

UCh-FC  
MAG-B  
G 216  
C. 1



**Universidad de Chile**  
**Facultad de Ciencias**

**DIVERSIDAD DE BACTERIAS FIJADORAS DE  
NITRÓGENO ASOCIADAS A LÍQUENES:  
POTENCIALES SOCIOS EN LA INTERACCIÓN  
SIMBIÓTICA**

**Tesis presentada a la Universidad de Chile en el cumplimiento  
parcial de los requisitos para optar al grado de Magíster en Ciencias  
Biológicas.**

**JAIME ADOLFO GARCÍA SOTO**

**DIRECTORAS DE TESIS**

**Dra. Julieta Orlando  
Dra. Margarita Carú**

**Santiago-Chile  
2017**

**FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE  
INFORME DE APROBACION  
TESIS DE MAGISTER**

Se informa a la escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magister presentada por el candidato:

**JAIME ADOLFO GARCÍA SOTO**

Ha sido aprobada por la comisión Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas, en el examen de defensa de Tesis rendido el día 27 de abril del año 2017.

Directora de Tesis:

Julieta Orlando



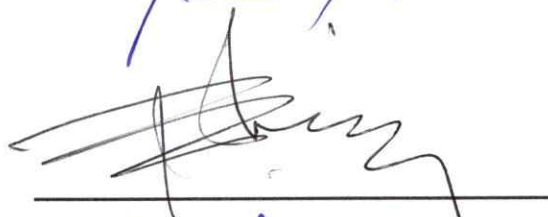
Co-directora de Tesis:

Margarita Carú



Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Francisco Chávez



Dr. Jennifer Alcaíno



*Dedicada a mi niña, Helena.*



## **RESUMEN BIOGRÁFICO**

Mi nombre es Jaime Adolfo García Soto, nací el 28 de mayo de 1989 y fui criado en el Lago Rapel, sexta Región. Soy hijo

único, mi madre se llama María Angélica y mi padre Jaime, tengo una hermosa hija de 1 año y medio llamada Helena Colomba, junto con Nicole Henríquez.

Estudí la enseñanza básica en una escuela rural, F-114 Republica de Grecia, posteriormente realicé la enseñanza media en el Liceo Ignacio Carrera Pinto. El 2008 entré a estudiar pedagogía en química y biología en la Universidad de Santiago. Desde ese entonces que mi vida ha estado ligada a la educación e investigación, desarrollando mi tesis de pregrado en el laboratorio de Microbiología Molecular del Dr. Claudio Vásquez, y actualmente mi tesis de postgrado en el laboratorio de Ecología Microbiana, donde siempre encontré apoyo de la Profe Julieta Orlando y Margarita Carú, y en donde además tuve la oportunidad de conocer y compartir con grandes personas.

He trabajado en varios centros educacionales, desde municipales a privados. Mi carrera docente se ha formado en grandes colegios, tales como, Colegio Mayor de Peñalolén y Liceo Javiera Carrera, además de trabajar como docente por 3 años en la Universidad Santo Tomas. Hoy, en una nueva etapa y con una mochila llena de conocimientos, habilidades y destrezas, me desempeño a tiempo completo en unos de los mejores colegios de Chile.

## AGRADECIMIENTOS

Primero que todo, quisiera agradecer a Dios por darme la posibilidad de cumplir una de mis metas y por haberme puesto dentro de un equipo de trabajo con grandes y valiosas personas. Agradezco a la profe Julieta Orlando, por su inmensa generosidad, amabilidad, sabiduría y acogida, por darme esa palabra de aliento cuando más todo se veía oscuro. A la profe Margarita, por creer en mí y aceptarme en su laboratorio y por esos consejos sabios, que siempre ampliaban mi conocimiento. A mi comisión evaluadora, Dr. Francisco Chávez y la Dra. Jennifer Alcaíno por sus innumerables consejos que pulieron de manera óptima esta tesis. Además, quisiera agradecer a Diego por su incansable ayuda, e innumerables consejos. También, a mi amiga María Camila por su enseñanza, su amistad, por sus palabras de aliento y por las largas conversaciones. A la Juanita, por todo el cariño entregado, y a los MicroMachines, la Liti, la Stefania, el Kike, la Cata, la Lau, la Ceci y la Vale por hacer de este tiempo, unos lindos e inolvidables 3 años. Y por último quisiera agradecer al laboratorio de genética, por prestarme en innumerables ocasiones el qPCR.

Agradezco a mi familia, mi pequeña saltamontes y la mami Nicole por su apoyo constante, gracias por confiar en mí. A mi Madre y Padre por su apoyo incondicional.

De corazón, muchas gracias.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>Tabla de Contenido</b>	<b>v</b>
<b>Índice de Figuras</b>	<b>vii</b>
<b>Índice de Tablas</b>	<b>ix</b>
<b>Abreviaturas</b>	<b>x</b>
<b>Resumen</b>	<b>xi</b>
<b>Abstract</b>	<b>xiii</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1. Los líquenes	1
1.2. Comunidades bacterianas asociadas a líquenes	3
1.3. Planteamiento del problema	6
<b>2. Hipótesis</b>	<b>8</b>
<b>3. Objetivos</b>	<b>8</b>
3.1. Objetivo General	8
3.2. Objetivos Específicos	8
<b>4. Materiales y Métodos</b>	<b>9</b>
4.1. Toma de muestras	9
4.2. Identificación molecular de los líquenes del género <i>Peltigera</i> y <i>Cladonia</i> de la Reserva Nacional Coyhaique	10
4.2.1. Amplificación por PCR de marcadores moleculares para micobionte	11
4.2.2. Análisis de los productos de PCR	12
4.2.3. Definición de OTUs y análisis filogenético de los micobiontes	12
4.3. Determinación de la estructura de bacterias fijadoras de nitrógeno en la microbiota de líquenes de los géneros <i>Peltigera</i> y <i>Cladonia</i>	13
4.3.1. Extracción del DNA desde el talo y el sustrato asociado a líquenes del género <i>Peltigera</i> y <i>Cladonia</i>	13
4.3.2. Amplificación del gen <i>nifH</i> y perfiles de T-RFLP	14
4.4. Determinación de la abundancia de bacterias fijadoras de nitrógeno	16
	<b>v</b>

en la microbiota de líquenes de los géneros <i>Peltigera</i> y <i>Cladonia</i>	
4.4.1. Clonación de genes rRNA 16S y <i>nifH</i>	17
4.4.2. Curvas de calibración	18
4.4.3. Cuantificación del gen <i>nifH</i>	18
<b>5. Resultados</b>	<b>20</b>
5.1. Identificación molecular de los líquenes del género <i>Peltigera</i> y <i>Cladonia</i> de la Reserva Nacional Coyhaique	20
5.2. Determinación de la estructura de bacterias fijadoras de nitrógeno en la microbiota de líquenes de los géneros <i>Peltigera</i> y <i>Cladonia</i>	27
5.2.1. Comparación de la estructura genética de los fijadores de nitrógeno asociados a <i>Peltigera</i> y <i>Cladonia</i>	30
5.2.2. Comparación de la estructura genética de los fijadores de nitrógeno asociados a los talos de <i>Peltigera</i> y <i>Cladonia</i>	34
5.2.3. Comparación de la estructura genética de los fijadores de nitrógeno presentes en los sustratos asociados a <i>Peltigera</i> y <i>Cladonia</i>	37
5.3. Determinación de la abundancia del gremio de bacterias fijadoras de nitrógeno en la microbiota de líquenes de los géneros <i>Peltigera</i> y <i>Cladonia</i> y en la microbiota de sus sustratos asociados	40
<b>6. Discusión</b>	<b>44</b>
6.1. Identificación molecular de los líquenes del género <i>Peltigera</i> y <i>Cladonia</i> de la Reserva Nacional Coyhaique	44
6.2. Determinación de la estructura de bacterias fijadoras de nitrógeno en la microbiota de líquenes de los géneros <i>Peltigera</i> y <i>Cladonia</i>	46
<b>7. Conclusiones</b>	<b>54</b>
<b>8. Referencias</b>	<b>55</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Sitio de muestreo, fotografías y datos de georreferenciación asociados a cada muestra de <i>Peltigera</i> en su hábitat de Coyhaique (n=25)	21
<b>Figura 2:</b> Sitio de muestreo, fotografías y datos de georreferenciación asociados a cada muestra de <i>Cladonia</i> en su hábitat de Coyhaique (n=25)	22
<b>Figura 3:</b> Árbol filogenético de las OTUs de los micobiontes	23
<b>Figura 4:</b> Árbol filogenético de las OTUs de <i>Peltigera</i>	26
<b>Figura 5:</b> Árbol filogenético de los OTUs de <i>Cladonia</i>	27
<b>Figura 6:</b> Producto de la amplificación del gen <i>nifH</i> asociado a líquenes <i>Peltigera</i>	28
<b>Figura 7:</b> Producto de la amplificación del gen <i>nifH</i> asociado a líquenes <i>Cladonia</i>	29
<b>Figura 8:</b> Análisis de componentes principales basado en los perfiles de TRFLP del gen <i>nifH</i> obtenidos a partir de las muestras de <i>Peltigera</i>	31
<b>Figura 9:</b> Análisis de componentes principales basado en los perfiles de TRFLP del gen <i>nifH</i> obtenidos a partir de las muestras de <i>Cladonia</i>	32
<b>Figura 10:</b> Índices de diversidad de Shannon de las bacterias fijadoras de nitrógeno en la microbiota líquénica y en la microbiota de los sustratos asociados	33
<b>Figura 11:</b> Perfiles de TRFLP del gen <i>nifH</i> obtenidos a partir de las muestras de talo líquénico de <i>Peltigera</i> y <i>Cladonia</i>	35
<b>Figura 12:</b> Análisis de componentes principales basado en los perfiles de TRFLP del gen <i>nifH</i> obtenidos a partir de las muestras de talo líquénico	36
<b>Figura 13:</b> Perfiles de TRFLP del gen <i>nifH</i> obtenidos a partir de las muestras de sustrato asociado a los líquenes <i>Peltigera</i> y <i>Cladonia</i>	38
<b>Figura 14:</b> Análisis de componentes principales basado en los perfiles de TRFLP del gen <i>nifH</i> obtenidos a partir de las muestras de sustrato líquénico	39



<b>Figura 15:</b> Curvas de calibración para la evaluación del número de copias del gen <i>nifH</i>	41
<b>Figura 16:</b> Curvas de calibración para la evaluación del número de copias del gen del rRNA 16S	42
<b>Figura 17:</b> Abundancia de bacterias fijadoras de nitrógeno expresada como el logaritmo decimal del número de copias de <i>nifH</i> por nanogramos de DNA genómico	43

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Oligonucleótidos utilizados en este trabajo para la amplificación de genes	11
<b>Tabla 2:</b> Análisis de similitud de los perfiles de TRFLP del gen <i>nifH</i> obtenidos a partir de las muestras de <i>Peltigera</i>	32
<b>Tabla 3:</b> Análisis de similitud de los perfiles de TRFLP del gen <i>nifH</i> obtenidos a partir de las muestras de <i>Cladonia</i>	33
<b>Tabla 4:</b> Análisis de similitud de los perfiles de TRFLP del gen <i>nifH</i> obtenidos a partir de las muestras de talo líquénico de <i>Peltigera</i> y <i>Cladonia</i>	37
<b>Tabla 5:</b> Análisis de similitud de los perfiles de TRFLP del gen <i>nifH</i> obtenidos a partir de las muestras de sustrato asociados a líquenes <i>Peltigera</i> y <i>Cladonia</i>	40

## ABREVIATURAS

% (p/v)	Porcentaje peso/volumen
6-FAM	6-Carboxifluoresceína
ANOSIM	Análisis de similitud
ANOVA	Análisis de varianza
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxinucleótido trifosfato
GPS	Sistema de posicionamiento global
LAR1	Rizobios asociados a líquenes 1
NCBI	Centro nacional para la información biotecnológica
OTU	Unidad taxonómica operacional
PCA	Análisis de componentes principales
rpm	Revoluciones por minuto
rRNA	Ácido ribonucleico ribosomal
SIMPER	Porcentaje de similitud
TRFLP	Polimorfismo del largo de los fragmentos de restricción terminales

## RESUMEN

La simbiosis líquénica ha sido ampliamente estudiada y descrita, sin embargo, la evidencia reciente sugiere que ésta es compleja y que los miembros de la comunidad bacteriana que se encuentra asociada al líquen podría aportar con nuevas funciones a esta interacción simbiótica. En este trabajo se planteó como hipótesis que la microbiota de clorolíquenes bipartitos (*Cladonia*), en comparación a la de cianolíquenes bipartitos (*Peltigera*), presenta una mayor diversidad de bacterias fijadoras de nitrógeno. En el sitio de estudio, Reserva Nacional Coyhaique, se encontró un mayor número de filotipos del género *Cladonia* (11) que del género *Peltigera* (6), donde además, se registró la presencia de una especie de *Cladonia* no descrita previamente en América del sur.

La estructura del gremio de fijadores de nitrógeno en la microbiota de los líquenes y la microbiota de sus sustratos asociados, se determinó mediante la técnica del polimorfismo en el largo de los fragmentos terminales de restricción (TRFLP) del gen *nifH*. Los análisis multivariados muestran que las bacterias fijadoras de nitrógeno asociadas a ambos tipos de líquen se distinguieron de aquellas presentes en la microbiota de sus sustratos. Asimismo, la estructura de las bacterias fijadoras de nitrógeno presentes en la microbiota de los cianolíquenes fue distinta a la de los clorolíquenes.

La cuantificación del gremio de fijadores de nitrógeno mediante PCR en tiempo real reveló que su abundancia fue considerablemente mayor en la microbiota asociada a los talos de los cianolíquenes *Peltigera* que de los clorolíquenes *Cladonia*, probablemente debido a la presencia del cianobionte en los primeros. Sin embargo, la diversidad de este gremio bacteriano calculada mediante el índice de Shannon confirma la propuesta de que los clorolíquenes presentan una mayor diversidad de bacterias fijadoras de nitrógeno que los cianolíquenes.

## ABSTRACT

Lichen symbiosis has been extensively studied and described, however, recent evidence suggests that lichen symbiosis is complex and that members of the bacterial community associated to the lichen could contribute with new functions to this symbiotic interaction. In this work, we hypothesized that the microbiota of bipartite chlorolichens (*Cladonia*), in comparison to that of bipartite cyanolichens (*Peltigera*), has a greater diversity of nitrogen-fixing bacteria. In the study site, Coyhaique National Reserve, a higher number of phylotypes of the genus *Cladonia* (11) than of the genus *Peltigera* (6) was found, and in addition, a *Cladonia* species non-previously-described in South America was registered.

The structure of the nitrogen fixer guild in the lichen microbiota and the microbiota of its associated substrates was determined by restriction fragment length polymorphism (TRFLP) of the *nifH* gene. The multivariate analyses showed that the nitrogen-fixing bacteria associated to both types of lichen were distinguishable from those present in the microbiota of their substrates. Likewise, the structure of the nitrogen-fixing bacteria present in the microbiota of cyanolichens was different from that of chlorolichens.

The quantification of the nitrogen fixer guild by real-time PCR revealed that its abundance was considerably higher in the microbiota associated to the thalli of the *Peltigera* cyanolichenes than to the *Cladonia* chlorolichens, probably due to the presence of the cyanobiont in the former. However, the diversity of this

bacterial guild calculated using the Shannon index confirms the proposal that chlorolichens present a higher diversity of nitrogen-fixing bacteria than cyanolichens.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Los líquenes.

Los líquenes se definen como asociaciones simbióticas entre un hongo (micobionte) y un socio fotosintético (fotobionte), el cual es un alga verde (eucariota) o una cianobacteria (procariota) en el caso de las interacciones bipartitas, o ambas en el caso de las interacciones tripartitas. Recientemente, además de los simbioses clásicos que conforman el talo líquénico un grupo de investigadores derribó el paradigma de un solo hongo para un líquen, describiendo la inesperada presencia de levaduras inmersas en la corteza del líquen como miembros estables de la simbiosis líquénica (Spribille *et al.*, 2016).

Los líquenes son pioneros en la colonización de diversos ambientes y se desarrollan en distintos sustratos, como suelos, piedras, o sobre las plantas viviendo como organismos epífitos, entre otros (Petrini *et al.*, 1990). Estos organismos representan una de las formas de vida más exitosa, en la cual las funciones de los miembros clásicos de la asociación simbiótica son bien conocidas: el micobionte provee al fotobionte de un anclaje firme, protegiéndolo de la erosión y la desecación, mientras que el fotobionte está encargado de la producción de materia orgánica mediante la fotosíntesis (Ahmadjian, 1993; Nash, 2008). En el caso particular que el fotobionte sea una cianobacteria, ésta aporta además con su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico (Nash, 2008). En el caso de las asociaciones tripartitas, hay una clara separación de las



funciones de los fotobiontes, donde el cianobionte fija principalmente nitrógeno y el clorobionte fija carbono (Cornejo y Scheidegger, 2013). En el caso de las asociaciones bipartitas, la cianobacteria de los cianolíquenes (hongocianobacteria) es capaz de realizar ambos procesos: fijar carbono y nitrógeno. Sin embargo, en los clorolíquenes bipartitos, el alga verde proporciona los carbohidratos productos de la fotosíntesis al micobionte, pero no es capaz de fijar nitrógeno (Belnap, 2001; Rai, 2002). En este último caso, se propone que las bacterias que viven asociadas a los talos liquénicos podrían aportar nitrógeno a la asociación a través de los fijadores de nitrógeno y sustentar así la nutrición del líquen.

