

# UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



**DIVERSIDAD DE BACTERIAS CON POTENCIAL DE PRODUCIR  
FITOHORMONAS EN CIANOLÍQUENES *Peltigera* DEL SUR DE CHILE**

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de  
Magíster en Bioquímica área de Especialización en Bioquímica  
Ambiental y Memoria para optar al Título de Bioquímica por:

***KARCIA ISABEL WYSS TOLEDO***

**Directora de Tesis: Dra. Julieta Orlando**

**Codirectora de Tesis: Dra. Katerin Almendras**

**Santiago-CHILE**

**Enero 2024**

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

**INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER**

**Se informa a la Dirección de la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por el candidato**

**KARCIA ISABEL WYSS TOLEDO**

**Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización: Bioquímica Ambiental, y Título de Bioquímica, en el examen público rendido el día**

---

**Director de Tesis:**

**Dra. Julieta Orlando**

---

**Codirector de Tesis:**

**Dra. Katerin Almendras**

---

**Comisión Evaluadora de Tesis:**

**Dr. Davor Cotoras**

---

**Dr. Carlos Santiviago**

---

**Dr. Francisco Chávez**

---

## FINANCIAMIENTO

Este trabajo de investigación fue financiado a través de los siguientes proyectos:

- FONDECYT N°1181510 (Dra. Julieta Orlando)
- Instituto Milenio BASE ICN2021\_002 (Dra. Julieta Orlando)

Presentaciones a Congresos, Jornadas o Reuniones Científicas

**Wyss, K.**, Bertín, A., Delgado, M., Orlando, J., Zúñiga, A. 2021. La composición de ácidos orgánicos de bajo peso molecular exudados por las raíces de *Embothrium coccineum* (Notro) depende del origen de las semillas y el tipo de sustrato volcánico en el que se desarrollan. LXIV Reunión Anual Sociedad de Biología de Chile. Modalidad on-line, Chile.

**Wyss, K.**, Almendras, K., Veas-Mattheos, K., Orlando, J. 2022. Las bacterias asociadas a líquenes *Peltigera* del sur de Chile tienen el potencial de producir hormonas que podrían contribuir a la tolerancia al estrés ambiental. XLIV Congreso Chileno de Microbiología. La Serena, Chile.

# ÍNDICE GENERAL

<b>FINANCIAMIENTO</b>	iii
<b>ÍNDICE GENERAL</b>	v
<b>ABREVIATURAS</b>	vi
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	x
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	xii
<b>ÍNDICE DE TABLAS ANEXO</b>	xiii
<b>RESUMEN</b>	xiv
<b>ABSTRACT</b>	xvi
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	
1.1 Líquenes.	1
1.2 Bacterias asociadas a los líquenes.	3
1.3 Fitohormonas.	5
1.4 Fitohormonas en líquenes.	6
1.5 Fitohormonas y estrés ambiental.	8
1.6 Cianolíquenes <i>Peltigera</i> del sur de Chile.	10
1.7 Planteamiento del problema.	13
<b>2. HIPÓTESIS</b>	15
<b>3. OBJETIVOS</b>	16
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
4.1 Toma de muestras.	17
4.2 Caracterización ambiental de los sitios.	17
4.3 Secuenciación masiva.	18
4.4 Predicción de funciones con PICRUSt2.	20
4.5 Abundancia y composición de las comunidades bacterianas.	22
4.6 Diversidad alfa y beta.	22
4.7 Partición de la varianza.	23

<b>5. RESULTADOS</b>	
5.1 Vía de síntesis de fitohormonas en bacterias.	25
5.2 Diversidad de las bacterias con potencial de producir fitohormonas	44
5.3 Factores ambientales que influyen sobre la diversidad de las bacterias con potencial de producir fitohormonas.	53
<b>6. DISCUSIÓN</b>	
6.1 Las vías de síntesis de fitohormonas en bacterias no se encuentran completamente descritas.	61
6.2 Las bacterias asociadas a líquenes <i>Peltigera</i> tienen el potencial de sintetizar cinco fitohormonas.	63
6.3 El ambiente es el principal factor que influye sobre las comunidades bacterianas con potencial de producir fitohormonas.	68
<b>7. CONCLUSIONES</b>	73
<b>8. REFERENCIAS</b>	75
<b>9. ANEXO</b>	86

## ABREVIATURAS

12-OPDA	: Ácido 12-oxofitodienoico
4-Cl-IAA	: 4-cloroindol-3-acético
4DO	: 4-deoxiorobanchol
ABA	: Ácido abscísico
ADP	: Adenosín difosfato
AKG	: 2-oxoglutarato
AMP	: Adenosín monofosfato
AO	: Aldehído oxidasa
AOC	: Aleno óxido ciclasa
AOS	: Óxido de aleno sintasa
ASVs	: <i>Amplicon Sequence Variants</i>
ATP	: Adenosín trifosfato
BR	: Brasinoesteroides
BR6ox1	: BR6 oxidasa 1
BR6ox2	: BR6 oxidasa 2
CCD7	: Dioxigenasa de escisión de carotenoides 7
CCD8	: Dioxigenasa de escisión de carotenoides 8
CH	: Contenido hídrico
CL	: Carlactona
CLA	: Ácido carlactónico
CO	: Carbono orgánico
COG	: <i>Cluster of Orthologous Groups</i>
CPD	: Fotomorfogénesis constitutiva y proteína de enanismo
CPS	: Ent-copalil difosfato sintasa
CYP450	: Citocromo P450
CYP771	: Citocromo P771
cZ	: Cis-zeatina

cZR	: Ribosido de cis-zeatina
cZRMP	: cZ ribosido-50-monofosfato
DHZ	: Dihidrozeatina
DMAPP	: Isopentenilo del pirofosfato de dimetilalilo
DNA	: Ácido desoxirribonucleico
DWF4	: ENANO-4
EC	: <i>Enzyme Commission</i>
EFE	: Enzima formadora de etileno
EP	: Estacionalidad de la precipitación
ET	: Etileno
ET	: Temperatura estacional
GA	: Giberelinas
GGPP	: Geranil-geranil difosfato
HPODE	: Ácido hidroepoxioxtacedinoico
IAA	: Ácido indol acético
IAAld	: Indol-3-acetaldehido
IAM	: Indol-3-acetamida
IAN	: Indol-3-acetonitrilo
IBA	: Ácido indol 3-butirico
ICS	: isocorismato sintasa
iP	: N6-(2-isopentenil) adenina
IPA	: Indol-3- piruvato
iPRDP	: iP ribosido-50-difosfato
iPRMP	: iP ribosido-50-monofosfato
iPRTP	: iP ribosido-50-trifosfato
IPT	: Isopentenil transferasa
Iso	: Isothermalidad
JA	: Ácido jasmónico
KAO	: Ácido ent-kaurenoico

KMBA	: Ácido 2-ceto-metiltiobutirico
KO	: <i>KEEG ORTHOLOGY</i>
KO	: Ent-kaureno oxidasa
KS	: Ent-kaureno sintasa
LOG	: Citoquinina fosforribohidrolasa " <i>Lonely guy</i> "
LOX	: Lipoxigenasa
MiaE	: tRNA 2-metiltio-N6-isopentenil-adenosina hidroxilasa
N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	: Nitrógeno en forma de amonio
N-NO <sub>3</sub> <sup>+</sup>	: Nitrógeno en forma de nitrato
OPR	: Ácido 12-oxofitodienoico reductasa
PAA	: Ácido fenilacético
pb	: Pares de bases
PCA	: Análisis de componentes principales
PCR	: Reacción en cadena de la polimerasa
PICRUST2	: <i>Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States</i>
PMa	: Precipitación máxima
PMA	: Precipitación media anual
PMi	: Precipitación mínima
PMTc	: Precipitación media del trimestre más cálido
PMTf	: Precipitación media del trimestre más frío
PMTH	: Precipitación media del trimestre más húmedo
PMTs	: Precipitación media del trimestre más seco
P	: Fósforo
RAT	: Rango anual de temperatura
RDA	: Análisis de redundancia
ROS	: Especies reactivas de oxígeno
ROT3	: Rotundifolia 3
RTM	: Rango de temperatura media

SA	: Ácido salicílico
SDR	: Deshidrogenasa reductasa de cadena corta
SL	: Estrigolactonas
TAM	: Triptamina
TMax	: Temperatura máxima
TMA	: Temperatura media anual
TMi	: Temperatura mínima
TMTC	: Temperatura media del trimestre más cálido
TMTF	: Temperatura media del trimestre más frío
TMTH	: Temperatura media del trimestre más húmedo
TMTS	: Temperatura media del trimestre más seco
tRNA	: Ácido ribonucleico de transferencia
TSO	: Triptófano cadena lateral oxidasa
tZ	: Trans-zeatina
tZRDP	: tZ ribosido-50-difosfato
tZRMP	: tZ ribosido-50-monofosfato
tZRTP	: tZ ribosido-50-trifosfato

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Vías de síntesis del ácido indol acético en bacterias.	28
<b>Figura 2</b>	Vías de síntesis de las citoquininas en bacterias.	31
<b>Figura 3</b>	Vías de síntesis del ácido salicílico en bacterias.	33
<b>Figura 4</b>	Vías de síntesis de las giberelinas en bacterias.	35
<b>Figura 5</b>	Vías de síntesis del etileno en bacterias.	36
<b>Figura 6</b>	Vías de síntesis del ácido abscísico en plantas.	37
<b>Figura 7</b>	Vías de síntesis del ácido jasmónico en plantas.	39
<b>Figura 8</b>	Vías de síntesis de los brasinoesteroides en plantas.	41
<b>Figura 9</b>	Vías de síntesis de las estrigolactonas y su precursor (carlactona) en plantas.	44
<b>Figura 10</b>	Diagrama de Venn del porcentaje de bacterias que contendrían genes relacionados a la síntesis de fitohormonas.	46
<b>Figura 11</b>	Abundancia y composición taxonómica a nivel de filo de las ASVs relacionadas a la síntesis de las distintas hormonas.	49
<b>Figura 12</b>	Diversidad de Shannon de las bacterias que contendrían genes relacionados a la síntesis de fitohormonas.	51
<b>Figura 13</b>	Análisis de escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) de las comunidades bacterianas con potencial de producir fitohormonas.	53
<b>Figura 14</b>	Análisis de componentes principales (PCA) basado en las variables edáficas para cada sitio y ambiente.	55
<b>Figura 15</b>	Análisis de componentes principales (PCA) basado en las variables bioclimáticas de cada sitio y ambiente.	56

**Figura 16** Partición de la varianza de las comunidades bacterianas con el potencial de producir fitohormonas entre las variables edáficas (verde) y bioclimáticas (azul). 60

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b>	Enzimas involucradas en las vías síntesis del ácido indol acético en bacterias.	29
<b>Tabla 2</b>	Enzimas involucradas en las vías de síntesis de las citoquininas en bacterias.	32
<b>Tabla 3</b>	Enzimas involucradas en las vías de síntesis del ácido salicílico en bacterias.	33
<b>Tabla 4</b>	Enzimas involucradas en las vías de síntesis de las giberelinas en bacterias.	35
<b>Tabla 5</b>	Enzimas involucradas en la vía de síntesis del etileno en bacterias.	36
<b>Tabla 6</b>	Enzimas involucradas en la vía de síntesis del ácido abscísico en plantas.	38
<b>Tabla 7</b>	Enzimas involucradas en la vía de síntesis del ácido jasmónico en plantas.	39
<b>Tabla 8</b>	Enzimas involucradas en las vías de síntesis de los brasinoesteroides en plantas.	42
<b>Tabla 9</b>	Enzimas involucradas en la vía de síntesis de las estrigolactonas y su precursor (carlactona) en plantas.	44
<b>Tabla 10</b>	PERMANOVA por pares.	55
<b>Tabla 11</b>	Significancia de las variables edáficas sobre la diversidad de las comunidades bacterianas con potencial de producir fitohormonas según análisis de redundancia (RDA).	57
<b>Tabla 12</b>	Significancia de las variables bioclimáticas sobre la diversidad de las comunidades bacterianas con potencial de producir fitohormonas según análisis de redundancia (RDA).	58

## ÍNDICE DE TABLAS ANEXO

<b>Tabla A1</b>	Georreferencia de las muestras de talo y sustrato recolectadas de las cuatro especies de cianolíquenes <i>Peltigera</i> en cuatro sitios del sur de Chile.	86
<b>Tabla A2</b>	Variables edáficas medidas en el sustrato de cada muestra recolectada.	89
<b>Tabla A3</b>	Variables bioclimáticas para cada sitio/ambiente.	92
<b>Tabla A4</b>	Porcentaje de varianza explicado por las variables edáficas según análisis de redundancia (RDA) para cada fitohormonas en talo y sustrato.	92
<b>Tabla A5</b>	Porcentaje de varianza explicado por las variables bioclimáticas según análisis de redundancia (RDA) para cada fitohormonas en talo y sustrato.	92

## RESUMEN

En la actualidad los líquenes son considerados como una asociación simbiótica entre un micobionte (hongo), un fotobionte (alga verde y/o cianobacteria) y una gran diversidad de microorganismos asociados. Estos microorganismos estarían cumpliendo diversas funciones esenciales para el desarrollo de los líquenes, tales como el suministro de nutrientes y protección contra factores de estrés biótico y abiótico. Algunos estudios han demostrado que las bacterias asociadas a los líquenes son capaces de producir distintas fitohormonas, pero la función que estarían cumpliendo estas moléculas dentro de la simbiosis líquénica todavía no está clara. En otros organismos simbióticos la producción de fitohormonas se ha relacionado principalmente al crecimiento de sus compañeros y a la protección contra factores de estrés abiótico. Dado que los líquenes son capaces de crecer en ambientes extremos, es probable que la producción de fitohormonas por parte del microbioma esté contribuyendo en la tolerancia de los líquenes a distintos tipos de estrés abiótico. El objetivo de esta tesis es identificar los factores que modulan la diversidad de las comunidades bacterianas con potencial de producir fitohormonas en talos y sustratos de cianolíquenes *Peltigera* del sur de Chile. Se propone que la diversidad de las comunidades bacterianas con potencial de producir fitohormonas está influenciada principalmente por el sitio geográfico donde crecen los líquenes, mientras que el contexto ambiental y la especie de micobionte actuarían como factores secundarios. Para comprobar esta hipótesis, las comunidades bacterianas presentes en los talos y sustratos líquénicos (*i.e.*,

el suelo adyacente al líquen) se analizaron mediante secuenciación masiva del gen 16S. Luego, la identificación de las bacterias con potencial de sintetizar fitohormonas se llevó a cabo mediante la búsqueda de una serie de genes que codifican enzimas involucradas en la síntesis de distintas fitohormonas dentro de los metagenomas bacterianos predichos con PICRUSt2. Se pudo determinar que las bacterias asociadas a los líquenes *Peltigera* de este estudio tienen el potencial de producir ácido indol acético, citoquininas, giberelinas, ácido salicílico y etileno, mientras que los genes relacionados a la síntesis de ácido abscísico, ácido salicílico, brasinoesteroides y estrigolactonas no se detectaron en los genomas o no se encontraron en la base de datos de PICRUSt2. En los talos hubo mayor abundancia de bacterias con el potencial de producir fitohormonas que en los sustratos, pero la diversidad bacteriana fue menor. Por otro lado, tanto el sitio geográfico, como el contexto ambiental y la especie del líquen influyeron significativamente sobre la diversidad bacteriana. Sin embargo, el tipo de ambiente fue el factor más importante, relacionado a las diferencias edáficas y bioclimáticas que existen entre los bosques y praderas. En conjunto, estos resultados sugieren que en los talos existe un mayor potencial de producción de fitohormonas mediada por comunidades bacterianas especializadas y que la producción de fitohormonas por parte de las bacterias asociadas a los líquenes está relacionada a la tolerancia de diferentes condiciones climáticas.

## ABSTRACT

### **Diversity of bacteria with potential to produce phytohormones in *Peltigera* cyanolichens from southern Chile**

Currently, lichens are considered a symbiotic association between a mycobiont (fungus), a photobiont (green algae and/or cyanobacteria), and a great diversity of associated microorganisms. These microorganisms would be fulfilling various essential functions for the development of lichens, such as the supply of nutrients and protection against biotic and abiotic stress factors. Some studies have shown that bacteria associated with lichens are also capable of producing different phytohormones, but the function that these molecules would fulfill within the lichen symbiosis is still unclear. In other symbiotic organisms, the production of phytohormones has been mainly related to the growth of their partners and protection against abiotic stress factors. Given that lichens can grow in extreme environments, the production of phytohormones by the microbiome is likely contributing to the tolerance of lichens to different types of abiotic stress. The objective of this thesis is to identify the factors that modulate the diversity of bacterial communities with the potential to produce phytohormones in thalli and substrates of *Peltigera* cyanolichens from southern Chile. It is proposed that the diversity of bacterial communities with the potential to produce phytohormones is mainly influenced by the geographic site where the lichens grow, while the environmental context and the mycobiont species would act as secondary factors.

To test this hypothesis, the bacterial communities present in the thalli and lichen substrates (*i.e.*, the soil adjacent to the lichen) were analyzed by massive sequencing of the 16S gene. Then, the identification of bacteria with the potential to synthesize phytohormones was carried out by searching for a series of genes that encode enzymes involved in the synthesis of different phytohormones within the bacterial metagenomes predicted with PICRUSt2. It was determined that the bacteria associated with the *Peltigera* lichens in this study would have the potential to produce indole acetic acid, cytokinins, gibberellins, salicylic acid, and ethylene, while the genes related to the synthesis of abscisic acid, salicylic acid, brassinosteroids, and strigolactones were not detected in the genomes or were not found in the PICRUSt2 database. In the thalli, there was a greater abundance of bacteria with the potential to produce phytohormones than in the substrates, but the bacterial diversity was lower. On the other hand, both the geographical site, the environmental context, and the lichen species significantly influenced bacterial diversity. However, the type of environment was the most important factor, related to the edaphic and bioclimatic differences between forests and grasslands. Taken together, these results suggest that in the thalli there would be a greater potential for phytohormone production mediated by specialized bacterial communities and that the production of phytohormones by bacteria associated with lichens would be related to the tolerance of different climatic conditions.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Líquenes

Los líquenes han sido definidos globalmente como una asociación simbiótica entre un micobionte (hongo), que da refugio y provee de minerales a los compañeros simbióticos; y un fotobionte (alga verde y/o cianobacteria), que aporta carbono por medio de la fotosíntesis, y nitrógeno en el caso de ser una cianobacteria (Nash, 2008). Sin embargo, estudios actuales han mostrado que hay diversos microorganismos que crecen asociados a los líquenes (sobre o dentro del talo), tales como hongos filamentosos, levaduras, bacterias, arqueas y virus (Grube & Berg, 2009; Aschenbrenner et al., 2016; Hawksworth & Grube, 2020; Sargsyan et al., 2021). Se ha comprobado que estos microorganismos participan en diversas funciones dentro del metabolismo liquénico, regulando las relaciones hídricas, procesos de degradación, influyendo en la morfología del talo, y llevando a cabo procesos de degradación (Sargsyan et al., 2021). Todo lo anterior ha llevado a redefinir a los líquenes como una asociación entre el micobionte, el o los fotobiontes, y los microorganismos asociados, considerándolos como un ecosistema complejo, autosuficiente y adaptable, en el que existe una compleja red de interacciones bióticas entre los distintos componentes (Hawksworth & Grube, 2020).

Los líquenes pueden variar en color, tamaño y formas de crecimiento (Denton & Karlén, 1973), siendo las formas de crecimiento más comunes: crustosa, foliosa

y fruticosa. Los líquenes crustosos tienen forma de costra y se adhieren directamente al sustrato con toda la superficie inferior; los líquenes foliosos tienen un crecimiento similar a hojas y su talo tiene mayor flexibilidad higroscópica y estabilidad estructural; y los líquenes fruticosos tienen un talo con crecimiento ascendente y ramificado logrando forma de arbusto (Aschenbrenner et al., 2016; Barreno & Rico, 1984.; Grimm et al., 2021). Además, pueden crecer en diversos sustratos, siendo la corteza vegetal, rocas, hojas y suelos los sustratos más comunes de crecimiento, seguido de la madera o el musgo en los que crece aproximadamente el 12% de las especies (de los Ángeles Herrera-Campos et al., 2014). Según el sustrato sobre el que se desarrollan, se denominan saxícolas (rocas), cortícolas (corteza), muscícolas (musgo), terrícolas (suelo) y folícolas (hojas) (García et al., 2016).

Los líquenes son componentes esenciales y de gran importancia ecológica en los ambientes, debido a que contribuyen significativamente al ciclado de nutrientes mediante la fijación atmosférica del carbono y nitrógeno, a la formación del suelo y a la colonización del suelo desnudo, además de que en general son buenos bioindicadores de la contaminación (Nash, 2008; Grimm et al., 2021). También se caracterizan por presentar una alta tolerancia a la desecación, la radiación UV, las temperaturas extremas, y baja disponibilidad de nutrientes. Esto les permite persistir durante cientos de años y colonizar una amplia gama de hábitats terrestres, la mayoría hostiles para otros organismos (Nash, 2008). Se han registrado líquenes que crecen en desiertos rocosos, hábitats fríos y húmedos

como la tundra ártica, suelos de bosques boreales, y también en ecosistemas como bosques tropicales, templados húmedos, entre otros (Grimm et al., 2021). En general, la alta tolerancia a los ambientes hostiles se ve facilitada por la interacción simbiótica entre los distintos integrantes, ya que se mejora la tolerancia al estrés en comparación al caso en que los integrantes crezcan por separado (Grimm et al., 2021).

