	0,008



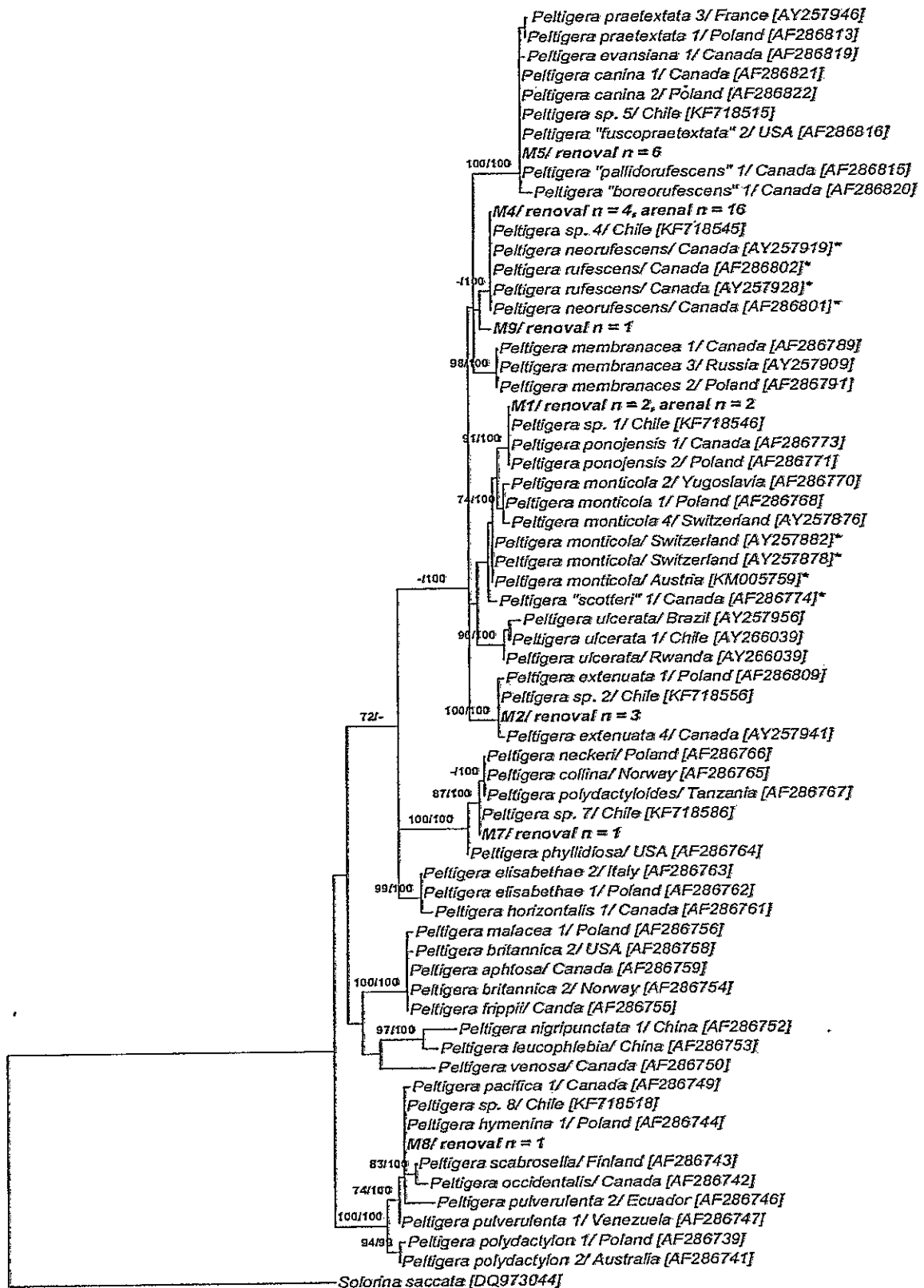
**Figura 5.** Morfotipos de los cianolíquenes del género *Peltigera* de acuerdo a los haplotipos identificados. En azul se indican los tipos encontrados en el renoval y en verde los tipos encontrados en el arenal. La barra representa 1 cm.

Posteriormente, se determinó la relación filogenética entre los haplotipos con representantes del género *Peltigera* identificados anteriormente para el sur de Chile y la Antártica (Zúñiga *et al.* 2015), y líquenes recolectados en otros sitios del resto del mundo. Por lo tanto, el set de secuencias a analizar constó de un representante de cada grupo de haplotipos encontrados, 6 haplotipos identificados anteriormente en el sur de Chile y 53 secuencias descargadas desde la base de datos GenBank, resultando en un total de 66 secuencias de 695 pares de bases cada una. El set de secuencias se analizó mediante MV e IB resultando ambos análisis en una topología similar (Figura 6).

De la reconstrucción filogenética se observa que 6 de los 7 haplotipos encontrados se relacionan con secuencias ya descritas, a excepción de M9 que no se relaciona estrechamente con ninguno de los micobiontes descritos hasta ahora. En particular M1, M2 y M4 se relacionan cercanamente con *P. ponojensis*, *P. extenuata* y *P. rufescens*, respectivamente. Por otro lado, el resto de los haplotipos se relacionan a más de una especie dentro del género *Peltigera*, formando linajes bien definidos y con buen soporte: M5 relacionado con *P. "boreorufescens" / P. canina / P. evansiana / P. "fuscopraetextata" / P. "pallidorufescens" / P. praetextata* (linaje de *P. canina*); M7 con *P. collina / P. neckeri / P. polydactyloides* (linaje de *P. neckeri*); y M8 con *P. hymenina / P. occidentalis / P. pacifica / P. polydactylon / P. pulverulenta / P. scabrosella* (linaje de *P. hymenina*).

Dado que el haplotipo M9 no se había descrito con anterioridad en Chile, se amplificó adicionalmente la región ITS, usada como segundo marcador molecular con el fin de obtener mayor información filogenética sobre este haplotipo; sin embargo, no se logró obtener una secuencia de buena calidad para su análisis. Por lo tanto, se procedió a utilizar la herramienta BLAST para buscar en la base de datos alguna secuencia similar al gen del rRNA 28S de ese haplotipo; encontrándose 8 secuencias con el mismo puntaje máximo y 99% de identidad, todas pertenecientes a especies de *Peltigera* identificadas. Dichas secuencias encontradas se incluyeron en la construcción de los árboles filogenéticos para determinar la relación del haplotipo con especies conocidas. Como se puede observar en la Figura 6, el haplotipo M9 no se agrupa directamente con ninguna de las secuencias incluidas en este trabajo ni con las encontradas en la base de datos. Por otro lado, junto con las fotos registradas para ese haplotipo durante la toma de muestra y el fragmento de talo que se recolectó, se realizó la identificación morfológica utilizando dos claves taxonómicas diferentes específicas para el género *Peltigera* (Hitch

*et al.*, 2009; Louwhoff, 2009). Mediante este método, no se llegó a la identificación a nivel de especie del haplotipo, siendo la especie más similar *P. polydactylon*, pero diferenciándose por la forma de los apotecios (estructuras de reproducción sexual) y el largo de las rizinas (estructuras de adhesión al sustrato y que se encuentran en la cara inferior del talo) (Hitch *et al.*, 2009).



0.0 0.008

**Figura 6. (Figura en página anterior).** Reconstrucción filogenética del gen del rRNA 28S de los haplotipos de micobionte encontrados, junto con representantes del género *Peltigera*, obtenida por Máxima Verosimilitud (MV). Se indica el soporte en los nodos de los análisis de MV (valores de *bootstrap*  $\geq 70\%$ ) e Inferencia Bayesiana (IB; valores de probabilidad posterior  $\geq 95\%$ ) (MV/IB). Para cada secuencia se indica su origen geográfico y el número de acceso entre corchetes. Las secuencias con mayor similitud al haplotipo M9 encontradas en la base de datos GenBank se indican con un asterisco. Los haplotipos nombrados como *Peltigera sp.* corresponden a los representantes chilenos reportados en Zúñiga *et al.* (2015). La secuencia de *Solorina saccata* se incluye como raíz. La escala indica distancia genética.

#### 4.2.2. Cianobiontes

Las 36 secuencias de la región *rbclX* fueron amplificadas exitosamente desde las muestras de talo y cada reacción de secuenciación resultó en lecturas limpias sin evidencia de registros secundarios, todas relacionadas al género *Nostoc*, por lo que se sugiere que solo un genotipo de cianobionte es el dominante en cada talo. Los 6 haplotipos de cianobionte identificados se nombraron como "Cr" seguidos por un número consecutivo, para distinguir los haplotipos encontrados en este Seminario de Título con el marcador *rbclX* de aquellos reportados por Zúñiga *et al.* (2015) obtenidos con el marcador rRNA 16S.

Todos los haplotipos estuvieron presentes en el renoval, pero solo el haplotipo Cr1 se encontró en la zona del arenal, que además es el más abundante ( $n = 25$ ). Por otro lado, de los haplotipos Cr4, Cr5 y Cr6 se encontró un único representante y solo se encontraron en el renoval. Lo anterior, junto con los índices de diversidad (Tabla 2), indica que existe una mayor diversidad de haplotipos de cianobiontes en el renoval que en el arenal.

**Tabla 2.** Abundancia de los haplotipos de cianobionte encontrados por sitio, e índice de diversidad de Shannon ponderado ( $H'_w$ ).

Haplotipo	N° de muestras	
	Renoval	Arenal
Cr1	7	18
Cr2	6	0
Cr3	2	0
Cr4	1	0
Cr5	1	0
Cr6	1	0
Diversidad ( $H'_w$ )	0,039	0,000

Posteriormente, se determinó la relación filogenética entre los haplotipos con representantes del género *Nostoc* de otras partes del mundo y con secuencias no publicadas correspondientes a las mismas muestras estudiadas por Zúñiga *et al.* (2015) pero utilizando el marcador *rbcLX*. Por lo tanto, el set de secuencias a analizar constó de un representante de cada grupo de los haplotipos encontrados, 18 secuencias identificadas anteriormente en el sur de Chile y 31 secuencias descargadas desde la base de datos GenBank, resultando en un total de 55 secuencias de 407 pares de bases cada una. El set de secuencias se analizó mediante MV e IB resultando ambos análisis en una topología similar (Figura 7).