Entre las bacterias, existen varias que son capaces de colonizar hábitats muy diversos y establecer numerosas interacciones mutualistas con macro y microorganismos. Hay muchos ejemplos de este tipo de interacciones, entre las más estudiadas se encuentran las simbiosis rizobiales (Kiers y Denison, 2008); las simbiosis actinorrícicas (Benson y Silvester, 1993; Schwencke y Carú, 2001) y los líquenes (Øvstedal y Lewis-Smith, 2001), entre otras. En general estas simbiosis se describen como asociaciones bipartitas (entre dos organismos distintos); sin embargo, la información reciente sugiere que son más complejas y que involucran nuevos socios (Bonfante y Anca, 2009).

Aunque la diversidad de los componentes simbióticos de los líquenes se han estudiado extensamente (Øvstedal y Lewis-Smith, 2001; DePriest, 2004), es muy reciente y escaso el estudio de la diversidad de la comunidad bacteriana

asociada a los talos liquénicos, a pesar que se conoce la presencia de estas comunidades desde hace largo tiempo por determinaciones tempranas basadas en características fenotípicas y fisiológicas (Iskina, 1938; Panosyan y Nikogosyan, 1966; Henkel y Plotnikova, 1973; Zook, 1983; González *et al.*, 2005). Los líquenes son capaces de crecer y sobrevivir en sustratos pobres en nutrientes, por lo que se sugiere que las comunidades bacterianas asociadas a ellos les otorgarían, entre otras funciones, una fuente de nutrientes esenciales para el desarrollo del talo liquénico en estos ambientes (González *et al.*, 2005; Cardinale *et al.*, 2006; Liba *et al.*, 2006; Selbmann *et al.*, 2010).

## **1.2. Comunidades bacterianas asociadas a líquenes.**

Los ensamblajes microbianos asociados a los líquenes forman una biopelícula altamente estructurada sobre el talo (Grube y Berg, 2009). La importancia y los posibles roles que podrían estar llevando a cabo las bacterias de esta microbiota en la simbiosis liquénica han sido descritas últimamente gracias a técnicas moleculares tales como metaproteómica y técnicas de actividad antagónica *in vitro*, actividad hidrolítica macromolecular, detección de ácido indol-3-acético, entre otras. Con éstas se han podido comprobar algunos aportes de la microbiota asociada a los líquenes, entre ellos: suministro de nutrientes, resistencia contra factores bióticos y abióticos, apoyo a la fotosíntesis mediante suministro de vitamina B12, entre otras (Grube *et al.*, 2009, 2014; Lee *et al.*, 2014; Erlacher *et al.*, 2015; Aschenbrenner *et al.*, 2016).

Asimismo, las técnicas de DNA *fingerprinting* permiten la caracterización de las comunidades microbianas *in situ*. En estas técnicas moleculares, independientes de cultivo, se usan biomarcadores específicos que permiten estudiar la comunidad bacteriana asociada al líquen (Cardinale *et al.*, 2006; Grube *et al.*, 2009). Los marcadores moleculares usualmente usados son los genes ribosómicos o genes específicos que definen la funcionalidad de estos grupos bacterianos.

Por otra parte, en cuanto a la adquisición de los microorganismos que componen la microbiota asociada a los líquenes, se ha descrito que existiría una co-dispersión simultánea de los propágulos simbióticos vegetativos y de la microbiota asociada a ellos (Aschenbrenner *et al.*, 2014), y que además estos grupos microbianos irían cambiando estructuralmente por la pérdida de especies originales debido a las nuevas condiciones ambientales, y aumentarían los competidores locales mejor adaptados al nuevo entorno (Cardinale *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2014; Leiva *et al.*, 2016). En definitiva, varios estudios se han centrado en la determinación de cuáles son los factores que estructuran dicha comunidad, encontrándose que la abundancia, composición y organización espacial de las comunidades bacterianas asociadas a líquenes están mediadas tanto por factores intrínsecos (e.g. tipo de fotobionte, tipo de micobionte, edad del talo líquénico, etc) (Bates *et al.*, 2011; Mushegian *et al.*, 2011; Cardinale *et al.*, 2012a; Hodkinson *et al.*, 2012) como por factores extrínsecos (e.g. tipo de sustrato, factores ambientales, localización geográfica,

etc) (Hodkinson *et al.*, 2012; Cardinale *et al.*, 2012a, 2012b; Printzen *et al.*, 2012; Ramírez-Fernández *et al.*, 2014; Leiva *et al.*, 2016; Aranda, 2016).

No cabe duda de que la microbiota asociada a los líquenes juega un rol importante, siendo un socio estable, específico y estructuralmente integrado de la simbiosis líquénica, por lo que actualmente los líquenes deben considerarse como una asociación simbiótica compleja entre múltiples microorganismos y no como la descripción clásica, de una asociación simbiótica entre un micobionte y un fotobionte (Aschenbrenner *et al.*, 2016).

Uno de los aspectos a estudiar sobre la microbiota líquénica tiene que ver con aquellos microorganismos responsables de la fijación de nitrógeno. Al respecto, la fijación biológica del nitrógeno (FBN) corresponde a la reducción del nitrógeno molecular ( $N_2$ ) a amonio biológicamente disponible ( $NH_4^+$ ) y es catalizada por la enzima nitrogenasa, la cual se encuentra codificada en el operón *nifHDK* de los microorganismos que la poseen (Leigh y Dodsworth, 2007). Con el advenimiento de los métodos moleculares independientes de cultivo se reveló la presencia de alfaproteobacterias como un grupo dominante en la comunidad bacteriana asociada a diferentes líquenes (Cardinale *et al.*, 2008; Grube *et al.*, 2009; Bates *et al.*, 2011; Hodkinson, 2011) y describiéndose entre ellas incluso un grupo de bacterias rizobiales exclusivamente asociado a líquenes (LAR, por las siglas en inglés de *Lichen Associated Rhizobiales*) (Hodkinson, 2011). Hodkinson y Lutzoni (2009) y Hodkinson *et al.*, (2012) presentaron evidencia preliminar que indicaría que la estructura de las

comunidades bacterianas asociadas con cianolíquenes bipartitos difiere de las que se encuentran en clorolíquenes bipartitos. Por lo tanto, los talos liquénicos conteniendo diferentes tipos de fotobiontes (cianobacteria vs alga verde) tendrían diferentes comunidades microbianas asociadas; sin embargo, no existen estudios en particular de la diversidad de los genes funcionales relacionados con el gremio de fijadores de nitrógeno asociado a líquenes bipartitos con diferente tipo de fotobionte.

### **1.3. Planteamiento del problema.**

Como se mencionó anteriormente, la microbiota asociada a líquenes constituye una interacción compleja en la simbiosis liquénica, y juega un rol fundamental para el desarrollo del líquen. Uno de estos roles tiene relación con la fijación de nitrógeno, cumpliendo los fotobiontes roles específicos cuando están interactuando. Tal es el caso de las asociaciones bipartitas, en las que la cianobacteria del cianolíquen es capaz de realizar ambos procesos, fijar carbono y fijar nitrógeno; sin embargo, en clorolíquenes bipartitos, el alga verde proporciona los carbohidratos productos de la fotosíntesis al micobionte, pero no es capaz de fijar nitrógeno. Por este motivo, se propone estudiar la diversidad del gremio de bacterias fijadoras de nitrógeno asociadas a la microbiota de clorolíquenes del género *Cladonia* y cianolíquenes del género *Peltigera* presentes en la Reserva Nacional Coyhaique. El sitio de muestreo fue

seleccionado por poseer un número considerable de macro y microhábitats disponibles para la colonización por líquenes (Quilhot *et al.*, 2012), haciendo de éste un sitio con una alta diversidad liquénica aún poco estudiada (Zúñiga *et al.*, 2015; Leiva *et al.*, 2016). Además, según nuestro conocimiento, existe solo un estudio de la microbiota asociada a líquenes en este sitio (Leiva *et al.*, 2016) aunque no existen estudios relacionados al gremio de bacterias fijadoras de nitrógeno en líquenes.

## 2. HIPÓTESIS

La microbiota de clorolíquenes bipartitos, en comparación a la de cianolíquenes bipartitos, presenta una mayor diversidad de bacterias relacionadas con la fijación biológica del nitrógeno.

## 3. OBJETIVOS

### Objetivo general:

Determinar la riqueza y la abundancia del gremio de bacterias fijadoras de nitrógeno en la microbiota asociada al talo y la microbiota del sustrato de cianolíquenes bipartitos del género *Peltigera* y clorolíquenes bipartitos del género *Cladonia*.

### Objetivos específicos:

- 1 Identificar molecularmente líquenes bipartitos del género *Peltigera* y *Cladonia* de la Reserva Nacional Coyhaique.
- 2 Determinar la estructura de bacterias fijadoras de nitrógeno en la microbiota asociada al talo y la microbiota del sustrato de líquenes bipartitos de los géneros *Peltigera* y *Cladonia*.
- 3 Determinar la abundancia del gremio de fijadores de nitrógeno en la microbiota asociada al talo y la microbiota del sustrato de líquenes bipartitos de los géneros *Peltigera* y *Cladonia*.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Toma de muestras.

Las muestras de los líquenes del género *Peltigera* y *Cladonia*, se recolectaron de un bosque de *Nothofagus pumilio* (Poepp. & Endl.) Krasser 1896 (lenga) de la Reserva Nacional Coyhaique, Región de Aysén. La identificación de las muestras en terreno se llevó a cabo mediante análisis morfológico, en el que se reconocieron las principales estructuras que caracterizan a cada uno de estos líquenes utilizando como referencia una base de datos fotográfica construida desde galerías virtuales de *Peltigera* (e.g. [www.waysofenlichenment.net/lichens/Peltigera/](http://www.waysofenlichenment.net/lichens/Peltigera/); [www.stridvall.se/la/galleries.php#lichens](http://www.stridvall.se/la/galleries.php#lichens)) y *Cladonia* (e.g. [www.stridvall.se/lichens/gallery/Cladonia](http://www.stridvall.se/lichens/gallery/Cladonia)).

Las muestras consistieron en fragmentos del talo y sustrato adyacente a cada líquen. Se recolectaron 25 fragmentos de talos y los sustratos adheridos por cada tipo de líquen (n=50 muestras de talo; n=50 muestras de sustrato). Los líquenes y sus sitios de muestreo se fotografiaron y geo-referenciaron. Posterior a ello, las muestras se colocaron en bolsas de papel para disminuir la humedad y evitar su deterioro, y se transportaron al laboratorio en recipientes tipo *cooler*. En el laboratorio, las muestras de líquen se guardaron en bolsas de papel a temperatura ambiente, con baja humedad, mientras que las muestras de sustrato (i.e. suelo) se almacenaron en tubos plásticos a 4 °C hasta el momento de su uso.



#### **4.2 Identificación molecular de los líquenes del género *Peltigera* y *Cladonia* de la Reserva Nacional Coyhaique.**

La identificación molecular de los micobiontes de líquenes del género *Peltigera* y *Cladonia*, se realizaron mediante análisis filogenéticos de las secuencias del gen rRNA 28S, a partir de DNA genómico del talo líquénico.

Para la extracción del DNA del talo líquénico se realizó la limpieza de la superficie del talo, utilizando un pincel y una espátula para remover los restos de sustrato adheridos. Posteriormente, las muestras se lavaron con agua estéril. Para la extracción de DNA se fraccionaron mecánicamente 10 mg del talo utilizando un mini-mortero. El DNA se extrajo utilizando el "Power soil DNA Isolation Kit" (MoBio Laboratories, Inc) según las indicaciones del fabricante. La calidad e integridad del DNA extraído se comprobaron en geles de agarosa al 0,8% (p/v) en buffer TAE 1X (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA [pH 8,0]) y teñidos con GelRed™ (Biotium); mientras que la cuantificación se realizó utilizando el equipo "Epoch Microplate Spectrophotometer" (BioTek). Todas las muestras de DNA se almacenaron en buffer TE (Tris-HCl 10 mM y EDTA 1 mM [pH 8,0]) a -20 °C hasta el momento de su uso.

#### 4.2.1 Amplificación por PCR de marcadores moleculares para micobionte.

Para los micobiontes tanto de *Peltigera* como de *Cladonia* se amplificó mediante PCR el marcador molecular el gen del rRNA 28S de hongos (partidores *LIC24R* y *LR7*) (Miadlikowska y Lutzoni, 2000) (Tabla 1). El programa utilizado para la amplificación consistió en: 1 min a 94 °C, 30 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 52 °C y 1 min 30 s a 72 °C, y finalmente 4 min a 72 °C.

Todas las mezclas de reacción se prepararon utilizando "GoTaq® Green Master Mix" (GoTaq® DNA polimerasa en buffer de reacción Green GoTaq® [pH 8,5], 200 µM de cada dNTP y MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM) (Promega) y todas las amplificaciones se llevaron a cabo en un termocilador Maxygene II (Axygen).

**Tabla 1.** Oligonucleótidos utilizados en este trabajo para la amplificación de genes.

Gen	Partidores	Secuencia Nucleotídica (5' - 3')	Tamaño esperado	Referencia
rRNA 28S hongos	LIC24R	GAAACCAACAGGGATTG	1200 pb	Miadlikowska y Lutzoni, 2000
	LR7	TACTACCACCAAGATCT		
<i>nifH</i>	nifHF	AAAGGYGGWATCGGYAARTCCACCAC	457 pb	Rosch <i>et al.</i> , 2002
	nifHR	TTGTTSGCSGCRTACATSGCCATCAT		
rRNA 16S cianobacterias	CYA106F	CGGACGGGTGAGTAACGCGTGA	280 pb	Nübel <i>et al.</i> , 1997
	CYA280R	GGTATTGCTCCGTCAGGCTTT		Zuñiga, 2013 (no publicado)

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

El tamaño de los productos de PCR se determinó por electroforesis en geles de agarosa al 1,2% (p/v) en buffer TAE 1X y teñidos con GelRed™ (Biotium). Posteriormente, los amplicones se secuenciaron en un sentido con el partidor *forward* utilizando un Analizador Genético 3730 (Applied Biosystems; Macrogen Inc., Corea). Las secuencias se verificaron y editaron individualmente en el programa MEGA v5.0 (Tamura *et al.*, 2011). La identidad preliminar 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 GenBank del NCBI (Benson *et al.*, 2011).

#### **4.2.3 Definición de OTUs y análisis filogenético de los micobiontes.**

Las secuencias del gen del rRNA 28S de hongos, tanto para líquenes del género *Peltigera* como de *Cladonia*, se alinearon por el método Muscle (Edgar, 2004) y luego se agruparon con el criterio de 100% de identidad en el programa MEGA v5.0. Las secuencias 100% idénticas se definieron como pertenecientes a una OTU, por lo tanto cada OTU corresponde a un haplotipo diferente.

Utilizando un representante por cada OTU encontrada en cada ambiente, se realizó un análisis filogenético de inferencia bayesiana (5.000.000 de generaciones) en el programa MrBayes v3.2.2 (Ronquist y Huelsenbeck, 2003). El mejor modelo de sustitución nucleotídica se determinó mediante el programa

jModelTest v2.1.3 (Darriba *et al.*, 2012). Además, el soporte en los nodos se calculó con el método de *bootstrap* (Felsenstein, 1985). La representación gráfica de los árboles se obtuvo con el programa FigTree v1.4.0 (Rambaut, 2012). Se consideraron solamente las secuencias depositadas en la base de datos nucleotídicas de GenBank del NCBI (Benson *et al.*, 2011) de las especies más cercanas a cada una de las OTUs, para crear los árboles filogenéticos.

#### **4.3 Determinación de la estructura de bacterias fijadoras de nitrógeno en la microbiota de líquenes de los géneros *Peltigera* y *Cladonia*.**

La estructura genética del gremio de fijadores de nitrógeno se determinó mediante la técnica del Polimorfismo de Longitud de los Fragmentos de Restricción Terminal (TRFLP, por las siglas en inglés de *Terminal Restriction Length Polymorphism*) del gen *nifH*, que codifica la nitrogenasa-reductasa, a partir del DNA genómico del talo líquénico, así como del DNA extraído del sustrato asociado a cada líquen.

##### **4.3.1 Extracción del DNA desde el talo y el sustrato asociado a líquenes del género *Peltigera* y *Cladonia*.**

El DNA obtenido a partir de los talos de los líquenes se consiguió como se indica en el ítem 4.2.1. Utilizando un protocolo similar, se obtuvo el DNA a partir de 0,1 g del sustrato asociado a cada uno de los líquenes.

### 4.3.2 Amplificación del gen *nifH* y perfiles de T-RFLP.

A partir del DNA extraído, tanto desde los talos liquénicos como del sustrato asociado a cada uno de ellos, se amplificó el gen *nifH* con los partidores *nifHF\**-*nifHR* (\*= partidador marcado con fluoróforo 6-FAM) (Rosch *et al.*, 2002) (Tabla 1). El tamaño esperado del amplicón es de aproximadamente 450 pb, el cual se obtuvo con el siguiente programa de amplificación: 40 ciclos a 94 °C por 30 s, 52 °C por 30 s y extensión a 72 °C por 30 s, con una extensión final a 72 °C por 7 min. Todas las mezclas de reacción se prepararon utilizando "GoTaq® Green Master Mix" (Promega) y todas las amplificaciones se llevaron a cabo en un termocilador Maxygene II (Axygen). La concentración y calidad del DNA se determinaron de la misma forma que en el ítem 4.2.