## **1.2 Bacterias asociadas a los líquenes**

Dentro de la gran variedad de microorganismos que crecen asociados a los líquenes, las bacterias son las más abundantes y estudiadas. La densidad de bacterias encontradas en los talos liquénicos ( $10^7$ - $10^8$  células por gramo) es mucho mayor a la reportada en la superficie de las plantas ( $10^5$  células por gramo) (Cardinale et al., 2006; Grube & Berg, 2009; Saleem, 2015; Grimm et al., 2021). Las bacterias pueden colonizar distintas partes del talo y en distintas abundancias, ya que se ha visto que las comunidades más consistentes se encuentran en las zonas centrales del talo (Sargsyan et al., 2021). La comunidad bacteriana comúnmente encontrada en los talos está compuesta por miembros de los filos *Actinobacteria*, *Firmicutes* y *Proteobacteria* (Sigurbjörnsdóttir et al., 2016) e integrantes predominantes de la clase *Alphaproteobacteria* (Grube & Berg, 2009). Sin embargo, se ha reportado que la composición de las comunidades bacterianas en el talo liquénico se ve afectada por diversos factores bióticos y abióticos, como la identidad del micobionte, el tipo de fotobionte y la

producción de metabolitos, y actividades enzimáticas provenientes de los líquenes (Bates et al., 2011; Grube & Berg, 2009; Hodkinson et al., 2012; Leiva et al., 2016); y también factores como el ambiente y el contexto geográfico en el que se encuentran creciendo los líquenes (Cardinale et al., 2006; Hodkinson et al., 2012; Printzen et al., 2012; Ramírez-Fernández et al., 2013).

Todavía no se sabe con claridad cómo los líquenes adquieren estas comunidades bacterianas, pero se ha sugerido que esto podría ocurrir, al menos en parte, durante las etapas de reproducción asexual de los líquenes. En el estudio de Aschenbrenner et al, (2014) se reportó que los talos y los isidios (propágulos vegetativos) comparten la mayoría de los taxones dominantes, por lo que se sugiere que los propágulos podrían llevar consigo una parte de la comunidad bacteriana original al propagarse a un nuevo sitio. Por otra parte, también se ha propuesto que una parte de la comunidad bacteriana podría ser adquirida desde los sustratos en donde los líquenes crecen, ya que a pesar de que las comunidades microbianas asociadas a los talos son distintas a las que se encuentran en el sustrato adyacente, existe una mayor abundancia en los talos que en los sustratos de los taxa bacterianos que se comparten entre los dos microambientes (Leiva et al., 2021).

Se ha reportado que las comunidades bacterianas asociadas a los líquenes pueden contribuir con diversas funciones esenciales para el crecimiento y desarrollo del líquen. Éstas incluyen la adquisición y suministro de nutrientes, vitaminas y elementos traza (nitrógeno, fósforo, azufre), protección contra

factores de estrés abiótico (desintoxicación de metales pesados, protectores de estrés oxidativo) y resistencia contra factores de estrés biótico (compuestos antibióticos y antimicrobianos) (Cernava et al., 2017a; Grimm et al., 2021; Grube et al., 2015). Otra característica de las comunidades bacterianas asociadas a líquenes que se ha reportado en numerosos estudios es la producción de fitohormonas, tales como auxinas y etileno (Aschenbrenner et al., 2017; Cernava et al., 2017a; Erlacher et al., 2015; Grube et al., 2015; Grube & Berg, 2009; Liba et al., 2006). En estos estudios se sugiere que las fitohormonas podrían fomentar el crecimiento del micobionte o de otros integrantes de la simbiosis, pero no existen mayores antecedentes al respecto y no se puede descartar que estas moléculas pudieran estar cumpliendo otras funciones importantes para la simbiosis.

### **1.3 Fitohormonas**

A pesar de que las fitohormonas se relacionan principalmente a las plantas, otros organismos como los hongos, las algas verdes y las bacterias, también pueden producirlas y responder a ellas (Costacurta & Vanderleyden, 1995; Ochoa et al., 2010). Estas moléculas pueden ejercer su función intracelularmente, pero también pueden ser liberadas extracelularmente y participar en la interacción con otros organismos (Pichler et al., 2020a). Las fitohormonas son pequeñas moléculas orgánicas naturales que regulan los procesos fisiológicos y actividades celulares (Su et al., 2017). Actualmente, las fitohormonas se clasifican en nueve

grupos: auxinas, ácido abscísico, ácido salicílico, jasmonatos, giberelinas, citoquininas, etileno, brasinoesteroides y estrigolactonas (Santner et al., 2009).

Las fitohormonas son importantes reguladores del crecimiento, diferenciación, y desarrollo en plantas (Egamberdieva et al., 2019). Sin embargo, también se ha descrito que pueden regular el crecimiento en otros organismos. Se ha observado que las auxinas, específicamente el ácido indol-3-butírico, acelera el crecimiento de hongos aislados desde líquenes del género *Ramalina*, entre un 34% y 64% (Wang et al., 2009). Además, el ácido abscísico y el ácido indol acético pueden ser usados como fuentes de carbono por algunas bacterias (Belimov et al., 2014; Leveau & Lindow, 2005). Adicionalmente, las fitohormonas tienen funciones clave en las interacciones entre las plantas, microorganismos y hongos micorrízicos arbusculares (Foo et al., 2019; Pichler et al., 2020a), y se ha observado que el control y desarrollo de la simbiosis entre las distintas especies está dado por la interacción de estas moléculas (Costacurta & Vanderleyden, 1995; Foo et al., 2019). Toda esta evidencia sugiere que las fitohormonas son compuestos claves que permiten la señalización y comunicación entre organismos taxonómicamente diversos (Pichler et al., 2020a).

#### **1.4 Fitohormonas en líquenes**

Existe evidencia de diversas fitohormonas que se han detectado en distintas especies de líquenes (Dietz & Hartung, 1998; Epstein et al., 1986; Ott et al., 2000; Ergün et al., 2002). Sin embargo, en algunos de estos estudios no queda claro

cuál simbionte es el responsable de la producción de las fitohormonas. Recientemente, en dos estudios relacionados, se demostró que al aislar los micobiontes y fotobiontes algales (de la familia *Trebouxiaceae*) de los líquenes *Cladonia*, *Xanthoria* y *Tephromela*, ambos simbiontes son capaces de producir distintas fitohormonas. Los micobiontes son capaces de producir ácido indol acético, ácido salicílico y ácido jasmónico; mientras que los fotobiontes son capaces de liberar ácido indol acético, ácido abscísico, ácido jasmónico y giberelinas (Pichler et al., 2020a; Pichler et al., 2020b). Adicionalmente, también existe evidencia de la producción de ácido indol acético por cianobacterias, las cuales también pueden ser fotobiontes en la simbiosis líquénica (Sergeeva et al., 2002). Se cree que la producción de las fitohormonas juega un papel clave en el proceso de liquenización, es decir, los eventos que llevan al micobionte y fotobionte a reconocerse entre sí, hacer contacto físico y comenzar el desarrollo del talo líquénico (Nazem-Bokaei et al., 2021).

Por otro lado, también se ha visto que las comunidades bacterianas presentes en la simbiosis líquénica tienen la capacidad de producir estas hormonas. En estudios llevados a cabo utilizando técnicas dependientes de cultivo se ha observado que la mayoría de los aislados bacterianos tienen la capacidad de producir ácido indol acético y etileno (Grube & Berg, 2009). En líquenes *Canoparmelia* y *Parmotrema* se lograron aislar 14 cepas bacterianas de los géneros pertenecientes a la clase *Gammaproteobacteria*, tales como *Stenotrophomonas*, *Pantoea*, *Serratia*, *Pseudomonas* y *Acinetobacter*. Todas

estas cepas fueron capaces de producir ácido indol acético, y cuatro aislados de *Stenotrophomonas* fueron capaces de producir, además, etileno (Liba et al., 2006). De la misma forma, en el 21% de los aislados bacterianos obtenidos desde líquenes *Cladonia*, *Lecanora* y *Umbilicaria*, se observó la producción de ácido indol acético (Grube et al., 2009).

Mediante estudios de secuenciación masiva, se ha analizado el metagenoma de *Lobaria pulmonaria*, un líquen tripartito conformado por la asociación del hongo con un alga verde (*Trebouxia*) y una cianobacteria (*Nostoc*). Se obtuvieron 156 *contigs* bacterianos relacionados a la biosíntesis de auxinas, las cuales se propone que pudieran apoyar el crecimiento del micobionte y fotobionte (Grube et al., 2015). Otros estudios en el mismo líquen han relacionado la producción de auxinas al filo *Proteobacteria* (Cernava et al., 2017), y más específicamente al orden *Rhizobiales* (Erlacher et al., 2015), así como al género *Sphingomonas* (orden *Sphingomonadales*; Aschenbrenner et al., 2017). Esta evidencia de que algunos grupos bacterianos que son abundantes en el microbioma líquénico tienen la capacidad de producir fitohormonas sugiere que las fitohormonas podrían jugar un rol fundamental dentro de la simbiosis líquénica.

### **1.5 Fitohormonas y estrés ambiental**

Las fitohormonas también están relacionadas con el estrés ambiental. Distintos tipos de estrés abiótico, como la sequía, la alta intensidad lumínica, las altas temperaturas, los metales pesados y el estrés salino, pueden ser tolerados por

los organismos mediante la acción de las fitohormonas (Wang et al., 2021). Se ha reportado que el tratamiento con ácido abscísico exógeno mejora la capacidad del líquen *Peltigera polydactylon* de recuperarse después de un periodo de desecación, lo que sugiere que el ácido abscísico probablemente está involucrado en las vías de señalización que incrementan la tolerancia al estrés hídrico (Beckett et al., 2005). De la misma forma, se ha demostrado que el ácido indol acético puede incrementar el contenido de agua de las células de los fotobiontes de diferentes especies de líquenes (Pichler et al., 2020a). En cuanto al estrés lumínico, Prasanna et al., (2010) observaron que la luz puede estimular la producción de ácido indol acético en cianobacterias y que las auxinas se acumulan con el tiempo. Junto con esto, también se ha reportado en cianobacterias que la radiación influye sobre las concentraciones de ácido abscísico, auxinas y ácido salicílico (Wenz et al., 2019a). Por otra parte, el estrés oxidativo puede ser inhibido por el etileno y las citoquininas, ya que se ha observado que el etileno puede mejorar las respuestas de varias peroxidasas que eliminan especies reactivas de oxígeno (ROS) y mantienen el equilibrio de la generación y eliminación de ROS (Peng et al., 2014). Por otro lado, las citoquininas y el ácido salicílico son capaces de inhibir enzimas productoras de ROS y también incrementar la tolerancia a la salinidad a través del incremento de la fotosíntesis, azúcares solubles y prolina (Gashaw et al., 2014; Hönig et al., 2018; Wenz et al., 2019).

En resumen, las fitohormonas representan importantes moléculas de señalización y respuesta al estrés abiótico en organismos simbióticos. Sin embargo, el rol de las fitohormonas en los líquenes todavía está muy poco estudiado, por lo que este tema merece una mayor investigación para comprender mejor el papel de las fitohormonas en la compleja asociación que representan los líquenes.

### **1.6 Cianolíquenes *Peltigera* del sur de Chile**

El modelo de estudio de esta tesis corresponde a líquenes *Peltigera*, un género cosmopolita de la familia *Peltigeraceae* que comprende más de 150 especies de macrolíquenes foliosos (Chagnon et al., 2019). Estos líquenes crecen en ambientes húmedos, principalmente sobre suelo o musgos (Martínez et al., 2003). La mayoría de las especies registradas provienen del hemisferio norte, en Europa y América del Norte (Zúñiga et al., 2015). Sin embargo, en el sur de Chile, específicamente en las regiones de Aysén y Magallanes, se han reportado al menos 10 especies de líquenes *Peltigera* bipartitos en asociación con una cianobacteria del género *Nostoc*, creciendo en distintos contextos ambientales (Zúñiga et al., 2015; Orlando et al., 2021). De estas especies, se ha observado que *P. frigida* y *P. fuscopraetextata* crecen principalmente asociadas a bosques de *Nothofagus*, mientras que *P. rufescens* y *P. ponojensis/monticola* 11 (previamente identificada como *P. antarctica*, Miadlikowska et al., 2023) se encuentran en mayor abundancia en ambientes abiertos, como praderas, orillas

de camino y claros de bosque (Quilhot et al., 2012; Zúñiga et al., 2015; Orlando et al., 2021).

En estudios previos se han analizado las comunidades bacterianas asociadas a distintas especies de líquenes *Peltigera* creciendo en el sur de Chile. Se ha observado que las bacterias asociadas a los talos liquénicos son distintas a las presentes en sus sustratos (*i.e.*, suelo sobre el cual crece el líquen), y a los suelos aledaños sin influencia del líquen (Leiva et al., 2016; Muster, 2019; Leiva et al., 2021; Pezoa, 2021; Almendras, 2022). En los talos predominan las bacterias del filo *Proteobacteria*, mientras que en los sustratos y suelos hay mayor predominancia del filo *Acidobacteriota*. A niveles taxonómicos menores, los órdenes *Rhizobiales*, *Sphingomonadales* y *Acetobacterales* son los más abundantes en talos, mientras que en los sustratos su abundancia es significativamente menor (Leiva, 2019; Leiva et al., 2021).

Por otro lado, también se ha reportado que la especie de micobionte presente en la asociación liquénica es un factor determinante de la diversidad bacteriana asociada. En el microbioma bacteriano de *P. frigida* se ha observado un mayor porcentaje de taxa únicos, los cuales no se han observado en *P. fuscopraetextata*, otra especie creciendo en el mismo bosque (Almendras, 2022). En praderas se ha observado algo similar, *P. ponojensis/monticola* 11 presenta mayor número de taxa únicos, los cuales no se observaron en *P. rufescens*, especie que también crece en el mismo contexto ambiental (Pezoa, 2021).

Además del micobionte, el contexto ambiental (bosque o pradera) también influye en la estructuración del microbioma liquénico (Almendras, 2022). Se ha reportado que estos dos ambientes pueden presentar diferentes condiciones microclimáticas, ya que en bosques de *Nothofagus pumilio* existe una mayor oscilación de las temperaturas durante el día, mayor humedad relativa del aire y menores niveles de radiación y de la velocidad del viento, en comparación a las praderas (Sanchez-Jardon et al., 2014; Bernardi et al., 2016; Tarabini et al., 2021).

A pesar de que los estudios previos del microbioma de líquenes *Peltigera* no han reportado que el sitio de muestreo sea un factor determinante de la diversidad bacteriana asociada, en otros estudios se ha reportado que los microorganismos del suelo pueden cambiar, por ejemplo, con la temperatura y las precipitaciones (Carey, 2016). En las regiones de Aysén y Magallanes, sitios donde crecen los líquenes *Peltigera* de este estudio, predominan los climas templado frío, de estepa fría y trasandino con degeneración esteparia (Troncoso, 2004). A pesar de que en ambas regiones predominan los mismos climas, la ubicación latitudinal de los sitios influye en las precipitaciones y temperaturas anuales, ya que la precipitación aumenta y la temperatura disminuye hacia latitudes Sur (Stolpe & Undurraga, 2016). Por lo tanto, el sitio geográfico podría ser un factor de interés a la hora de analizar las comunidades bacterianas productoras de fitohormonas asociadas a líquenes *Peltigera*.

## 1.7 Planteamiento del problema

Los líquenes son organismos con una alta tolerancia a distintos tipos de estrés abiótico, lo que les permite colonizar una amplia diversidad de ambientes con condiciones ambientales hostiles. Uno de los principales mecanismos para enfrentar distintos tipos de estrés abióticos descritos en hongos, bacterias y líquenes, es la producción y liberación de fitohormonas. Estas moléculas son compuestos clave que permiten la señalización y comunicación entre organismos. Dentro del microbioma liquénico, las bacterias de los órdenes *Rhizobiales* y *Sphingomonadales*, tienen la capacidad de producir fitohormonas, y estos grupos son abundantes en el microbioma de los cianolíquenes *Peltigera*. Sin embargo, no se ha estudiado si la producción de fitohormonas por parte de las bacterias estaría relacionada con el estrés ambiental.

En esta tesis se propone analizar la diversidad de las bacterias con potencial de producir fitohormonas en los talos y sustratos de cianolíquenes *Peltigera*. A lo largo del sur de Chile, los líquenes *Peltigera* son abundantes y se ha observado que algunas especies de este género crecen preferentemente en ambientes de bosques, mientras que otras crecen más abundante en ambientes abiertos como praderas. Por lo tanto, dependiendo del sitio geográfico y del contexto ambiental en donde los líquenes crecen, existen diferentes condiciones ambientales que estos organismos deben enfrentar. Para la caracterización de estas bacterias se utilizan secuencias del gen 16S obtenidas mediante secuenciación masiva, para

predecir los genomas bacterianos con herramientas bioinformáticas y se buscan una serie de genes que codifican enzimas involucradas en las vías de síntesis de las fitohormonas.

## 2. HIPÓTESIS

Considerando que las fitohormonas contribuirían a mejorar la tolerancia al estrés abiótico en líquenes y que en sitios de mayores latitudes existirían mayores niveles de estrés abiótico, se propone que:

“La diversidad de las comunidades bacterianas con potencial de producir fitohormonas asociadas a cianolíquenes *Peltigera* está influenciada principalmente por el sitio geográfico donde crecen los líquenes, mientras que el contexto ambiental y la especie de micobionte actuarían como factores secundarios”.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo general**

Identificar los factores que modulan la diversidad de las comunidades bacterianas con potencial de producir fitohormonas en talos y sustratos de cianolíquenes *Peltigera* del sur de Chile.

#### **3.2. Objetivos específicos**

**3.2.1.** Caracterizar las vías de síntesis de distintas fitohormonas en bacterias de acuerdo con la literatura.

**3.2.2.** Determinar la diversidad de bacterias con potencial de producción de fitohormonas en talos y sustratos de diferentes especies de cianolíquenes *Peltigera* del sur de Chile.

**3.2.3.** Relacionar la diversidad bacteriana con potencial de producción de fitohormonas con las variables específicas de cada contexto ambiental y cada sitio.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Toma de muestras

Las muestras de talos y sustratos de cianolíquenes *Peltigera* se recolectaron desde cuatro sitios del sur de Chile en distintas campañas de muestreo realizadas por el Laboratorio de Ecología Microbiana de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile (Orlando et al., 2021). Los sitios corresponden a: (i) Reserva Nacional Coyhaique (Coyhaique), (ii) Parque Nacional Patagonia (Tamango), ambos ubicados en la región de Aysén; (iii) Parque Natural Karukinka (Karukinka) y (iv) Puerto Williams (Navarino), localizados en la región de Magallanes. En cada sitio se recolectaron muestras de talo y sustrato de ocho individuos de líquenes *Peltigera frigida* y ocho individuos de *Peltigera fuscopraetextata* desde ambientes de bosque; y ocho individuos de *Peltigera rufescens* y ocho individuos de *P. ponojensis/monticola* 11 desde ambientes de pradera; obteniendo un total 128 muestras de talos y 128 muestras de sustrato (**Tabla A1**).

### 4.2 Caracterización ambiental de los sitios

Para cada sitio (*i.e.*, Coyhaique, Tamango, Karukinka y Navarino) y cada ambiente (*i.e.*, bosque y pradera) se obtuvieron los datos de distintas variables edáficas cuantificadas por González et al., (2023). Las variables edáficas consideradas corresponden al contenido hídrico, pH, amonio, nitrato, carbono orgánico y fosforo Olsen (**Tabla A2**).

Las variables bioclimáticas se obtuvieron de la base de datos WorldClim con R (Fick & Hijmans, 2017). En total se extrajeron los datos de 19 variables que están relacionadas principalmente con la precipitación y temperatura (**Tabla A3**). Para evitar sobrecargar los análisis multivariados se disminuyó el número de variables bioclimáticas, seleccionando aquellas que representan tendencias anuales (e.g., temperatura media anual, precipitación anual) y estacionalidad (e.g., rango anual de temperatura y precipitación) y descartando los factores ambientales extremos o limitantes (e.g., temperatura del mes más frío y cálido, y precipitación del mes más húmedo y seco).

Los datos edáficos y bioclimáticos se analizaron mediante análisis de componentes principales (PCA) llevados a cabo con la función *PCA* del paquete FactoMineR en R (Lê et al., 2008). El efecto del sitio y del ambiente sobre las variables edáficas y bioclimáticas se evaluó mediante un PERMANOVA usando la función *adonis* del paquete *vegan* (Oksanen et al., 2022).