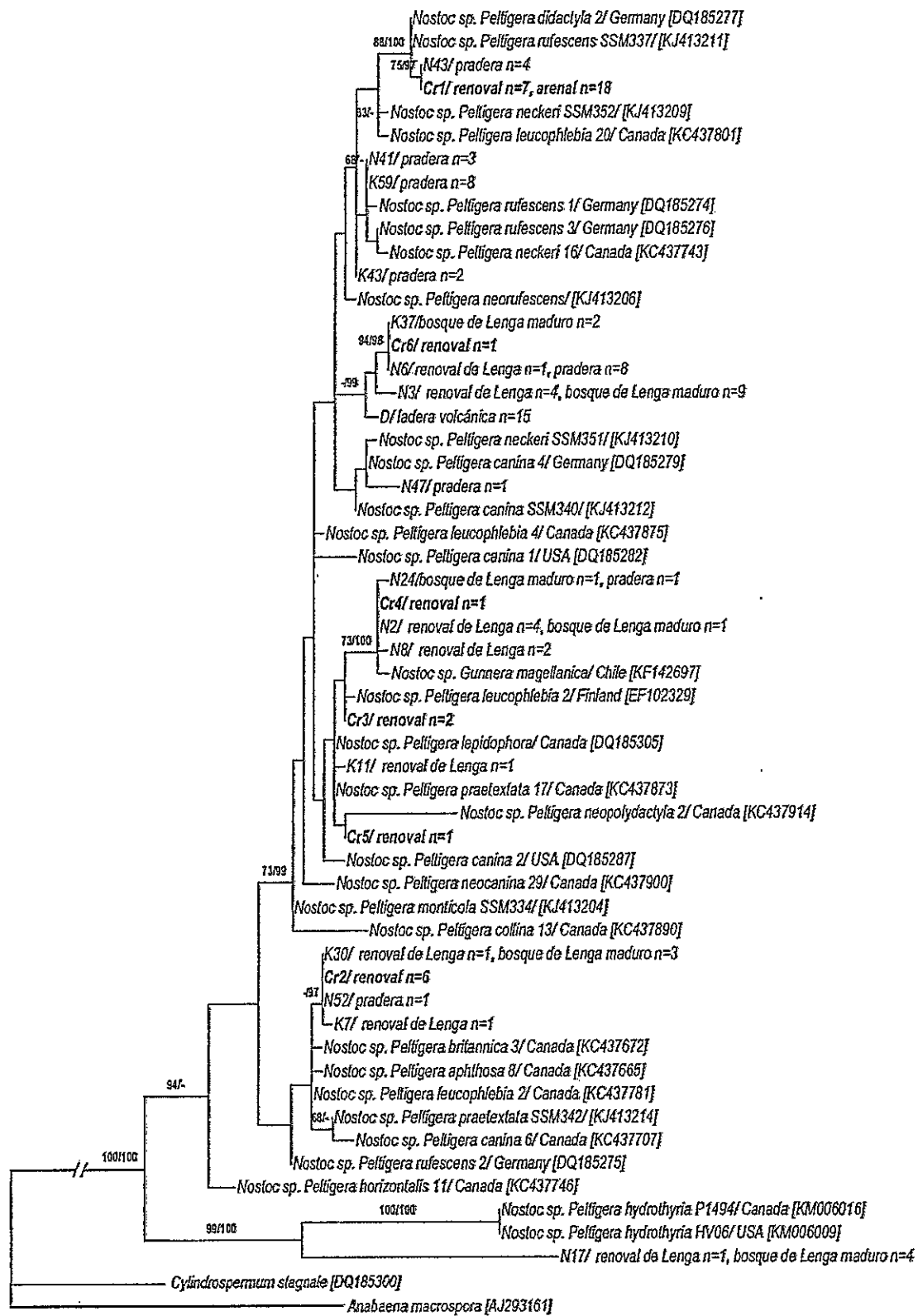
Se puede observar que los haplotipos detectados solo se relacionan con cianobiontes de *Peltigera*, a diferencia de lo observado en otros trabajos, donde también se han encontrado haplotipos relacionados con cianobiontes de *Nephroma* (Zúñiga *et al.*, 2015). De los haplotipos encontrados, Cr1 forma un grupo bien soportado con otras especies asociadas a *Nostoc* de *Peltigera*, mientras que Cr2, Cr3 y Cr5 también se relacionan con este grupo, pero sin un soporte significativo. El haplotipo Cr6 no se relaciona cercanamente con ninguna secuencia específica, pero se agrupa en un gran



clado perteneciente a dicho grupo de *Nostoc*. También se destaca que Cr4 es el único haplotipo que se relaciona con una secuencia proveniente de Chile, más aún, la única del hemisferio sur, y que corresponde a *Nostoc* de *Gunnera magellanica*. No existen datos publicados sobre haplotipos ni secuencias en la base de datos para identificar cianobiontes utilizando el gen *rbcLX* en regiones cercanas al sitio de estudio, pero sí para el gen rRNA 16S para especímenes recolectados en las regiones de Aysén y de Magallanes y la Antártica (Zúñiga *et al.*, 2015). En el laboratorio se tienen datos sobre secuencias de la región *rbcLX* sin publicar para la mayoría de las muestras reportadas en dicho artículo, por lo que fueron revisadas y editadas para poder usarlas a modo de comparación. Se identificaron algunos haplotipos que fueron incluidos en la reconstrucción filogenética de la Figura 7. De esta forma, cruzando la información obtenida del análisis de estas secuencias con los haplotipos identificados en el artículo de Zúñiga *et al.* (2015) se relacionaron las secuencias encontradas en este trabajo con los ya descritos para el sur de Chile y Antártica (Tabla 3).

**Tabla 3.** Equivalencia sugerida entre los haplotipos de este trabajo utilizando el marcador *rbcLX* con los haplotipos descritos por Zúñiga *et al.* (2015) con el marcador rRNA 16S.

Haplotipos de este Seminario de Título	Haplotipos equivalentes según Zúñiga <i>et al.</i> (2015)
Cr1	C3
Cr2	C1/C2
Cr3	C6/C10
Cr4	C10
Cr5	C6/C10
Cr6	C14

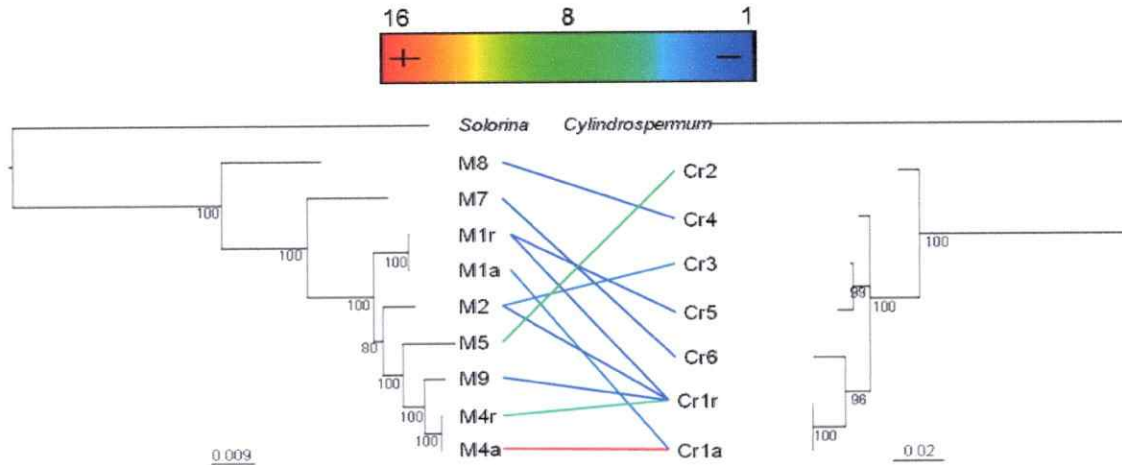


0.0 0.01

**Figura 7. (Figura en página anterior).** Reconstrucción filogenética de la región *rbcLX* de los haplotipos de cianobionte encontrados, junto con representantes del género *Nostoc*, obtenida por Máxima Verosimilitud (MV). Se indica el soporte en los nodos de los análisis de MV (valores de *bootstrap*  $\geq 70\%$ ) e Inferencia Bayesiana (IB; valores de probabilidad posterior  $\geq 95\%$ ) (MV/IB). Para cada secuencia se indica el hospedero y su origen geográfico, si el dato estaba disponible, y el número de acceso entre corchetes. Los haplotipos nombrados por una letra, un número y el hábitat de donde se recolectaron corresponden a los representantes chilenos reportados en Zúñiga *et al.* (2015) pero obtenidos usando el marcador *rbcLX*. Las secuencias de *Cylindrospermum stagnale* y *Anabaena macrospora* se incluyen como raíz. La escala indica distancia genética.

#### **4.2.3. Asociación entre los simbioses**

Las relaciones entre los haplotipos de los simbioses encontrados en este Seminario de Título se visualizan en el enfrentamiento de los árboles filogenéticos (Figura 8) donde también se indica la frecuencia de asociación entre los pares. El micobionte M4 se asocia con la mayor frecuencia y exclusivamente con el cianobionte Cr1. Este cianobionte, es el más promiscuo de los encontrados, asociándose con varios micobiontes (M1, M2, M4 y M9), y siendo el único presente en el arenal. Por otro lado, los micobiontes M1 y M2 en renoval son los únicos que se asocian con más de un cianobionte, de los cuales uno es Cr1.



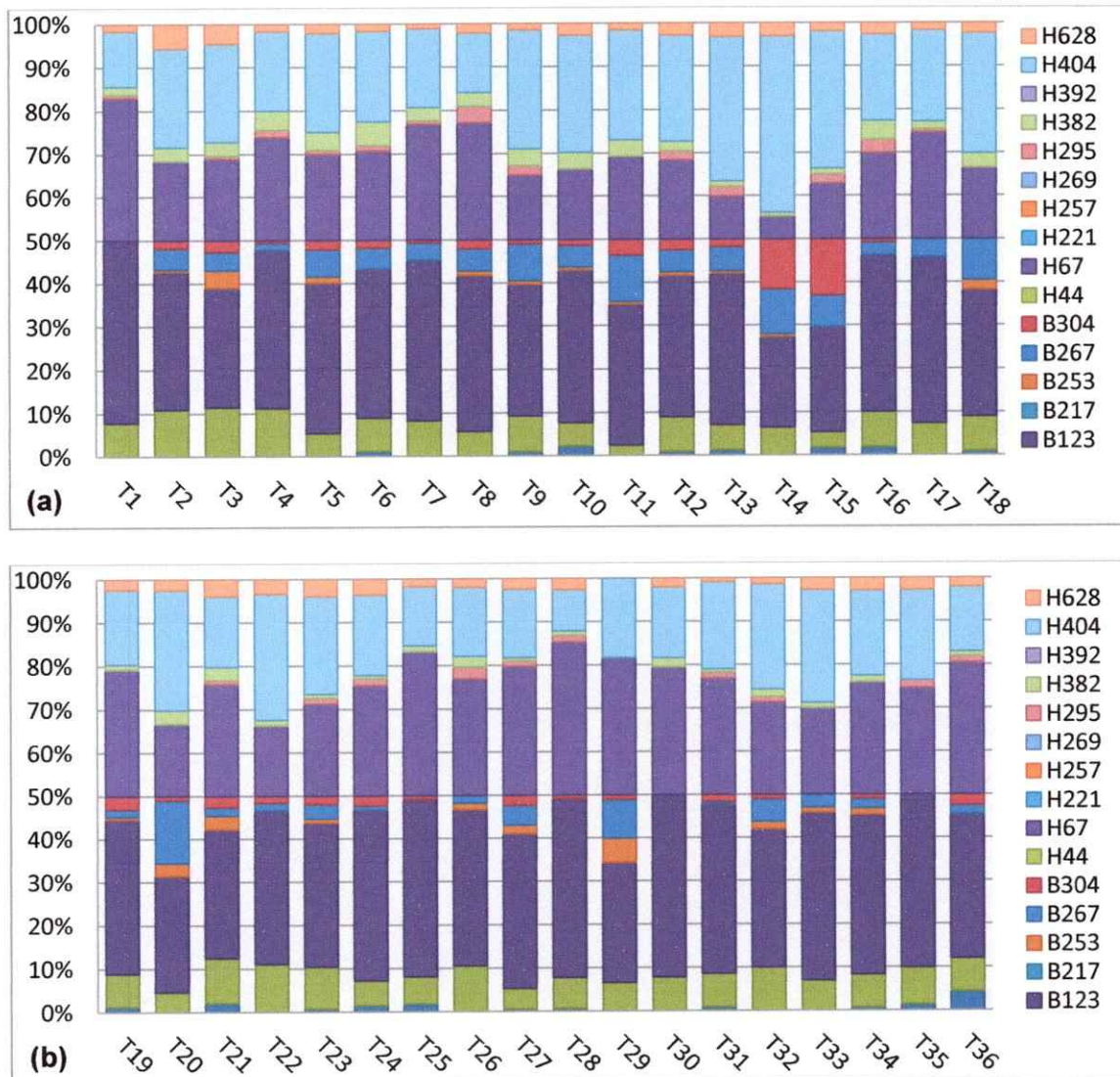
**Figura 8.** Enfrentamiento de los árboles filogenéticos obtenidos por Inferencia Bayesiana de los haplotipos identificados de micobiontes (izquierda) y cianobiontes (derecha), indicando el respectivo soporte en cada nodo (>95%). La escala indica distancia genética. Se utilizó como raíz la secuencia de *Solorina saccata* para micobiontes y *Cylindrospermum stagnale* para cianobionte. r: renoval; a: arenal. Las líneas uniendo los diferentes haplotipos indican la asociación simbiótica encontrada y, según la escala de colores, la frecuencia de dicha asociación.