Los amplicones se purificaron mediante el uso del kit "PCR Clean-Up System" (Promega) y se incubaron por 16 h a 37 °C con 2 enzimas de restricción independientemente: *HaeIII* y *HhaI* (Fermentas) siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, se realizó una precipitación alcohólica del DNA, cuyo producto se suspendió en buffer 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), 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.

Por otra parte, para eliminar de los perfiles los TRFs asociados a *Nostoc* antes de los análisis posteriores, se descargó la secuencia del gen *nifH* de la cianobacteria *Nostoc flageliforme* (número de acceso GenBank: KU886163.1) y se realizó un análisis *in silico* con el programa BioEdit (Hall, 1999) para determinar la posición de los sitios de corte de las enzimas *HaeIII* y *HhaI* a partir del sitio de hibridación del partidador *nifHF*.

La estimación de la diversidad genética de la comunidad microbiana se realizó mediante el índice de diversidad de Shannon, según la fórmula  $H' = -\sum p_i \ln p_i$  (Shannon & Weaver 1963), donde  $p_i$  es la proporción de cada fragmento terminal dentro del total de TRFs de cada perfil.

El grado de relación de las comunidades bacterianas analizadas mediante TRFLP se determinó mediante un análisis de componentes principales (PCA) utilizando el índice de disimilitud de Bray-Curtis (Bray y Curtis, 1957). Asimismo,

se realizó un análisis de similitud (ANOSIM) para determinar el coeficiente R, que cuanto más grande y positivo (hasta 1) indica mayor disimilitud entre los grupos comparados. Finalmente, se calcularon los porcentajes de similitud entre los grupos (SIMPER). Todos estos análisis se llevaron a cabo en la herramienta PAST v2.17c (Hammer *et al.*, 2001).

#### **4.4 Determinación de la abundancia de bacterias fijadoras de nitrógeno en la microbiota de líquenes de los géneros *Peltigera* y *Cladonia*.**

La abundancia de bacterias fijadoras de nitrógeno asociadas a los talos y sustratos de líquenes de los géneros *Peltigera* y *Cladonia*, se evaluó mediante la cuantificación del gen *nifH* mediante PCR cuantitativo (qPCR).

Las reacciones de qPCR se llevaron a cabo en un volumen total de 20  $\mu$ L, utilizando el kit "GoTaq<sup>®</sup> qPCR Master Mix" (Promega) con los partidores *nifHF-nifHR* (Rosch *et al.*, 2002) (Tabla 1) a una concentración de 0,3  $\mu$ M. Los ensayos de qPCR se realizaron siguiendo el siguiente programa de ciclos térmicos: 94 °C por 30 s, seguido de 40 ciclos de 52 °C por 30 s y extensión a 72 °C por 30 s. Las reacciones se realizaron en el equipo Mx3000P Real-Time PCR System (Stratagene). Asimismo, para amplificar el gen del rRNA 16S de cianobacterias, se utilizaron los partidores CYA 106F y CYA 280R (Tabla 1) variando solamente los ciclos térmicos: 94 °C por 45 s, seguido de 30 ciclos de 58 °C por 45 s y extensión a 72 °C por 45 s.

#### 4.4.1 Clonación de genes rRNA 16S y *nifH*.

Con el objetivo de obtener los moldes requeridos para realizar las curvas de calibración para qPCR, se construyó una genoteca de cada uno de los genes amplificados. Para ello, 100 ng de los productos de PCR se purificaron mediante el Wizard® DNA Clean-Up System (Promega). Los amplicones purificados de los genes del rRNA 16S y *nifH* se ligaron en el vector Ptz57R/T y se clonaron en células competentes de *Escherichia coli* DH5- $\alpha$  usando el InstAclone™ PCR Cloning Kit (Fermentas) según las indicaciones del fabricante.

Los transformantes se crecieron en medio LB (1,0% Triptona; 0,5% extracto de levadura; 1,0% NaCl; pH 7,0) y se seleccionaron por su resistencia a ampicilina (50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) y por su incapacidad de degradar el compuesto X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-b-D-galactopiranosido) en presencia de IPTG (isopropil- $\beta$ -D-tio-galactósido). Los clones se suspendieron en 10  $\mu\text{L}$  de amortiguador TE. El DNA se obtuvo por lisis celular mediante 8 ciclos sucesivos de choques térmicos de 1 min a 98 °C / 4 °C. La presencia del inserto esperado se determinó por PCR utilizando los partidores CYA106F/CYA280R para el gen del rRNA 16S y nifHF/ nifHR para el gen *nifH*. Las condiciones de reacción de PCR fueron las mismas que se describieron en los puntos 4.4 y 4.3.2, respectivamente. Los productos de PCR presentaron el tamaño de inserto esperado. Los clones se guardaron en glicerol al 20% a -80°C (Sambrook *et al.*, 1989).



#### 4.4.2 Curvas de calibración.

Para cuantificar el número de copias del gen que codifica la nitrogenasa-reductasa (*nifH*), se realizó una curva estándar usando diluciones seriadas 1:4 (v:v) de una mezcla equimolar (mix) consistente en DNA genómico de *Rhizobium* (bacteria que contiene el gen *nifH*) y DNA genómico de *Trichoderma* (como DNA "competidor"). Del mismo modo, con el objetivo relativizar respecto al número de copias del gen *nifH* provenientes de las cianobacterias de los talos de *Peltigera*, se amplificó el gen del rRNA 16S de cianobacterias. Para esto, se realizó una curva estándar utilizando diluciones seriadas 1:10 (v:v) del gen del rRNA 16S.

Los resultados obtenidos a partir de las curvas de calibración se analizaron con el programa "MxPro qPCR" (Agilent Genomics). Mediante este programa se obtuvieron gráficos del ciclo umbral (CT) versus el logaritmo decimal ( $\text{Log}_{10}$ ) del número de copias (NC) de cada una de las diluciones, pudiéndose calcular la ecuación de regresión lineal y el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) para cada curva de calibración. La eficiencia de las reacciones se calculó mediante la ecuación:  $\text{Eficiencia} = (10^{(-1/\text{pendiente})} - 1) * 100$ .

#### 4.4.3 Cuantificación del gen *nifH*.

El número de copias de los genes *nifH* y rRNA 16S de cianobacterias en cada una de las muestras, se obtuvo interpolando los valores de CT obtenidos en la ecuación de la recta y los resultados se expresaron como el logaritmo

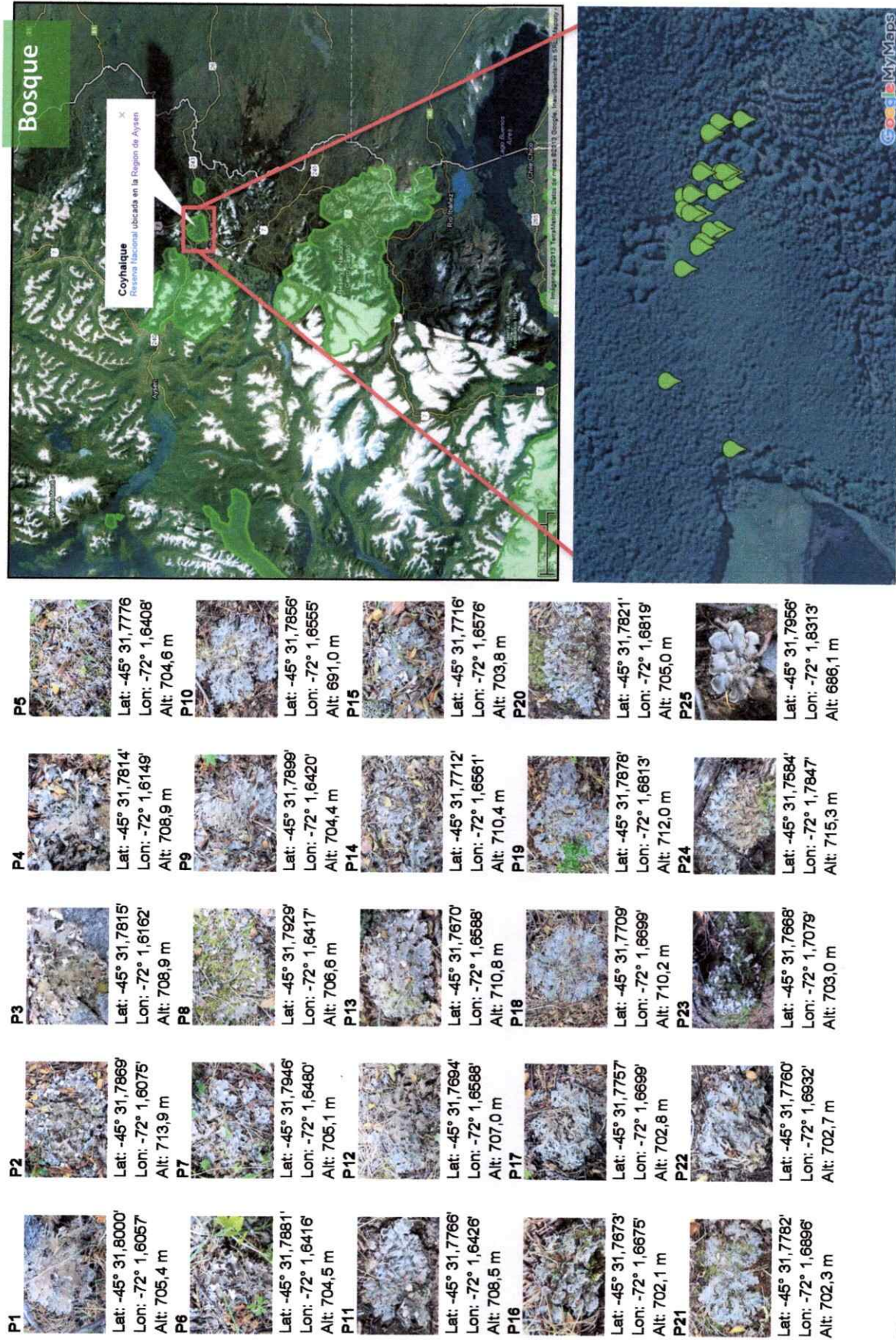
decimal del número de copias del gen, relativo a los nanogramos de DNA genómico en las respectivas muestras ( $\text{Log}_{10} \text{NC} / \text{ng gDNA}$ ). En el caso de los talos de líquenes del género *Peltigera*, a la abundancia de genes *nifH* se les restó la abundancia de genes rRNA 16S (Yeager *et al.*, 2012). Las diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tipos de tratamiento en el tiempo se analizaron mediante ANOVA de dos vías y el post test de Tukey con el programa GraphPadPrism v5.01.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Identificación molecular de los líquenes del género *Peltigera* y *Cladonia* de la Reserva Nacional Coyhaique.

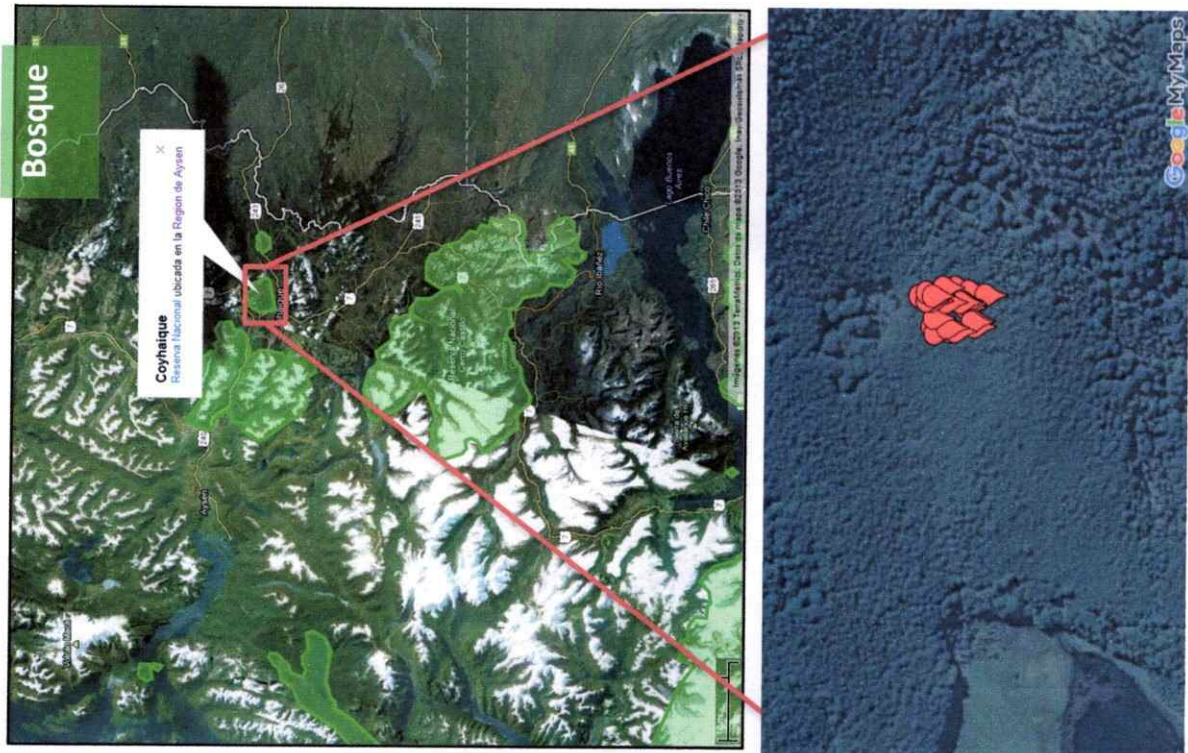
Se recolectaron 25 fragmentos de talos de *Peltigera* y 25 de *Cladonia*, cada uno con su sustrato asociado, en un bosque de *N. pumilio* situado en la Reserva Nacional Coyhaique, Región de Aysén (Figuras 1 y 2). El sitio de estudio correspondió a bosques secundarios de *N. pumilio* originados luego de los incendios de origen antropogénico ocurridos en las primeras décadas del siglo XX. El área de estudio está ubicada a 45°31'47" de latitud sur y 72°01'40" de longitud oeste, con una altitud promedio de 705 m. El suelo deriva de depósitos de ceniza volcánica y la zona recibe 1350 mm de lluvia anual promedio (Till-Bottraud *et al.*, 2012).

Para identificar molecularmente el micobionte de cada líquen, se extrajo DNA desde el talo de las 25 muestras de *Peltigera* y desde las 25 de *Cladonia*. La integridad del DNA extraído se verificó por electroforesis en geles de agarosa. Del mismo modo se verificó la integridad de los productos de amplificación del gen del rRNA 28S para el micobionte, obteniéndose el tamaño de amplicón esperado, como una banda única.



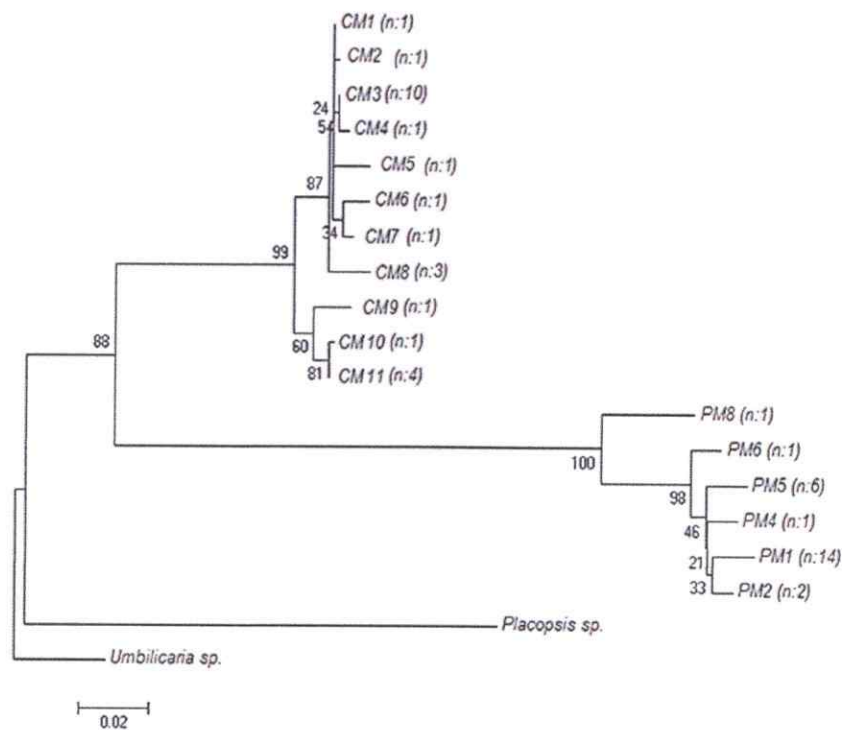
**Figura 1.** Sitio de muestreo, fotografías y datos de georreferenciación asociados a cada muestra de *Peltigera* en su hábitat de Coyhaique (n=25). (Lat: latitud; Lon: longitud; Alt: altitud. P, seguido de un número, indica el nombre de la muestra).





**Figura 2.** Sitio de muestreo, fotografías y datos de georreferenciación asociados a cada muestra de *Cladonia* en su hábitat de Coyhaique (n=25). (Lat: latitud; Lon: longitud; Alt: altitud). C, seguido de un número, indica el nombre de la muestra).