### **4.3 Secuenciación masiva**

Previamente se realizó la extracción de DNA desde los talos y sustratos y se amplificó por PCR la región V4-V5 del gen bacteriano 16S utilizando partidores que permiten excluir cianobacterias (Pezoa, 2021; Almendras, 2022; Veas Mattheos, 2022). Los productos de PCR fueron purificados y se secuenciaron mediante la plataforma Illumina MiSeq (300 pb x2) (Macrogen, Corea del Sur).

Como parte de esta tesis, las secuencias obtenidas se analizaron y optimizaron con el programa R utilizando el paquete DADA2 (Callahan et al., 2016). Para poder analizar las muestras, se agruparon según el sitio (Coyhaique, Tamango, Navarino y Karukinka), la especie de líquen (*P. frigida*, *P. fuscopraetextata*, *P. ponojensis/monticola* 11 y *P. rufescens*) y el microambiente (talo y sustrato), obteniendo un total de 32 grupos. Luego, se analizaron los gráficos de calidad y se definió un corte para las secuencias directas e inversas para poder obtener una calidad *phred* superior a 30. Se estableció el corte en los 287 pb para las lecturas directas y en los 201 pb para las lecturas inversas, y además se eliminó la secuencia de los partidores que corresponden a los primeros 19 y 25 nucleótidos de las lecturas directas e inversas, respectivamente. Para el filtrado, se eliminaron las lecturas con bases ambiguas, secuencias correspondientes al control interno de Illumina, lecturas con errores mayores a 2 y truncamiento del primer nucleótido de la lectura con puntajes de calidad menor o igual a dos. Posteriormente, se utilizó el método *pooled* para inferir las variantes de secuencia de amplicón (ASVs, *Amplicon Sequence Variants*). Para la fusión de las lecturas directas e inversas se estableció que las secuencias deben superponerse en 20 bases mínimo y además ser idénticas en esta región. La eliminación de las secuencias quiméricas se hizo examinando las quimeras de forma independiente para formar una decisión consenso para cada variante, procedimiento conocido como método *consensus*.

La asignación taxonómica se realizó con la función *IdTaxa* del paquete DECIPHER utilizando la base de datos de GTDB 16S (revisión 95, Parks et al., 2018). Luego, se conservaron únicamente las ASVs designadas en el Dominio Bacteria y las que presentaron un número mayor a 10 lecturas. Finalmente, se escogió el microbioma *core*, seleccionando las ASVs presentes en al menos 7 de las 8 réplicas.

#### **4.4 Predicción de funciones con PICRUSt2**

Para caracterizar las bacterias con el potencial de producir fitohormonas, primero se construyó una base de datos de las enzimas involucradas en las vías de síntesis de los nueve grupos de fitohormonas descritos en la actualidad (Santner et al., 2009): ácido indol acético, ácido salicílico, etileno, giberelinas, citoquininas, ácido abscísico, ácido jasmónico, brasinoesteroides y estrigolactonas. Esta información se obtuvo desde distintas plataformas de revistas científicas como Elsevier, Nature, entre otros. Además, se utilizaron bases de datos como Uniprot, KEGG, Brenda y Expasy para obtener los códigos KO, EC y COG de cada enzima involucrada en las síntesis de fitohormonas.

Cada uno de los códigos utilizados corresponden a distintos métodos de clasificación enzimática. La nomenclatura EC (*Enzyme Commission*) corresponde a un esquema de clasificación numérica para las enzimas que se basa en las reacciones químicas que catalizan. En otras palabras, enzimas diferentes que proceden de diferentes organismos pero que catalicen la misma

reacción recibirán el mismo código EC. Cada código consiste en las letras “EC” seguido de cuatro números separados por puntos y cada uno de estos números representan una clasificación progresivamente más específica de la reacción que catalizan (Kanehisa, 2017). La nomenclatura KO (*KEEG ORTHOLOGY*) se basa en mapas de ruta KEGG que están divididas en seis categorías principales, cada una con su respectivo código; sin embargo, existe otra categoría principal para los códigos KO que aún no se incluyen en las otras seis categorías principales. Cada código KO consiste en la letra “K” seguido de cinco números dados por la categoría y la ubicación dentro del mapa de la ruta KEGG para esa categoría identificada como nodos de la red (Kanehisa, 2017). La nomenclatura COG (*Cluster of Orthologous Groups*) es una herramienta que consiste en una base de datos que clasifica proteínas a partir de genomas secuenciados con base en el concepto de genes ortólogos, es decir, genes de diferentes especies que derivan de un mismo ancestro en común. Los códigos COG consisten en las letras “COG” seguidas de cuatro números (Tatusov et al., 2000).

Luego de obtener todos los códigos, se llevó a cabo la predicción de las funciones relacionadas a la producción de fitohormonas a partir de las secuencias del gen 16S con la herramienta PICRUST2 (*Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States*) (Douglas & Langille, 2021). Para caracterizar las comunidades bacterianas con potencial de producir fitohormonas, se filtró el objeto *phyloseq* dejando únicamente las ASVs que contuvieran al menos unos de los genes involucrados en la síntesis de los

distintos grupos de fitohormonas. El porcentaje de bacterias que contendrían genes relacionados a la producción de las distintas fitohormonas en las muestras de talos y sustratos se graficó mediante un diagrama de Venn usando la función *ggVennDiagram* del paquete *ggVennDiagram* (Gao et al., 2021).

#### **4.5 Abundancia y composición de las comunidades bacterianas**

Para determinar la abundancia y composición de las bacterias con potencial de sintetizar fitohormonas, se fusionaron las ASVs de las muestras de talos y sustratos según la especie de líquen y el sitio (Coyhaique, Tamango, Karukinka, Navarino) con la función *merge\_samples*. Luego, se aglomeraron las ASVs a nivel de filo con la función *tax\_glom* y se llevaron a cabo gráficos de barra con la función *plot\_bar*. Todas las funciones empleadas corresponden al paquete *phyloseq* (McMurdie 2013).

#### **4.6 Diversidad alfa y beta**

La diversidad alfa, correspondiente a la diversidad a nivel de comunidad, se determinó mediante el índice de diversidad de Shannon con la función *plot\_richness* del paquete *phyloseq* (McMurdie 2013). Las diferencias significativas entre los grupos se determinaron según la prueba de Wilcoxon Mann Whitney con la función *stat\_compare\_means* del paquete *ggpubr* (Kassambara 2023).

La diversidad beta, correspondiente al cambio en la composición de especies entre las diferentes comunidades, se estimó mediante un escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) basado en la distancia de Bray-Curtis a nivel de ASVs. La distancia se calculó con la función *distance* y el gráfico se llevó a cabo con la función *plot\_ordination*, ambas del paquete *phyloseq* (McMurdie 2013). El efecto de la región, el sitio, el ambiente y la especie de líquen sobre las comunidades bacterianas se determinó con un ANOSIM usando la función *anosim* del paquete *vegan* (Oksanen et al., 2022).

#### **4.7 Partición de la varianza**

Para identificar los factores ambientales que influyen sobre la composición de las comunidades bacterianas, se llevaron a cabo análisis de partición de la varianza utilizando los datos edáficos y bioclimáticos como variables explicativas. La partición de varianza es un tipo de análisis que combina un análisis de redundancia (RDA) y un RDA parcial para dividir la variación de una variable respuesta entre dos, tres o cuatro conjuntos de datos explicativos. A las matrices comunitarias se les aplicó la transformación de Hellinger y a las matrices de variables explicativas se les aplicó la estandarización *z-score*, ambas con la función *decostand*. El RDA se llevó a cabo con la función *rda* y la significancia de cada variable se determinó con la función *anova.cca*. Para disminuir las variables y evitar sobrecargar el modelo se seleccionaron las variables más importantes con el método *forward selection* usando la función *ordiR2step*. Finalmente, se

determinó la partición de la varianza con la función *varpart* usando sólo las variables seleccionadas previamente. Se realizó un diagrama de Venn de la partición de la varianza con la función *plot*. La significancia de las distintas fracciones se determinó con la función *anova.cca*. Todas las funciones empleadas corresponden al paquete *vegan* (Oksanen et al., 2022).

## **5. RESULTADOS**

### **5.1 Vías de síntesis de fitohormonas en bacterias**

Para cada uno de los nueve grupos de fitohormonas se buscó la vía de síntesis en bacterias, junto con los códigos EC, KO y COG asociados a cada enzima involucrada en la ruta.

#### **Auxinas**

Las auxinas son ácidos orgánicos de bajo peso molecular, conformados por un anillo aromático y un grupo carboxilo como base estructural, producidas por plantas y distintos microorganismos como hongos, algas y bacterias (Duca et al., 2014). En la naturaleza se han encontrado cuatro auxinas en total: el ácido fenilacético, el ácido 4-cloroindol-3-acético, el ácido indol 3-butírico y el ácido indol acético (Sauer et al., 2013). Esta última es la auxina endógena con mayor abundancia en la naturaleza y por lo tanto la más estudiada. La biosíntesis de ácido indol acético en bacterias puede ser dependiente o independiente de triptófano. Para la primera se han propuesto cinco vías, mientras que para la segunda aún no existen vías descritas debido a que ha sido poco estudiada (Spaepen et al., 2007). Las vías presentes en cada bacteria dependen de la especie y es posible encontrar más de una vía funcional en la misma especie bacteriana (Costacurta & Vanderleyden, 1995).

Dentro de las vías dependiente de triptófano, la ruta más estudiada y una de las más importantes en bacterias corresponde a la vía indol-3-acetamida (IAM), la cual consta de dos pasos (**Figura 1**). En el primero, el triptófano es hidroxilado a indol-3-acetamida por acción de la enzima triptófano 2 monooxigenasa. Posteriormente, el indol-3-acetamida es convertido a ácido indol acético por la enzima hidrolasa/amidasa IAM específica (Duca et al., 2014).

La vía del indol-3-piruvato (IPA) ha sido descrita en una gran variedad de bacterias asociadas a plantas y también es una de las vías principales de producción de ácido indol acético en bacterias. Esta vía consta de tres pasos (**Figura 1**), en el primero el triptófano es desaminado por una aminotransferasa inespecífica y es convertido a ácido indol-3-pirúvico. Luego, el ácido indol-3-pirúvico es descarboxilado por la enzima IPA descarboxilasa formando indol-3-acetaldehído (Spaepen et al., 2007). Finalmente, el indol-3-acetaldehído es oxidado a ácido indol acético por la aldehído deshidrogenasa (Duca et al., 2014).

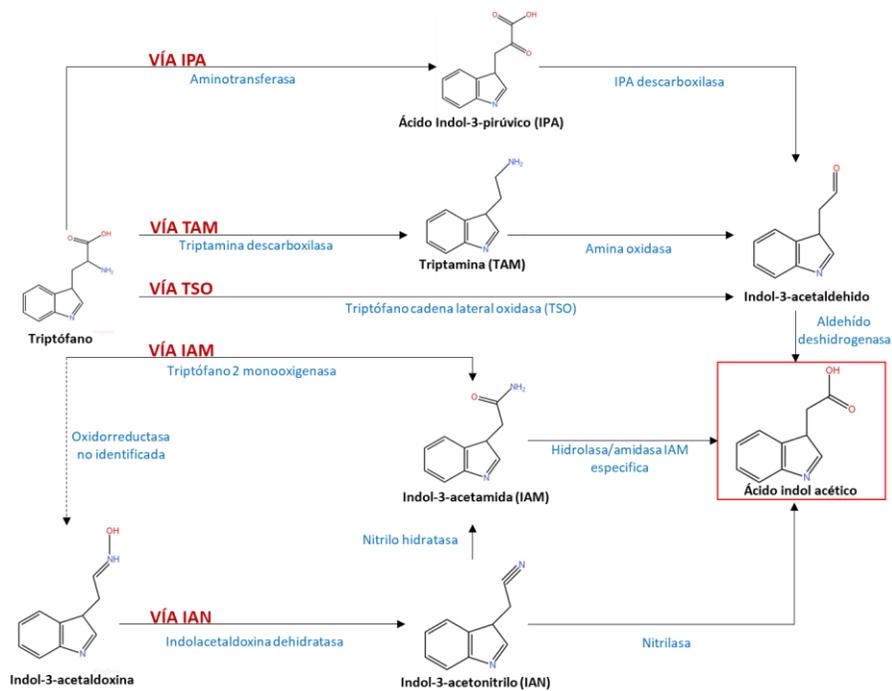
La vía de la triptamina (TAM) en bacterias consta de tres pasos (**Figura 1**). Primero el triptófano es descarboxilado a triptamina por acción de la enzima triptamina descarboxilasa. Después, la triptamina es amino oxidada a indol-3-acetaldehído por acción de una amina oxidasa. Por último, ocurre la oxidación del indol-3-acetaldehído a ácido indol acético por acción de la aldehído deshidrogenasa (Duca et al., 2014).

La vía triptófano cadena lateral oxidasa (TSO) se ha descrito únicamente en bacterias y consta de dos pasos (**Figura 1**). Primero, el triptófano es transformado directamente a indol-3-acetaldehído por la doble acción de la enzima triptófano cadena lateral oxidasa. Luego, es transformado a ácido indol acético por la enzima aldehído deshidrogenasa (Spaepen et al, 2007; Duca et al., 2014).

La última vía corresponde a la vía del indol-3-acetonitrilo (IAN), también considerada una de las principales vías de producción de ácido indol acético en bacterias. Puede tener tres o cuatro pasos (**Figura 1**). En el primero el triptófano es oxidado a indol-3-acetaldoxina por una oxidorreductasa no identificada y de la que se desconoce el mecanismo de reacción (Duca et al., 2014). En el segundo paso la indolacetaldoxina dehidratasa permite la liberación del grupo hidroxilo desde la indol-3-acetaldoxina para producir indol-3-acetonitrilo (Duca et al., 2014). En el tercer paso, el indol-3-acetonitrilo puede ser carboxilado a ácido indol acético por la enzima nitrilasa, o puede ser hidratado a indol-3-acetamida por la enzima nitrilo hidratasa, para posteriormente ser convertido a ácido indol acético por la enzima hidrolasa/amidasa IAM específica (Spaepen et al., 2007).

Se encontraron los códigos EC, KO y COG de la mayoría de las enzimas (**Tabla 1**). Sin embargo, para la aminotransferasa de la vía IPA y la oxidorreductasa de la vía TAM, no se registraron códigos debido a que estas enzimas son inespecíficas o no están identificadas. Para la vía IAM se encontraron los códigos EC y KO para ambas enzimas, y además para la enzima indol-3-acetamida hidrolasa se encontró el código COG. En la vía IPA se encontraron los códigos

EC, KO y COG de las enzimas indol-3-piruvato descarboxilasa y la aldehído deshidrogenasa. En el caso de la aminotransferasa no se encontró ninguno de los tres códigos ya que corresponde a una enzima inespecífica. En la vía TAM se encontraron todos los códigos para las enzimas involucradas e incluso para la enzima triptófano descarboxilasa se encontraron dos códigos COG. Para la vía TSO se encontraron los tres códigos para la enzima aldehído deshidrogenasa y sólo el código EC para la enzima triptófano cadena lateral oxidasa. Finalmente, para la vía IAM se encontraron los códigos EC y KO para las cuatro enzimas involucradas, y además se encontró el código COG para las enzimas indol-3-acetamida hidrolasa y nitrilasa (**Tabla 1**).



**Figura 1. Vías de síntesis del ácido indol acético en bacterias.** En letras rojas se indican los nombres de las vías de síntesis, en letras azules se indica el nombre de las enzimas y en letras negras los nombres de las moléculas. La flecha punteada indica un paso enzimático todavía desconocido. En el cuadro rojo se encuentra el producto final de todas las vías, el ácido indol acético. Todas las abreviaciones están descritas en el texto. Figura adaptada de Li et al., (2021).

**Tabla 1. Enzimas involucradas en las vías de síntesis del ácido indol acético en bacterias.**

Vía	Enzima	Gen	EC	KO	COG
Indol-3-acetamida (IAM)	Triptófano-2 monooxigenasa	<i>iaaM</i>	EC:1.13.12.3	K00466	-
	Indol-3-acetamida hidrolasa	<i>iaaH</i>	EC:3.5.1.-	K21801	COG0154
Indol-3- piruvato (IPA)	Aminotransferasa	-	-	-	-
	Indol-3-piruvato decarboxilasa	<i>lpdC</i>	EC:4.1.1.74	K04103	COG3961
	Aldehído deshidrogenasa	<i>aldA</i>	EC:1.2.1.3	K00128	COG1012
Triptamina (TAM)	Triptófano descarboxilasa	<i>tdc</i>	EC:4.1.1.28 EC:4.1.1.105	K01593	COG0076 COG0688
	Amina de cobre tiramina oxidasa	<i>AOC2</i>	EC:1.4.3.21	K00276	COG3733
	Aldehído deshidrogenasa	<i>aldA</i>	EC:1.2.1.3	K00128	COG1012
Triptófano cadena lateral oxidasa (TSO)	Triptófano cadena lateral Oxidasa	<i>NHase</i>	EC:1.13.99.3	-	-
	Aldehído deshidrogenasa	<i>aldA</i>	EC:1.2.1.3	K00128	COG1012
Indol-3-acetonitrilo (IAN)	Óxidorreductasa	-	-	-	-
	Indolacetaldoxina deshidratasa	<i>Nha1</i>	EC:4.8.1.3	K11868	-
	Nitrilasa	<i>NIT</i>	EC:3.5.5.1	K01501	COG0388
	Nitrilo hidratasa	<i>NHase</i>	EC:4.2.1.84	K01721	-
	Indol-3-acetamida hidrolasa	<i>iaaH</i>	EC:3.5.1.-	K21801	COG0154

## Citoquininas

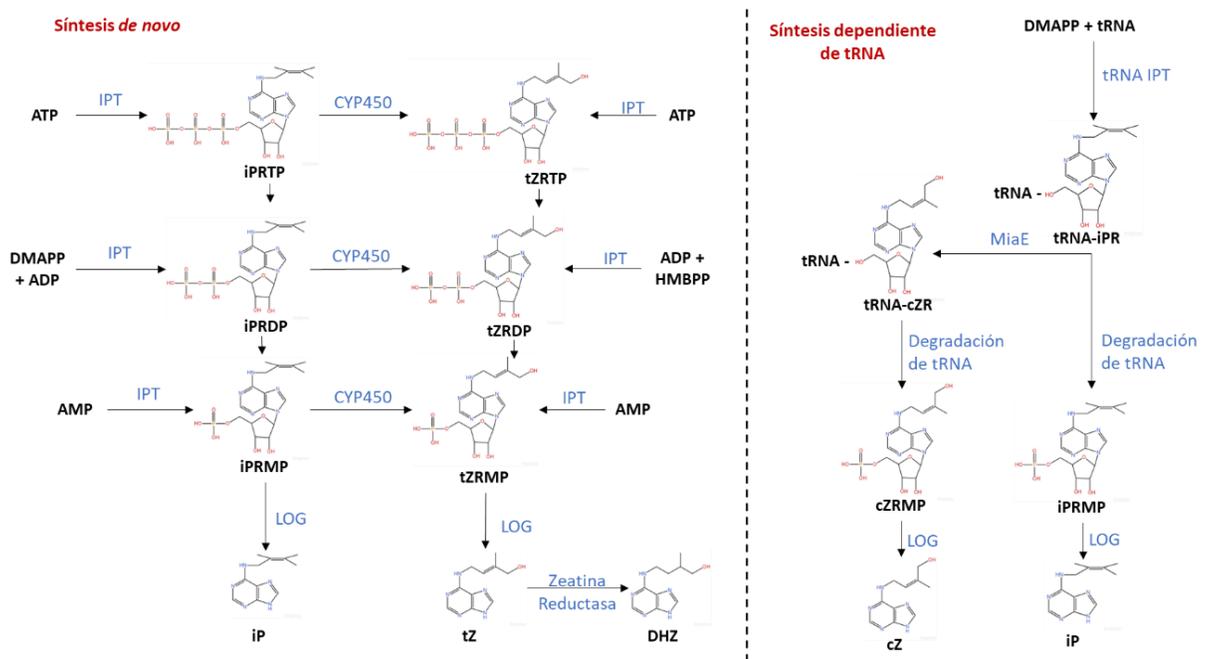
Las citoquininas son derivados de adenina con una cadena lateral aromática o isoprenoide, producidas por plantas, hongos, algas, insectos, bacterias, entre otros organismos (Frébortová & Frébort, 2021). Las citoquininas aromáticas incluyen a la beniladenina, sus derivados hidroxilados orto-y metatopolina y sus metoxi-derivados. Sin embargo, la ruta de síntesis para este grupo de citoquininas aún es desconocida. Las citoquininas isoprenoides incluyen a la N6-(2-isopentenil) adenina (iP), trans-zeatina (tZ), cis-zeatina (cZ) y dihidrozeatina (DHZ). En diversos grupos bacterianos, se han descrito dos vías de síntesis para las citoquininas isoprenoides, la *vía de novo* y la *vía dependiente de tRNA* (Frébortová & Frébort, 2021).