#### 4.3. Determinación de la estructura de la comunidad bacteriana del talo líquénico y del sustrato

Para determinar la estructura de la comunidad bacteriana se utilizó la técnica de TRFLP utilizando el gen del rRNA 16S amplificado con partidores que excluyen las secuencias de cianobacterias con el fin de evitar la amplificación del cianobionte presente en el talo líquénico, ya que éste genera un sesgo durante la amplificación por PCR debido a que se encuentra más representado en la muestra, ocultando así las secuencias de la comunidad bacteriana asociada. Se utilizaron las enzimas *BsuRI* (B) y *HhaI* (H) con las que se digirieron los fragmentos amplificados desde talo (T) y sustrato (S). Ambos tipos de comunidades se comparan en los dos sitios de estudio: el renoval (muestras 1 a 18) y el arenal (muestras 19 a 36).

#### **4.3.1. Determinación de la estructura de la comunidad bacteriana asociada a los talos liquénicos**

De los análisis de TRFs obtenidos para la comunidad bacteriana asociada a los talos liquénicos se encontraron 11 fragmentos en total, donde 6 corresponden a la enzima *BsuRI* y 5 a la enzima *HhaI*, siendo todos encontrados tanto en el sitio de renova como arenal. Los TRFs más abundantes para cada enzima correspondieron a B123, H67 y H404, representando aproximadamente el 33%, 19% y 24% en las muestras de renova y el 36%, 26% y 19% en el arenal, respectivamente (Figura 9).



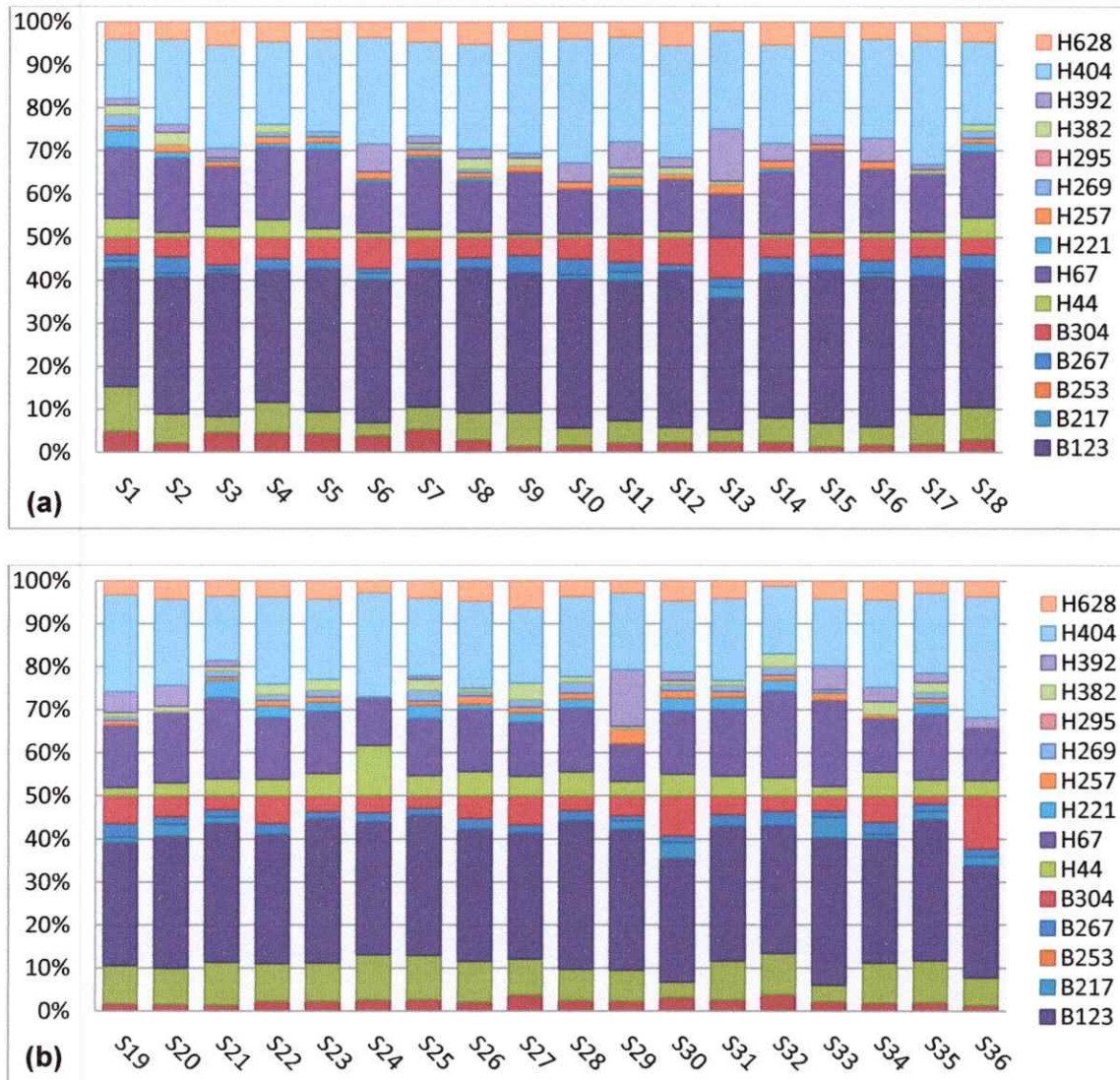
**Figura 9.** Frecuencia relativa de los TRFs detectados usando el gen del rRNA 16S de la comunidad bacteriana proveniente de los talos en (a) Renoval y (b) Arenal. Se utilizaron las enzimas *Bsu*RI (B) y *Hha*I (H) y los TRFs obtenidos con cada enzima se muestran en la leyenda de colores.

#### 4.3.2. Determinación de la estructura de la comunidad bacteriana presente en los sustratos

Para el caso de los análisis de los TRFs obtenidos para la comunidad bacteriana presente en los sustratos, se encontraron 15 fragmentos en total, 6 para la enzima *Bsu*RI



y 9 para la enzima *Hhal*, siendo todos encontrados tanto en el sitio de renovación como arenal. Los TRFs más abundantes para cada enzima fueron nuevamente B123, H67 y H404, representando aproximadamente el 33%, 15% y 23% en las muestras de renovación y el 31%, 15% y 20% en el arenal, respectivamente (Figura 10).



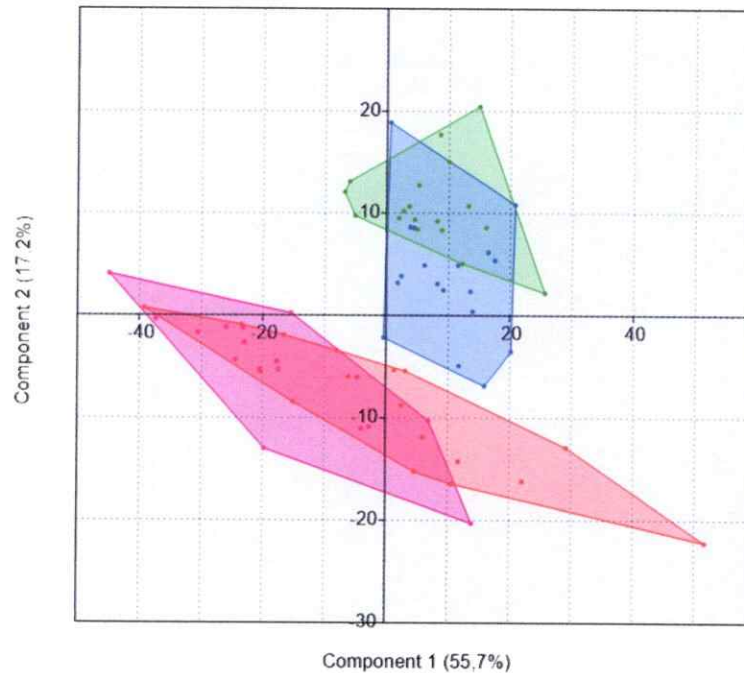
**Figura 10.** Frecuencia relativa de los TRFs detectados usando el gen del rRNA 16S de la comunidad bacteriana proveniente de los sustratos en (a) Renovación y (b) Arenal. Se utilizaron las enzimas *Bsu*RI (B) y *Hha*I (H) y los TRFs obtenidos con cada enzima se muestran en la leyenda de colores.

#### **4.3.3. Comparación de la estructura de la comunidad bacteriana presente en el talo líquénico y en el sustrato**

Al comparar los fragmentos obtenidos con ambas enzimas de restricción para las muestras de talo y sustrato, se detectaron mayor cantidad de TRFs en el caso de sustrato, 11 y 15 respectivamente. Particularmente, con la enzima *BsuRI* se obtuvieron 8 TRFs en total, donde 4 son compartidos (B67, B123, B267, B304), dos exclusivos para talo (B35 y B253) y dos exclusivos para sustrato (B42 y B217). Por otro lado, con la enzima *HhaI* se obtuvieron 10 TRFs en total, de los cuales 4 son comunes (H67, H382, H404, H628), uno exclusivo para talo (H295) y 5 exclusivos para sustrato (H44, H221, H257, H269 y H392). Los TRFs más abundantes coinciden tanto para talo como para sustrato (B123, H67 y H404), representando aproximadamente en los talos un 76% en renoval y un 81% en el arenal; y en los sustratos un 70% en el renoval y un 65% en el arenal.

Con los perfiles de las comunidades bacterianas de talos y sustratos tanto de renoval como de arenal obtenidos con ambas enzimas, se realizó un análisis multivariado utilizando el método de análisis de componentes principales (PCA). El componente 1 explica en mayor cantidad la varianza de los perfiles, con un porcentaje de 55,7%, y alcanzando con ambos componentes la explicación de un 72,9% de la varianza (Figura 11). Se observa que la separación de los perfiles se debe a si las muestras se obtuvieron desde talos o desde sustratos, no detectándose una diferencia clara por sitio (ie. renoval vs. arenal). Complementando lo anterior, se realizaron análisis de ANOSIM entre los grupos, obteniéndose una diferencia significativa al comparar las comunidades bacterianas de talos y sustratos ( $p < 0,0001$ ;  $R = 0,6568$ , mientras que el análisis de SIMPER arrojó un 24,19% de disimilitud entre los grupos (Tabla 4).





**Figura 11.** Análisis de Componentes principales (PCA) de los perfiles de TRFs de las comunidades bacterianas. Rojo, comunidades del talo en renoval. Rosa, comunidades del talo en el arenal. Azul, comunidades del sustrato en renoval. Verde, comunidades del sustrato en el arenal.

Posteriormente se realizaron los mismos análisis estadísticos, pero agrupando los perfiles de las comunidades bacterianas desde talos y sustratos por sitio (i.e. renoval y sustrato), identidad del micobionte e identidad del cianobionte. En promedio, el porcentaje de disimilitud calculado por SIMPER es de aproximadamente 19% para muestras de talo y 15% para muestras de sustrato. El único factor que tiene una influencia estadísticamente significativa sobre las comunidades bacterianas de talos y sustratos por separado es el sitio ( $p = 0,0033$  y  $p = 0,0001$ , respectivamente). Sin embargo, es importante destacar que los coeficientes de determinación son bajos ( $R = 0,1603$  y  $R = 0,3162$ , respectivamente) (Tabla 4).