El análisis con la herramienta BLAST contra la base de datos GenBank confirma que las muestras pertenecen a los géneros *Peltigera* (n=25) y *Cladonia* (n=25). Una vez analizados los datos, se definieron como OTUs los diferentes haplotipos (i.e. los grupos de secuencias 100% idénticas). Se diferenciaron 6 haplotipos de micobionte para *Peltigera* (PM1, PM2, PM4, PM5, PM6 y PM8, en donde los números corresponden a aquellos informados en Zúñiga *et al.*, 2015) y 11 para *Cladonia* (CM1, CM2, CM3, CM4, CM5, CM6, CM7, CM8, CM9, CM10 y CM11) (Figura 3).



**Figura 3.** Árbol filogenético de las OTUs de los micobiontes obtenido mediante inferencia bayesiana, se muestra el soporte de *bootstrap* en los nodos. Se indica entre paréntesis la cantidad de muestras representadas por cada secuencia. Se utilizaron las secuencias de *Umbilicaria sp.* y *Placopsis sp.* como grupo externo. La barra indica la distancia genética. CM, seguido de un número, OTUs correspondientes a *Cladonia*; PM, seguido de un número, OTUs correspondientes a *Peltigera*.



Posteriormente, se construyó un árbol filogenético con las secuencias del gen del rRNA 28S usando los métodos de máxima verosimilitud e inferencia bayesiana y se determinó a qué especie de *Peltigera* se asocia cada OTU con mayor cercanía. Este análisis se llevó a cabo mediante un análisis filogenético propuesto por Zúñiga *et al.*, (2015) para la identificación y clasificación de líquenes del género *Peltigera*, del cual se seleccionaron 18 secuencias descargadas de la base de datos GenBank del gen del rRNA 28S de *Peltigera* de un tamaño de 728 bases nucleotídicas, siendo éstas las más cercanas a las muestras obtenidas en esta tesis.

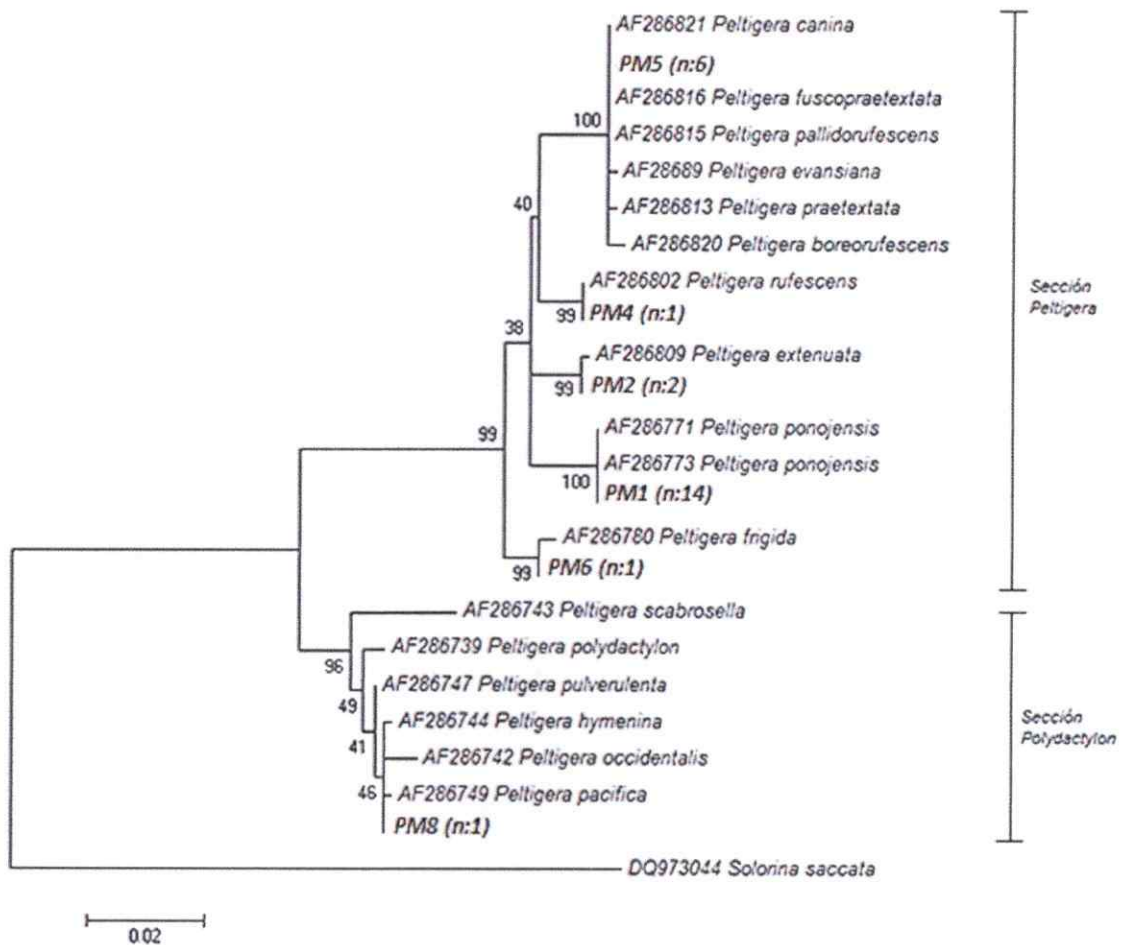
En este análisis se determinó que las muestras se asocian a especies de dos secciones dentro del género *Peltigera*, 5 OTUs se agrupan dentro de la sección *Peltigera*, siendo PM1 más cercana a *P. ponojensis*, PM2 a *P. extenuata*, PM4 a *P. rufescens*, PM5 al grupo de *P. canina* (especies *P. evansiana*, *P. canina*, *P. "fuscopraetextata"*, *P. "pallidorufescens"*, *P. praetextata* y *P. "boreorufescens"*) y PM6 a *P. frigida*; mientras que solo PM8 se agrupó dentro de la sección *Polydactylon*, siendo más cercana al grupo de *P. hymenina* (especies *P. polydactylon*, *P. occidentalis*, *P. scabrosella*, *P. pacifica*, *P. hymenina* y *P. pulverulenta*) (Figura 4).

Del mismo modo, se construyó un árbol filogenético con las secuencias del gen del rRNA 28S de 774 bases nucleotídicas usando los métodos de máxima verosimilitud e inferencia bayesiana y se determinó a qué especie de *Cladonia* se asocia cada OTU con mayor cercanía. Este análisis se llevó a cabo

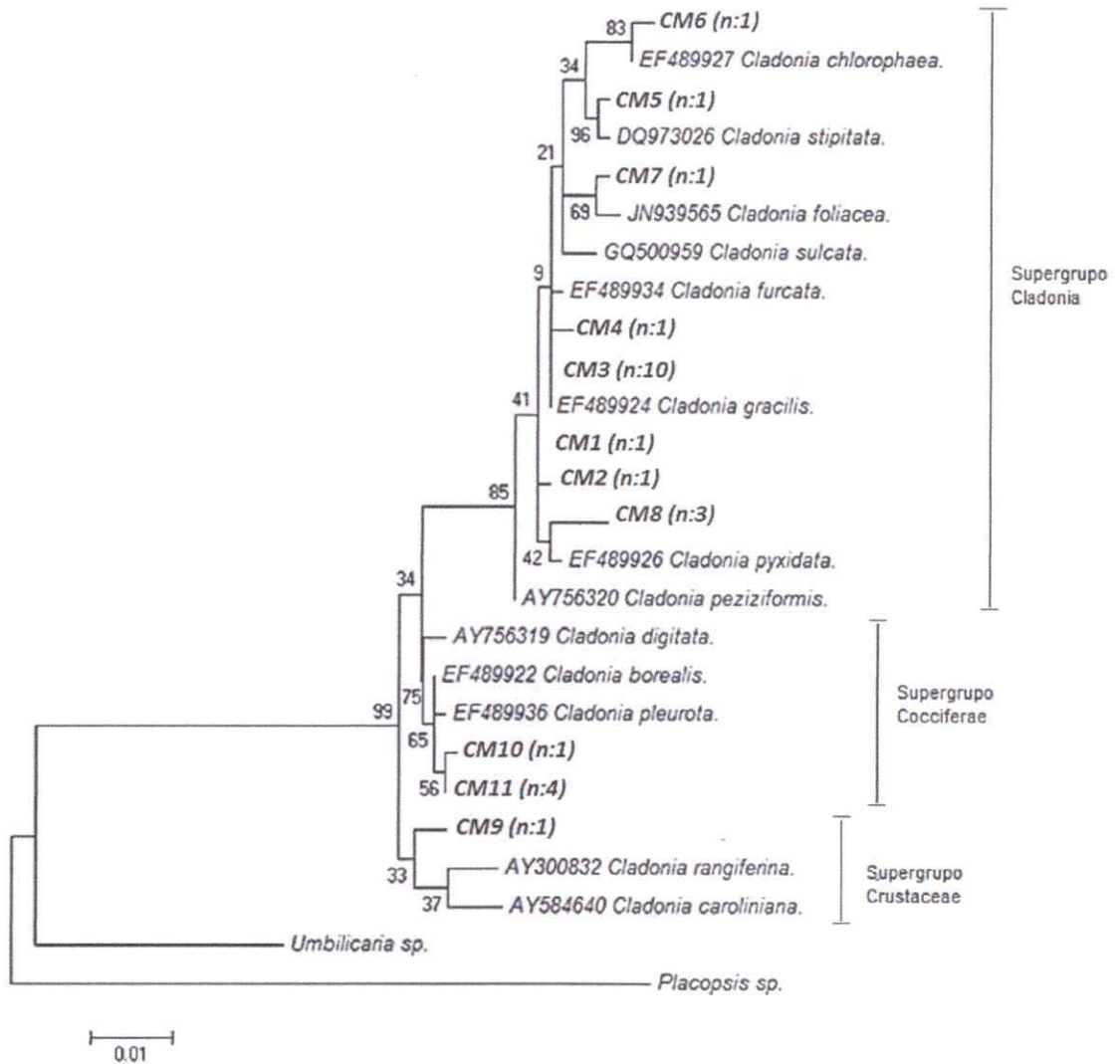
basándose en un análisis filogenético propuesto por Stenroos *et al.* (2002) para la clasificación de *Cladonia*, en el que se consideraron 13 secuencias de *Cladonia*, las más cercanas a las muestras investigadas.

La Figura 5 muestra que solamente CM5 y CM6 se asocian, con un soporte superior al 75%, con la secuencia de una especie descrita (CM5 con *Cladonia stipitata* y CM6 con *Cladonia chlorophaea*). El resto de los grupos no poseen buen soporte y por ende no se pueden identificar las OTUs por su relación con la secuencia de alguna especie cercana; sin embargo, se los puede incluir en una categoría más general como supergrupos (Stenroos *et al.*, 2002). De las 11 OTUs obtenidas en esta tesis, 8 se agruparon dentro del Supergrupo Cladonia, 2 se agruparon dentro del Supergrupo Cocciferae y 1 dentro del Supergrupo Crustaceae.





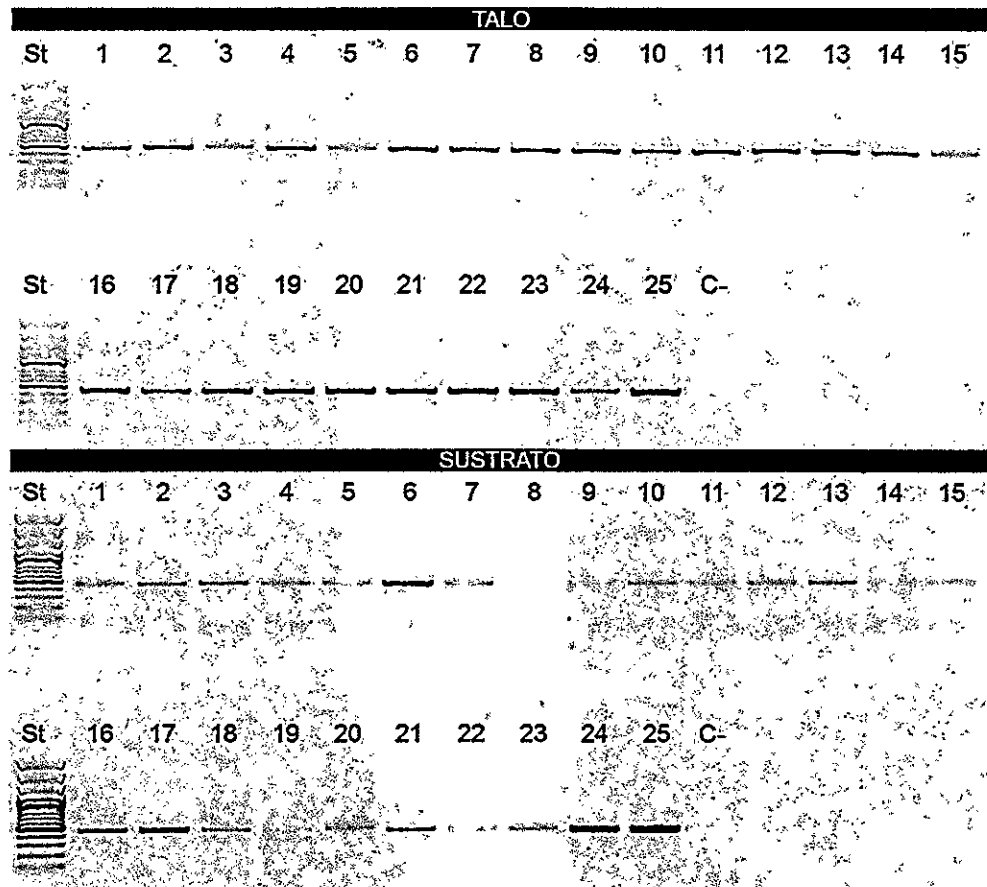
**Figura 4.** Árbol filogenético de las OTUs de *Peltigera* obtenido mediante inferencia bayesiana, se muestra el soporte de *bootstrap* en los nodos. Se indica entre paréntesis la cantidad de muestras representadas por cada haplotipo. Se utilizó la secuencia de *Solorina saccata* como externa. La barra indica la distancia genética. PM, seguido de un número, OTUs correspondientes a *Peltigera*. Se indican las secciones de acuerdo a Zúñiga *et al.*, (2015).



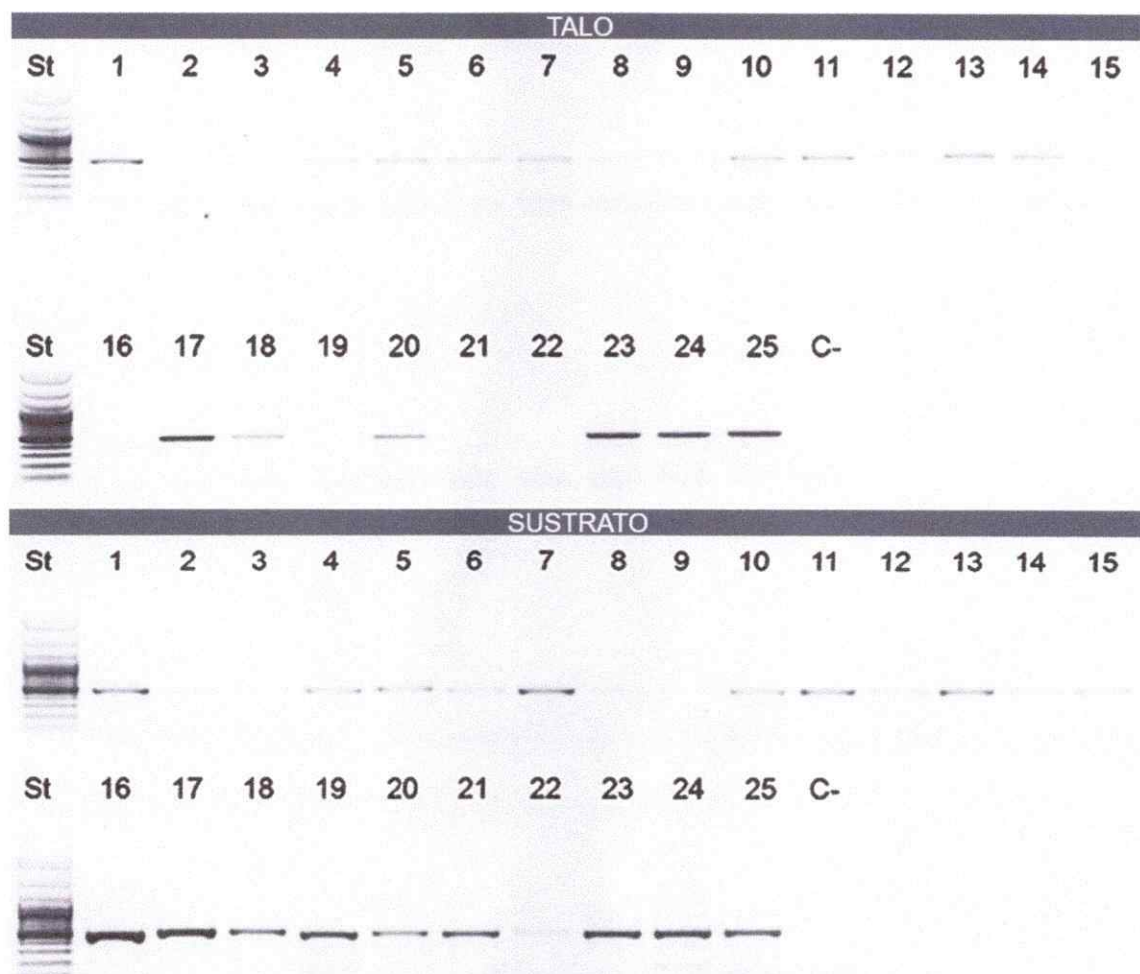
**Figura 5.** Árbol filogenético de los OTUs de *Cladonia* obtenido mediante inferencia bayesiana, se muestra el soporte de *bootstrap* en los nodos. Se indica entre paréntesis la cantidad de muestras representadas por haplotipo. Se utilizaron las secuencias de *Umbilicaria sp.* y *Placopsis sp.* como grupos externos. La barra indica la distancia genética. CM, seguido de un número, OTUs correspondientes a *Cladonia*. Se indican las secciones de acuerdo a Stenroos *et al.*, (2002).