La vía de síntesis *de novo* produce iP, tZ y DHZ (**Figura 2**). Esta vía comienza con la prenilación de ATP o AMP y de ADP unido a pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP) o unido a (E)-4-Hidroxi-3-metil-but-2-enilpirofosfato (HMBPP), por una isopentenil transferasa (IPT) de adenilato dependiente de AMP y otra dependiente de ADP/ATP, obteniéndose por un lado iP ribósido-50-monofosfato, difosfato y trifosfatos libres (iPRMP, iPRDP e iPRTP), y por otro lado tZ ribósido monofosfato, difosfato y trifosfato (tZRMP, tZRDP y tZRTP). Los iPRDP, iPRTP, se transforman en monofosfato y éste es transformado a iP por acción de la enzima citoquinina fosforribohidrolasa “*Lonely guy*” (LOG). Por otro lado, los tZRDP y tZRTP se transforman en monofosfato y éste es transformado a tZ por acción de la enzima LOG, y luego se puede transformar en DHZ por la enzima zeatina reductasa. Además, los iPRMP, iPRDP e iPRTP también pueden ser hidroxilados a tZRMP, tZRDP y tZRTP por una monooxigenasa del citocromo P450 (CYP450) y seguir la misma ruta descrita anteriormente hasta la obtención de tZ y DHZ (Frébortová & Frébort, 2021).

La vía dependiente de tRNA produce cZ e iP (**Figura 2**), y ha demostrado tener un papel dominante en la producción de citoquininas (Frébortová & Frébort, 2021). Esta ruta comienza con la acción de la enzima tRNA isopenteniltransferasa (tRNA IPT) que transfiere la cadena de isopentenilo del pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP) para prenilar fosfato de adenosina unido a tRNA, formando ribósido de isopenteniladenina unido a tRNA (tRNA-iPR). En este punto la vía se divide en dos: por un lado, el tRNA-IPR es degradado

directamente a iPRMP, que luego es convertido a iP por acción de la enzima LOG; por el otro lado, el tRNA-iPR pasa a tRNA unido a ribosido de cis-zeatina (tRNA-cZR) por acción de la tRNA 2-metiltio-N6-isopentenil-adenosina hidroxilasa (MiaE) y luego es degradado a cZRMP (Frébortová & Frébort, 2021).

Para la síntesis *de novo* se lograron encontrar los códigos EC, KO y COG para las enzimas IPT dependiente de AMP e IPT dependiente de ATP/ADP. Para la vía dependiente de tRNA, se encontraron los tres códigos para las enzimas tRNA IPT y MiaE. Para la enzima LOG sólo se encontró el código EC (**Tabla 2**).



**Figura 2. Vías de síntesis de las citoquininas en bacterias.** En letras rojas se indican los nombres de las vías de síntesis, en letras azules se indica el nombre de las enzimas y procesos de degradación de tRNA, y en letras negras los nombres de las moléculas. Todas las abreviaciones están descritas en el texto. Figura adaptada de Frébortová & Frébort, (2021).

**Tabla 2. Enzimas involucradas en las vías de síntesis de las citoquininas en bacterias.**

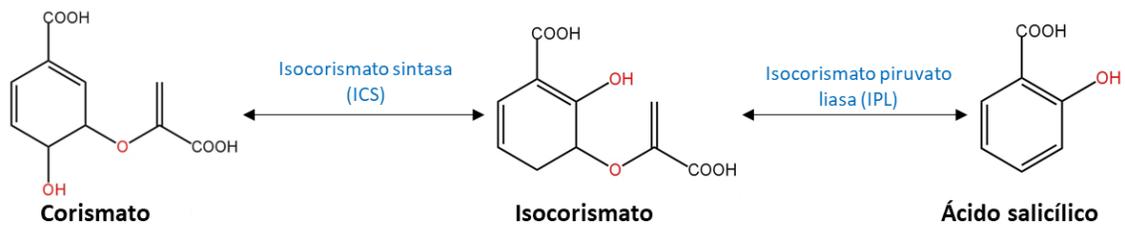
Vía	Enzima	Gen	EC	KO	COG
Síntesis <i>de novo</i>	Isopentil transferasa dependiente de AMP (IPT)	<i>tzs</i>	EC:2.5.1.27	K10760	COG0324
	Isopentil transferasa dependiente de ATP/ADP (IPT)	<i>IPT</i>	EC:2.5.1.112	K10760	COG0324
	CK fosforibohidrolasa "lonely guy" (LOG)	<i>fasF</i>	EC:3.2.2.n1	-	-
Vía dependiente de tRNA	tRNA isopentenil transferasas (tRNA IPT)	<i>miaA</i>	EC:2.5.1.75	K00791	COG0324
	tRNA 2-metiltio-N6-isopentenil-adenosina hidroxilasa (MiaE)	<i>miaE</i>	EC:1.14.99.69	K06169	COG4445
	CK fosforibohidrolasa "lonely guy" (LOG)	<i>fasF</i>	EC:3.2.2.n1	-	-

## Ácido salicílico

El ácido salicílico es un compuesto fenólico que posee un anillo de bencénico aromático, un grupo hidroxilo y un grupo carboxilo. Plantas, hongos y bacterias son capaces de sintetizar ácido salicílico a partir de corismato, conocido como el precursor principal de la síntesis (Bakker et al., 2014). Se ha reportado un gran número de géneros bacterianos (principalmente de rizobacterias), que tienen la capacidad de producir ácido salicílico (Bakker et al., 2014).

La única vía de síntesis descrita en bacterias corresponde a la ruta corismato/isocorismato, la cual está compuesta por dos pasos (**Figura 3**). El primer paso consiste en la conversión de corismato a isocorismato por acción de la enzima isocorismato sintasa (ICS) (Mishra & Baek, 2021a), en donde el residuo K147 de la ICS contribuye a la activación de una molécula de agua para el ataque nucleofílico en la posición C2 del corismato (Sridharan et al., 2010). El segundo paso corresponde a la conversión de isocorismato a ácido salicílico por acción de la enzima isocorismato piruvato liasa (IPL) (Kerbarh et al., 2005). Esta enzima cataliza la eliminación de la cadena lateral de enolpiruvato del isocorismato, por

una reacción pericíclica en donde el átomo de hidrógeno en C2 se transfiere a el C9 de la cadena lateral en simultáneo con la escisión de C-O, produciendo ácido salicílico y piruvato (DeClue et al., 2005). Para ambas enzimas de la vía se encontraron los códigos EC, KO y COG (**Tabla 3**).



**Figura 3. Vía de síntesis del ácido salicílico en bacterias.** En letras azules se indica el nombre de las enzimas y en letras negras el nombre de las moléculas. Figura adaptada de Kerbarh et al., (2005).

**Tabla 3. Enzimas involucradas en la vía de síntesis del ácido salicílico en bacterias.**

Vía	Enzima	Gen	EC	KO	COG
Corismato/Isocorismato	Isocorismato sintasa	<i>PchA</i>	EC:5.4.4.2	K02361	COG1169
	Isocorismato piruvato liasa	<i>PchB</i>	EC:4.2.99.21	K04782	COG1605

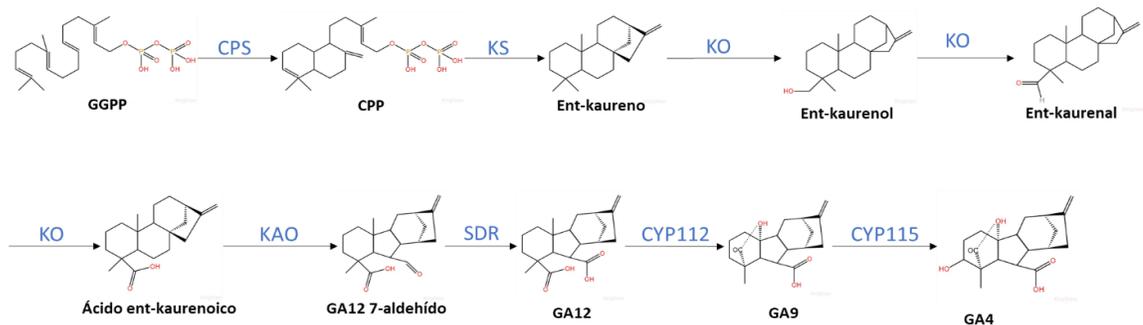
## Giberelinas

Las giberelinas son compuestos derivados de diterpenos complejos, que tienen en común una estructura de anillo hidrocarburo fusionado llamado giberelano (Morrone et al., 2009). Se han identificado 130 giberelinas en plantas, hongos y bacterias (Morrone et al., 2009). Dentro de éstas existen las giberelinas inactivas que tienen 20 carbonos en su estructura, y las activas que tienen 19 carbonos en su estructura. Entre las giberelinas activas que se han encontrado en bacterias se incluyen GA1, GA3 y GA4. Estas giberelinas tienen en común un grupo

hidroxilo en el C3, un grupo carboxilo en el C6 y una lactona entre el C4 y el C10 (Yamaguchi., 2008).

La vía de síntesis de las giberelinas en bacterias comienza a partir del precursor geranil-geranil difosfato (GGPP) (**Figura 4**). En el primer paso de la ruta, el GGPP es ciclado por la ent-copalil difosfato sintasa (CPS) produciendo CPP (difosfato de copalilo). Luego la enzima ent-kaureno sintasa (KS) termina el ciclado de CPP a ent-kaureno. Posteriormente, la enzima ent-kaureno oxidasa (KO) cataliza tres reacciones consecutivas; una hidroxilación y dos oxidaciones, en donde el producto final es el ácido ent-kaurenoico. Luego actúa la enzima ácido ent-kaurenoico (KAO) que cataliza las mismas dos reacciones, pero en otro carbono de la molécula, en donde se obtiene GA12; sin embargo, para que la última oxidación ocurra eficientemente se necesita de una deshidrogenasa reductasa de cadena corta (SDR). La enzima CYP112 cataliza una hidroxilación, seguida de una oxidación y una esterificación intramolecular obteniendo GA9 (Nett et al., 2017). Finalmente, la enzima CYP115 produce GA4 a partir de GA9 (Salazar-Cerezo et al., 2018).

Se logró encontrar el código EC para todas las enzimas involucradas en la síntesis de las giberelinas. Para las enzimas CPS y KS se encontraron adicionalmente los códigos KO y para la enzima KO se encontró además el código COG (**Tabla 4**).



**Figura 4. Vía de síntesis de las giberelinas en bacterias.** En letras azules se indica el nombre de las enzimas y en letras negras los nombres de las moléculas. Las abreviaciones de las enzimas se indican en el texto. Figura adaptada de Nett et al., (2017).

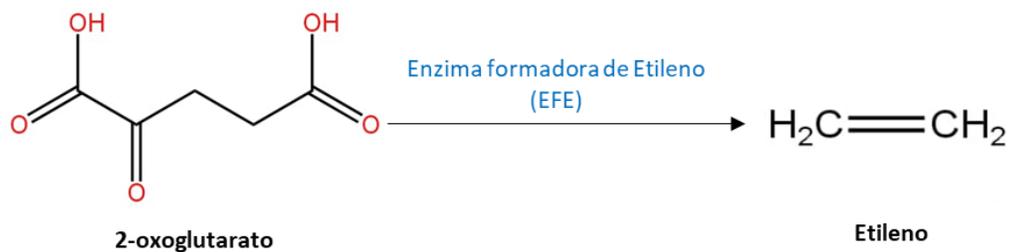
**Tabla 4. Enzimas involucradas en la vía de síntesis de las giberelinas en bacterias.**

Vía	Enzima	Gen	EC	KO	COG
Vía única	Ent-copalil difosfato sintasa (CPS)	<i>CPS</i>	EC:5.5.1.13	K04120	-
	Ent-keureno sintasa (KS)	<i>KS</i>	EC:4.2.3.19	K04121	-
	Ent-kaureno oxidasa (KO)	<i>CYP117</i>	EC:1.14.14.86	K04122, K21292	COG2124
	Ácido ent-kaurenico oxidasa (KAO)	<i>CYP114</i>	EC:1.14.14.107	K04123	-

## Etileno

El etileno es una molécula gaseosa producida por plantas, hongos y bacterias, que participa en diversos procesos fisiológicos (Weingart et al., 1997). Se conocen dos vías de síntesis de etileno en bacterias: la vía del ácido 2-ceto-metiltiobutirico (KMBA) y la vía 2-oxoglutarato (AKG) (Van de Poel et al., 2015). La vía KMBA es una reacción no enzimática que produce cantidades traza de etileno (Weingart et al., 1999). Por otro lado, la vía AKG descubierta en bacterias es la más importante ya que produce la mayor cantidad de etileno (**Figura 5**). En esta vía se utiliza la enzima formadora de etileno (EFE) para convertir el AKG en etileno (Weingart et al., 1999). Se ha reportado que EFE produce simultáneamente etileno y succinato (Johansson et al., 2013). La reacción

catalizada por EFE es entre una L-arginina y el 2-oxoglutarato, como una estructura de base Schiff, para formar un intermediario que reacciona con una molécula de oxígeno formando un complejo  $Fe^{4+}$  inestable, el cual se descompone en etileno y succinato en proporción 2:1 (Fukuda et al., 1993). Se encontraron los tres códigos para esta enzima e incluso se encontraron dos códigos EC (**Tabla 5**).



**Figura 5. Vía de síntesis de etileno en bacterias.** En letras azules se indica el nombre de la enzima y en letras negras el nombre de las moléculas. Figura adaptada de Van de Poel et al., (2015).

**Tabla 5. Enzima involucrada en la vía de síntesis del etileno en bacterias.**

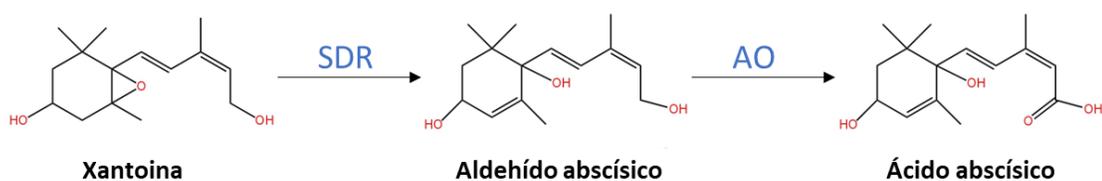
Vía	Enzima	Gen	EC	KO	COG
2-oxoglutarato	Enzima formadora de etileno (EFE)	<i>efe</i>	EC:1.13.12.19 EC:1.14.20.7	K21815	COG3491

## Ácido abscísico

El ácido abscísico es un ácido débil, sesquiterpenoide con un átomo de carbono asimétrico ópticamente activo (Finkelstein & Rock, 2002). Se ha detectado la producción de esta hormona en diversos organismos como plantas, hongos, animales y bacterias (Finkelstein & Rock, 2002; Lievens et al., 2017). Hasta la fecha no hay rutas ni roles fisiológicos descritos en bacterias; sin embargo, se ha

propuesto que algunos géneros como *Achromobacter*, *Bacillus* y *Pseudomonas* podrían presentar una ruta dependiente de carotenoides para la generación de ácido abscísico (Belimov et al., 2014; Lievens et al., 2017; Takezawa et al., 2011). En plantas la vía de producción de ácido abscísico se encuentra más detallada, por esta razón se utilizó esta ruta como guía para la búsqueda de genes homólogos.

La biosíntesis de ácido abscísico en plantas se desarrolla en dos pasos (**Figura 6**). Primero, ocurre la conversión de la xantonxina a aldehído abscísico catalizada por una enzima relacionada a una familia de deshidrogenasa/reductasa de cadena corta llamada xantoina deshidrogenasa (SDR), y luego una isoforma de esta misma enzima, llamada aldehído oxidasa (AO), cataliza la oxidación de aldehído abscísico a ácido abscísico (Sao & Koshiba., 2002). Para ambas enzimas involucradas en la biosíntesis se encontraron los códigos EC y KO (**Tabla 6**). El código COG no se encontró para ninguna de las dos enzimas de la ruta.



**Figura 6. Vía de síntesis del ácido abscísico en plantas.** En letras azules se indica el nombre de las enzimas y en letras negras el nombre de las moléculas. Las abreviaciones de las enzimas se indican en el texto. Figura adaptada de Lievens et al., (2017).

**Tabla 6. Enzimas involucradas en la vía de síntesis del ácido abscísico en plantas.**

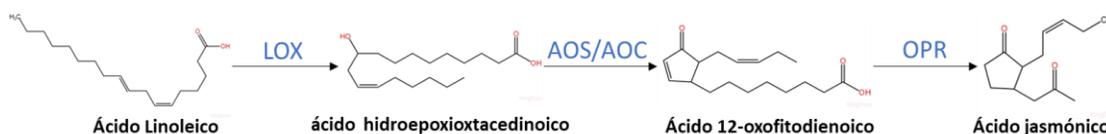
Vía	Enzima	Gen	EC	KO	COG
Xantoina a ABA	Xantoina deshidrogenasa (sdr)	<i>ABA2</i>	EC:1.1.1.288	K09841	-
	Abscísico-aldehído oxidasa (AO)	<i>Aao3</i>	EC:1.2.3.14	K09842	-

## Ácido jasmónico

El ácido jasmónico y sus derivados como jasmonil isoleucina, jasmónico de metilo, ácido 12-hidroxijasmónico sulfato, cis-jasmona, éster de glucosilo de ácido jasmónico, éster metilo de jasmonil isoleucina y jasmonil-aminoácido son conocidos como jasmonatos; sin embargo, el ácido jasmónico es el principal representante de este grupo de fitohormonas (Wan & Xin, 2022). Esta fitohormona es una ciclopentanona que tiene dos centros quirales que se ubican en el C3 y el C7, permitiéndole tener cuatro estereoisómeros posibles (Creelman & Mullet, 1997). Puede ser producida por plantas, algas y bacterias. La síntesis de ácido jasmónico en bacterias se ha podido confirmar por métodos de cultivo y cromatográficos (Forchetti et al., 2007; Ji et al., 2020); sin embargo, la vía de producción aún no ha sido descrita. En plantas la ruta ha sido descrita completamente. Por esta razón, se utilizará esta vía como guía para la búsqueda de genes homólogos (**Figura 7**).

En el primer paso de la ruta los fosfolípidos, ácido linolénico (18:2) y ácido linolénico (18:3) sufren una dioxigenación catalizada por lipoxigenasas (LOX), formando ácido hidroepoxioctadecenoico (HPODE) (Lyons et al., 2013). Luego, el HPODE se convierte en ácido 12-oxofitodienoico (12-OPDA) a través de una

reacción catalizada por la óxido de aleno sintasa (AOS) y posteriormente por aleno óxido ciclasa (AOC). Finalmente, el 12-OPDA se convierte en ácido jasmónico por reducción debido a la reductasa del ácido 12-oxofitodienoico (OPR), seguida de 3 ciclos de  $\beta$ -oxidación (Lyons et al., 2013). Para todas enzimas involucradas en la vía se síntesis se encontraron los códigos EC y KO (Tabla 7). El código COG no se encontró para ninguna de las enzimas de la ruta.



**Figura 7. Vía de síntesis del ácido jasmónico en plantas.** En letras azules se indica el nombre de las enzimas y en letras negras los nombres de las moléculas. Las abreviaciones de las enzimas se indican en el texto. Figura adaptada de Lyons et al., (2013).

**Tabla 7. Enzimas involucradas en la vía de síntesis del ácido jasmónico en plantas.**

Vía	Enzima	Gen	EC	KO	COG
Vía Única	Lipoxigenasa (LOX)	<i>LOX</i>	EC:1.13.11.12	K00454	-
	Aleno óxido sintasa (AOS)	<i>AOS</i>	EC:4.2.1.92	K01723	-
	Aleno óxido ciclasa (AOC)	<i>AOC</i>	EC:5.3.99.6	K10525	-
	12-oxofitodienoato reductasa (OPR)	<i>OPR3</i>	EC:1.3.1.42	K05894	-

## Brasinoesteroides

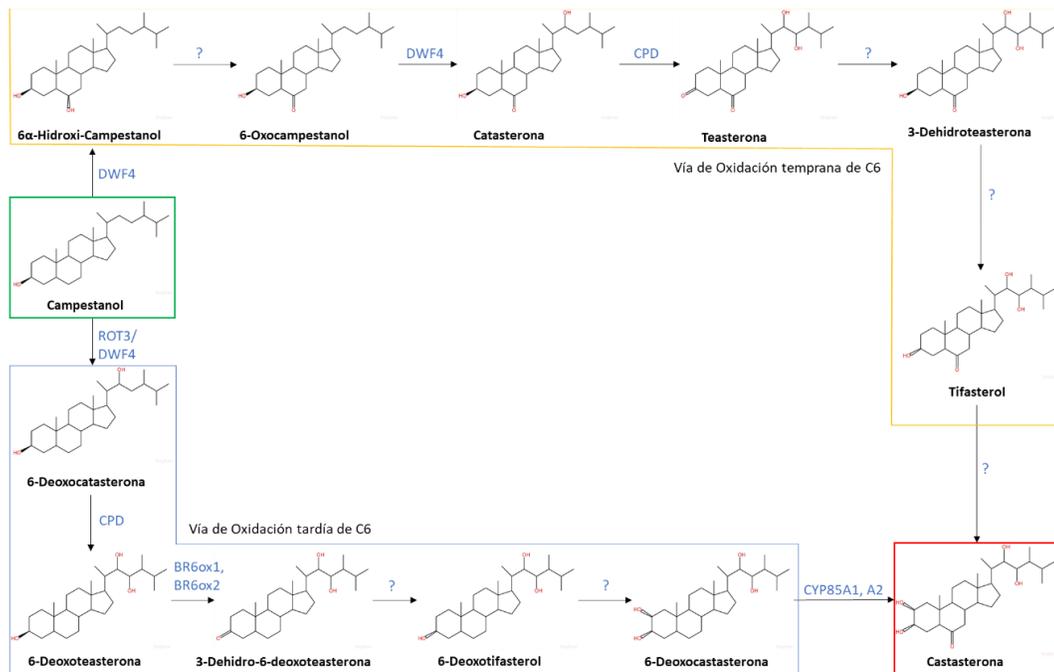
Los brasinoesteroides son esteroides polihidroxilados, derivados de  $5\alpha$ -colesterol que varían en estructura según la cadena lateral que presenten (Kour et al., 2021a) y estructuralmente son muy similares a andrógenos, estrógenos, corticoides y ecdiesteroides (Bajguz et al., 2020). Según el tamaño de la cadena lateral, los brasinoesteroides se dividen en esteroides C27, C28 y C29 presentes de forma libre o conjugada con ácidos grasos y azúcares; sin embargo, entre el

40%-50% de los brasinoesteroides son C28, entre ellos la castasterona (Kour et al., 2021a).