**Tabla 4.** Análisis de similitud de los perfiles de TRFLP mediante ANOSIM de una vía ( $p$  y  $R$ ) y porcentajes de disimilitud calculados por SIMPER de acuerdo a los agrupamientos por sitio, micobionte y cianobionte. Ambos análisis se realizaron utilizando el índice de Bray-Curtis.

Muestras		$p$	$R$	Disimilitud (%)
Talos vs. Sustratos		0,0001	0,6568	24,19
	Sitio	0,0033	0,1603	18,81
Talos	Micobionte	0,0679	0,1613	18,79
	Cianobionte	0,0852	0,1616	19,47
	Sitio	0,0001	0,3162	15,90
Sustratos	Micobionte	0,1327	0,1108	15,06
	Cianobionte	0,1555	0,1118	15,24

#### **4.3.4. Índice de diversidad de Shannon ponderado de las comunidades bacterianas de talo y sustrato**

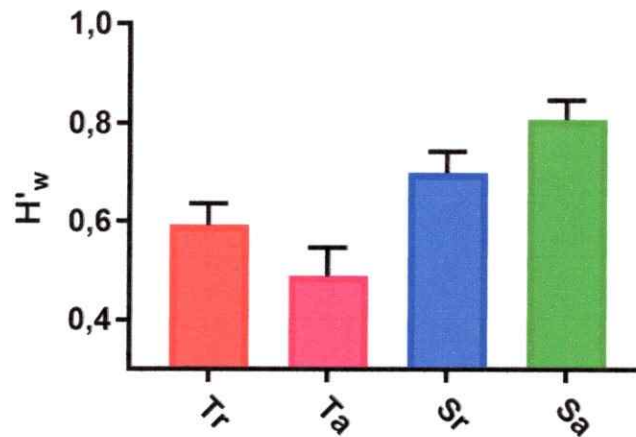
Con los datos obtenidos en los perfiles de TRFLP, se calculó la diversidad con el índice de Shannon ponderado considerando el número de TRFs como una medida de la riqueza y la fluorescencia asociada a cada TRF como su abundancia relativa ponderando por la distancia entre los TRFs. Cabe destacar que los TRFs no son una medida de las especies de las comunidades bacterianas, ya que más de un tipo bacteriano podría poseer el mismo fragmento, solo se considera de esta forma con fines operacionales.

Para calcular si existen diferencias estadísticamente significativas en la diversidad de los cuatro tipos de comunidades bacterianas en estudio, las 18 muestras de cada tipo se consideraron como réplicas biológicas (i.e. comunidades bacterianas de los talos en renoval y arenal y comunidades bacterianas de los sustratos en renoval y arenal). La diversidad promedio para cada tipo de comunidad se muestra en la Tabla 5. Luego se realizó un análisis de ANOVA de una vía y un post-test de Tukey para comparar

los promedios entre los grupos, obteniéndose que los índices de diversidad son significativamente diferentes entre todos los grupos ( $p < 0,0001$ ) (Figura 12).

**Tabla 5.** Índice de diversidad de Shannon ponderado para cada tipo de comunidad bacteriana. Se incluyen los promedios  $\pm$  la desviación estándar en cada caso.

Grupo (n=18)	Promedio $H'_w$
Talos renoval	0,592 $\pm$ 0,045
Talos arenal	0,488 $\pm$ 0,059
Sustratos renoval	0,699 $\pm$ 0,043
Sustratos arenal	0,807 $\pm$ 0,039



**Figura 12.** Índice de diversidad de Shannon ponderado de las comunidades bacterianas de cada tipo. Tr: Talos renoval; Ta: Talos arenal; Sr: Sustratos renoval; Sa: Sustratos arenal.

## 5. Discusión

Clásicamente, se define un líquen como la relación simbiótica entre un hongo liquenizable y un componente fotosintético (alga y/o cianobacteria), sin embargo, recientemente dicha visión se ha visto cuestionada dado que se ha identificado un potencial nuevo simbiote correspondiente a levaduras basidiomicetes (Spribille *et al.*, 2016). Además, se ha observado que la comunidad bacteriana que se estructura sobre el talo liquénico cumpliría roles fundamentales en dicha simbiosis como aporte de nutrientes, defensa contra depredadores, entre otros (Aschenbrenner *et al.*, 2016). Estos hallazgos contribuyen con la noción de que las comunidades de microorganismos asociadas a los líquenes podrían explicar por qué los líquenes sintetizados *in vitro* a partir de ascomicetes y fotobiontes cultivados axénicamente, desarrollan sólo capas rudimentarias de corteza (Spribille *et al.*, 2016). En este trabajo, con el fin de determinar los factores que influyen sobre la estructura y diversidad de esta comunidad en un contexto ambiental determinado por la presencia o ausencia de cobertura arbórea, se estudió la diversidad de los componentes simbióticos del cianolíquen terrícola del género *Peltigera* (i.e. hongo ascomicete y cianobacteria) y su relación con la comunidad bacteriana asociada directamente al talo y la comunidad del sustrato sobre el que crece el líquen (i.e. suelo).

### 5.1. Simbiontes clásicos de los líquenes

La identificación de los componentes de los líquenes basada en caracteres morfológicos representa una dificultad debido a la existencia de especies crípticas, las cuales no poseen características morfológicas y químicas diferenciadoras debido a la

alta variedad intra-específica e inter-específica, lo que dificulta su identificación y asignación taxonómica (Lumbsch y Leavitt, 2011; Miadlikowska y Lutzoni, 2000, 2004). Por esta razón, la identificación de los simbioses se realiza mediante marcadores moleculares, que por lo demás, es el único tipo de herramienta que permiten identificar el fotobionte presente en estos organismos. Los marcadores utilizados corresponden a genes conservados con valor taxonómico y filogenético, por lo que son adecuados para la identificación de los pares simbióticos. Para el componente fúngico se han utilizado como marcadores moleculares los genes ribosomales del rRNA 18S y del rRNA 28S (que codifican para los RNA de las subunidades pequeña y grande de los ribosomas de eucariontes, respectivamente) (Miadlikowska y Lutzoni, 2004) y los espaciadores transcritos intergénicos del operón ribosomal (ITS) (Summerfield *et al.*, 2002). Por su parte, para la identificación del cianobionte normalmente se usan marcadores moleculares como el gen del rRNA 16S (subunidad pequeña del RNA ribosomal bacteriano) y la región *rbclX* (la cual incluye los últimos 82 aminoácidos de la subunidad mayor de la RUBISCO, un gen putativo de una chaperona y dos regiones espaciadoras intergénicas) (O'Brien *et al.*, 2005). En el presente trabajo se usaron los marcadores rRNA 28S para hongo y *rbclX* para cianobacteria (Han *et al.*, 2009). La utilización de esta aproximación permitió distinguir 7 haplotipos de micobiontes y 6 de cianobiontes en el área de estudio que se encuentra en el valle del río Leones, región de Aysén.

Los árboles filogenéticos conseguidos para ambos simbioses se conciben con estudios anteriores y más exhaustivos, que indican que tanto los hongos liquenizados del género *Peltigera* (Miadlikowska y Lutzoni, 2000, 2004) como las cianobacterias del género *Nostoc* (O'Brien *et al.*, 2013; Rikkinen, 2013) tienen un origen monofilético.

### 5.1.1. Micobionte

Del muestreo realizado a 36 especímenes recolectados en los alrededores del río Leones, se identificaron 7 OTUs utilizando el marcador molecular para el gen del rRNA 28S. La reconstrucción filogenética de los micobiontes se realizó en conjunto con representantes del género *Peltigera* provenientes del hemisferio norte, algunos del hemisferio sur (Miadlikowska y Lutzoni, 2000; 2004) y los haplotipos descritos últimamente para zonas del sur de Chile (Zúñiga *et al.*, 2015). Seis de los haplotipos encontrados en este Seminario de Título ya han sido reportados en el sur de Chile.

A pesar de varios intentos para amplificar el espaciador transcrito intergénico (ITS), que ha sido propuesto como el marcador de DNA universal para hongos (Schoch *et al.*, 2012), no fue posible obtener secuencias de alta calidad necesarias para un análisis filogenético. En el género *Peltigera*, corridas mono-nucleotídicas son comunes en la región ITS (Miadlikowska *et al.*, 2003) y se conoce que causan problemas en la secuenciación mediante el método de Sanger (Kircher y Kelso, 2010), por lo que se utilizó el gen rRNA 28S a pesar de no ser el marcador de mayor resolución disponible.

La secuenciación del marcador rRNA 28S solo indicó miembros bipartitos del género *Peltigera*, ajustándose a la distribución biogeografía para el género dado que no se han registrado especímenes tripartitos en esta región (Martínez *et al.*, 2003; Quilhot *et al.*, 2012; Ramírez-Fernández *et al.*, 2013; Zúñiga *et al.*, 2015).

Existen pocos estudios sobre la diversidad de líquenes del género *Peltigera* en la región de Aysén, lugar de procedencia de las muestras (Martínez *et al.*, 2003; Quilhot *et al.*, 2012; Zúñiga *et al.*, 2015). De las especies identificadas, *P. ponojensis* se describió por primera vez en trabajos previos de nuestro laboratorio realizados en el Parque Natural Karukinka (Región de Magallanes) y la Reserva Nacional de Coyhaique, donde existe una gran diversidad de líquenes, pero aún son poco estudiados (Ramírez-

Fernández *et al.*, 2013; Zúñiga *et al.*, 2015). Por el contrario, y debido probablemente a su poca abundancia, no se encontraron otras 8 especies de este género descritas previamente en la región de Aysén mediante identificaciones morfológicas (Quilhot *et al.*, 2012).

En el sitio de estudio, la mayor diversidad de haplotipos se encontró en el renoval de Ñirre, en contraste con el sitio arenoso sin cobertura arbórea. Esto es congruente con la literatura (Leppik *et al.*, 2013; Ramírez-Fernández *et al.*, 2013; Zúñiga *et al.*, 2015) donde se observa que en sitios sin perturbaciones y con bosques nativos jóvenes y maduros, existe la mayor diversidad de especies de líquenes (Fedrowitz *et al.*, 2012). En relación a los haplotipos encontrado, el más abundante fue M5 (n=6), el cual está relacionado con el linaje de *P. canina* que ha sido descrito en las regiones de Aysén y Magallanes (Zúñiga *et al.*, 2015) asociado principalmente a bosques de *N. pumilio*. Le siguen en abundancia los haplotipos M4, M2 y M1 relacionados con las especies *P. rufescens*, *P. extenuata* y *P. ponojensis* reportándose en la literatura en las regiones de Aysén y Magallanes asociados principalmente a ambientes abiertos como praderas (M4 y M1) y laderas volcánicas (M2) (Zúñiga *et al.*, 2015). Especies pertenecientes al linaje de *P. neckeri* (relacionada con M7, n=1) y del linaje de *P. hymenina* (relacionada a M8, n=1) tienen escasos reportes en América del Sur (Quilhot *et al.*, 2012; Martínez *et al.*, 2003) siendo comúnmente definidos como circumpolares (Martínez *et al.*, 2003), pero recientemente se ha confirmado su presencia en la región de Aysén y Magallanes asociados a bosques de *N. pumilio* (Zúñiga *et al.*, 2015). De todos los haplotipos identificados, sólo M9 (n=1) no se relacionó directamente con ninguna de las especies registradas en la base de datos y, si además consideramos la dificultad para identificarla morfológicamente de acuerdo a los caracteres consideradas en las claves taxonómicas, se sugiere que podría corresponder a una nueva especie.