## 5.2 Determinación de la estructura de bacterias fijadoras de nitrógeno en la microbiota de líquenes de los géneros *Peltigera* y *Cladonia*.

La estructura genética del gremio de bacterias fijadoras de nitrógeno se determinó mediante perfiles de TRFLP, para ello se extrajo DNA del talo y del sustrato de *Peltigera* y *Cladonia* y se amplificó el gen *nifH* (Figuras 6 y 7, respectivamente).



**Figura 6.** Producto de la amplificación del gen *nifH* asociado a líquenes *Peltigera* en gel de agarosa al 1,2%. St: marcador de peso molecular 100 bp plus (Thermo Fisher), bandas más intensas de 500 y 1000 pb. En las filas 1 y 2 se muestran los productos de amplificación de los talos liquénicos y en las filas 3 y 4 los productos de amplificación de los sustratos. C- representa el control negativo.



**Figura 7.** Producto de la amplificación del gen *nifH* asociado a líquenes *Cladonia* en gel de agarosa al 1,2%. St: marcador de peso molecular 100 bp plus (Thermo Fisher), bandas más intensas de 500 y 1000 pb. En las filas 1 y 2 se muestran los productos de amplificación de los talos liquénicos y en las filas 3 y 4 los productos de amplificación de los sustratos. C- representa el control negativo.

A partir del DNA extraído desde 6 muestras de talo de *Cladonia* (C2, C3, C16, C19, C21 y C22) no se obtuvo producto de la amplificación del gen *nifH*. Esto a pesar de realizar varios intentos de optimización de la amplificación, tales como modificación de la temperatura de hibridación, prueba de otros

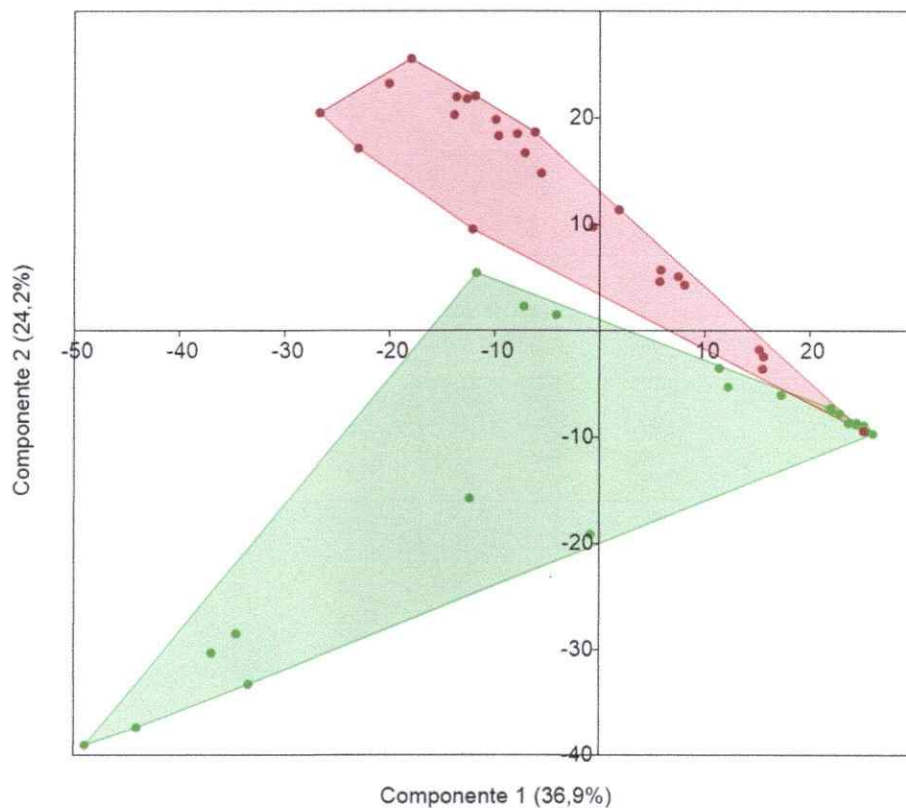
partidores, variación de la concentración de  $Mg^{2+}$ , adición de BSA (albúmina de suero bovina), DMSO (dimetilsulfóxido), Urea. Sin embargo, a partir de estas muestras se pudo amplificar exitosamente el gen del rRNA 16S. Cabe mencionar que la OTU CM9, conformada solo por la muestra C19, no estará representada en los análisis posteriores que incluyan los talos de *Cladonia*.

Luego de purificar los amplicones, se digirieron independientemente con 2 enzimas de restricción (*HaeIII* y *HhaI*), obteniendo un electroferograma para cada una de las digestiones, 4 por cada muestra (considerando el talo liquénico y el sustrato). En cada electroferograma, la presencia e intensidad de cada TRF, son indicativos de la riqueza y la abundancia de la comunidad bacteriana, respectivamente.

### **5.2.1 Comparación de la estructura genética de los fijadores de nitrógeno asociados a *Peltigera* y *Cladonia*.**

En la Figura 8 se muestra el resultado del análisis de componentes principales utilizando los datos de los perfiles de TRFLP del gen *nifH* tanto de los talos como de los sustratos asociados a líquenes del género *Peltigera*. Al comparar los patrones de TRFLP obtenidos para ambos tipos de muestra mediante ANOSIM, se observó que estos grupos presentan una diferencia significativa ( $p=0,0001$ ), mientras que un análisis de SIMPER entregó una disimilitud de 57,9% entre ellos (Tabla 2).

En la Figura 9 se muestra el resultado del análisis de componentes principales con los datos de los perfiles de TRFLP del gen *nifH* tanto de los talos como de los sustratos asociados a líquenes del género *Cladonia*. Al comparar los patrones de TRFLP obtenidos para ambos tipos de muestras mediante ANOSIM, se observó que estos grupos presentan una diferencia significativa ( $p=0,0001$ ), mientras que un análisis de SIMPER entregó una disimilitud de 94,7% entre ellos (Tabla 3).



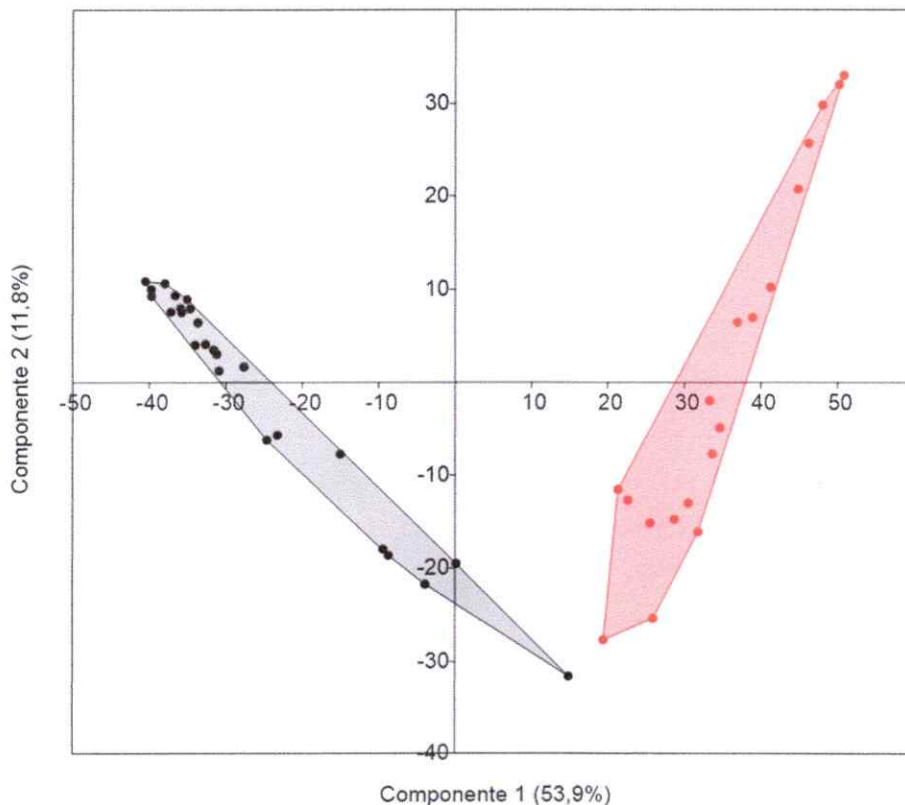
**Figura 8.** Análisis de componentes principales basado en los perfiles de TRFLP del gen *nifH* obtenidos a partir de las muestras de *Peltigera*; talo (verde) y sustrato (marrón).



**Tabla 2.** Análisis de similitud de los perfiles de TRFLP del gen *nifH* obtenidos a partir de las muestras de *Peltigera*.

Muestras	R	<i>p</i>	Disimilitud (%)
TRFLP-pt	0,3961	0,0001	57,9
TRFLP-ps			

TRFLP-pt: perfil del talo y TRFLP-ps: perfil del sustrato. El valor de R y *p* derivan de las comparaciones ANOSIM y los porcentajes de disimilitud de las comparaciones SIMPER; ambos análisis usando el índice de Bray-Curtis.



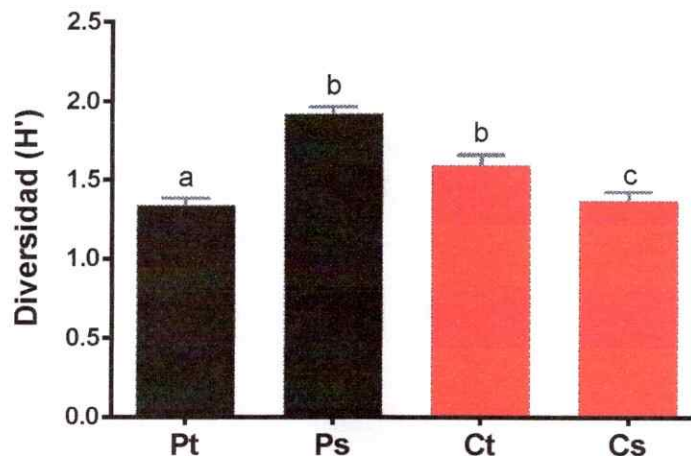
**Figura 9.** Análisis de componentes principales basado en los perfiles de TRFLP del gen *nifH* obtenidos a partir de las muestras de *Cladonia*; talo (negro) y sustrato (rojo).

**Tabla 3.** Análisis de similitud de los perfiles de TRFLP del gen *nifH* obtenidos a partir de las muestras de *Cladonia*.

Muestras	R	p	Disimilitud (%)
TRFLP-ct TRFLP-cs	0,9817	0,0001	94,7

TRFLP-ct: perfil del talo y TRFLP-cs: perfil del sustrato. El valor de R y p derivan de las comparaciones ANOSIM y los porcentajes de disimilitud de las comparaciones SIMPER; ambos análisis usando el índice de Bray-Curtis.

Mediante un análisis de varianza (ANOVA-Tukey;  $p \leq 0,05$ ) se compararon los índices de Diversidad de Shannon ( $H'$ ) de los fijadores de nitrógeno de talos y sustratos de ambos líquenes, encontrándose significativamente mayor diversidad del gremio de fijadores de nitrógeno en la microbiota de los talos de *Cladonia* que de *Peltigera*, y un comportamiento inverso en la microbiota de sus sustratos asociados (Figura 10).

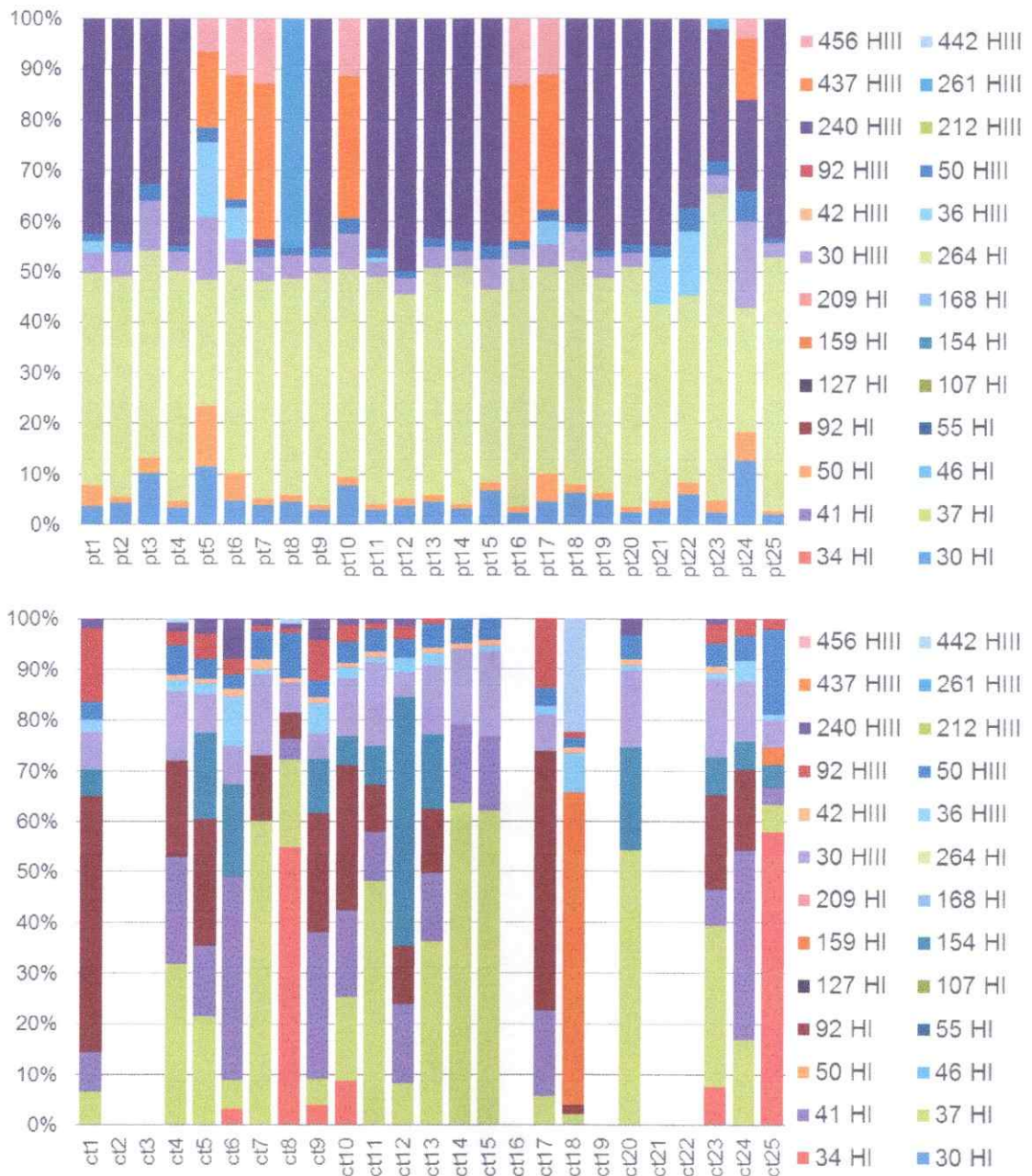


**Figura 10.** Índices de diversidad de Shannon de las bacterias fijadoras de nitrógeno en la microbiota líquénica y en la microbiota de los sustratos asociados. Se muestran las medias y los límites de los intervalos de confianza como barras de error. Letras diferentes sobre las barras representan valores significativamente diferentes (ANOVA-Tukey;  $p \leq 0,05$ ). Talo de *Cladonia* (Ct), talo de *Peltigera* (Pt), sustrato de *Cladonia* (Cs), sustrato de *Peltigera* (Ps).