Hasta el momento sólo se ha reportado la producción de brasinoesteroides en plantas, por lo que no hay rutas de síntesis descritas en bacterias ni en otro tipo de microorganismos. Por esta razón, se utilizará la vía en plantas como referencia (**Figura 8**). Las enzimas involucradas en la síntesis de brasinoesteroides en plantas se han dilucidado por medio de estudios genéticos y bioquímicos; sin embargo, se necesitan más estudios para comprender el mecanismo molecular de la biosíntesis de brasinoesteroides (Kour et al., 2021a). Existen tres vías de producción en plantas: la de oxidación tardía y temprana de C6, consideradas las dos vías principales (también llamadas vías dependientes de campestanol); y la vía de hidroxilación de C22 inicial, pero aún no se tiene certeza de la estructura general de la vía (Kour et al., 2021a).

La vía de oxidación tardía de C6 (**Figura 8**) comienza con la acción de las enzimas ENANO-4 (DWF4) y rotundifolia 3 (ROT3), las cuales actúan sobre el campestanol produciendo 6-deoxocasterona. Luego, la enzima fotomorfogénesis constitutiva y proteína de enanismo (CPD) transforma la 6-deoxocasterona a 6-deoxoteasterona. Posteriormente, la acción conjunta de las enzimas BR6 oxidasa 1 y 2 (BR6ox1 y BR6ox2) produce 3-dehidro-6-deoxoteasterona, que se transforma en 6-deoxotifasterol y luego en 6-deoxocasterona por enzimas aun no identificadas. Finalmente, las citocromos CYP85A1 y CYP85A2 se encargan de transformarlo en castasterona

(brasinoesteroide activo) (Nishant Bhanu, 2019; Kour et al., 2021). La vía de oxidación temprana de C6 (**Figura 8**) también comienza desde el precursor campestanol, el cual es modificado a 6 $\alpha$ -hidroxi-campestanol por la enzima DWF4. Posteriormente, se produce 6-oxocampestanol (paso enzimático desconocido), que por acción de DWF4 es transformado a catasterona. Luego, la catasterona es transformada a teasterona por la enzima CPD. Finalmente, después de tres pasos enzimáticos catalizados por enzimas aún no identificadas, se produce castasterona (Nishant Bhanu, 2019; Kour et al., 2021). Para las enzimas involucradas en ambas vías se encontraron sólo los códigos EC y KO (**Tabla 8**). EL código COG no se encontró para ninguna de las enzimas involucradas en la síntesis.



**Figura 8.** Vía de síntesis de los brasinoesteroideos en plantas (*leyenda en página siguiente*).

**Figura 8. Vía de síntesis de los brasinoesteroides en plantas** (*figura en página anterior*). En letras azules se indica el nombre de las enzimas y en letras negras el nombre de las moléculas. Los signos de interrogación indican enzimas que aún no han sido descritas. En el cuadro verde se encuentra el campestanol, precursor de ambas vías; en el cuadrado rojo se encuentra el castasterona, producto final de las vías; en el cuadro amarillo se encuentra la vía de oxidación temprana de C6; y en el cuadro azul se encuentra la vía de oxidación tardía de C6. Figura adaptada de Kour et al., (2021).

**Tabla 8. Enzimas involucradas en las vías de síntesis de los brasinoesteroides en plantas.**

Vía	Enzima	Gen	EC	KO	COG
Vía de oxidación temprana de C6	ENANO-4 (DWF4)	<i>DWF4</i>	EC:1.14.14.178	K09587	-
	Fotomorfogénesis constitutiva y proteína de enanismo (CPD)	<i>CYP90A1</i>	EC:1.14.19.79	K09588	-
Vía de oxidación tardía de C6	Desetiolo-2 (DET 2)	<i>DET2</i>	EC:1.3.1.22	K09591	-
	ENANO-4 (DWF4)	<i>DWF4</i>	EC:1.14.14.178	K09587	-
	Fotomorfogénesis constitutiva y proteína de enanismo (CPD)	<i>CYP90A1</i>	EC:1.14.19.79	K09588	-

## Estrigolactonas

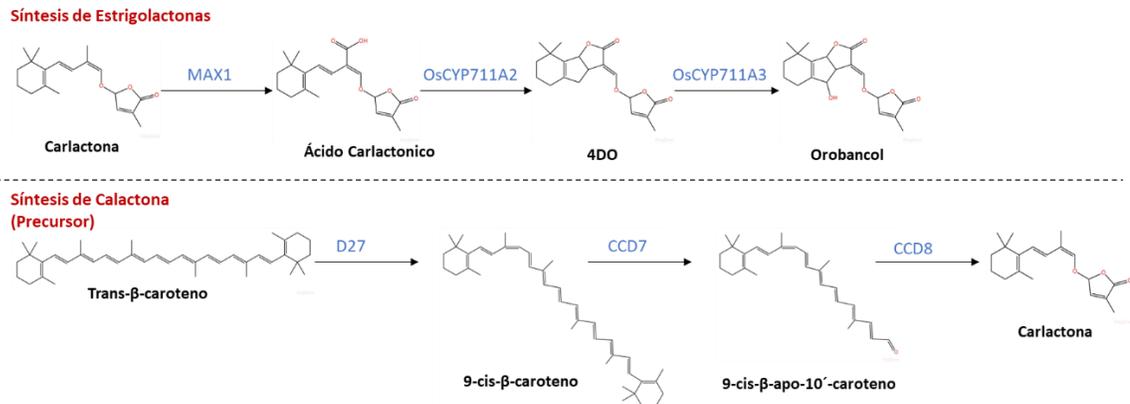
Las estrigolactonas son compuestos derivados de carotenoides, que tienen un anillo butenólido (anillo D) unido por un puente de enol éter a un radical menos conservado que permite clasificar las estrigolactonas en dos grupos: estrigolactonas con lactonas tricíclicas (anillo ABC) y estrigolactonas que carecen de lactona tricíclica; de las que se han dilucidado 18 y 2 formas diferentes, respectivamente (Al-Babili & Bouwmeester, 2015). Asimismo, las lactonas tricíclicas se pueden dividir en dos grupos según la configuración del anillo C que es esencial para la funcionalidad de las estrigolactonas. Los estrigolactonas tipo estrigol tienen el anillo C en orientación  $\beta$  (arriba) y las estrigolactonas de tipo orobanchol tienen el anillo C en orientación  $\alpha$  (abajo) (Al-Babili & Bouwmeester, 2015; Wakabayashi et al., 2022).

La síntesis de estrigolactonas se ha reportado únicamente en plantas. Las enzimas que catalizan la conversión a estrigol aún no están descritas, así como tampoco sus genes. Está claro que la expresión de algún integrante de la subfamilia de CYP722C es el responsable de catalizar el paso clave para la síntesis de estrigol; sin embargo, se requiere un análisis funcional más detallado de la subfamilia (Wakabayashi et al., 2022).

El precursor de la vía de síntesis de las estrigolactonas de tipo orobanchol (**Figura 9**) corresponde a la carlactona (CL), que se convierte en ácido carlactónico (CLA) por acción de la MAX1. En este punto es donde se generan los esqueletos tricíclicos y se hace la separación en estrigol y orobanchol por medio de hidroxilaciones y otras modificaciones. Para la síntesis de orobanchol, se produce una conversión de CLA a 4-deoxiorobanchol (4DO), catalizada por OsCYP711A2. Luego, OsCYP711A3 cataliza la hidroxilación de 4DO a orobanchol, dando término a la vía (Wakabayashi et al., 2022).

Debido a que no se encontraron los códigos EC, KO y COG para ninguna de las tres enzimas involucradas en la síntesis del orobanchol, se optó por buscar la ruta de síntesis del precursor de esta fitohormona (**Figura 9**), es decir de la carlactona. El precursor de esta molécula corresponde al trans- $\beta$ -caroteno, que por acción de la enzima  $\beta$ -caroteno isomerasa (D27) produce 9-cis- $\beta$ -caroteno. Luego, la enzima dioxigenasa de escisión de carotenoides 7 (CCD7) produce 9-cis- $\beta$ -apo-10'-caroteno, que finalmente es transformado a carlactona por acción de la enzima dioxigenasa de escisión de carotenoides 8 (CCD8) (Wakabayashi

et al., 2022). Para estas tres enzimas se encontraron los códigos EC y KO (**Tabla 9**). El código COG no se encontró para ninguna de las enzimas de la ruta del precursor.



**Figura 9. Vía de síntesis de las estrigolactonas y su precursor (carlactona) en plantas.** En letras rojas se indican las vías de síntesis, en letras azules los nombres de las enzimas, en letras negras los nombres de las moléculas. Figura adaptada de Wakabayashi et al., (2022).

**Tabla 9. Enzimas involucradas en la vía de síntesis de las estrigolactonas y su precursor (carlactona) en plantas.**

Vía	Enzima	Gen	EC	KO	COG
Vía Única	"Más crecimiento axial" 1 (MAX1)	<i>CYP711A1</i>	EC:1.14.-.-	-	-
	OsCYP711A2	-	-	-	-
	OsCYP711A3	-	-	-	-
Precursor	β-caroteno isomerasa	<i>D27</i>	EC:5.2.1.14	K17911	-
	Dioxigenasa de escisión de carotenoides 7	<i>CCD7</i>	EC:1.13.11.68	K17912	-
	Dioxigenasa de escisión de carotenoides 8	<i>CCD8</i>	EC:1.13.11.69	K17913	-

## 5.2 Diversidad de las bacterias con potencial de producir fitohormonas

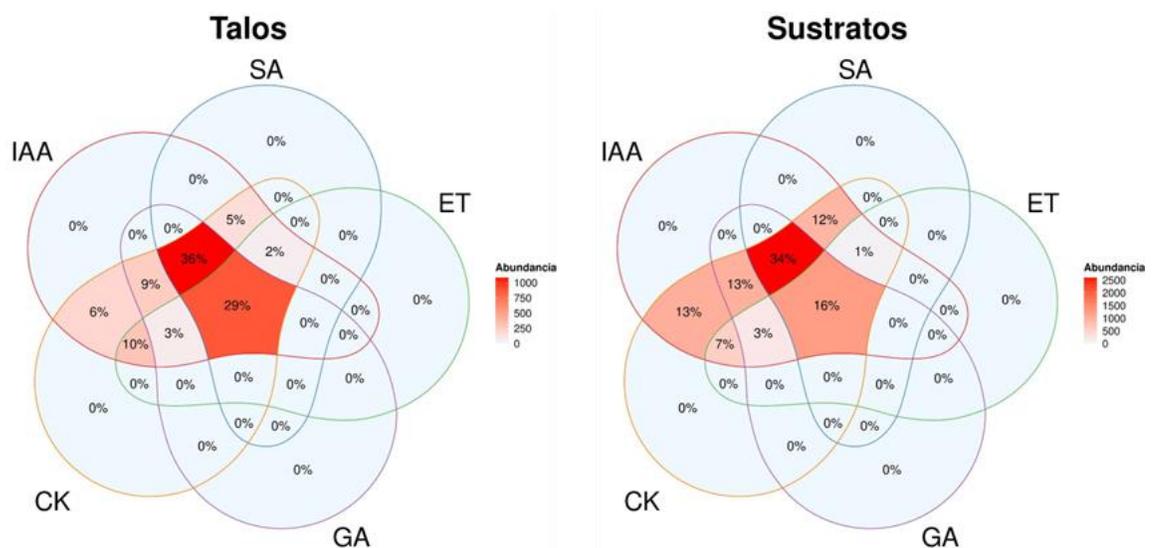
Se estudiaron las comunidades bacterianas asociadas a los talos y sustratos de dos especies de líquenes de bosque (*P. frigida* y *P. fuscopraetextata*) y dos de pradera (*P. ponojensis/monticola* 11 y *P. rufescens*). Estas muestras se recolectaron desde cuatro sitios ubicados en el sur de Chile: Coyhaique y Tamango (Región de Aysén), Karukinka y Navarino (Región de Magallanes). Para

estudiar la diversidad de las comunidades bacterianas, se utilizaron las secuencias del gen 16S bacteriano obtenidas previamente en el Laboratorio de Ecología Microbiana de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile. Para identificar las bacterias con el potencial de producir fitohormonas, se predijeron las funciones con la herramienta bioinformática PICRUST2 y la lista de códigos enzimáticos recopilados en este trabajo (**Tabla 1 a Tabla 9**).

Se determinó que las comunidades bacterianas asociadas a los talos y sustratos de líquenes *Peltigera* presentarían genes relacionados a la síntesis de cinco de las nueve fitohormonas: ácido indol acético, citoquininas, giberelinas, ácido salicílico, etileno. Los genes de síntesis de ácido jasmónico, ácido abscísico, brasinoesteroides no se encontraron presentes en los genomas de las bacterias estudiadas, por lo que las comunidades bacterianas asociadas a *Peltigera* no tendrían el potencial de producir estas hormonas. Finalmente, los códigos asociados a la síntesis de estrigolactonas no se encontraron en la base de datos de PICRUST2, por lo que no se puede afirmar que las bacterias presenten o no el potencial para producir esta fitohormona.

A partir de las ASVs identificadas en las muestras de talos, se infiere que el 100% de las bacterias contendrían genes asociados a la síntesis de ácido indol acético y de citoquininas, mientras que un 77%, 72% y 32% de las bacterias contendrían genes asociados a la síntesis de giberelinas, ácido salicílico y etileno, respectivamente. Porcentajes similares se determinaron en las muestras de sustratos (**Figura 10**). Al analizar el potencial total de síntesis de fitohormonas,

un 29% de las bacterias presentes en los talos contendría genes relacionados a las síntesis de las cinco fitohormonas, mientras que en sustratos este porcentaje corresponde al 16% (**Figura 10**). Además, un 36% de las bacterias en talos y un 34% en sustratos contendrían genes asociados a la síntesis de ácido indol acético, citoquininas, giberelinas y ácido salicílico. Por otro lado, en ambos microambientes (talo y sustrato) se observó que ninguna bacteria contendría genes asociados a la síntesis de una única fitohormona.

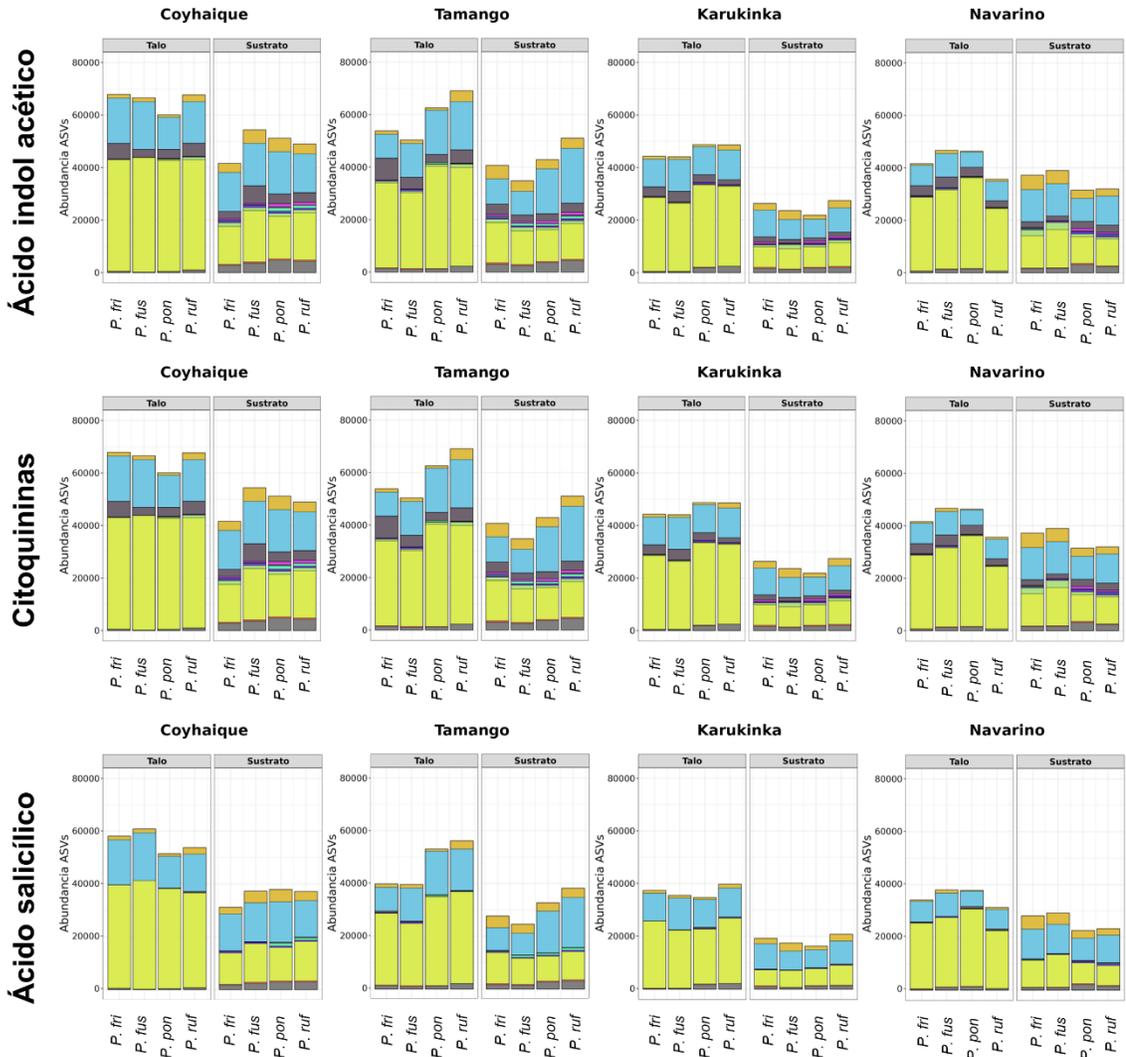
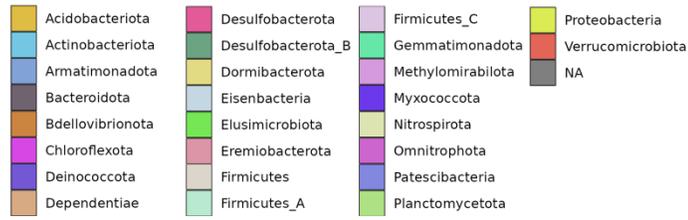


**Figura 10. Diagrama de Venn del porcentaje de bacterias que contendrían genes relacionados a la síntesis de fitohormonas.** IAA: ácido indol acético, SA: ácido salicílico, CK: citoquininas, GA: giberelinas y ET: etileno.

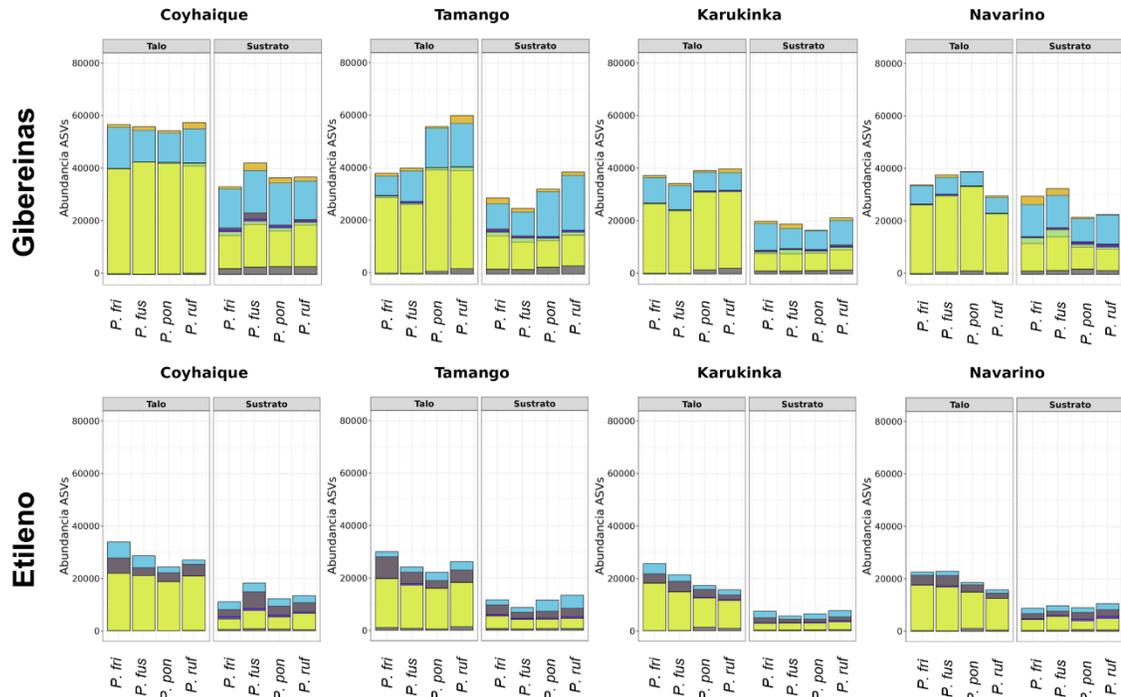
En cuanto a la abundancia de bacterias, tanto en los talos como en los sustratos se encontró mayor abundancia de bacterias con potencial de producir ácido indol acético y citoquininas, y menor abundancia de bacterias con potencial de sintetizar etileno (**Figura 11**). Por otro lado, para todas las hormonas se observó que los talos presentaron mayor abundancia de bacterias en comparación con

los sustratos. Además, las muestras de los sitios de la Región de Aysén (Coyhaique y Tamango) presentaron mayor abundancia de bacterias que aquellas de la Región de Magallanes (Karukinka y Navarino). Las mayores diferencias se encontraron al comparar entre las muestras de bosques y praderas, aunque no se observó la misma tendencia de abundancia en todos los casos.