Por otro lado, en el sitio del arenal, que no posee cobertura arbórea, se identificaron los haplotipos M1 (n=2) relacionado con *P. ponojensis* y M4 (n=16) relacionado con *P. rufescens*. La presencia de ambas especies en este sitio altamente arenoso, de baja retención hídrica y expuesto a radiación debido a la ausencia de cobertura arbórea, coincide con el hábitat descrito en la literatura (Brodo *et al.*, 2001). El hábitat de *P. rufescens* es suelo seco, arenoso y usualmente calcáreo, especialmente al costado de caminos o espacios abiertos y siempre expuesta completamente al sol. Representantes de esta especie ya han sido descritos en América del sur (Martínez *et al.*, 2003) y específicamente en Chile para la región de Aysén, en suelo y asociado a musgo (Quilhot *et al.*, 2012; Zúñiga *et al.*, 2015), y Magallanes, en praderas y asociado a bosques de Lenga (Zúñiga *et al.*, 2015). Sin embargo, la especie *P. ponojensis* solo ha sido reportada recientemente en trabajos de nuestro laboratorio en praderas y asociado a bosque nativo de Lenga (Zúñiga *et al.*, 2015), y su hábitat, descrito principalmente en el hemisferio norte, corresponde a suelo desnudo, expuesto y seco, a veces asociado a musgo (Brodo *et al.*, 2001). Cabe destacar que, a excepción de los trabajos previos del laboratorio en el que se utilizaron marcadores moleculares, los métodos para la identificación de las especies de líquenes de América del Sur se basan principalmente en la caracterización morfológica, por lo que es posible que exista una subestimación de la diversidad de líquenes para esta zona geográfica (Lücking *et al.*, 2014; Moncada *et al.*, 2014a, b).

Los valores del índice de diversidad ponderado por la distancia genética indican que la diversidad de ambos componentes simbióticos es mayor en el caso del renoval de Ñirre que en ausencia de cobertura arbórea, sugiriendo que a pesar de que estos líquenes no crecen sobre árboles, sí se ven beneficiados por éstos en la medida que los protege frente a radiación, proporcionándoles nutrientes y humedad (McCune, 1993;





McCune *et al.*, 1997; Normann *et al.*, 2010; Kobylinski y Fredeen, 2014). Cabe destacar que, de las 18 muestras tomadas desde el renoval, se detectaron 7 haplotipos, mientras que en los resultados obtenidos por Zúñiga *et al.* (2015), en bosques maduros de Lenga en la Reserva Nacional Coyhaique y en el Parque Natural Karukinka, se reportaron 6 haplotipos en cada uno, de un total de 25 y 20 muestras respectivamente, dando luces de la alta diversidad encontrada en el renoval de Ñirre. La composición de la comunidad de cianolíquenes epífitos se ha visto que es afectada por diversos factores del sustrato, en especial, por la química de la corteza (Rikkinen, 2015). A pesar de que los líquenes de este estudio son terrícolas (i.e. crecen sobre suelo), se ha observado que la hojarasca de bosques de *Nothofagus* afectan parámetros edáficos como el pH y la disponibilidad de nutrientes (Satti *et al.*, 2003), pudiendo así influenciar en las comunidades de líquenes que habitan en el suelo.

### **5.1.2 Cianobionte**

En cuanto a los cianobiontes encontrados, todos pertenecen a cianobacterias del género *Nostoc* dentro del grupo *Peltigera* definido por Rikkinen *et al.* (2002) y el clado *Nostoc* II propuesto por O'Brien *et al.* (2005). Todos los cianobiontes asociados a *Peltigera* se encuentran en este grupo según los autores, incluyendo otros simbiontes y cepas de vida libre. Llama la atención que ninguna de las secuencias de los cianobiontes de asoció con secuencias de *Nephroma*, pese a que se han encontrado previamente secuencias de cianobiontes de *Peltigera* estrechamente relacionadas con secuencias de cianobiontes de *Nephroma* (O'Brien, 2013; Zúñiga *et al.*, 2015).

Con respecto a su distribución geográfica, los cianobiontes encontrados durante esta investigación no se relacionan con ninguna de las secuencias descritas de líquenes de América del Sur para el marcador *rbclX*, sin embargo, el haplotipo C1 ya había sido

descrito exclusivamente en Sudamérica y se relacionaría con Cr2, mientras que C3 y C14 se han encontrado solo en Europa y América del Norte (Kaasalainen *et al.*, 2012) y equivaldrían a los haplotipos Cr1 y Cr6. Mientras, que las secuencias de *Nostoc* encontradas en este trabajo, no se agrupan de acuerdo al sitio (ie. renoval y arenal) y no se separan en la filogenia de aquellas secuencias provenientes de sitios de muestreo en América del Norte obtenidas desde la base de datos. Nuestros resultados parecen coincidir con los publicados por Stenroos *et al.* (2006) cuyos clados de *Nostoc* no se correlacionan con el origen geográfico de los líquenes, indicando que muchos taxa de *Nostoc* están ampliamente distribuidos a nivel mundial.

Destaca la cercana relación que se observa entre la secuencia de Cr4 y la de *Nostoc* de *G. magellanica* (Fernández-Martínez *et al.*, 2013), ya que es la única secuencia obtenida desde Chile y su hospedero es no liquénico. Se ha sugerido previamente que, a través de asociaciones simbióticas con diversos organismos, la cianobacteria estaría extendiendo su nicho ecológico (Fernández-Martínez *et al.*, 2013).

Por otro lado, es notoria la nula diversidad de cianobiontes encontrada en el sitio del arenal, siendo el único haplotipo detectado corresponde Cr1, que por lo demás es el que presenta la mayor abundancia en el renoval, lo que da cuenta de la alta capacidad de adaptación de algunos haplotipos a diversas condiciones. No se tiene certeza de los factores que determinarían el éxito de un determinado tipo de cianobacterias en un ambiente, pero podría estar determinado por la cantidad y calidad de la radiación que efectivamente llega a la cianobacteria a través de las ficobilinas y al requerimiento de agua líquida para la fotosíntesis (Lange *et al.*, 1986; Clarke *et al.*, 1993; Rikkinen, 1995).

### **5.1.3 Asociación entre los simbioses**

Para determinar si existe algún patrón filogenético de la asociación de los pares simbióticos, se enfrentaron los árboles filogenéticos de micobiontes y cianobiontes construidos mediante Inferencia Bayesiana. No se observa una relación clara entre los clados observados para cada simbiote con la relación y frecuencia de asociación entre ellos. Sin embargo, se puede observar que existen haplotipos que son más promiscuos que los demás ya que se asocian con más de un par simbiótico. Lo anterior se evidencia para el caso del micobionte M1 y M2 en renoval que se asocian con Cr5/Cr1 y Cr3/Cr1 respectivamente. Por el lado de los cianobiontes es notoria la relación del haplotipo Cr1 con una gran variedad de micobiontes, tanto en renoval como arenal, sugiriendo que este haplotipo proveería un mayor éxito ecológico para el micobionte en los hábitats estudiados. Dado que Cr1 es el único haplotipo detectado en el sitio sin cobertura arbórea, es de suponer que corresponde a un haplotipo mejor adaptado a esas condiciones. Además, el equivalente de este haplotipo para el marcador rRNA 16S se ha observado que es altamente promiscuo en otros sitios geográficos (Leiva, 2015). El micobionte de cianolíquenes tiende a ser más selectivo por la cianobacteria que a la inversa, ya que solo determinados genotipos cianobacterianos son los apropiados para el establecimiento de la simbiosis (Rikkinen, 2013; O'Brien *et al.*, 2013; Belinchón *et al.*, 2014; Magain y Sérusiaux, 2014).

Desde otra perspectiva, existen algunas asociaciones únicas, como por ejemplo la relación entre el micobionte presente en el arenal con la mayor abundancia (M4), identificado como *P. rufescens*, que se asocia específicamente con el cianobionte Cr1, lo que se puede deber a una relación exitosa para sobrevivir en ambientes con condiciones adversas. Se ha observado que cuanto menos selectivo sea un micobionte, mayor es su éxito ecológico, relacionándose también con una amplia distribución global del líquen (Orlando *et al.*, 2015). La alta frecuencia de esta relación se puede explicar

considerando que M4 presenta un gran rango de especificidad (i.e. rango taxonómico de los fotobiontes asociados), siendo descrito anteriormente asociado a una amplia variedad de cianobiontes, al menos 5 haplotipos en Zúñiga *et al.* (2015). Sin embargo, dicho estudio se realizó en un rango geográfico más amplio que el del presente trabajo, sugiriendo que, para el sitio del arenal en particular, dicho micobionte encontró al cianobionte disponible más apropiado para dicho ambiente, lo cual se ve reflejado en su gran éxito ecológico.

## **5.2. Comunidad bacteriana asociada a cianolíquenes y la presente en el sustrato subyacente**

Otro componente, que se sugiere, que participa en la relación simbiótica es la comunidad bacteriana asociada al talo liquénico. Existen diversos trabajos en donde se han intentado determinar los factores más importantes que determinan la estructura de la comunidad bacteriana asociada a los líquenes tomando en consideración la biogeografía (Cardinale *et al.*, 2008; Hodkinson *et al.*, 2012), el tipo de fotobionte (Hodkinson *et al.*, 2012) y/o la identidad del micobionte (Grube y Bates, 2009; Bates *et al.*, 2011). Además, hay evidencia de que la comunidad de plantas vasculares (St. Clair *et al.*, 2007) y el estado de conservación del bosque (Ramírez-Fernández *et al.*, 2013) tienen una fuerte influencia sobre la estructura de la comunidad liquénica, por lo que, con el fin de evaluar si la presencia de cobertura arbórea, en particular de Ñirre, influencia también la estructura y diversidad de la comunidad bacteriana asociada, se analizó la estructura de las comunidades bacterianas asociadas a líquenes terrícolas del género *Peltigera* del sector río Leones, Región de Aysén, así como la de las comunidades bacterianas presentes en el sustrato donde los líquenes crecen.

Los perfiles de TRFLP de la comunidad bacteriana muestran que la riqueza de TRFs obtenidos para las muestras de sustrato fue mayor a la obtenida desde el talo líquénico, indicando que las comunidades de talo se diferencian de aquellas presentes en el sustrato adyacente como ya se ha observado en otros trabajos (Bjelland *et al.*, 2011; Ramírez-Fernández *et al.*, 2014; Leiva *et al.*, 2016). Dicho resultado difiere de los obtenidos anteriormente en el laboratorio, donde la mayor riqueza microbiana se obtuvo en la comunidad del talo (Ramírez-Fernández *et al.*, 2013; Leiva, 2015). Sin embargo, en análisis de pirosecuenciación del gen rRNA 16S de cuatro muestras de líquenes foliosos diferentes se ha obtenido una mayor cantidad de filotipos bacterianos en el caso del sustrato (Bates *et al.*, 2011). Sin embargo, es necesario resaltar que la aproximación utilizada en este trabajo presenta un sesgo al momento de estudiar la comunidad bacteriana debido al uso de partidores específicos que no estarían representando aquellos organismos no cultivables (Donachie *et al.*, 2007). Estudios recientes han revelado la importancia de los microorganismos que no poseen representantes cultivables y que han re-estructurado el árbol de la vida, revelando una gran diversidad bacteriana (Hug *et al.*, 2016) por lo que cabe destacar que el uso de partidores específicos implica un sesgo al momento de estimar la diversidad microbiana.