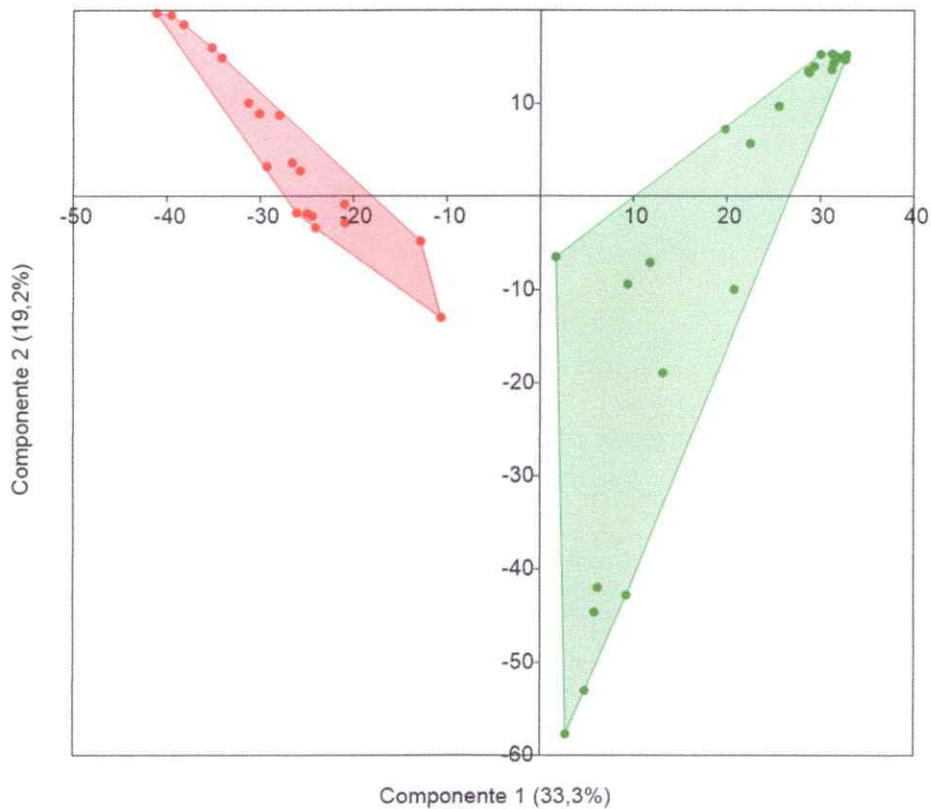
### 5.2.2 Comparación de la estructura genética de los fijadores de nitrógeno asociados a los talos de *Peltigera* y *Cladonia*.

Los patrones de TRFs desde los talos líquénicos entregados por cada enzima de restricción se muestran según su abundancia relativa en la Figura 11, tanto para los fragmentos obtenidos desde los talos de *Peltigera* (Figura 11, arriba) como para los fragmentos obtenidos desde los talos de *Cladonia* (Figura 11, abajo). Se obtuvieron un total de 10 TRFs con las 2 enzimas utilizadas (3 con *HhaI* y 7 *HaeIII* con) para los amplificadores del gen *nifH* desde los talos de *Peltigera* y 13 TRFs para el caso de la amplificación del gen *nifH* desde los talos de *Cladonia* (7 con *HaeIII* y 6 con *HhaI*). De los 19 TRFs obtenidos, solo 4 estuvieron presentes en ambos líquenes (30 HIII, 36 HIII, 50 HIII y 240 HIII), mientras que los 15 TRFs restantes fueron exclusivos de cada líquen. Los fragmentos más representados para *Peltigera* (Figura 11, arriba) fueron 264 HI (promedio 42,4%) y 240 HIII (promedio 29,6%); mientras que para el caso de *Cladonia* (Figura 11, abajo) los más abundantes fueron 37 HI (promedio 26,3%) y 30 HIII (promedio 10,3%). Los TRFs más abundantes en los talos de *Peltigera* coinciden con los TRFs esperados para *Nostoc* (266 pb para *HhaI* [GCG'C] y 244 pb para *HaeIII* [GG'CC]), por lo que fueron removidos de los perfiles para los análisis posteriores.



**Figura 11.** Perfiles de TRFLP obtenidos a partir de las muestras de talo liquénico de *Peltigera* (arriba) y *Cladonia* (abajo) con las enzimas de restricción *HhaI* (TRFs indicados en la leyenda con un número seguido de HI) y *HaeIII* (TRFs indicados en la leyenda con un número seguido de HIII).

En la Figura 12 se muestra el resultado del análisis de componentes principales con los datos de los perfiles de TRFLP del gen *nifH* tanto para los talos de *Peltigera* como de *Cladonia*. Al comparar los patrones de TRFLP obtenidos desde ambos líquenes mediante ANOSIM, se observó que estos grupos presentan una diferencia significativa ( $p=0,0001$ ), mientras que un análisis de SIMPER entregó una disimilitud de 86,1% entre ellos (Tabla 4).



**Figura 12.** Análisis de componentes principales basado en los perfiles de TRFLP del gen *nifH* obtenidos a partir de las muestras de talo líquénico; *Peltigera* (verde) y *Cladonia* (rojo).

**Tabla 4.** Análisis de similitud de los perfiles de TRFLP del gen *nifH* obtenidos a partir de las muestras de talo líquénico de *Peltigera* (TRFLP-pt) y *Cladonia* (TRFLP-ct).

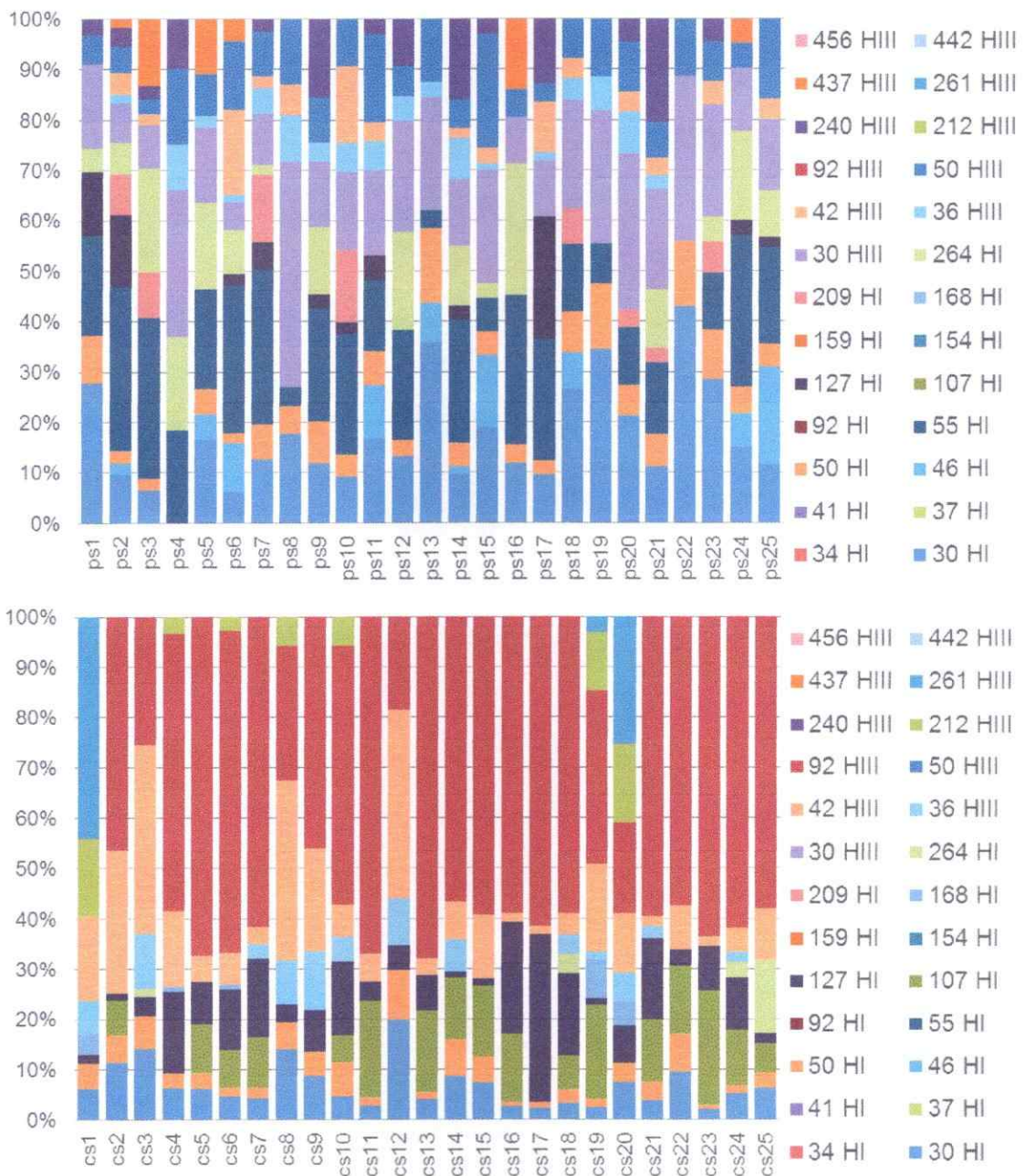
Muestras	R	p	Disimilitud (%)
TRFLP-pt	0,8812	0,0001	86,1
TRFLP-ct			

Los valores de R y p derivan de las comparaciones ANOSIM y el porcentaje de disimilitud de las comparaciones SIMPER; ambos análisis usando el índice de Bray-Curtis.

### 5.2.3 Comparación de la estructura genética de los fijadores de nitrógeno presentes en los sustratos asociados a *Peltigera* y *Cladonia*.

Los patrones de TRFs desde los sustratos líquénicos entregados por cada enzima de restricción se muestran según su abundancia relativa en la Figura 13, tanto para los fragmentos obtenidos desde los sustratos de *Peltigera* (Figura 13, arriba) como para los fragmentos obtenidos desde los sustratos de *Cladonia* (Figura 13, abajo). Se obtuvieron un total de 13 TRFs con las 2 enzimas utilizadas (7 con *HhaI* 6 y con *HaeIII*) para los amplificadores del gen *nifH* desde sustratos de *Peltigera* y 11 TRFs para el caso de la amplificación del gen *nifH* desde sustratos de *Cladonia* (6 con *HhaI* 5 y con *HaeIII*). De los 18 TRFs obtenidos, solo 6 estuvieron presentes en los sustratos asociados a ambos líquenes (30 HI, 50 HI, 127 HI, 264 HI, 36 HIII y 42 HIII), mientras que los 12 TRFs restantes fueron exclusivos de cada sustrato.

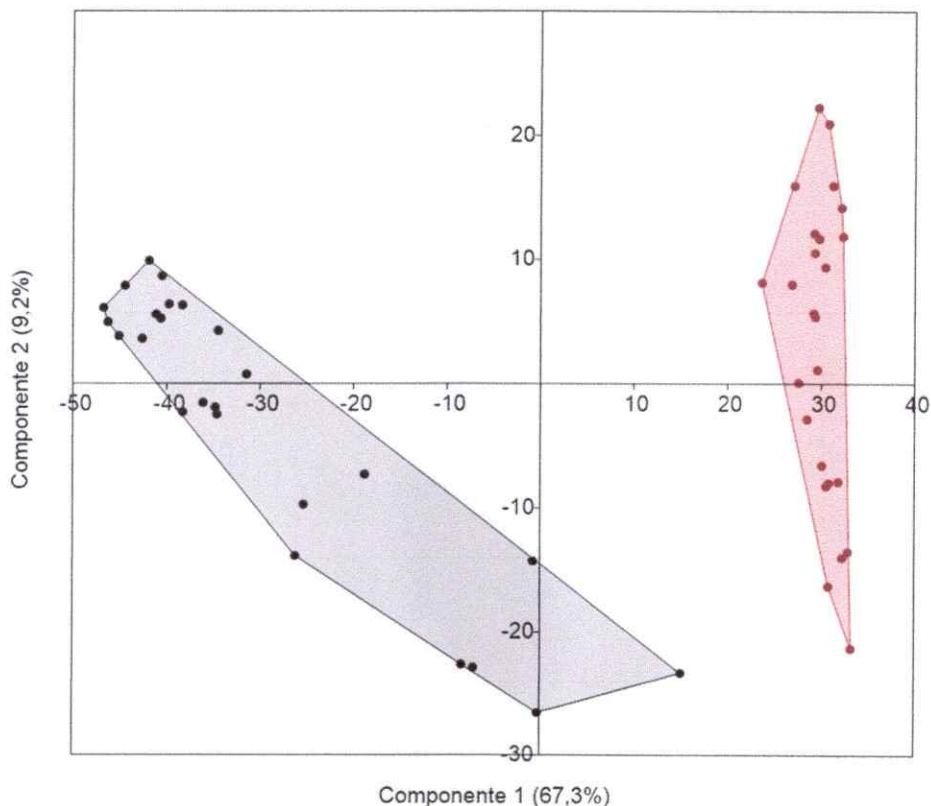




**Figura 13.** Perfiles de TRFLP del gen *nifH* obtenidos a partir de las muestras de sustrato asociado a los líquenes *Peltigera* (arriba) y *Cladonia* (abajo) con las enzimas de restricción *HhaI* (TRFs indicados en la leyenda con un número seguido de HI) y *HaeIII* (TRFs indicados en la leyenda con un número seguido de HIII).

Los fragmentos más representados para los sustratos asociados a líquenes *Peltigera* (Figura 13, arriba) fueron 30 HIII (promedio 18,6%) y 55 HI (promedio 18,5%); mientras que para el caso de los sustratos asociados a *Cladonia* (Figura 13, abajo) los más abundantes fueron 92 HIII (promedio 49,8%) y 42 HIII (promedio 12,3%).

En la Figura 14 se muestra el resultado del análisis de componentes principales con los datos de los perfiles de TRFLP del gen *nifH* tanto para los sustratos asociados a *Peltigera* como los asociados a *Cladonia*.



**Figura 14.** Análisis de componentes principales basado en los perfiles de TRFLP obtenidos a partir de las muestras de sustrato; *Peltigera* (negro) y *Cladonia* (rojo).

Al comparar los patrones de TRFLP obtenidos desde ambos líquenes mediante ANOSIM, se observó que estos grupos presentan una diferencia significativa ( $p=0,0001$ ), mientras que un análisis de SIMPER entregó una disimilitud de 84,6% entre ellos (Tabla 5).

**Tabla 5.** Análisis de similitud de los perfiles de TRFLP del gen *nifH* obtenidos a partir de las muestras de sustrato asociados a líquenes *Peltigera* (TRFLP-ps) y *Cladonia* (TRFLP-cs).

Muestras	R	p	Disimilitud (%)
TRFLP-ps	0,9695	0,0001	84,6
TRFLP-cs			

Los valores de R y  $p$  derivan de las comparaciones ANOSIM y el porcentaje de disimilitud de las comparaciones SIMPER; ambos análisis usando el índice de Bray-Curtis.

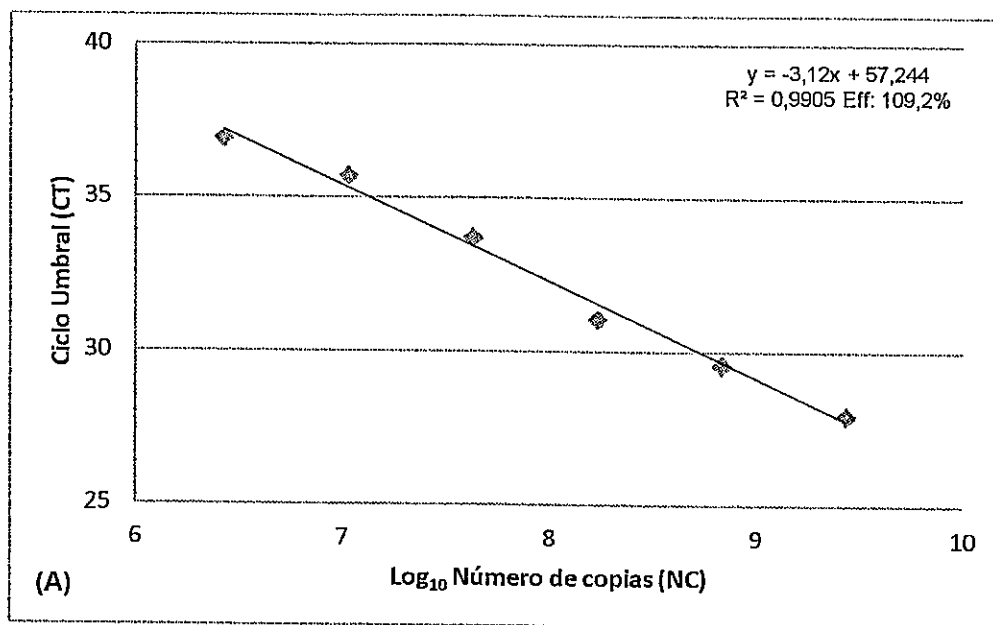
### 5.3 Determinación de la abundancia del gremio de bacterias fijadoras de nitrógeno en la microbiota de líquenes de los géneros *Peltigera* y *Cladonia* y en la microbiota de sus sustratos asociados.

La cuantificación del gen *nifH* se realizó mediante la técnica de PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR) tanto en las muestras de talo como de sustrato de *Cladonia* y *Peltigera*.

Debido que los partidores utilizados no excluyen las cianobacterias presentes en el talo de *Peltigera*, se realizaron 2 curvas de calibración, una para determinar directamente el número de copias del gen *nifH* y otra con el fin de cuantificar las cianobacterias presentes en el talo de *Peltigera* para poder

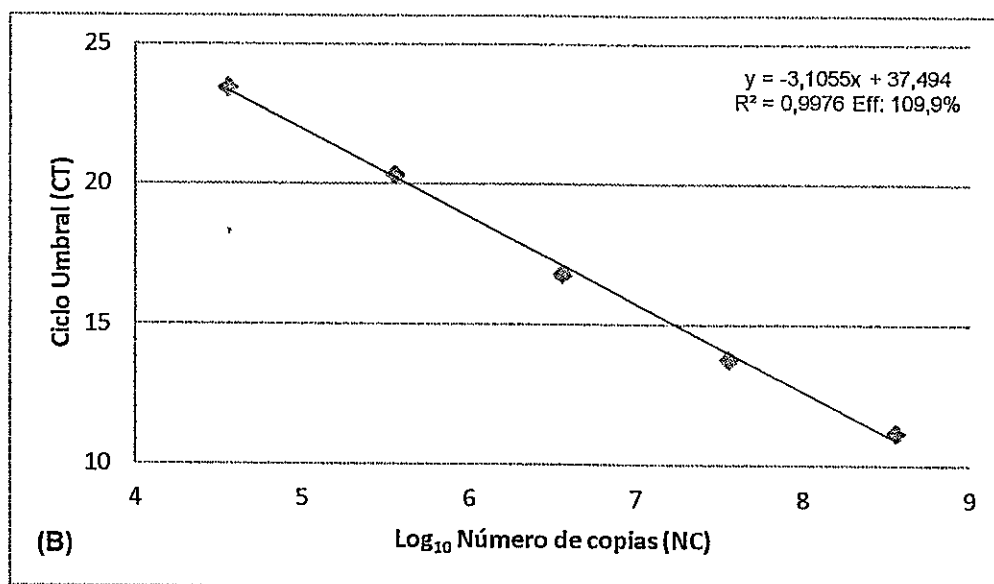
relativizar la cuantificación de fijadores de nitrógeno que no corresponden al fotobionte cianobacteriano.