La composición taxonómica de las bacterias con potencial de producir hormonas fue diferente dependiendo de la fitohormona, pero en general se pudo observar que los filos bacterianos más abundantes en todas las muestras fueron *Proteobacteria*, *Actinobacteriota*, *Bacteroidota* y *Acidobacteriota*. En las muestras de sustratos se observó mayor riqueza de filos. Asimismo, para el ácido indol acético y las citoquininas se detectaron más filos que para el resto de las fitohormonas.

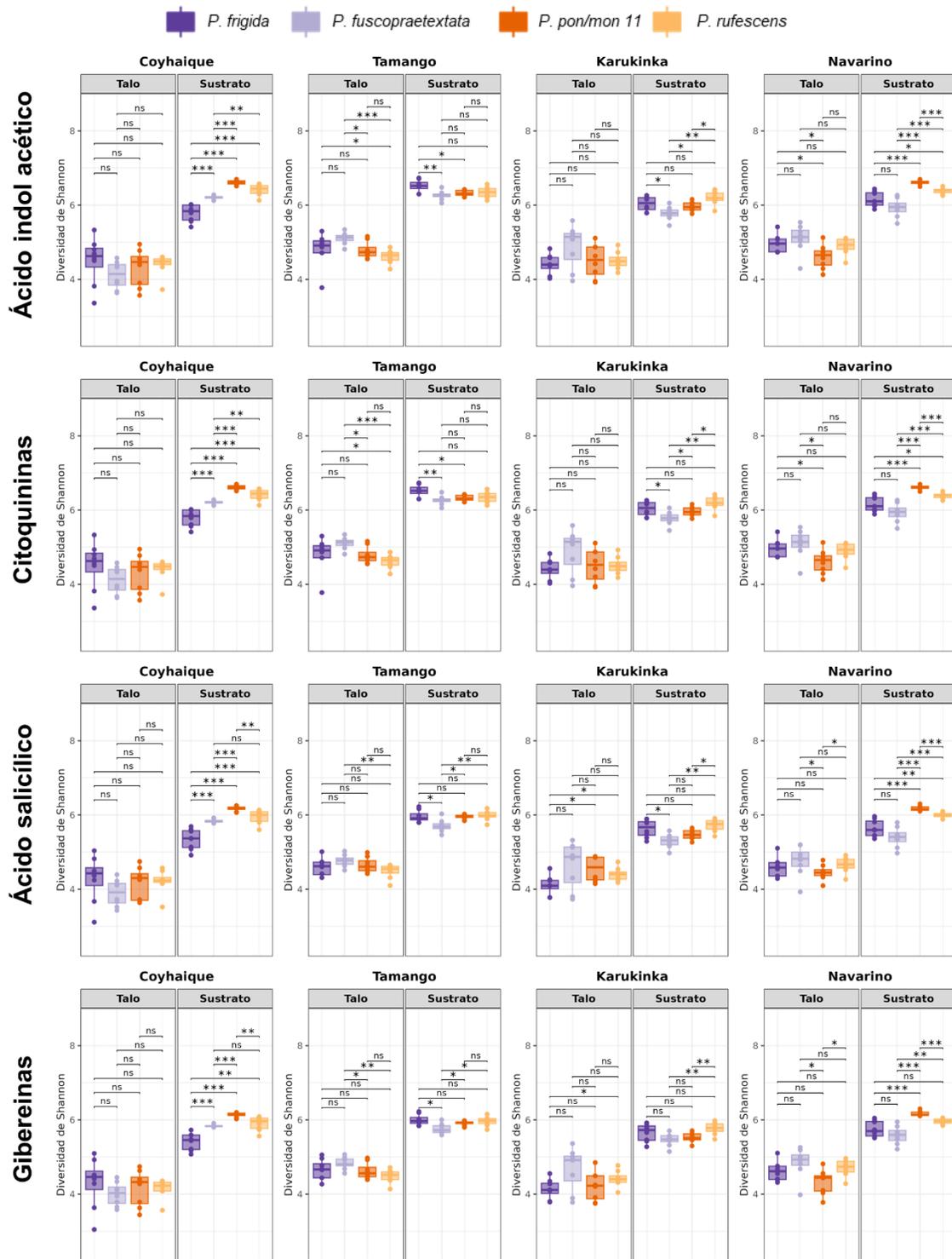


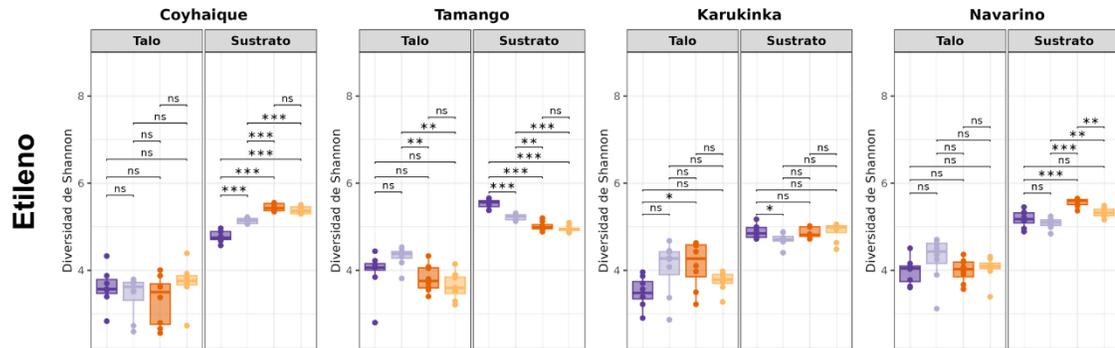
*Continua en página siguiente.*



**Figura 11. Abundancia y composición taxonómica a nivel de filo de las ASVs relacionadas a la síntesis de las fitohormonas.** *P. fri*: *P. frigida*, *P. fus*: *P. fuscopraetextata*, *P. pon*: *P. ponojensis/monticola* 11, *P. ruf*: *P. rufescens*.

Al analizar la diversidad alfa de las comunidades bacterianas se observó que las bacterias con potencial de producir ácido indol acético y citoquininas presentaron un índice de diversidad de Shannon mayor que las otras fitohormonas, y fue el etileno el que mostró la menor diversidad de bacterias con potencial de sintetizarlo. Además, en todos los casos la diversidad de las bacterias fue menor en talos y mayor en sustratos (**Figura 12**). En las muestras de talo, en general, no se encontraron diferencias significativas al comparar la diversidad de las bacterias entre las especies de líquenes, mientras que en los sustratos se observaron diferencias significativas entre las distintas especies. Por otro lado, no se detectaron grandes diferencias al comparar entre los distintos sitios geográficos.



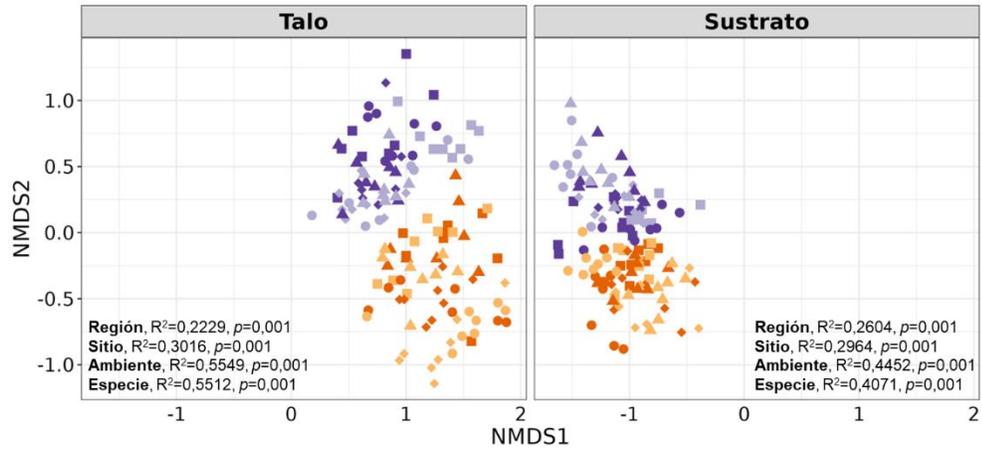


**Figura 12. Diversidad de Shannon de las bacterias que contendrían genes relacionados a la síntesis de fitohormonas.** Diferencias significativas según la prueba de Wilcoxon Mann Whitney (ns:  $p > 0,05$ ; \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*:  $p \leq 0,001$ ). *P. pon/mon 11*: *Peltigera ponojensis/monticola 11*.

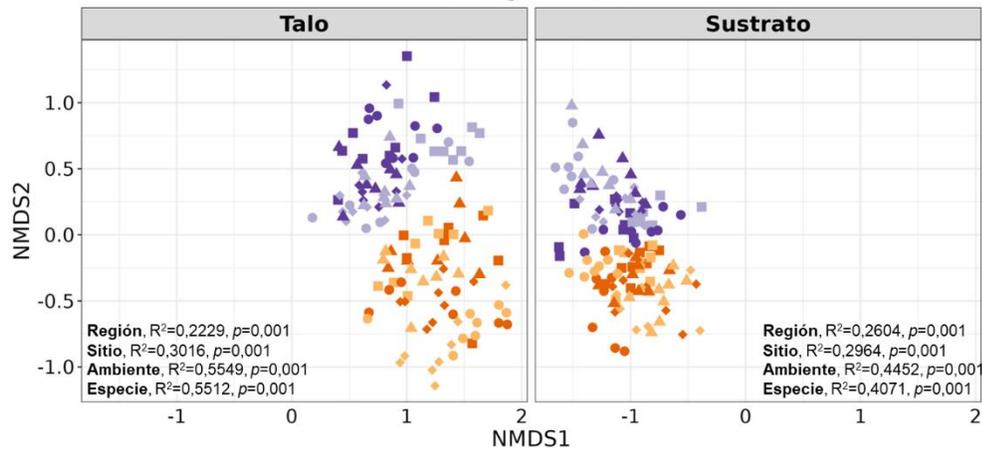
Al determinar la diversidad beta de las comunidades bacterianas, se observó que para todas las fitohormonas las muestras de talos fueron más dispersas y menos homogéneas que los sustratos (**Figura 13**). En todos los casos, tanto la especie de liquen, como el ambiente (bosque y pradera), el sitio (Coyhaique, Tamango, Karukinka y Navarino) y la región (Aysén y Magallanes) fueron factores significativos en la separación de las muestras. Sin embargo, la especie de liquen y el ambiente explicaron mayor porcentaje de la varianza que el sitio y la región.

- *P. frigida*    ● *P. fuscopraetextata*    ● *P. pon/mon 11*    ● *P. rufescens*
- Coyhaique    ● Tamango    ▲ Karukinka    ◆ Navarino

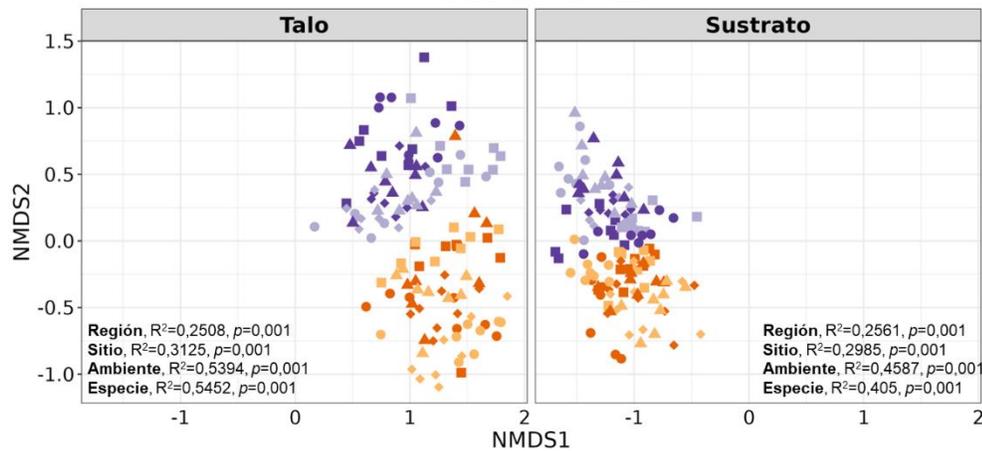
### Ácido indol acético



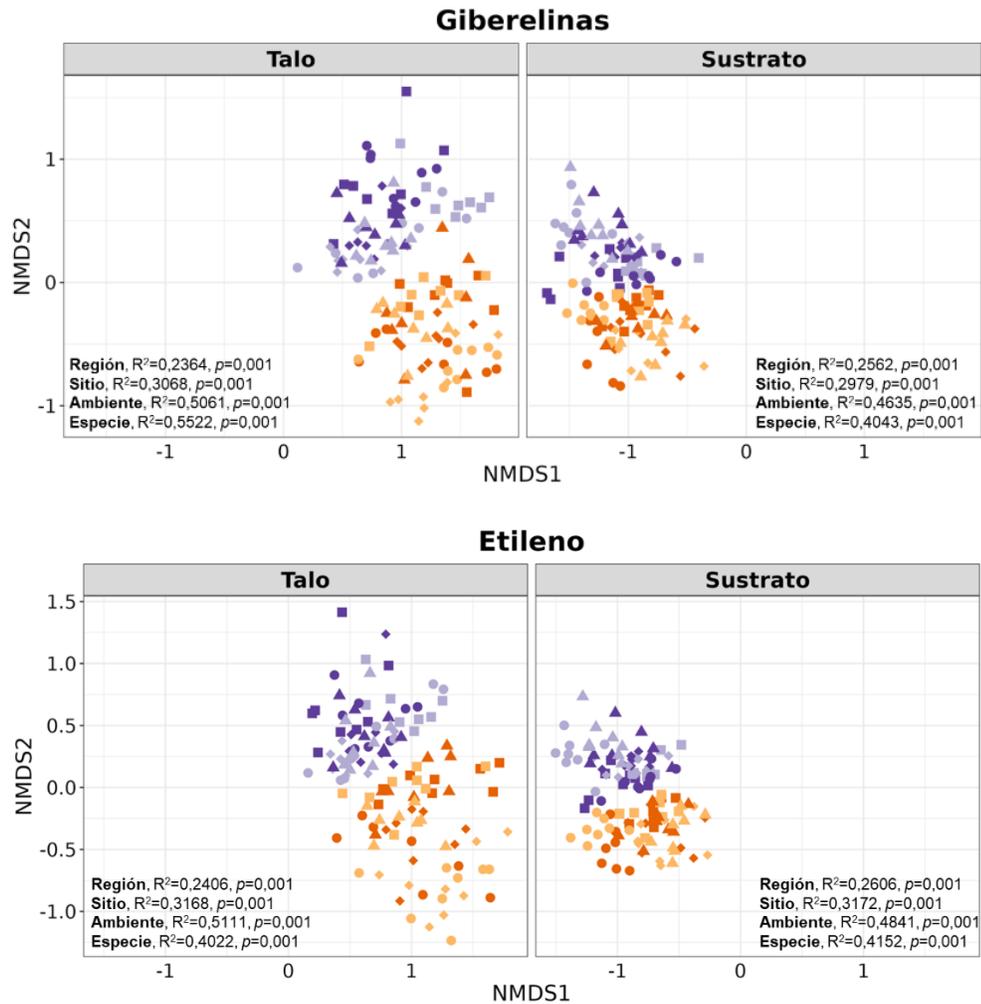
### Citoquininas



### Ácido salicílico



Continúa en página siguiente.



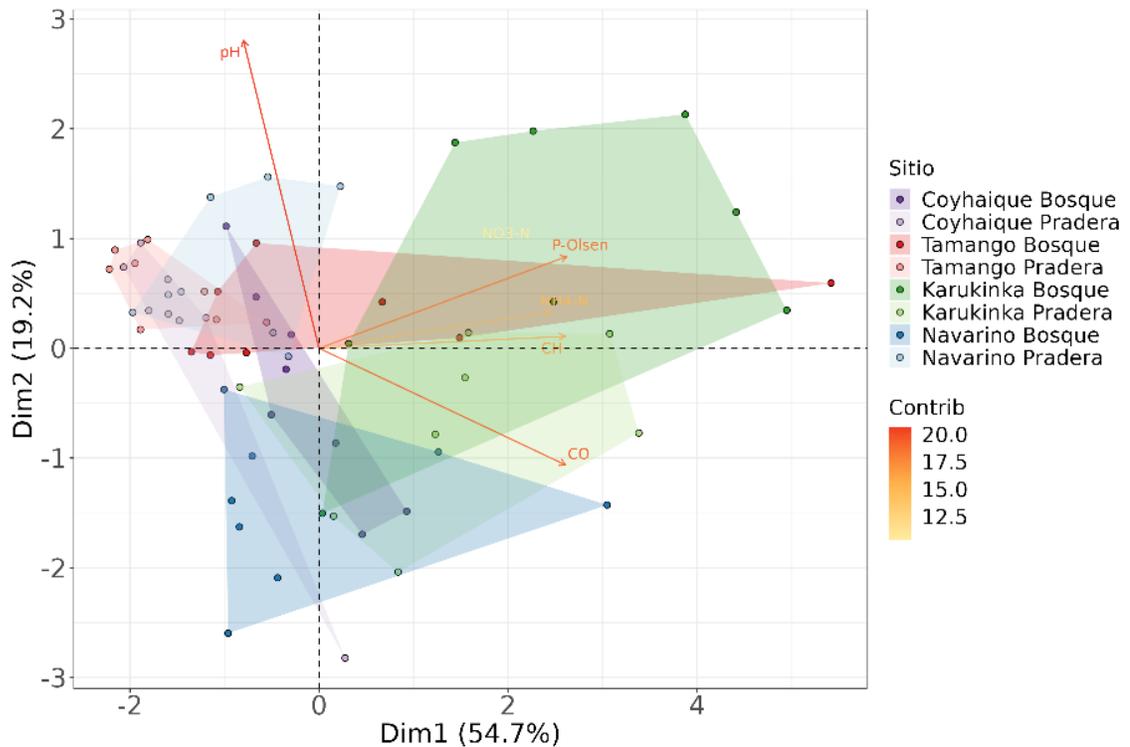
**Figura 13. Análisis de escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) de las comunidades bacterianas con potencial de producir fitohormonas.** Basado en una matriz de distancia de Bray-Curtis a nivel de ASV. Diferencias entre las distintas muestras de acuerdo con ANOSIM.

### 5.3 Factores ambientales que influyen sobre la diversidad de las bacterias con potencial de producir fitohormonas

Previamente, se pudo determinar que el factor que más influye sobre la diversidad de bacterias con potencial de producir fitohormonas es el ambiente (bosque o pradera). Para analizar con mayor profundidad este factor, se utilizó

información de los parámetros edáficos y bioclimáticos para caracterizar cada ambiente en cada sitio.

Los datos edáficos y bioclimáticos se analizaron mediante un análisis de componentes principales (PCA). En cuanto a las variables edáficas, se observó que la mayoría de los grupos se sobreponen; sin embargo, se evidencia una tendencia general de que los sitios de la región de Aysén se agrupan a la izquierda y los sitios de la región de Magallanes a la derecha, estos últimos caracterizándose por contener mayores niveles de nutrientes y menor pH (**Figura 14 y Tabla A2**). Las variables con mayor contribución en la separación de las muestras fueron el pH, el carbono orgánico y el fósforo. Se encontraron diferencias significativas entre el bosque y la pradera de Coyhaique y de Karukinka, pero no entre los dos ambientes de Tamango y Navarino (**Tabla 10**).



**Figura 14. Análisis de componentes principales (PCA) basado en las variables edáficas para de cada sitio y ambiente.** CH: contenido hidrico, CO: carbono orgánico, NH<sub>4</sub>-N: amonio, NO<sub>3</sub>-N: nitrato, P.Olsen: fósforo Olsen, Contrib: contribución de la variable sobre la separación de las muestras.