Un factor importante que podría estar influenciando la comunidad sobre el talo, sería la presencia de metabolitos secundarios característicos de los líquenes (Miadlikowka y Lutzoni, 2000), algunos con propiedades antimicrobianas y alelopáticas (Manojlovic *et al.*, 2012; Lokajová *et al.*, 2014; Cernava *et al.*, 2015) que estarían seleccionando cierto grupo de bacterias desde el suelo capaces de vivir en conjunto con el líquen de manera similar a lo observado en la rizósfera de plantas, creando condiciones ambientales particulares para la sobrevivencia de grupos bacterianos específicos (Philippot *et al.*, 2013). Las bacterias que viven íntimamente asociadas al

talo liquénico lo hacen formando biopelículas' (Grube *et al.*, 2009), y estarían compuestas principalmente de alfa proteobacterias (Bates *et al.*, 2011; Cardinale *et al.*, 2008; Grube *et al.*, 2009, Hodkinson *et al.*, 2012) dentro de las cuales, los órdenes más abundantes en *Peltigera* serían *Rhizobiales* y *Sphingomonadales* (Hodkinson *et al.*, 2012; Sigurbjörnsdóttir *et al.*, 2015).

La técnica de TRFLP no permite identificar la identidad de los organismos presentes en la comunidad, sin embargo, realizando un análisis de las secuencias del gen rRNA 16S de los principales tipos bacterianos presentes en asociación con el talo conocidos por trabajos anteriores mediante secuenciación, se realizó una digestión *in silico* con las enzimas utilizadas encontrando que integrantes del género *Sphingomonas* presentan uno de los TRFs más abundante, H67, y que no se detecta en secuencias pertenecientes al género *Nostoc*, comprobando además la eficiencia de los partidores utilizados precisamente para evitar la amplificación de este organismo, ya que se sabe, es la bacteria más abundante en el talo. Además, otro fragmento de alta abundancia, H404, se podría asociar preliminarmente a especies del género *Rickettsia* y *Acidobacteria* todos pertenecientes al grupo de alfa proteobacterias, grupo encontrado en mayor abundancia en comunidades de talo mediante técnicas de secuenciación (Hodkinson *et al.*, 2012; Sigurbjörnsdóttir *et al.*, 2015).

Por otro lado, se observó que las comunidades de talo provenientes del renoval de Ñirre fueron significativamente más diversas que las muestras provenientes del arenal. La presencia de cobertura arbórea favorece la diversidad de las comunidades bacterianas asociadas al líquen, probablemente mediante la regulación de condiciones ambientales favorables para la diversidad liquénica (Fedrowitz *et al.*, 2012; Lepikk *et al.*, 2013; Ramírez-Fernández *et al.*, 2014). Considerando que los líquenes utilizados en este trabajo corresponden a asociaciones bipartitas, donde la cianobacteria se conoce por la

fijación de nitrógeno molecular, además de la actividad fotosintética, las diferencias observadas entre las comunidades bacterianas de acuerdo a la presencia de cobertura arbórea se podrían deber a que diversos factores afectan la fijación de nitrógeno en líquenes, entre ellos, la humedad, temperatura y luz (Nash, 2008b) y que a su vez, están determinados por la presencia de bosques, donde la cobertura vegetal restringe la radiación solar, y mantiene una alta humedad y regula la temperatura (Barkman, 1958; Goward y Arsenault, 2000; Kivistö y Kusinnen, 2000; Stevenson y Coxson, 2008; Radies *et al.*, 2009). A pesar de que la respiración y la fotosíntesis puede ocurrir a niveles bajos de humedad, la fijación de nitrógeno requiere un nivel de humedad más alto (Kershaw, 1985; Fritz-Sheridan y Coxson, 1988) observándose que luego de varios días de desecación, la fijación de nitrógeno se recupera lentamente luego de humedecer el talo en la mayoría de las especies (Kershaw, 1985). Con respecto a la temperatura, se ha observado que esta capacidad aumenta con el aumento de la temperatura hasta los 25-30°C, detectándose en un rango que va desde los -5°C a los 39°C. Particularmente en el sitio de estudio existe una temperatura promedio anual de 9°C con un incremento de la amplitud térmica con respecto al lado oriental de la cordillera (Cruz y Calderón, 2008), donde la presencia de cobertura arbórea estaría regulando la temperatura disminuyendo las grandes oscilaciones diarias y estacionales. Asimismo, se ha observado que otro factor limitante para la fijación de nitrógeno es la luz y que su efecto varía de acuerdo a la especie, en el caso de especies del género *Peltigera* se ha visto una depresión de la actividad durante la noche (Nash, 2008b). Una potencial causa corresponde a que la fijación de nitrógeno requiere productos fotosintéticos (Rai, 2002) donde la presencia de una regulación de la radiación que llega al líquen por parte de la cobertura arbórea estaría afectando esta capacidad fijadora. Es de suponer que esta función en particular la realiza la cianobacteria en simbiosis, sin embargo, se ha sugerido que, en este tipo de

líquenes bipartitos, la principal función de la cianobacteria sería realizar fotosíntesis, quedando la fijación de nitrógeno relegada a un segundo plano. Es por esta razón que se propone que la comunidad bacteriana asociada al talo liquénico suplementaría esta función, en particular, mediante la presencia de diazótrofos de vida libre.

Cabe recordar que la amplificación realizada para identificar la comunidad bacteriana asociada al talo y al sustrato evita la amplificación de este tipo de bacterias, por lo que futuros estudios enfocados a la comparación de diversidad entre las cianobacterias en simbiosis y las de vida libre asociadas al talo y al sustrato serían muy interesantes para dilucidar el papel de estos gremios en la fijación de nitrógeno.

Finalmente, como se observó en el presente trabajo, y como ha sido revisado por Aschenbrenner *et al.* (2016), existe un bacterioma específico asociado al talo liquénico, que se diferencia de la microbiota bacteriana presente en el sustrato adyacente a los líquenes, cumpliendo funciones particulares en la asociación y corroborando la noción de que el líquen consiste en una simbiosis multi-especie. Mediante enfoques multi-ómicos, existe evidencia de una contribución funcional del bacterioma al meta-organismo liquénico completo (Sigurbjörnsdóttir *et al.*, 2016), mientras factores bióticos y abióticos influyen adicionalmente la estructura de la comunidad bacteriana, como se observó con la presencia de cobertura arbórea. Por lo tanto, se ha propuesto que el talo liquénico ha evolucionado para funcionar como un micro ecosistema capaz de seleccionar los organismos que le permitan un mayor éxito ecológico (Aschenbrenner *et al.*, 2016; Leiva *et al.*, 2016).



## 6. Conclusiones

En este trabajo se identificaron 7 haplotipos de micobiontes pertenecientes al género *Peltigera* y 6 de cianobiontes del género *Nostoc* en dos ambientes chilenos poco estudiados en cuanto a la diversidad liquénica, un renoval de Ñirre (renoval) y un suelo arenoso aledaño (arenal). De los micobiontes encontrados, 6 ya han sido descritos para el sur de Chile y 1 correspondería a una nueva especie. Por su parte, todos los haplotipos de cianobiontes encontrados en este estudio se asociaron con especies de *Nostoc* ya descritas principalmente para el hemisferio norte.

La mayor diversidad de ambos componentes simbióticos se observó en el renoval en comparación al arenal. Asimismo, las comunidades bacterianas asociadas a estos líquenes se diferenciaron de aquellas presentes en los sustratos subyacentes. La diversidad de estas comunidades también se vio afectada por la ausencia de cobertura arbórea, siendo el factor que afecta en mayor medida a la estructuración de estas comunidades la presencia o ausencia de cobertura arbórea por sobre la identidad de los componentes simbióticos.

## 7. Bibliografía

- Ahmadjian V. 1995. Lichens are more important than you think. *Bioscience*. 45: 123-124.
- Altschul S., Gish W., Miller W., Myers E. y Lipman D. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. 215: 403-410.
- Aragón G., Martínez I., Izquierdo P., Belinchón R. y Escudero A. 2010. Effects of forest management on apiphytic lichen diversity in Mediterranean forests. *Applied Vegetation Science*. 13: 183-194.
- Aschenbrenner I.A., Cernava T., Berg G. y Grube M. 2016. Understanding microbial multi-species symbioses. *Frontiers in Microbiology*. 7:180.
- Barkman J.J. 1958. Chapter II. En *Phytosociology and ecology of cryptogamic epiphytes, including a taxonomic survey and description of their vegetation units*. VanGorcum y Co. Ltd., Assen, Netherland.
- Bates S.T., Cropsey G.W.G., Caporaso J.G., Knight R. y Fierer N. 2011. Bacterial communities associated with the lichen symbiosis. *Applied and Environmental Microbiology*. 77: 1309-1314.
- Beckett R.P., Minibayeva F.V., Vylegzhanina N.N. y Tolpysheva T. 2003. High rates of extracellular superoxide production by lichens in the suborder Peltigerineae correlate with indices of high metabolic activity. *Plant, Cell & Environment*. 26: 1827-1837.
- Beckett R.P., Kranner I. y Minibayeva F.V. 2008. Stress physiology and the symbiosis. En Nash T.H. (ed.), *Lichen Biology*. Segunda edición. pp: 134-151. Cambridge: Cambridge University Press.
- Belinchón R., Yahr R. y Ellis C.J. 2014. Interactions among species with contrasting dispersal modes explain distributions for epiphytic lichens. *Ecography*. 37: 1-7.
- Benson D., Karsch-Mizrachi I., Lipman D., Ostell J. y Sayers E. 2011. GenBank. *Nucleic Acids Research*. 39: 23-27.
- Bjelland T., Grube M., Hoem S., Jorgensen S.L., Daae F.L., Thorseth I.H. y Øvreas, L. 2011. Microbial metacommunities in the lichen-rock habitat. *Environmental Microbiology Reports*. 3: 434-443.
- Boc A., Diallo A.B. y Makarenkov V. 2012. T-REX: a web server for inferring, validating and visualizing phylogenetic trees and networks. *Nucleic Acids Research*. 40: 573-579.
- Boustie J. y Grube M. 2005. Lichens - a promising source of bioactive secondary metabolites. *Plant Genetic Resources*. 3: 273-287.
- Bray J. y Curtis J. 1957. An ordination of the upland forest communities of southern Wisconsin. *Ecological Monographs*. 27: 325-349.
- Brodo I.M., Sharnoff S.D. y Sharnoff S. 2001. *Lichen of North America*. Primera edición. New Heaven and London: Yale University Press.
- Büdel B. y Scheidegger C. 2008. Thallus morphology and anatomy. En Nash T.H. (ed.), *Lichen Biology*. Segunda edición. pp: 40-68. Cambridge: Cambridge University Press.
- Büdel B., Darienko T., Deutschewitz K., Dojani S., Friedl T., Mohr K.I., Salisch M., Reisser W. y Weber B. 2009. Southern African biological soil crusts are ubiquitous and highly diverse in drylands, being restricted by rainfall frequency. *Microbial Ecology*. 57: 229-247.