En las Figuras 15 y 16 se observan las curvas estándar obtenidas para la cuantificación del gen *nifH* y la de la región v1-v3 del gen del rRNA 16S de cianobacterias, respectivamente. En ambos casos se calcularon coeficientes de determinación cercanos a 1 y porcentajes de eficiencia menores a 110%, parámetros adecuados para usar las curvas para la cuantificación de los respectivos genes en las muestras. El rango dinámico se definió entre  $1,0 \times 10^{-1}$  ng y  $9,8 \times 10^{-3}$  ng de DNA molde para el gen *nifH* y entre  $1,0 \times 10^{-1}$  ng y  $1,0 \times 10^{-5}$  ng de DNA molde para el gen del rRNA 16S, ya que para cantidades de DNA molde superiores o inferiores, las curvas de calibración perdían linealidad.



**Figura 15.** Curvas de calibración para la evaluación del número de copias del gen *nifH*. Se determinaron la ecuación de regresión lineal, el valor del coeficiente de determinación ( $R^2$ ) y la eficiencia del ensayo.

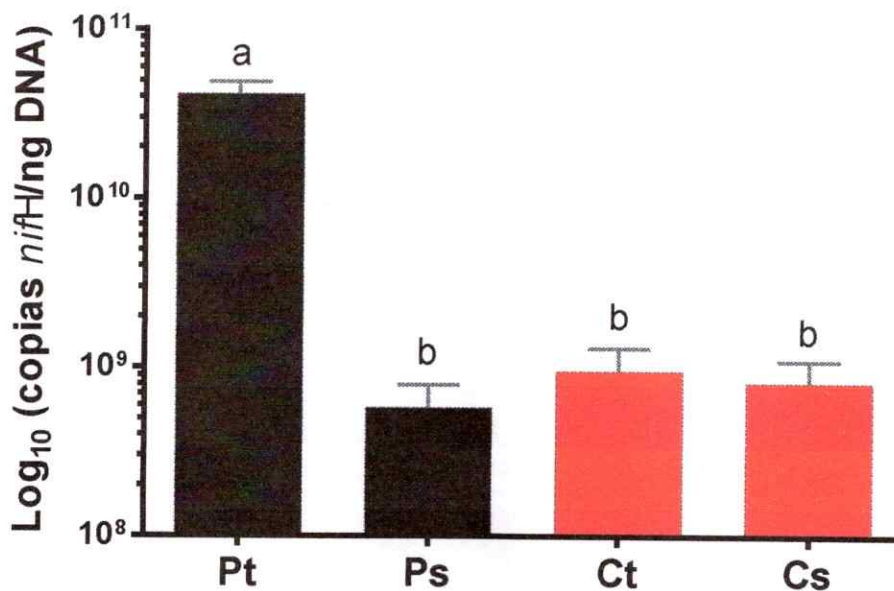




**Figura 16.** Curvas de calibración para la evaluación del número de copias del gen del rRNA 16S. Se determinaron la ecuación de regresión lineal, el valor del coeficiente de determinación ( $R^2$ ) y la eficiencia del ensayo.

La abundancia del gen utilizado como marcador molecular del gremio de bacterias fijadoras de nitrógeno, se expresó como el logaritmo decimal del número de copias del gen *nifH* por nanogramo de DNA genómico. Los resultados de qPCR muestran que existe significativamente mayor abundancia de genes *nifH* en los talos de *Peltigera* respecto a los sustratos asociados a ellos, así como también respecto a los encontrados en los talos y sustratos de *Cladonia* (Figura 17). Los líquenes *Peltigera* de este estudio corresponden a representantes bipartitos, cuyo fotobionte es una cianobacteria; por este motivo se relativizó la cuantificación del gen *nifH* con la del gen del rRNA 16S de cianobacterias con el fin de desestimar las señales provenientes del

cianobionte. Para ello se consideró la razón 1:1 gen *nifH* versus gen del rRNA 16S (Yeager *et al.*, 2012). Sin embargo, la resta no aportó cambios notorios en la cuantificación del gen *nifH* en los talos de *Peltigera* ( $4,1 \times 10^{10}$  número de copias/ng DNA) ya que la abundancia del gen del rRNA 16S de cianobacterias ( $5,4 \times 10^5$  número de copias/ng DNA) fue 5 órdenes de magnitud menor a la del gen *nifH*.



**Figura 17.** Abundancia de bacterias fijadoras de nitrógeno expresada como el logaritmo decimal del número de copias de *nifH* por nanogrammo de DNA genómico. Se muestran las medias y los errores estándar como barras de error. Letras diferentes sobre las barras representan valores significativamente diferentes (ANOVA-Tukey;  $p \leq 0,05$ ). Talo de *Peltigera* (Pt), sustrato de *Peltigera* (Ps), talo de *Cladonia* (Ct) y sustrato de *Cladonia* (Cs).

## 6. DISCUSIÓN

### 6.1 Identificación molecular de los líquenes del género *Peltigera* y *Cladonia* de la Reserva Nacional Coyhaique

La identificación de los líquenes comprende un objetivo fundamental para poner a prueba la hipótesis de este trabajo, debido a la comparación entre dos tipos de líquenes bipartitos, con fotobiontes diferentes, unos con cianobacteria, responsables de la fijación de nitrógeno y carbono, en el caso de los del género *Peltigera* (cianolíquenes), y otros con un alga verde responsable solamente de la fijación de carbono, en el caso de los del género *Cladonia* (clorolíquenes) (Hodkinson, 2011). La identificación líquénica basada en aspectos morfológicos implica una dificultad debido a la existencia de especies crípticas, las cuales no poseen características morfológicas diferenciadoras que permitan su identificación y asignación taxonómica (Lumbsch y Leavitt, 2011), por lo que la identificación de los hongos liquenizados de este trabajo se realizó mediante marcadores moleculares. El marcador utilizado fue el gen del rRNA 28S de hongos, este es un gen conservado con valor taxonómico y filogenético, por lo que es adecuado para la identificación del componente fúngico de los líquenes (Miadlikowska *et al.*, 2003). Mediante este análisis, se lograron distinguir 6 haplotipos de micobionte para *Peltigera* y 11 para *Cladonia*, todos bipartitos, ambos situados en el mismo bosque, de la Reserva Nacional Coyhaique.

Los árboles filogenéticos obtenidos tanto para *Cladonia* como para *Peltigera*, se condicen con estudios anteriores y más exhaustivos, que indican que los hongos liquenizados de ambos géneros tienen un origen monofilético (Miadlikowska y Lutzoni, 2000; Stenroos *et al.*, 2002; Miadlikowska y Lutzoni, 2004).

Existen pocos estudios sobre la diversidad de líquenes del género *Peltigera* en la región de Aysén, lugar de procedencia de las muestras (Martínez, 2003; Quilhot *et al.*, 2012; Zúñiga *et al.*, 2015; Leiva *et al.*, 2016), pero todas las especies identificadas (*P. ponojensis*, *P. extenuata*, *P. rufescens*, *P. frígida*, grupo de *P. canina* y grupo de *P. hymenina*) fueron previamente reportadas en la Reserva Nacional Coyhaique (Zúñiga *et al.*, 2015; Leiva *et al.*, 2016).

Por otra parte, en la filogenia de *Cladonia*, CM5 y CM6 están altamente emparentadas con *C. stipitata* y *C. chlorophaea*, respectivamente. Quilhot *et al.* (2012), realizó una compilación de las especies de líquenes, incluyendo *Cladonia*, presentes en la región de Aysén, en la cual no se registró la presencia de *C. stipitata*. Esta especie fue descrita por primera vez en América del Norte (Lendemer y Hodkinson, 2009) y hasta el momento no hay registros de descripciones de esta especie en Chile ni en Sudamérica.

Por otra parte, CM1, CM2, CM3, CM4, CM5, CM6, CM7 y CM8 están catalogadas dentro del Supergrupo de *Cladonia*. Asimismo, CM10 y CM11 están dentro del Supergrupo Cocciferae, mientras que CM9, está dentro del Supergrupo Crustaceae, pero no está directamente emparentada con las

secuencias obtenidas desde la base de datos, por lo que posiblemente sea una nueva especie no descrita en América del Sur; sin embargo, se requieren análisis posteriores para confirmar dicha posibilidad.

Estos resultados dejan en evidencia que, aunque el sur de Chile presenta una gran diversidad de líquenes, es una zona aún poco estudiada (Zúñiga *et al.*, 2015, Leiva *et al.*, 2016, Aranda, 2016).

## **6.2 Determinación de la estructura de bacterias fijadoras de nitrógeno en la microbiota de líquenes de los géneros *Peltigera* y *Cladonia*.**

Los microorganismos fijadores de nitrógeno son de gran importancia ecológica ya que proporcionan la única fuente biológica natural de nitrógeno en la biósfera fijado desde la atmósfera. Estos organismos transforman enzimáticamente  $N_2$  atmosférico en equivalentes de amonio necesarios para la biosíntesis de macromoléculas celulares esenciales. Las bacterias fijadoras de nitrógeno son diversas y la mayoría no han sido cultivadas (Zehr *et al.*, 2003), por este motivo se hace indispensable utilizar marcadores moleculares para aquellas investigaciones en las que se estudian la filogenia, la diversidad y la abundancia de microorganismos fijadores de nitrógeno. La fijación de nitrógeno se lleva a cabo por la enzima nitrogenasa, cuyas múltiples subunidades están codificadas por los genes *nifH*, *nifD* y *nifK* (Gaby y Buckley, 2012). De los tres, el gen *nifH* es el más representado en las bases de datos (Grube *et al.*, 2009, Hodkinson y Lutzoni 2009), siendo uno de los genes funcionales más antiguos

en la historia de la evolución génica y las relaciones filogenéticas, considerándose un marcador molecular adecuado para el análisis de la diversidad de organismos fijadores de nitrógeno. Por lo tanto, el gen *nifH* se ha utilizado como biomarcador primario para estudiar las asociaciones microbianas diazotróficas y la estructura genética de estos gremios en diferentes microhábitats como el suelo (Widner *et al.*, 1999; Poly *et al.*, 2001a, 2001b; Zehr *et al.*, 1995, 1997), ambientes polares (Olson *et al.*, 1998), intestino de termitas (Ohkuma *et al.*, 1999), entre otros.

Liba *et al.*, (2006), aislaron 17 cepas de bacterias fijadoras de nitrógeno de especies de líquenes foliosos de la selva atlántica de Brasil, pertenecientes a diferentes géneros de Gammaproteobacteria: *Acinetobacter*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Serratia* y *Stenotrophomonas*; sin embargo, la fracción cultivable en general representa sólo una pequeña fracción de la comunidad microbiana. Ramírez-Fernández *et al.* (2014) demostraron que las diferencias entre las comunidades bacterianas asociadas a líquenes del género *Peltigera* dependen en parte del contexto ambiental (bosque maduro, renoval y pradera) en el que se presentaban, y del mismo modo Zehr *et al.* (2003) indican que la distribución de diazótrofos varía como una función del tipo de hábitat en el medio ambiente. Por este motivo, las muestras utilizadas provienen de la misma reserva y del mismo bosque, todo esto con el fin de disminuir la influencia que posee el contexto ambiental sobre la estructuración de las comunidades bacterianas.

La comparación entre la estructura genética de las bacterias fijadoras de nitrógeno presentes en los talos liquénicos, comparada con la de los sustratos, entregó diferencias significativas, aunque algunos TRFs estuvieron presentes tanto en el talo como en el sustrato de cada tipo de líquen. Esto se relaciona con varios trabajos, como el descrito por Aschenbrenner *et al.*, (2014) quienes proponen que existe una dispersión de propágulos vegetativos del talo el cual ya viene con una microbiota *per se*, favoreciendo el desarrollo del líquen. Del mismo modo, se ha descrito que existe una fuerte selección de microorganismos desde el sustrato donde los líquenes crecen, ya sea por parte del micobionte como del fotobionte, existiendo incluso una serie de factores extrínsecos al talo que favorecen la selección de la microbiota asociada (Leiva *et al.*, 2016, Aranda, 2016). Todo hace pensar que tanto los factores intrínsecos como extrínsecos, podrían estar seleccionando además gremios particulares, como es el caso de los fijadores de nitrógeno, necesarios para el desarrollo del talo.

Cabe destacar que para *Peltigera* se obtuvo una menor disimilitud (57,9%), que para *Cladonia* (94,7%), al comparar la estructura genética de las bacterias fijadoras de nitrógeno en los talos y en los sustratos. Esto podría ser consecuencia de las diferentes formas de crecimiento de ambos tipos de líquenes. Los líquenes *Peltigera* tienen un crecimiento del tipo folioso y están en íntima interacción con el sustrato donde crecen; mientras que los líquenes

*Cladonia* tienen un crecimiento del tipo fruticoso, irguiéndose desde el sustrato y presentando por ende sólo pequeñas zonas de contacto con el mismo.

La riqueza de TRFs obtenida desde las muestras de talo de *Peltigera* fue menor en comparación al talo de *Cladonia*. Además, las estructuras de los fijadores de nitrógeno provenientes de los diferentes talos líquénicos, i.e. *Peltigera* y *Cladonia*, presentaron una alta disimilitud (86,1%), probablemente debido a que las comunidades bacterianas del talo se encuentran estructuradas por la interacción directa con el micobionte, el cual juega un rol importante en la selección de su microbiota asociada debido a la generación de metabolitos secundarios (Leiva *et al.*, 2016). De esta forma, cada especie fúngica puede seleccionar aquellos grupos bacterianos que sean un aporte benéfico para el líquen (Erlacher *et al.*, 2015; Aschenbrenner *et al.*, 2016), seleccionando en este caso, cada micobionte, gremios bacterianos relacionados con la fijación de nitrógeno acordes a las necesidades que requiere cada especie.

La diversidad del gremio de bacterias fijadoras de nitrógeno del talo de *Cladonia*, en comparación al talo de *Peltigera*, fue mayor. Al poseer los líquenes del género *Cladonia* un alga verde como fotobionte, los miembros clásicos de la simbiosis no poseen la capacidad de fijación de nitrógeno, como sí la tienen los cianobiontes de *Peltigera* (Hodkinson, 2011). Por este motivo, posiblemente la diversidad de bacterias fijadoras de nitrógeno en *Cladonia* sea mayor que en *Peltigera*, con la finalidad de suplir el nitrógeno necesario para su desarrollo (Henkel y Plotnikova, 1973; Lambright y Kapustka, 1981; Cardinale *et al.*, 2006;



Liba *et al.*, 2006; Hodkinson, 2011), aunque se requieren ensayos de actividad para poder confirmar esta suposición.

De manera similar, al comparar los sustratos de ambos líquenes, si bien esta vez los sustratos asociados a *Cladonia* presentaron una riqueza menor que los de *Peltigera*, ambos gremios también presentaron una disimilitud alta (84,6%). Sería esperable que al tratarse de sustratos provenientes del mismo bosque, la disimilitud sea menos. Sin embargo, esta diferencia de estructura sea probablemente debido a factores intrínsecos del líquen, como por ejemplo el micobionte, el fotobionte y/o los metabolitos secundarios generados por estos mismos, ya que se ha registrado, al menos en *Peltigera*, que estos factores pueden estructurar la microbiota del sustrato (Leiva *et al.*, 2016).

Previamente, Hodkinson *et al.* (2012) realizó un estudio en el cual asoció el tipo de fotobionte y la estructura de la comunidad bacteriana en líquenes de distintos géneros, aunque estudiando solo las comunidades asociadas íntimamente a los talos liquénicos. En dicho trabajo las muestras se agruparon de acuerdo al tipo de fotobionte (i.e. cianobacterias, algas verdes, o ambos) (Hodkinson *et al.*, 2012), y si bien en esta tesis no se identificaron los fotobiontes asociados a los líquenes, las especies identificadas son bipartitas y los fotobiontes de ambos géneros son completamente diferentes, ya que mientras en el caso de los representantes de *Peltigera* es una cianobacteria, en el caso de los de *Cladonia* es un alga verde. Por lo tanto, nuestros resultados están en concordancia con lo descrito por Hodkinson *et al.*, (2012) y otras

publicaciones recientes donde líquenes diferentes, con micobiontes, fotobiontes y necesidades diferentes, requieren y seleccionan la microbiota del sustrato acorde a sus insuficiencias metabólicas. Por ejemplo, Leiva *et al.* (2016), además de encontrar que la diversidad de metabolitos está inversamente relacionada con la estructura genética de las comunidades bacterianas tanto del líquen como del sustrato, sugiere que la microbiota bacteriana asociada al sustrato es diferente y que ésta estaría influenciada fuertemente por el cianobionte presente en el líquen, lo que podría indicar una influencia del metabolismo del fotobionte sobre la disponibilidad de nutrientes del suelo.