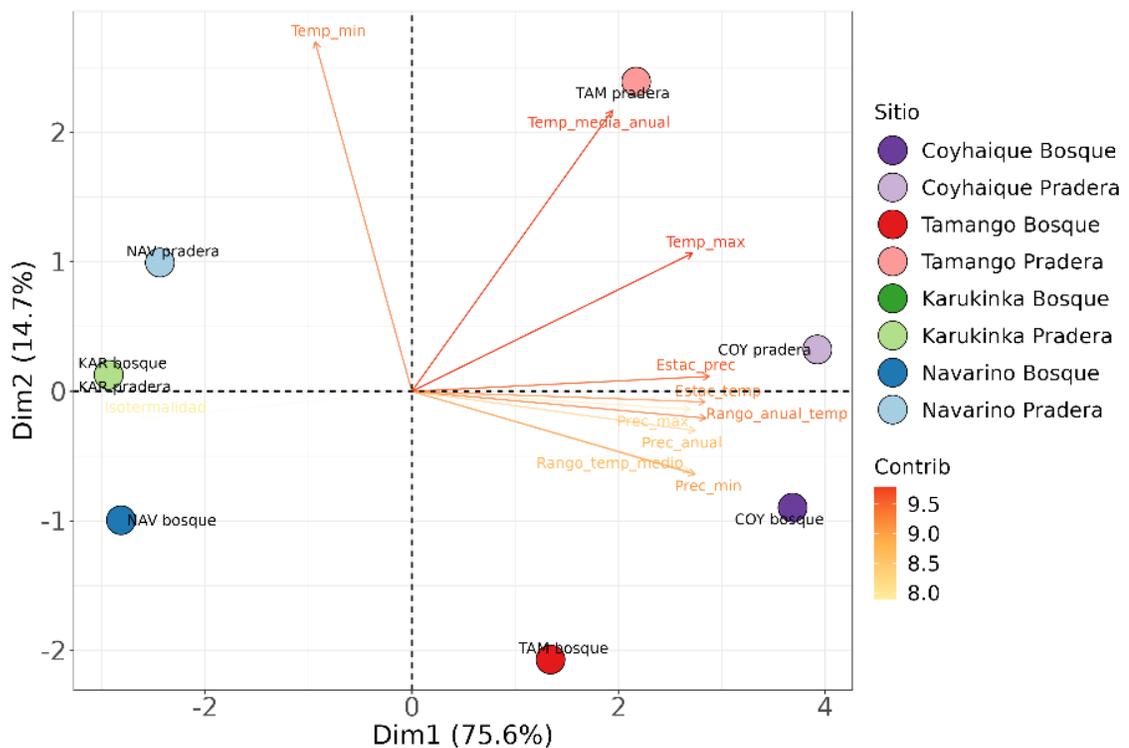
**Tabla 10. PERMANOVA por pares.**

Comparaciones	R <sup>2</sup>	p	p ajustado
Coyhaique Bosque vs Coyhaique Pradera	0,690	0,001	0,028
Coyhaique Bosque vs Tamango Pradera	0,608	0,001	0,028
Coyhaique Pradera vs Karukinka Pradera	0,594	0,001	0,028
Coyhaique Pradera vs Tamango Bosque	0,553	0,001	0,028
Karukinka Bosque vs Karukinka Pradera	0,517	0,001	0,028
Karukinka Bosque vs Navarino Bosque	0,425	0,001	0,028
Karukinka Bosque vs Tamango Pradera	0,667	0,001	0,028
Karukinka Pradera vs Tamango Bosque	0,335	0,001	0,028
Karukinka Pradera vs Tamango Pradera	0,519	0,001	0,028

Sólo se muestran los resultados con diferencias estadísticamente significativas ( $p$  ajustado < 0,05).

En cuanto a las variables bioclimáticas, a pesar de que no se pudieron llevar a cabo análisis estadísticos por la baja resolución de los datos (1 km<sup>2</sup>), se observa una clara separación a lo largo del eje 1 según el sitio geográfico. Los sitios de la

región de Aysén se caracterizaron por presentar mayores temperaturas y niveles de precipitaciones, mientras que los sitios de la región de Magallanes presentaron una isoterma más alta (**Figura 15 y Tabla A3**). Por otro lado, a lo largo del eje 2, las muestras se separaron según el tipo de ambiente, siendo en las praderas las temperaturas más altas, mientras que en los bosques existen mayores niveles de precipitaciones. Las variables que más contribuyeron a la separación de las muestras fueron la temperatura máxima, la temperatura media anual y la estacionalidad de las precipitaciones.



**Figura 15. Análisis de componentes principales (PCA) basado en las variables bioclimáticas de cada sitio y ambiente.** Temp\_min: temperatura mínima, Temp\_media\_anual: temperatura media anual, Temp\_max: temperatura máxima, Rango\_anual\_temp: rango anual de temperatura, Estac\_temp: estacionalidad de la temperatura, Rango\_temp\_medio: Rango de temperatura medio, Prec\_min: precipitación mínima, Prec\_media\_anual: precipitación media anual, Prec\_max: precipitación máxima, Rango\_anual\_prec: rango anual de precipitación, Estac\_prec: estacionalidad de la precipitación, Rango\_prec\_medio\_ rango medio de precipitación, Contrib: contribución de la variable sobre la separación de las muestras.

Luego de caracterizar los sitios, se evaluó la influencia de las variables edáficas y bioclimáticas sobre la diversidad de las comunidades bacterianas con potencial de producir fitohormonas. Para ello, se realizaron análisis de redundancia (RDA) para cada fitohormona por separado, tanto en talos como en sustratos. Las variables edáficas explicaron entre un 10,5% y un 11,5% de la varianza en los talos y entre un 15,6% y un 16,2% en los sustratos para las cinco fitohormonas estudiadas (**Tabla A4**). Además, las seis variables edáficas incluidas en el análisis tuvieron un efecto significativo sobre la diversidad de las comunidades bacterianas, pero el nitrato y el pH fueron las que explicaron mayores porcentajes de varianza (**Tabla 11**).

**Tabla 11. Significancia de las variables edáficas sobre la diversidad de las comunidades bacterianas con potencial de producir fitohormonas según análisis de redundancia (RDA).** CH: contenido hidrico, CO: carbono organico, N-NH<sup>+</sup><sub>4</sub>: amonio, N-NO<sup>+</sup><sub>3</sub>: nitrato, P Olsen: fósforo Olsen.

Micro-ambiente	Variable	Ácido indol acético		Citoquininas		Ácido salicílico		Giberelinas		Etileno	
		R <sup>2</sup>	p	R <sup>2</sup>	p	R <sup>2</sup>	p	R <sup>2</sup>	p	R <sup>2</sup>	p
Talo	CH	0,009	0,009	0,009	0,001	0,008	0,017	0,009	0,008	0,007	0,036
	pH	0,015	0,001	0,015	0,001	0,016	0,001	0,016	0,001	0,014	0,001
	CO	0,007	0,052	0,007	0,001	0,007	0,031	0,007	0,050	0,007	0,049
	N-NH <sup>+</sup> <sub>4</sub>	0,010	0,002	0,010	0,001	0,009	0,005	0,010	0,002	0,009	0,003
	N-NO <sup>+</sup> <sub>3</sub>	0,017	0,001	0,017	0,001	0,017	0,001	0,017	0,001	0,016	0,001
	P Olsen	0,007	0,047	0,007	0,001	0,007	0,049	0,007	0,046	0,008	0,021
Sustrato	CH	0,011	0,003	0,011	0,001	0,011	0,004	0,011	0,001	0,011	0,001
	pH	0,016	0,001	0,016	0,001	0,016	0,001	0,016	0,001	0,017	0,001
	CO	0,010	0,001	0,010	0,001	0,009	0,001	0,009	0,003	0,009	0,004
	N-NH <sup>+</sup> <sub>4</sub>	0,008	0,003	0,008	0,006	0,008	0,003	0,008	0,001	0,008	0,010
	N-NO <sup>+</sup> <sub>3</sub>	0,025	0,001	0,025	0,001	0,025	0,001	0,024	0,001	0,024	0,001
	P Olsen	0,007	0,008	0,007	0,010	0,007	0,008	0,007	0,016	0,007	0,016

Los parámetros bioclimáticos explicaron entre un 20,1% y un 20,6% de la varianza en los talos y entre un 23,4% y un 24,0% en los sustratos (**Tabla A5**) y todas las variables bioclimáticas incluidas en el análisis fueron significativas en la separación de las muestras para todas las fitohormonas en ambos microambientes (**Tabla 12**). La estacionalidad de la temperatura y la precipitación máxima fueron las variables que explicaron los mayores porcentajes de la varianza.

**Tabla 12. Significancia de las variables bioclimáticas sobre la diversidad de las comunidades bacterianas con potencial de producir fitohormonas según análisis de redundancia (RDA).** ET: Estacionalidad de la temperatura, TMa: Temperatura máxima, TMI: Temperatura mínima, PMA: Precipitación máxima, PMi: Precipitación mínima, EP: Estacionalidad de la precipitación.

Micro-ambiente	Variables	Ácido indol acético		Citoquininas		Ácido salicílico		Giberelinas		Etileno	
		R <sup>2</sup>	p	R <sup>2</sup>	p	R <sup>2</sup>	p	R <sup>2</sup>	p	R <sup>2</sup>	p
Talo	ET	0,036	0,001	0,036	0,001	0,039	0,001	0,037	0,001	0,039	0,001
	TMa	0,019	0,001	0,019	0,001	0,021	0,001	0,019	0,001	0,018	0,001
	TMI	0,013	0,001	0,013	0,001	0,013	0,002	0,012	0,001	0,012	0,001
	PMA	0,021	0,001	0,021	0,001	0,021	0,001	0,021	0,001	0,022	0,001
	PMi	0,010	0,001	0,010	0,001	0,009	0,003	0,009	0,002	0,010	0,002
	EP	0,015	0,001	0,015	0,001	0,014	0,001	0,016	0,001	0,015	0,001
Sustrato	ET	0,039	0,001	0,039	0,001	0,039	0,004	0,038	0,001	0,039	0,001
	TMa	0,015	0,001	0,015	0,001	0,015	0,001	0,013	0,001	0,015	0,001
	TMI	0,013	0,001	0,013	0,001	0,012	0,001	0,011	0,002	0,012	0,001
	PMA	0,017	0,001	0,017	0,001	0,016	0,003	0,016	0,001	0,017	0,001
	PMi	0,014	0,001	0,014	0,001	0,013	0,001	0,012	0,002	0,014	0,001
	EP	0,019	0,001	0,019	0,001	0,019	0,008	0,019	0,001	0,020	0,001

Por último, se llevaron a cabo análisis de partición de la varianza para dividir la variación de las comunidades bacterianas con potencial de producir fitohormonas entre las variables edáficas y bioclimáticas (**Figura 16**). Estos dos grupos de variables lograron explicar ~23% y ~30% de la variación en la diversidad de las comunidades bacterianas en los talos y sustratos, respectivamente. Las variables edáficas por sí solas explicaron entre 5,9% y 6,8% de la variación para las

muestras de talos, y entre 9,9% y 10,4% para las de sustratos. En cuanto a las variables bioclimáticas, el porcentaje explicado por este grupo por sí solo fue mayor que el explicado por las variables edáficas. En los talos el porcentaje varió entre 16,0% y 16,6%, y en los sustratos entre 18,0% y 18,8%. Además, el porcentaje de varianza explicada en conjunto por ambos grupos de variables fue extremadamente baja, en los talos entre 0,0% y 0,2% y en los sustratos entre 1,5% y 1,7%. Finalmente, todas las fracciones de la partición de la varianza fueron estadísticamente significativas.

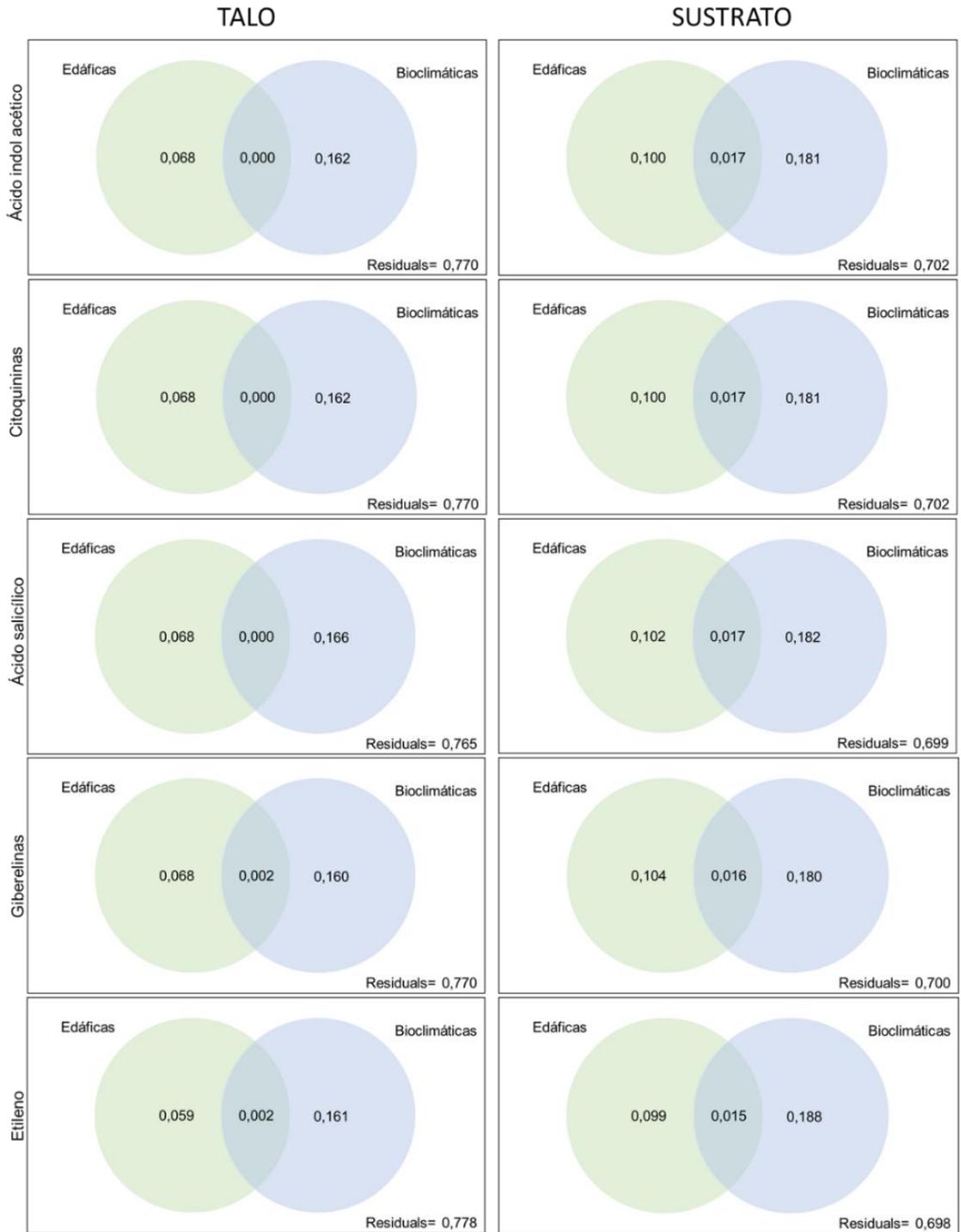


Figura 16. Partición de la varianza de las comunidades bacterianas con el potencial de producir fitohormonas entre las variables edáficas (verde) y bioclimáticas (azul).

## 6. DISCUSION

### 6.1 Las vías de síntesis de fitohormonas no se encuentran completamente descritas en bacterias

En esta tesis se estudió el potencial de producir fitohormonas del microbioma bacteriano presente en los talos y sustratos de cuatro especies de líquenes del género *Peltigera*. Para esto, el primer paso fue identificar las enzimas involucradas en las vías de síntesis bacteriana de cada una de las nueve fitohormonas descritas, para posteriormente predecir las funciones bacterianas con PICRUST2. Durante la revisión bibliográfica se encontraron rutas de síntesis descritas en bacterias para el ácido indol acético, citoquininas, giberelinas, ácido salicílico y etileno (Bastián et al., 1998; Costacurta & Vanderleyden, 1995; Duca et al., 2014; Frébortová & Frébort, 2021; Mishra & Baek, 2021; Morrone et al., 2009; Nett et al., 2017; Salazar-Cerezo et al., 2018; Spaepen et al., 2007; Weingart et al., 1999). A pesar de que se ha reportado la producción de ácido abscísico y ácido jasmónico en bacterias (Karadeniz et al., 2006; Mishra & Baek 2021), las rutas de síntesis y las enzimas involucradas no se encuentran completamente descritas. Por esta razón, se buscaron vías de síntesis descritas en otros microorganismos, como hongos y algas, para así tener una mayor probabilidad de encontraren genes homólogos en bacterias. Sin embargo, no se encontraron enzimas ni vías descritas en otros microorganismos y finalmente se optó por utilizar las rutas descritas en plantas (Sao & Koshiba., 2002; Kour et al.,

2021b; Lyons et al., 2013; Nishant Bhanu, 2019). Incluso así, no se encontraron los códigos de las enzimas involucradas en la ruta descrita para las estrigolactonas en plantas, probablemente debido a que estas enzimas fueron descubiertas recientemente (Mashiguchi et al., 2021).

Para poder predecir el potencial de producir fitohormonas de las bacterias asociadas a los líquenes, se utilizaron tres códigos de clasificación enzimática: EC, KO y COG, ya que PICRUSt2 tiene bases de datos para estos códigos. Estos permiten identificar a las enzimas bajo diferentes criterios que son complementarios entre sí, y que otorgan un código numérico a cada enzima (Douglas & Langille, 2021; Kanehisa, 2017; Tatusov et al., 2000). Es importante mencionar que hasta la fecha varias de las enzimas involucradas en la síntesis de fitohormonas carecen de algunos códigos. Esto se debe a que la clasificación no es inmediata y muchas de las enzimas han sido descritas recientemente. Debido a esto, y a que las clasificaciones son complementarias entre sí, se tomaron en consideración las ASVs que presentaran al menos uno de los tres códigos de clasificación enzimática. PICRUSt2 es una herramienta bioinformática que entrega predicciones confiables en muestras ambientales; sin embargo, al presentar dependencia con bases de datos existentes, puede que la base de datos KEGG no esté actualizada, y por lo tanto se esté subestimando la diversidad metabólica de las comunidades (Douglas et al., 2020; Toole et al., 2021).

En general, la búsqueda en bacterias de las vías de síntesis de fitohormonas y de las enzimas involucradas fue compleja, debido a que la mayoría de los estudios se enfocan en la descripción de la síntesis y función de las fitohormonas en plantas. Incluso hay estudios que informan sólo de la producción activa de cierta fitohormona en bacterias u otro microorganismo asociado a plantas, y mencionan cómo esta producción afecta a la planta y no sobre la función que pueda estar ejerciendo sobre la propia bacteria u otro compañero simbiótico como los hongos.

## **6.2 Las bacterias asociadas a líquenes *Peltigera* tienen el potencial de sintetizar cinco fitohormonas**

Los resultados de este estudio sugieren que las muestras de talo y sustrato de los líquenes *Peltigera* contienen bacterias con potencial de sintetizar, por lo menos, cinco de las nueve fitohormonas descritas: ácido indol acético, citoquininas, giberelinas, ácido salicílico y etileno. La producción de ácido indol acético y de etileno ha sido reportado previamente en el microbioma liquénico (Liba et al., 2006; Grube et al., 2009; Grube et al., 2015; Erlacher et al., 2015; Cernava et al., 2017; Aschenbrenner et al., 2017). Sin embargo, éste sería el primer estudio que demuestra la potencial producción de citoquininas, giberelinas y ácido salicílico por parte de las bacterias asociadas a los líquenes.

La potencial producción de ácido jasmónico, ácido abscísico y brasinoesteroides no fue detectada en las comunidades bacterianas. Además, debido a que no se

encontraron los códigos de las enzimas involucradas en la ruta de síntesis de las estrigolactonas, no se puede confirmar ni rechazar la hipótesis de que las bacterias asociadas a los líquenes tienen el potencial de producirlas. Se ha reportado producción de estrigolactonas en plantas y hongos, y se ha propuesto que esta hormona sería un importante señalizador en la simbiosis de estos organismos (Kohlen et al., 2011). Por esto, y debido a que la carlactona (precursor de las estrigolactonas) se produce a partir de carotenos, conocido como un pigmento natural que se encuentra en bacterias (Al-Babili & Bouwmeester, 2015), podría ser posible que las bacterias sí pudieran producirlas.

En distintos estudios se señala que la producción del ácido jasmónico, ácido abscísico y brasinoesteroides se estimula en situaciones de alta salinidad, presencia de metales pesados y estrés hídrico (Marsálek et al., 1991; Forchetti et al., 2007; Bhanu., 2019; Egamberdieva et al., 2019; Ji et al., 2020; Kour et al., 2021; Santini et al., 2021; You et al., 2022). Como la mayoría de los sitios de muestreo corresponden a áreas protegidas del sur de Chile ubicadas lejos de la costa marina, es poco probable la presencia de estos estresores en estos ambientes, por lo que no sería necesaria la producción de dichas fitohormonas por parte de las bacterias. Sin embargo, no se puede descartar que la ausencia de genes relacionados a la síntesis del ácido jasmónico, ácido abscísico y brasinoesteroides se deba al uso de códigos de enzimas reportadas en plantas.