- Cardinale M., Puglia A.M. y Grube M. 2006. Molecular analysis of lichen-associated bacterial communities. *FEMS Microbiology Ecology*. 57: 484-495.
- Cardinale M., De Castro J.V., Müller H., Berg G. y Grube M. 2008. *In situ* analysis of the bacterial community associated with the reindeer lichen *Cladonia arbuscula* reveals predominance of Alphaproteobacteria. *FEMS Microbiology Ecology*. 66: 63-71.
- Cardinale M., Grube M., De Castro J.V., Muller H. y Berg G. 2012(a). Bacterial taxa associated with the lung lichen *Lobaria pulmonaria* are differentially shaped by geography and habitat. *FEMS Microbiology Letters*. 329: 111-115.
- Cardinale M., Steinová J., Rabensteiner J., Berg G. y Grube M. 2012(b). Age, sun and substrate: triggers of bacterial communities in lichens. *Environmental Microbiology Reports*. 4: 23-28.
- Casquilho J., Neves M. y Rego F. 1997. Extensions of the Shannon function and the equilibria of proportions an application to the land mosaic. *Instituto Superior de Agronomia*. 46: 77-99.
- Cernava T., Müller H., Aschenbrenner I.A., Grube M. y Berg G. 2015. Analyzing the antagonistic potential of the lichen microbiome against pathogens by bridging metagenomic with culture studies. *Frontiers in Microbiology*. 6: 1-11.
- Chen J., Blume H.P. y Beyer L. 2000. Weathering of rocks induced by lichen colonization - a review. *Catena*. 39: 121-146.
- Clarke A.K., Soitamo A., Gustafsson P. y Oquist G. 1993. Rapid interchange between two distinct forms of cyanobacterial photosystem II reaction center protein D1 in response to photoinhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 90: 9973-9977.
- Cruz C. y Calderón J. 2008. *Guía Climática Práctica*. Dirección Meteorológica de Chile. pp: 86.
- Darriba D., Taboada G.L., Doallo R. y Posada D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*. 9: 772.
- Donachie S., Foster J., y Brown M. 2007) Culture clash: challenging the dogma of microbial diversity. *ISME Journal*. 1: 97-99.
- Dunbar J., Ticknor L. y Kuske C. 2001. Phylogenetic specificity and reproducibility and new method for analysis of terminal restriction fragment profiles of 16S rRNA genes from bacterial communities. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 190-197.
- Favero-Longo S., Cannone N., Worland R., Convey P., Piervittori R. y Guglielmin M. 2011. Changes in lichen diversity and community structure with fur seal population increase on Signy Island, South Orkney Islands. *Antarctic Science*. 23: 65-77.
- Fedrowitz K., Kuusinen M. y Snäll T. 2012. Metapopulation dynamics and future persistence of epiphytic cyanolichens in a European boreal forest ecosystem. *Journal of Applied Ecology*. 49: 493-502.
- Fernández-Martínez M.A., de los Ríos A., Sancho L.G., y Pérez-Ortega S. 2013. Diversity of Endosymbiotic *Nostoc* in *Gunnera magellanica* (L) from Tierra del Fuego, Chile. *Microbial Ecology*. 66: 335-350.
- Friedl T. y Büdel B. 2008. Photobionts. En Nash T.H. (ed.), *Lichen Biology*. Segunda edición. pp: 9-26. Cambridge: Cambridge University Press.
- Fritz-Sheridan R.P. y Coxson D.S. 1988. Nitrogen fixation on the tropical volcano, La Soufrière (Guadeloupe): the interaction of temperature, moisture, and light with net photosynthesis and nitrogenase activity in *Stereocaulon virgatum* and response to periods of insolation shock. *The Lichenologist*. 20: 63-81.



- Glew K.A. 1997. Do vascular plant communities influence the structure of alpine lichen communities? En Türk R. y Zorer R. (eds.), Progress and problems in lichenology in the nineties. pp: 177-194. Bibliotheca Lichenologica. Berlin, Germany: J. Cramer.
- Goffinet B., Miadlikowska J. y Goward T. 2003. Phylogenetic inferences based on nrDNA sequences support five morphospecies within the *Peltigera didactyla* complex (lichenized Ascomycota). *The Bryologist*. 106: 349-364.
- González I., Ayuso-Sacido A., Anderson A. y Genilloud O. 2005. Actinomycetes isolated from lichens: evaluation of their diversity and detection of biosynthetic gene sequences. *FEMS Microbiology Ecology*. 54: 401-415.
- Goward T. y Arsenault A. 2000. Cyanolichens and conifers: implications for global conservation. *Snow Landscape Research*. 75:303-318.
- Grube M. y Berg G. 2009. Microbial consortia of bacteria and fungi with focus on the lichen symbiosis. *Fungal Biology Reviews*. 23: 72-85.
- Grube M., Cernava T., Soh J., Fuchs S., Aschenbrenner I., Lassek C., Wegner U., Becher D., Riedel-K., Sensen C.W. y Berg G. 2015. Exploring functional contexts of symbiotic sustain within lichen-associated bacteria by comparative omics. *The ISME Journal*. 9: 412-424.
- Guiasu R. y Guiasu S. 2003. Conditional and weighted measures of ecological diversity. *International Journal of Uncertainty, Fuzziness and Knowledge-Based Systems*. 11: 283-300.
- Guindon S. y Gascuel O. 2003. A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood. *Systematic Biology*. 52: 696-704.
- Hall T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 41: 95-98.
- Hammer Ø., Harper D. y Ryan P. 2001. PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*. 4: 1-9.
- Han D., Fan Y. y Hu Z. 2009. An evaluation of four phylogenetic markers in *Nostoc*: Implications for cyanobacterial phylogenetic studies at the intrageneric level. *Current Microbiology*. 58: 170-176.
- Henckel P.A. y Plotnikova T.T. 1973. Nitrogen-fixing bacteria in lichens. *Izvestiya Akademii Nauk SSSR Seriya Biologicheskaya*. 6: 807-813.
- Henckel P.A. y Yuzhakova L.A. 1936. On the role of *Azotobacter* in the lichen symbiosis. *Izvestiya Biologicheskogo Instituta Permskom Gosudarstvennom Universitete*. 10: 9-10.
- Hitch C.J.B., Fletcher P.W., James P.W. y Purvis O.W. 2009. The lichens of Great Britain and Ireland. Natural History Museum Publications, London, U.K. *Peltigera*. 664-674.
- Hodkinson B.P. y Lutzoni F. 2009. A microbiotic survey of lichen-associated bacteria reveals a new lineage from the Rhizobiales. *Symbiosis*. 49: 163-180.
- Hodkinson B.P., Gottel N.R., Schadt C.W. y Lutzoni F. 2012. Photoautotrophic symbiont and geography are major factors affecting highly structured and diverse bacterial communities in the lichen microbiome. *Environmental Microbiology*. 14: 147-161.
- Honegger R. 2008. Morphogenesis. En Nash T.H. (ed.), *Lichen Biology*. Segunda edición. pp: 69-93. Cambridge: Cambridge University Press.
- Hug L.A., Baker B.J., Anantharaman K., Brown C.T., Probst A.J., Castelle C.J., Butterfield C.N., Hemsdorf A.W., Amano Y., Ise K., Suzuki Y., Dudek N., Relman D.A., Finstad K.M., Amundson R., Thomas B.C. y Banfield J.F. 2016. A new view of tree of life. *Nature Microbiology*. 1: 16048.

- Kaasalainen U., Fewer D.P., Jokela J., Wahlsten M., Sivonen K. y Rikkinen J. 2012. Cyanobacteria produce a high variety of hepatotoxic peptides in lichen symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 109: 5886-5891.
- Kershaw K.A. 1985. *Physiological ecology of lichens*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Kircher M. y Kelso J. 2010. High-throughput DNA sequencing – concepts and limitation. *BioEssays*. 32: 524-536.
- Kivistö L. y Kuusinen M. 2000. Edge effects on the epiphytic lichen flora of *Picea abies* in middle boreal Finland. *The Lichenologist*. 32: 387-398.
- Kobyliniski A. y Fredeen A.L. 2014. Vertical distribution and nitrogen content of epiphytic macrolichen functional groups in sub-boreal forests of central British Columbia. *Forest Ecology and Management*. 329: 118-128.
- Lange O.L., Reichenberger H., Meyer A. 1995. High thallus water content and photosynthetic CO<sub>2</sub> exchange of lichens—laboratory experiments with soil crust species from local xerothermic steppe formations Franconia, Germany. En Daniels F.J.A., Schulz M. y Peine J. (eds), *Flechten Follmann—contributions to lichenology in honour of Gerhard Follmann*. Geobotanical and phytotaxonomical study group. pp: 139-153. Botanical Institute University of Cologne, Cologne.
- Lättman H., Lindblom L., Mattsson J., Milberg P., Skage M. y Ekman S. 2009. Estimating the dispersal capacity of the rare lichen *Cliostomum corrugatum*. *Biological Conservation*. 142: 1870-1878.
- Leiva D. 2015. Relación de la producción de metabolitos y la actividad fenoloxidasas de líquenes del género *Peltigera* con sus comunidades bacterianas asociadas. Tesis de Magister, Universidad de Chile, Chile.
- Leiva D., Clavero-León C., Carú M. y Orlando J. 2016 Intrinsic factors of *Peltigera* lichens influence the structure of the associated soil bacterial microbiota. *FEMS Microbiology Ecology*. 92: fiw178.
- Leppik E., Jüriado I., Suija A. y Liira J. 2013. The conservation of ground layer lichen communities in alvar grasslands and the relevance of substitution habitats. *Biodiversity and Conservation*. 22: 591-614.
- Liba C.M., Ferrara F.I.S., Manfio G.P., Fantinatti-Garboggini F., Albuquerque R.C. y Pavan C. 2006. Nitrogen-fixing chemo-organotrophic bacteria isolated from cyanobacteria-deprived lichens and their ability to solubilize phosphate and to release amino acids and phyto-hormones. *Journal of Applied Microbiology*. 101: 1076-1086.
- Lisov A., Zavarzina A.G., Zavarzin A. Demin V. y Leontievsky A. 2012. Dimeric and monomeric laccases of soil-stabilizing lichen *Solorina crocea*: Purification, properties and reactions with humic acids. *Soil Biology and Biochemistry*. 45: 161-167.
- Lokajová V., Bačkorová M. y Bačkor M. 2014. Allelopathic effects of lichen secondary metabolites and their naturally occurring mixtures on cultures of aposymbiotically grown lichen photobiont *Trebouxia erici* (Chlorophyta). *South African Journal of Botanic*. 93: 86-91.
- Louwhoff S.H.J.J. 2009. *Peltigera*. En *Flora of Australia*. Volumen 57, quinta edición. Australian Biological Resources Study.
- Lücking R., Dal-Forno M., Sikaroodi M., Gillevet P.M., Bungartz F., Moncada D., Yáñez-Ayabaca A., Chaves J.L., Coca L.F. y Lawrey J.D. 2014. A single macrolichen constitutes hundreds of unrecognized species. *Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America*. 111: 11091-11096.
- Lumbch H.T. y Leavitt S.D. 2011. Goodbye morphology? A paradigm shift in the delimitation of species in lichenized fungi. *Fungal Diversity*. 50: 59-72.