Tanto los TRFs como el qPCR basados en el marcador molecular *nifH*, prueban la existencia de actividad potencial de fijación de nitrógeno asociada tanto al talo como al sustrato de los líquenes *Peltigera* y *Cladonia*. Esto contrasta con lo mencionado por Hodkinson (2011), quien realizó un análisis metagenómico y mediante búsqueda en la base de datos MG-RAST, determinó que no existía una relación con genes posiblemente relacionados a la fijación de nitrógeno en talos de *Cladonia*, mientras que sí encontró un alto porcentaje de esos genes en talos de *Peltigera*.

La abundancia del gen *nifH* fue mucho mayor en los talos de *Peltigera* que de *Cladonia* probablemente debido a la cianobacteria presente en el talo líquénico de *Peltigera*. De todas formas, el hecho de que se detectara una menor presencia del gen *nifH* en *Cladonia* comparado con *Peltigera*, tiene poca relación con la capacidad de fijación de nitrógeno en *Cladonia*, ya que la fijación

de nitrógeno está regulada de manera diferente en proteobacterias (grupo más abundante en la microbiota líquénica) y cianobacterias. Generalmente las proteobacterias fijan nitrógeno en momentos específicos y cuando las condiciones micro-climáticas son adecuadas, mientras que las cianobacterias designan células específicas como fijadoras de nitrógeno (Belnap, 2001).

En resumen, existe una mayor diversidad del gremio de bacterias fijadoras de nitrógeno en *Cladonia*, pero una menor abundancia del gen *nifH*. Si bien Hodkinson (2011) no encontró genes putativos relacionados con la fijación de nitrógeno, al analizar el gen del rRNA 16S bacteriano presente en el talo líquénico de *Cladonia*, encontró alrededor de un 10% de Rhizobiales en *Cladonia* y alrededor de un 65% en *Peltigera*. Publicaciones pasadas, sugieren que el orden Rhizobiales es particularmente común entre los líquenes, el cual está conformado en su mayoría por bacterias capaces de fijar nitrógeno, y existiendo incluso dentro de este orden un grupo específicos de líquenes, denominado LAR1 (Hodkinson y Lutzoni, 2009; Bates *et al.*, 2011; Cardinale *et al.*, 2012b). Recientemente, Erlacher *et al.* (2015), realizó un análisis funcional basado en el "entorno de anotación SEED" centrado en Rhizobiales, sobre representantes del liquen *Lobaria pulmonaria* (tripartito), revelando funciones que ayudan a la simbiosis, entre las que se incluían la producción de auxinas y vitaminas, la protección contra el estrés y la fijación de nitrógeno.

Finalmente, como se observó en el presente trabajo y como ha sido revisado por Aschenbrenner *et al.*, (2016), existe una comunidad bacteriana específica

asociada 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 liquen 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), tal es el caso del gremio de bacterias fijadoras de nitrógeno, presentes tanto en *Cladonia* como en *Peltigera*.

## 7. CONCLUSIONES

1. La Reserva Nacional Coyhaique presenta una mayor diversidad de líquenes del género *Cladonia* que del género *Peltigera*, encontrándose para el primero una especie no descrita previamente en América del sur: *Cladonia stipitata*.
2. Si bien la estructura del gremio de fijadores de nitrógeno es diferente entre los talos y sustratos de los líquenes estudiados, la microbiota de los talos comparte algunos filotipos con la microbiota de los sustratos. Esto sugiere que estos últimos podrían constituir una fuente de diazótrofos para conformar la microbiota líquénica.
3. La estructura del gremio de fijadores de nitrógeno también se diferencia de acuerdo al género al cual pertenecen los líquenes, lo que se explicaría por la influencia de los componentes simbióticos clásicos de los líquenes sobre los microorganismos que conforman la microbiota de los sustratos y la microbiota de los talos.
4. La abundancia de diazótrofos fue considerablemente mayor en la microbiota asociada a los talos de los cianolíquenes *Peltigera* que de los clorolíquenes *Cladonia*, probablemente debido a la presencia del cianobionte en los primeros; sin embargo, la diversidad de estos microorganismos fue menor en los cianolíquenes.

## 8. REFERENCIAS

- Ahmadjian V. (1993). The lichen symbiosis. Wiley & Sons, New York. USA.
- Altschul S, Gish W, Miller W, Myers E, y Lipman D. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215 (3), 403–410.
- Aranda C. (2016). El efecto de la cobertura arbórea predomina sobre la identidad de los simbioses en la estructuración del bacterioma de líquenes del género *Peltigera*. Tesis de Magister, Universidad de Chile, Chile.
- Aschenbrenner I, Cardinale M, Berg G, y Grube M. (2014). Microbial cargo: do bacteria on symbiotic propagules reinforce the microbiome of lichens?. *Applied and Environmental Microbiology*. 16, 3743–3752.
- Aschenbrenner I, Cernava T, Berg G, y Grube M. (2016). Understanding Microbial Multi-Species Symbioses. *Frontiers Microbiology*. 7 (180).
- Bates S, Cropsey G, Caporaso J, Knight R, y Fierer N. (2011). Bacterial communities associated with the lichen symbiosis. *Applied and Environmental Microbiology*, 77 (4), 1309–1314.
- Belnap J. (2001) Factors influencing nitrogen fixation and nitrogen release in biological soil crusts. In: Belnap, J., y Lange, O.L. (Eds). *Biological soil crusts: Structure, function, and management*. Springer-Verlag, pp. 241–261, New York, USA.
- Benson D, y Silvester W. (1993). Biology of *Frankia* strains, Actinomycete symbionts of actinorhizal plants. *Microbiology Review*, 57 (2), 293–319.
- Benson D, Karsch-Mizrachi I, Lipman D, Ostell J, y Sayers E. (2011). GenBank. *Nucleic Acids Research* 39(Database issue):D32–D37.
- Bonfante P, y Anca I. (2009). Plants, mycorrhizal fungi, and bacteria: A network of interactions. *Microbiology Review*, 63, 363–83.
- Bray J, y Curtis J. (1957). An ordination of the upland forest communities of southern Wisconsin. *Ecological Monographs*, 27 (4), 325–349.
- Cardinale M, Puglia A, y Grube M. (2006). Molecular analysis of lichen-associated bacterial communities. *FEMS Microbiol Ecology*, 57 (3), 484–495.
- Cardinale M, Vieira de Castro J, 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 (1), 63–71.
- Cardinale M, Steinova J, Rabensteiner J, Berg G y Grube M. (2012a). Age, sun, and substrate: triggers of bacterial communities in lichens. *Environmental Microbiology Reports*, 4 (1), 23–28.
- Cardinale M, Grube M, de Castro Jr JV, Muller H, y Berg G. (2012b). Bacterial taxa associated with the lung lichen *Lobaria pulmonaria* are differentially shaped by geography and habitat. *FEMS Microbiol Letters*, 329 (2), 111–115.

- Cornejo C, y Scheidegger C. (2013) Morphological aspects associated with repair and regeneration in *Lobaria pulmonaria* and *L. amplissima* (Peltigerales, Ascomycota). *Lichenologist* 45 (2), 285-289.
- Darriba D, Taboada G, Doallo R, y Posada D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9 (8), 772.
- DePriest P. (2004). Early molecular investigations of lichen-forming symbionts: 1986-2001. *Annual Review Microbiology*, 58, 273-301.
- 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 (1), 190-197.
- Edgar R. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32 (5), 1792-1797.
- Erlacher A, Cernava T, Cardinale M, Soh J, Sensen C, Grube M, y Berg G. (2015). Rhizobiales as functional and endosymbiotic members in the lichen symbiosis of *Lobaria pulmonaria* L. *Frontiers in Microbiology*, 6, 53.
- Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39 (4), 783-791.
- Gaby J, y Buckley D. (2012) A Comprehensive evaluation of PCR primers to amplify the *nifH* gene of nitrogenase. *PLoS ONE*, 7 (7), e42149.
- 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 (3), 401-415.
- Grube M, y Berg G. (2009). Microbial consortia of bacteria and fungi with focus on the lichen symbiosis. *Fungal Biology Reviews*, 23(3), 72-85.
- Grube M, Cardinale M, De Castro J, Muller H, y Berg G. (2009). Species-specific structural and functional diversity of bacterial communities in lichen symbiosis. *ISME Journal*, 3, 1105-1115.
- Hall TA. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 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), 1-9.
- Henkel P, y Plotnikova T. (1973). Nitrogen-fixing bacteria in lichens. *Izvestiya Akademii Nauk Seriya Biologicheskaya*, 807-813.
- Hodkinson B, y Lutzoni F. (2009). A microbiotic survey of lichen-associated bacteria reveals a new lineage from the Rhizobiales. *Symbiosis* 49 (3), 163-180.
- Hodkinson B. (2011). A phylogenetic, ecological, and functional characterization of non-photoautotrophic bacteria in the lichen microbiome. Dissertation submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy in the department of biology in the graduate school of Duke University; EE.UU.

- Hodkinson B, Gottel N, Schadt C, 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 (1), 147–161.
- Iskina R. (1938). On nitrogen fixing bacteria in lichens. *Bull Perm (Molotov) Biology Research Institutes*, 11, 133–139.
- Kiers E, y Denison R. (2008). Sanctions, cooperation, and the stability of plant-rhizosphere mutualisms. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 39, 215-236.
- Lambright D, y Kapustka A. (1981). The association of N<sub>2</sub>-fixing bacteria with *Dermatocarpon miniatum* and *Lepraria* sp. *Botanical Society of America: Miscellaneous*, 160, 5.
- Lee Y, Kim E, Lee H, y Hong S (2014). Biodiversity and physiological characteristics of Antarctic and Arctic lichens-associated bacteria. *World Journal Microbiology Biotechnology*, 30, 2711-2721.
- Leigh J, y Dodsworth J. (2007). Nitrogen regulation in bacteria and archaea. *Annual Review of Microbiology*, 61, 349-377
- Leiva D. (2015). Relación de la producción de metabolitos y la actividad fenoloxidasa de líquenes del genero *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.
- Lendemer J, y Hodkinson B. (2009). The Wisdom of Fools: new molecular and morphological insights into the North American apodetiate species of *Cladonia*. *Opuscula Philolichenum*, 7, 79-100.
- Liba C, Ferrara F, ManWo G, Fantinatti-Garboggini F, Albuquerque R, Pavan C, Ramos P, Moreira-Filho C, y Barbosa H. (2006). Nitrogen-fixing chemo-organotrophic bacteria isolated from cyanobacteria-deprived lichens and their ability to solubilize phosphate and to release amino acids and phytohormones. *Journal Applied Microbiology*, 101 (5), 1076–1086.
- Lumbsch H, y Leavitt S. (2011). Goodbye morphology? A paradigm shift in the delimitation of species in lichenized fungi. *Fungal Diversity*, 50 (1), 59–72.
- Martínez I. (2003). Distribution patterns in the genus *Peltigera* willd. *The Lichenologist*, 35 (4), 301-323.
- 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 (6), 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 (3), 449–464.



- Mushegian A, Peterson C, Baker C, y Pringle A. (2011). Bacterial diversity across individual lichens. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 4249-4252.
- Nash T. (2008). Introduction. – In: Nash T. (Ed.), *Lichen Biology*. 2nd Edition, pp 1–8. Cambridge University Press, Cambridge.UK.
- Nübel U, Garcia-Pichel F, y Muyzer G. (1997). PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 3327–3332.
- Ohkuma M, Noda S, y Kudo T. (1999) Phylogenetic diversity of nitrogen fixation genes in the symbiotic microbial community in the gut of diverse termites. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 4926–4934.
- Olson J, Steppe T, Litaker R, Paerl H. (1998). N<sub>2</sub> fixing microbial consortia associated with the ice cover of Lake Bonney, Antarctica. *Microbiology and Ecology*, 36, 231–238.
- Øvstedal D, y Lewis-Smith R. (2001). *Lichens of Antarctica and South Georgia. A guide to their identification and ecology*. Studies in polar research. Cambridge University Press, Cambridge. UK, 411 pp.
- Panosyan A, y Nikogosyan G. (1966): The presence of *Azotobacter* in lichens. *Biologicheskii Zhurnal Armenii*, 19, 3–11.
- Petrini O, U Hake, y MM Dreyfuss. (1990). An analysis of fungal communities isolated from fruticose lichens. *Mycologia*, 82, 444–451.
- Poly F, Jocteur L, y Bally R. (2001a). Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil. *Research in Microbiology*, 152 (1), 95-103.
- Poly F, Ranjard L, Nazaret S, Gourbiere F, y Jocteur L. (2001b). Comparison of *nifH* gene pools in soils and soil microenvironments with contrasting properties. *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (5), 2255-2262.
- Printzen C, Fernández-Mendoza F, Muggia L, Berg G y Grube M. (2012). Alphaproteobacterial communities in geographically distant populations of the lichen *Cetraria aculeate*. *FEMS Microbiolgy Ecology*, 82, 316–325.
- Quilhot W, Cuellar M, Díaz R, Riquelme F, y Rubio C. (2012). Lichens of Aisen, Southern Chile. *Gayana Botanica*, 69(1), 57-87.
- Rai A. (2002). Cyanolichens: Nitrogen Metabolism. –In: Rai, A., Berman, B., and Rasmussen, U. (Eds). *Cyanobacteria in symbiosis*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 97–115.
- Rambaut A. (2012). FigTree: Tree Figure Drawing Tool (Version 1.4.0) [en línea] <<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>> [consulta: 26 septiembre 2013]
- Ramírez-Fernández L, Zúñiga C, Méndez M, Carú M, y Orlando J. (2013). Genetic diversity of terricolous *Peltigera* cyanolichen 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.
- Ronquist F, y Huelsenbeck J. (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19 (12), 1572–1574.
- Rösch C, Mergel A, y Bothe H. (2002). Biodiversity of denitrifying and dinitrogen-fixing bacteria in an acid forest soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 3818–3829.
- Sambrook J, Fritsch E, y Maniatis T. (1989). *Molecular cloning – a laboratory manual*. 2<sup>nd</sup> Edition. Cold Spring Harbor Press, New York.
- Selbmann L, Zucconi L, Ruisi S, Grube M, Cardinale M, y Onofri S. (2010). Culturable bacteria associated with Antarctic lichens: affiliation and psychrotolerance. *Polar Biology*, 33, 71–83.
- Schwencke J, y Carú M. (2001). Advances in actinorhizal symbiosis: Host plant-*Frankia* interactions, biology and applications in arid land reclamation. A review. *Arid Land Research Management*, 15 (4), 285–327.
- Shannon C, Weaver W. (1963). *The mathematical theory of communication*. University of Illinois Press, Urbana. 125 pp.
- Sigurbjörnsdóttir A, Andrésón, 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, Schneider K, Stabentheiner E, Toome-Heller M, Thor G, Mayrhofer H, Johannesson H, y McCutcheon J. (2016). Basidiomycete yeasts in the cortex of ascomycete macrolichens. *Science*, 353, 488–492.
- Stenroos S, Hyvönen J, Myllys L, Thell A, y Ahtiş T. (2002). Phylogeny of the Genus *Cladonia* s.lat, (Cladoniaceae, Ascomycetes) Inferred from Molecular, Morphological, and Chemical Data. *Cladistics*, 18 (3), 237–278.
- 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 and Evolution*, 28 (10), 2731–2739.
- Till-Bottraud I, Fajardo A, y Rioux D. (2012). Multi-stemmed trees of *Nothofagus pumilio* second-growth forest in Patagonia are formed by highly related individuals. *Annals of Botany*, 110 (4), 905–913.
- Yeager C, Kuske C, Carney T, Johnson S, Ticknor L, y Belnap J. (2012). Response of biological soil crust diazotrophs to season, altered summer precipitation, and year-round increased temperature in an air grassland of the Colorado Plateau, USA. *Frontiers in Microbiology*, 3 (358).
- Widner B, Murr C, Wirleitner B, Mayer C, Baier-Bitterlich G y Fuchs D. (1999). The importance of neopterin as a laboratory diagnostic marker of immune activation. *Pteridines*, 10, 101–111.

- Zehr J, Mellon M, Braun S, Litaker W, Steppe T, y Paer H. (1995). Diversity of heterotrophic nitrogen fixation genes in a marine cyanobacterial mat. *Applied and Environmental Microbiology*, 61 (7), 2527-2532.
- Zehr J, Mellon M, y Hiorns W. (1997). Phylogeny of cyanobacterial *nifH* genes: evolutionary implications and potential applications to natural assemblages. *Microbiology*, 143 (4), 1443-1450.
- Zehr J, Jenkins B, Short S, y Steward G. (2003) Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. *Applied and Environmental Microbiology*, 5, 539-554.
- Zook P. (1983). A Study of the role of bacteria in lichens. MA thesis, Clark University, Worcester, Mass.
- Zúñiga C. (2013). Measuring the factors involved in the successful establishment of the cyanolichen *Peltigera*. Tesis de Doctorado, Universidad de Chile, Chile.
- Zúñiga C, Leiva D, Ramírez-Fernández L, Carú M, Yahr R y Orlando J. (2015). Phylogenetic diversity of *Peltigera* cyanolichens and their photobionts in Southern Chile and Antarctica. *Microbes and Environments*, 30 (2), 172-179.