- Lutzoni F. y Miadlikowska J. 2009. Lichens. *Current Biology*. 13: 502-503.
- Magain N. y Sérusiaux E. 2014. Do photobiont switch and cephalodia emancipation act as evolutionary drivers in the lichen symbiosis? A case study in the Pannariaceae (Peltigerales). *PLoS ONE*. 9: e89876.
- Martínez I., Burgaz A., Vitikainen O. y Escudero A. 2003. Distribution patterns in the genus *Peltigera* Willd. *The Lichenologist*. 35: 301-323.
- Manojlović N., Ranković B., Kosanić M., Vasiljević P. y Stanojković T. 2012. Chemical composition of three *Parmelia* lichens and antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of some their major metabolites. *Phytomedicine*. 19: 1166-1172.
- McCune B. 1993. Gradients in epiphyte biomass in three *Pseudotsuga-Tsuga* forests of different ages in western Oregon and Washington. *The Bryologist*. 96: 405-411.
- McCune B., Amsberry K.A., Camacho F.J., Clery S., Cole C., Emerson C., Felder G., French P., Greene D., Harris R., Hutten M., Larson B., Lesko M., Majors S., Markwell T., Parker G.G., Pendergrass K., Peterson E.B., Peterson E.T., Platt J., Proctor J., Rambo T., Rosso A., Shaw D., Turner R. y Widmer M. 1997. Vertical profile of epiphytes in a Pacific Northwest old-growth forest. *Northwest Science*. 71: 145-152.
- Miadlikowska J. y Lutzoni F. 2000. Phylogenetic revision of the genus *Peltigera* (lichen-forming Ascomycota) based on morphological, chemical, and large subunit nuclear ribosomal DNA data. *International Journal of Plant Sciences*. 161: 925-958.
- Miadlikowska J. y Lutzoni F. 2004. Phylogenetic classification of peltigeralean fungi (Peltigerales, Ascomycota) based on ribosomal RNA small and large subunits. *American Journal of Botany*. 91: 449-464.
- Miadlikowska J., Lutzoni F., Goward T., Zoller S. y Posada D. 2003. New approach to a old problem: Incorporating signal from gap-rich region of ITS and rDNA large subunit into phylogenetic analyses to resolve the *Peltigera canina* species complex. *Mycologia*. 95: 1181-1203.
- Miller M.A., Pfeiffer W. y Schwartz T. 2010. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. *Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)*. 1-8.
- Molnár K. y Farkas E. 2010. Current results on biological activities of lichen secondary metabolites: A review. *Zeitschrift für Naturforschung C*. 65: 157-173.
- Moncada B., Lücking R. y Suárez A. 2014(a). Molecular phylogeny of the genus *Sticta* (lichenized Ascomycota: Lobariaceae) in Colombia. *Fungal Diversity*. 64: 205-231.
- Moncada B., Ready B. y Lücking R. 2014(b). A phylogenetic revision of Hawaiian *Pseudocyphellaria sensulato* (lichenized Ascomycota: Lobariaceae) reveals eight new species and a high degree of inferred endemism. *The Bryologist*. 117: 119-160.
- Nash T.H. 2008(a). Introduction. En Nash T.H. (ed.), *Lichen Biology*. Segunda edición. pp: 1-8. Cambridge: Cambridge University Press.
- Nash T.H. 2008(b). Nitrogen, its metabolism and potential contribution to ecosystems. En Nash T.H. (ed.), *Lichen Biology*. Segunda edición. pp: 216-233. Cambridge: Cambridge University Press.
- Normann F., Weigelt P., Gehrig-Downie C., Gradstein S.R., Sipman H.J., Obregon A. y Bendix J. 2010. Diversity and vertical distribution of epiphytic macrolichens in lowland rain forest and lowland cloud forest of French Guiana. *Ecological Indicator*. 10: 1111-1118.
- O'Brien H.E., Miadlikowska J. y Lutzoni F. 2005. Assessing host specialization in symbiotic cyanobacteria associated with four closely related species of the lichen fungus *Peltigera*. *European Journal of Phycology*. 40: 363-378.

- O'Brien H. 2013. Another perspective on diversity of symbiotic cyanobacteria: 16S. <http://dx.doi.org/10.6084/m9.figshare.806242>.
- O'Brien H.E., Miadlikowska J. y Lutzoni F. 2013. Assessing population structure and host specialization in lichenized cyanobacteria. *New Phytologist*. 198: 557-566.
- Orlando J., Zúñiga C. y Carú M. 2015. Cianolíquenes, la elección del compañero determina el éxito de la relación. *Boletín Antártico Chileno*. 34: 13-16.
- Otálora M., Martínez I., Belinchón R., Widmer I., Aragón G., Escudero A. y Scheidegger C. 2011. Remnants fragments preserve genetic diversity of the old forest lichen *Lobaria pulmonaria* in a fragmented Mediterranean mountain forest. *Biodiversity Conservation*. 20: 1239-1254.
- Philippot L., Raaijmakers J.M., Lemanceau P. y van der Putten W.H. 2013. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Reviews Microbiology*. 11: 789-799.
- Printzen C., Fernández-Mendoza F., Muggia L., Berg G. y Grube M. 2012. Alphaproteobacterial communities in geographically distant populations of the lichen *Cetraria aculeata*. *FEMS Microbiology Ecology*. 82: 316-325.
- Quilhot W., Cuellar M., Díaz R., Riquelme F. y Rubio C. 2012. Lichens of Aisen, Southern Chile. *Gayana Botánica*. 69: 57-87.
- Radies D.N., Coxson D.S., Johnson C.J. y Konwicki K. 2009. Predicting canopy macrolichen diversity and abundance within old-growth inland temperate rainforests. *Ecology and Management*. 259: 86-97.
- Rai A.N. 2002. Cyanolichens: Nitrogen Metabolism. En *Cyanobacteria in Symbiosis*. Rai A.N., Berman B. y Rasmussen U. (eds). pp: 97-115. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Rai H., Upreti D.K. y Gupta R. 2012. Diversity and distribution of terricolous lichens as indicator of habitat heterogeneity and grazing induced trampling in a temperate alpine shrub and meadow. *Biodiversity and Conservation*. 21: 97-113.
- Ramírez-Fernández L., Zúñiga C., Méndez M., Carú M. y Orlando J. 2013. Genetic diversity of terricolous *Peltigera* cyano-lichens communities in different conservation states of native forest from Southern Chile. *International Microbiology*. 16: 243-252.
- Ramírez-Fernández L., Zúñiga C., Carú M. y Orlando J. 2014. Environmental context shapes the bacterial community structure associated to *Peltigera* cyanolichens growing in Tierra del Fuego, Chile. *World Journal Microbiology and Biotechnology*. 30: 1141-1144.
- Ricotta C., Pacini A. y Avena G. 2002. Parametric scaling from species to growth-form diversity: an interesting analogy with multifractal functions. *Biosystems*. 65: 179-186.
- Rikkinen J. 1995. What's behind the pretty colours? A study on the photobiology of lichens. *Bryobrothera*. 4: 1-239.
- Rikkinen J., Oksanen I. y Lohtander K. 2002. Lichen guilds share related cyanobacterial symbionts. *Science*. 297: 357.
- Rikkinen J. 2013. Molecular studies on cyanobacterial diversity in lichen symbioses. *MycKeys*. 6: 3-32.
- Satti P., Mazzarino M.J., Gobbi M., Funes F., Roselli L. y Fernandez H. 2003. Soil N dynamics in relation to leaf litter quality and soil fertility in north-western Patagonian forests. *Journal of Ecology*. 91: 173-181.
- Schoch C.L., Seifert K.A., Huhndorf S., Robert V., Spouge J.L., Levésque C.A., Chen W. y Fungal Barcoding Consortium. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America*. 109: 6241-6246.

- Scutari N., Bertiller M. y Carrera A. 2004. Soil-associated lichens in rangelands of north-eastern Patagonia. Lichen groups and species with potential as bioindicators of grazing disturbance. *The Lichenologist*. 36: 405-412.
- Seaward M.R.D. 2008. Environmental role of lichen. En Nash T.H. (ed.), *Lichen Biology*. Segunda edición. pp: 274-298. Cambridge: Cambridge University Press.
- Sigurbjörnsdóttir M.A., Andrésón O.S. y Vilhelmsson O. 2015. Analysis of the *Peltigera membranacea* metagenome indicates that lichen-associated bacteria are involved in phosphate solubilization. *Microbiology*. 161: 989-996.
- Sigurbjörnsdóttir M.A., Andrésón O.S. y Vilhelmsson O. 2016. Nutrient scavenging activity and antagonistic factors of non-photobiont lichen-associated bacteria: a review. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 32: 68.
- Spribile T., Tuovinen V., Resl P., Vanderpool D., Wolinski H., Aime M.C., Schneider K., Stabentheiner E., Toome-Heller M., Thor G., Mayrhofer H., Johannesson H. y McCutcheon J.P. 2016. Basidiomycete yeasts in the cortex of ascomycete macrolichens. *Science*. 353: 488-492
- St. Clair L.L., Johansen J.R., St. Clair S.B. y Knight K.B. 2007. The influence of grazing and other environmental factors on lichen community structure along an alpine tundra ridge in the Uinta Mountains, Utah. U.S.A. *Arctic, Antarctic, and Alpine Research*. 39: 603-613.
- Stenroos S., Högnabba F., Myllys L., Hyvönen J. y Thell A. 2006. High selectivity in symbiotic associations of lichenized ascomycetes and cyanobacteria. *Cladistics*. 22: 230-238.
- Stevenson S.K. y Coxson S.D. 2008. Growth responses of *Lobaria retigera* to forest edge and canopy structure in the inland temperate rainforest, British Columbia. *Ecology and Management*. 256: 618-623.
- Summerfield T., Galloway D. y Eaton-Rye J. 2002. Species of cyanolichens from *Pseudocyphellaria* with indistinguishable ITS sequences have different photobionts. *New Phytologist*. 155: 121-129.
- Tajima F. y Nei M. 1984. Estimation of evolutionary distance between nucleotide sequences. *Molecular Biology Evolution*. 1: 269-285.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M. y Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology Evolution*. 28: 2731-2739.
- Voytsekhovich A.O., Mikhailyuk T.I. y Darienko T.M. 2011. Lichen photobionts 1: biodiversity, ecophysiology and co-evolution with the mycobiont. *Algologia* 21: 3-26.
- Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A. y Lane D.J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*. 173: 697-703.
- Zúñiga C., Leiva D., Ramírez-Fernández L., Carú M. y Orlando J. 2015. Phylogenetic diversity of *Peltigera* cyanolichens and their photobionts in Southern Chile and Antarctica. *Microbes and Environments*. 30: 172-179.



8. ANEXOS

alineamiento micobiontes

Table with 80 columns and 100 rows of DNA sequence alignments. Columns are numbered 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80. Rows are labeled M1 through KM005759.

Table with 10 columns and 100 rows of DNA sequence alignments. Columns are numbered 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170. Rows are labeled M1 through AF286759.

AF286761 TCGAGTGGT TGGGAATGCA GCTCTAAATG GGTGGTAAAT TTCATCTAAA GCTAAATATT GGCCGGAGAC CGATAGCGCA CAAGTAGAGT

M1 GATCGAAAAG TGA AAAAGCAC TTTGAAAAGA GAGTTAAATA GTACGTGAAA TTGTTGAAA GGAAGCGCTT GCGGCCAGAC CTGTGCGTAG



















KC437890 AGCATTAGA ACGCATCACA CG---AATAG ACACATCTAA CCCCAGT  
KC437900 AGCATTAGA ACGCATCACA CG---AATAG ACACATCTAG CCCCAGT  
KC437914 AGCATTAGA ACGCATCACA CG---AATAG ACACATCTAA CCCCAGT  
KF142697 -----  
KJ413212 AGCATTAGA ACGCATCACA CAAGTAGTAG ACACATCTAA CCCCAGT  
KJ413204 AGCATTAGA ACGCATCACA CG---AATAG ACACATCTAA CCCCAGT  
KJ413206 AGCATTAGA ACGCATCACA CAAGTAGTAG ACACATCTAA CCCCAGT  
KJ413209 AGCATTAGA ACGCATCACA CAAGTAGTAG ACACATCTAA CCCCAGT  
KJ413210 AGCATTAGA ACGCATCACA CAAGTAGTAG ACACATCTAA CCCCAGT  
KJ413211 AGCATTAGA ACGCATCACA CAAGTAGTAG ACACATCTAA CCCCAGT  
KJ413214 AGCATTAGA ACGCATCACA CG---AATAG ACACATCTAA CCCCAGT  
KM006009 AGCATCTAGA ACGCATAACA CG---AATAG ACACATCTAA CCCCAGT  
KM006016 AGCATCTAGA ACGCATAACA CG---AATAG ACACATCTAA CCCCAGT