En varios estudios se indica que las fitohormonas actúan en conjunto para poder cumplir distintas funciones en los organismos (Ochoa et al., 2010; Egamberdieva et al., 2019; Pichler, et al., 2020a). Esto podría explicar el alto porcentaje de bacterias que contendrían genes asociados a la síntesis de hasta cinco fitohormonas distintas y la ausencia de bacterias con genes exclusivos de alguna hormona. Todas las bacterias presentes en los talos y sustratos contendrían por lo menos un gen relacionado a la producción de ácido indol acético y citoquininas, y además la mayor abundancia y diversidad bacteriana se determinaron para estas hormonas. En varios estudios se afirma que el ácido indol acético y las citoquininas actúan en conjunto para modular distintos procesos de comunicación y desarrollo, y también se ha comprobado que los niveles de síntesis de ambas fitohormonas son regulados entre ellas mismas (Morris., 1986; Bajguz & Piotrowska., 2009; Su et al., 2011). Por otro lado, para el etileno se determinó la menor diversidad y abundancia de bacterias con el potencial de producirlo. Esta tendencia podría sugerir que esta fitohormona tendría un papel menos predominante, en comparación con otras fitohormonas, en el contexto de los líquenes estudiados. Sin embargo, como el etileno es una molécula pequeña y simple, sintetizada por parte de una sola enzima, y que además es un gas relativamente reactivo que se necesita en bajas concentraciones (Van de Poel et al., 2015; Kazan., 2015), para lograr su efecto no sería necesaria una alta abundancia o diversidad de bacterias. Por el contrario, el ácido indol acético y las citoquininas son moléculas más complejas y requieren de múltiples pasos

enzimáticos para su síntesis, lo que requeriría la presencia de diferentes taxa bacterianos para aportar los genes necesarios.

En cuanto a la composición taxonómica, los filos *Proteobacteria* y *Actinobacteriota* fueron los más abundantes en todas las fitohormonas. Estudios previos del microbioma de líquenes han relacionado la producción de fitohormonas al filo *Proteobacteria* (Aschenbrenner et al., 2017; Cernava et al., 2017; Erlacher et al., 2015; Liba et al., 2006). Sin embargo, este estudio sería el primero en sugerir la potencial producción de fitohormonas por bacterias del filo *Actinobacteria*, así como de otros menos abundantes, como *Acidobacteriota* y *Bacteroidota*. Estos antecedentes, en conjunto con el primer reporte de la potencial producción de citoquininas, giberelinas y ácido salicílico por las bacterias del microbioma líquénico, sugieren que la producción de fitohormonas sería la función del microbioma más preponderante y transversal en los líquenes de lo que se ha reportado hasta la actualidad.

La abundancia de las bacterias con potencial de producir fitohormonas fue mayor en los talos en comparación a los sustratos. Sin embargo, la diversidad fue mayor en los sustratos que en los talos. La mayor abundancia bacteriana en los talos podría deberse a que éstos se encuentran más expuestos a condiciones ambientales extremas, tales como radiación, altas y bajas temperaturas, y precipitaciones; a diferencia de los sustratos que se encuentran más resguardados bajo la protección de los talos. Por lo tanto, en los talos habría un

requerimiento mayor de la acción de las fitohormonas para combatir el estrés ambiental. Por su parte, que la menor diversidad bacteriana encontrada en los talos se podría explicar por el efecto de la selección de parte del liquen de taxa bacterianos especializados desde los sustratos (Cardinale et al., 2012; Leiva et al., 2021), lo que provocaría una disminución en la diversidad taxonómica de las bacterias, pero no necesariamente el nivel de producción de las fitohormonas.

Por otro lado, se observó que los sitios de la región de Aysén (Coyhaique y Tamango) presentaron mayor abundancia bacteriana con potencial de síntesis de fitohormonas que los sitios de la región de Magallanes (Karukinka y Navarino). Estos resultados podrían deberse a las diferencias ambientales entre ambas regiones, tales como el menor contenido de nutrientes y mayores niveles de temperaturas y precipitaciones detectados en los sitios de la región de Aysén en comparación a la región de Magallanes, los que podrían influir en la abundancia y diversidad de las comunidades bacterianas del talo liquénico. Las condiciones ambientales en la región de Aysén podrían ser más adversas para los líquenes provocando una mayor abundancia de bacterias que colaboren en la resistencia al estrés por medio de la producción de fitohormonas. Adicionalmente, el tipo de ambiente (bosque y pradera) fue el factor con mayor influencia en la separación de las muestras tanto en talos como en sustratos. Se pudo observar que en las praderas existen menores niveles de nutrientes y mayores temperaturas, lo que podría explicar el mayor efecto del tipo de ambiente sobre la diversidad de las bacterias con potencial de producir fitohormonas.

### **6.3 El ambiente es el principal factor que influye sobre las comunidades bacterianas con potencial de producir fitohormonas**

Para poder entender mejor la influencia del contexto ambiental sobre la diversidad de las bacterias con potencial de sintetizar fitohormonas, se analizaron las variables edáficas y las variables bioclimáticas de cada ambiente en cada sitio geográfico. Los análisis de redundancia mostraron que todas las variables edáficas y bioclimáticas estudiadas influyeron significativamente en la diversidad de las comunidades bacterianas con potencial de producir fitohormonas, tanto en talos como en sustratos. Sin embargo, dentro de las variables edáficas, el contenido de nitrato fue el parámetro que explicó un mayor porcentaje de la variación, mientras que en el caso de las variables bioclimáticas fue la estacionalidad de la temperatura. Se ha comprobado que el nitrato influye positivamente sobre la producción de fitohormonas en plantas, específicamente aumentando la producción de ácido indol acético, citoquininas y ácido abscísico (Caba et al., 2000). También hay estudios en plantas, que conectan el nitrato con otras fitohormonas como el etileno, el ácido salicílico, giberelinas y brasinoesteroides (Vega et al., 2019). La mayor influencia de la estacionalidad de la temperatura sugiere que la temperatura es un parámetro que presenta más fluctuaciones durante el año, afectando al potencial de producir fitohormonas, a diferencia de la estacionalidad de las precipitaciones que no presenta oscilaciones mayores, por lo que la comunidad bacteriana del talo y del sustrato no necesitarían modificar la producción de fitohormonas por este factor.

Otras investigaciones han dilucidado que la producción de fitohormonas por parte de bacterias en organismos simbióticos aporta en la protección contra factores de estrés abióticos y bióticos (Beckett et al., 2005; Prasanna et al., 2010; Wenz et al., 2019; Pichler et al., 2020a). Sin embargo, el mecanismo de acción o la cascada de señalización producido por las fitohormonas para favorecer la protección frente a factores de estrés, aún es desconocido en bacterias. La mayoría de los estudios se enfocan en las cascadas de señalización presentes en las plantas y en cómo estos mecanismos aportan en la protección contra factores de estrés. Wenz et al, (2019) proponen que el ácido salicílico podría estar modulando la expresión de enzimas que promueven la respuesta de aclimatación al estrés oxidativo dado por cambios repentinos en la intensidad de la luz. En otras palabras, la producción de las enzimas citocromo c oxidasa (COX), quinol oxidasa (Cyd), oxidasa terminal respiratoria alternativa (ARTO) y plastoquinona terminal oxidasa (PTOX) podría estar modulada por el ácido salicílico, ayudando a las cianobacterias a combatir el ROS producido por la exposición a radiación UV. En plantas, la cascada de señalización de las auxinas, ácido jasmónico, giberelinas, etileno y ácido salicílico comienza con los receptores de estas fitohormonas, las cuales luego de percibir las comienzan con la proteólisis de reguladores negativos, provocando que los factores de transcripción objetivo se liberen y puedan mediar la expresión de genes esenciales para la respuesta de las plantas reguladas por hormonas (Shan et al., 2012). Las citoquininas, brasinoesteroides y ácido abscísico son percibidas por

receptores citoplasmáticos o localizados en la membrana y transmitidas, mediante fosforilación reversible de proteínas, a factores de transcripción en el núcleo, regulando la expresión de genes (Shan et al., 2021). De las estrigolactonas aún no se conoce mucha información acerca de la cascada de señalización que produce en las plantas.

Los análisis de partición de la varianza considerando las variables edáficas y ambientales lograron explicar en promedio un 23% de la variación en los talos y un 30% en los sustratos, por lo que quedaría un alto porcentaje de variación sin explicar. Esto sugiere que factores bióticos también podrían estar influenciando la diversidad de bacterias con potencial de producir fitohormonas. La identidad del micobionte fue el segundo factor con mayor influencia sobre la diversidad bacteriana de acuerdo con los análisis de diversidad beta, por lo que sería interesante analizar con mayor detalle el efecto tanto del micobionte como del cianobionte sobre las comunidades bacterianas, ya que se ha reportado que el tipo de cianobionte también podría tener un efecto sobre ellas (Leiva et al., 2016). Recientemente, se ha propuesto que las fitohormonas tendrían un rol esencial en la señalización y reconocimiento de los simbioses líquénicos principales (Nazem-Bokaei et al., 2021). Por lo tanto, es probable que la producción de fitohormonas por parte del microbioma bacteriano también esté cumpliendo un rol en el reclutamiento bacteriano para la conformación y modulación del microbioma.

Las variables bioclimáticas influyeron en mayor medida sobre la diversidad de las bacterias con potencial de sintetizar fitohormonas que las variables edáficas, apoyando la idea de que las fitohormonas tendrían relación con la defensa frente al estrés ambiental fomentando la supervivencia del líquen. Dado que las variables bioclimáticas utilizadas se relacionaban principalmente a la precipitación y temperatura, estos resultados podrían sugerir que las fitohormonas estarían ayudando a combatir el estrés relacionado a estos parámetros, más que el estrés por nutrientes. Por otro lado, se pudo observar que las variables edáficas y bioclimáticas lograron explicar un mayor porcentaje de la varianza en las muestras de sustratos en comparación a los talos. En los sustratos, la abundancia de bacterias con potencial de sintetizar fitohormonas fue menor que en los talos, por lo que es probable que las comunidades bacterianas de los sustratos sean más susceptibles al estrés ambiental y eso se relacionaría a los mayores porcentajes de varianza explicada en este microambiente.

Finalmente, todos los resultados en conjunto permiten determinar que el principal factor en determinar la diversidad de bacterias con potencial de producir fitohormonas asociadas a cianolíquenes *Peltigera* del sur de Chile sería el contexto ambiental, explicado principalmente por las variables bioclimáticas que caracterizan a cada ambiente. Sin embargo, tanto el sitio geográfico como la especie de líquen también fueron factores significativos en la estructuración de las comunidades bacterianas, aunque dieron cuenta de menores porcentajes de la variación. Estos resultados refuerzan la hipótesis de que la producción de

fitohormonas por parte del microbioma bacteriano permitiría a los líquenes tolerar distintos tipos de estrés abiótico y de esta forma crecer en ambientes extremos. Sería interesante, en estudios futuros, comprobar la presencia de los genes relacionados a la síntesis de fitohormonas mediante secuenciación metagenómica y complementar estos resultados con el aislamiento de bacterias y posterior cuantificación de la producción de fitohormonas por métodos analíticos, tales como HPLC acoplada a un sistema de espectrometría (UV-Vis) para el caso del ácido jasmónico y el ácido abscísico (Forchetti et al., 2007), espectrofotometría de masas para cuantificar ácido salicílico (Forchetti et al., 2010), entre otros. Por otro lado, también sería importante incorporar en los análisis estadísticos datos de otros tipos de estrés ambiental, tales como los niveles de humedad, la radiación, el viento, etc. Éstos podrían ser obtenidos desde bases de datos o por mediciones *in situ*. De esta forma, se podrían obtener resultados más robustos sobre la relación entre la producción de fitohormonas y la tolerancia al estrés abiótico en líquenes.

## 7. CONCLUSIONES

- En bacterias se ha reportado la producción de ácido indol acético, citoquininas, giberelinas, ácido salicílico, etileno, ácido abscísico y ácido jasmónico.
- Las vías de síntesis del ácido abscísico y el ácido jasmónico todavía no están descritas.
- La producción de brasinoesteroides y estrigolactonas sólo se ha reportado en plantas.
- La vía de síntesis de las estrigolactonas todavía está incompleta.
- Las bacterias asociadas a los cianolíquenes *Peltigera* del sur de Chile tienen el potencial de producir ácido indol acético, citoquininas, giberelinas, ácido salicílico y etileno.
- Las bacterias asociadas a los cianolíquenes *Peltigera* del sur de Chile no tienen el potencial para producir ácido abscísico, ácido jasmónico y brasinoesteroides.
- No se puede descartar que tengan el potencial para producir estrigolactonas.
- Las comunidades bacterianas de los talos contendrían mayor abundancia de bacterias con potencial de sintetizar fitohormonas, en comparación a los sustratos. Sin embargo, la diversidad sería mayor en los sustratos que en los talos.

- Tanto el sitio geográfico, como el contexto ambiental y la especie de líquen son factores que influyen significativamente sobre la diversidad de las bacterias con potencial de producir fitohormonas.
- El ambiente fue el factor que explicó mayores porcentajes de la variación.
- El efecto de las variables bioclimáticas fue mayor en comparación a las variables edáficas. Por lo tanto, la hipótesis propuesta en esta tesis se cumple parcialmente.

## 8. REFERENCIAS

- Al-Babili, S., & Bouwmeester, H. J. (2015). Strigolactones, a novel carotenoid-derived plant hormone. *Annual Review of Plant Biology*, 66, 161-186.
- Almendras Neira, K. G. (2022). Bacterias solubilizadoras de fosfato asociadas a talos y sustratos de cianolíquenes *Peltigera* creciendo en un bosque y una pradera de la Reserva Nacional Coyhaique. Tesis de doctorado, Universidad de Chile.
- Aravena Romero, M. (2014). Macro-líquenes del Parque Natural Karukinka. Seminario de título, Universidad de Chile.
- Aschenbrenner, I. A., Cardinale, M., Berg, G., & Grube, M. (2014). Microbial cargo: do bacteria on symbiotic propagules reinforce the microbiome of lichens?. *Environmental Microbiology*, 16(12), 3743-3752.
- Aschenbrenner, I. A., Cernava, T., Berg, G., & Grube, M. (2016). Understanding microbial multi-species symbioses. *Frontiers in Microbiology*, 7, 180.
- Aschenbrenner, I. A., Cernava, T., Erlacher, A., Berg, G., & Grube, M. (2017). Differential sharing and distinct co-occurrence networks among spatially close bacterial microbiota of bark, mosses and lichens. *Molecular Ecology*, 26(10), 2826-2838.
- Bajguz, A., & Piotrowska, A. (2009). Conjugates of auxin and cytokinin. *Phytochemistry*, 70(8), 957-969.
- Bakker, P. A., Ran, L., & Mercado-Blanco, J. (2014). Rhizobacterial salicylate production provokes headaches!. *Plant and Soil*, 382, 1-16.
- Barreno, E., & Rico, V. J. (1984). Sobre la biología de los líquenes. I. Anatomía, morfología y estructuras vegetativas. In *Anales de Biología*, 1, 161-195
- Bastián, F., Cohen, A., Piccoli, P., Luna, V., Bottini, R., Baraldi, R., & Bottini, R. (1998). Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. *Plant Growth Regulation*, 24, 7-11.
- Bates S., Cropsey G., Caporaso J., Knight R., Fierer N. 2011. Bacterial communities associated with the lichen symbiosis. *Appl. Environmental Microbiology*. 77, 1309–1314.
- Beckett RP, Mayaba N, Minibayeva FV, Alyabyev AJ (2005) Hardening by partial dehydration and ABA increase desiccation tolerance in the cyanobacterial lichen *Peltigera polydactylon*. *Annals of Botany*, 96, 109–115.

- Belimov, A. A., Dodd, I. C., Safronova, V. I., Dumova, V. A., Shaposhnikov, A. I., Ladatko, A. G., & Davies, W. J. (2014). Abscisic acid metabolizing rhizobacteria decrease ABA concentrations in planta and alter plant growth. *Plant Physiology and Biochemistry*, *74*, 84-91.
- Bernardi, R. E., de Jonge, I. K., & Holmgren, M. (2016). Trees improve forage quality and abundance in South American subtropical grasslands. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, *232*, 227-231.
- Bhanu, A. N. (2019). Brassinosteroids: Relevance in biological activities of plants and agriculture. *Journal of Plant Science and Research*, *35*, 1-15.
- Caba, J. M., Centeno, M. L., Fernández, B., Gresshoff, P. M., & Ligeró, F. (2000). Inoculation and nitrate alter phytohormone levels in soybean roots: differences between a supernodulating mutant and the wild type. *Planta*, *211*, 98-104.
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., & Holmes, S. P. (2017). Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *The ISME Journal*, *11*(12), 2639-2643.
- Campos, M. Á. H., Lücking, R., Pérez, R. E. P., González, R. M., Sánchez, N., Peña, A. B., ... & Nash III, T. H. (2014). Biodiversidad de líquenes en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, *85*, 34.
- Cardinale, M., Puglia, A. M., & Grube, M. (2006). Molecular analysis of lichen-associated bacterial communities. *FEMS Microbiology Ecology*, *57*(3), 484-495.
- Cardinale, M., Grube, M., Castro Jr, J. V., Müller, H., & Berg, G. (2012). Bacterial taxa associated with the lung lichen *Lobaria pulmonaria* are differentially shaped by geography and habitat. *FEMS Microbiology Letters*, *329*(2), 111-115.
- Carey, J. (2016). Crucial role of belowground biodiversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *113*(28), 7682-7685.
- Cernava, T., Erlacher, A., Aschenbrenner, I. A., Krug, L., Lassek, C., Riedel, K., ... & Berg, G. (2017). Deciphering functional diversification within the lichen microbiota by meta-omics. *Microbiome*, *5*(1), 1-13.
- Chagnon, P., Magain, N., Miadlikowska, J., & Lutzoni, F. (2019). Species diversification and phylogenetically constrained symbiont switching generated high modularity in the lichen genus *Peltigera*. *Journal of Ecology*, *107*(4), 1645-1661.
- Costacurta, A., & Vanderleyden, J. (1995). Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, *21*(1), 1-18.
- Creelman, R. A., & Mullet, J. E. (1997). Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annual Review of Plant Biology*, *48*(1), 355-381.

- DeClue, M. S., Baldrige, K. K., Künzler, D. E., Kast, P., & Hilvert, D. (2005). Isochorismate pyruvate lyase: a pericyclic reaction mechanism?. *Journal of the American Chemical Society*, 127(43), 15002-15003.
- Denton, G. H., & Karlén, W. (1973). Lichenometry: its application to Holocene moraine studies in southern Alaska and Swedish Lapland. *Arctic and Alpine Research*, 5(4), 347-372.
- Dietz, S., & Hartung, W. (1998). Abscisic acid in lichens: variation, water relations and metabolism. *The New Phytologist*, 138(1), 99-106.
- Douglas, G. M., & Langille, M. G. (2021). A primer and discussion on DNA-based microbiome data and related bioinformatics analyses. *Peer Community Journal*, 1, e5.
- Duca, D., Lorv, J., Patten, C. L., Rose, D., & Glick, B. R. (2014). Indole-3-acetic acid in plant–microbe interactions. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 106, 85-125.
- Egamberdieva, D., Wirth, S., & Abd\_Allah, E. F. (2018). Plant hormones as key regulators in plant-microbe interactions under salt stress. In *Plant Microbiome: Stress Response*. 1ed, 165-182.
- Epstein E, Sagee O, Cohen JD, Garty J (1986) Endogenous auxin and ethylene in the lichen *Ramalina duriaei*. *Plant Physiology* 82,1122–1125.
- Ergün N, Topcuoğlu ŞF, Yildiz A (2002) Auxin (indole-3-acetic acid), gibberellic acid (GA3), abscisic acid (ABA) and cytokinin (zeatin) production by some species of mosses and lichens. *Turkish Journal Botany* 26, 13–18.
- Erlacher, A., Cernava, T., Cardinale, M., Soh, J., Sensen, C. W., Grube, M., & Berg, G. (2015). Rhizobiales as functional and endosymbiotic members in the lichen symbiosis of *Lobaria pulmonaria*. *Frontiers in Microbiology*, 6, 53.
- Fick, S. E., & Hijmans, R. J. (2017). WorldClim 2: new 1-km spatial resolution climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology*, 37(12), 4302-4315.
- Finkelstein, R. (2013). Abscisic acid synthesis and response. *The Arabidopsis book/American Society of Plant Biologists*, 11, e0166.
- Foo, E., Plett, J. M., Lopez-Raez, J. A., & Reid, D. (2019). The Role of plant hormones in plant-microbe symbioses. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1391.
- Forchetti, G., Masciarelli, O., Alemano, S., Alvarez, D., & Abdala, G. (2007). Endophytic bacteria in sunflower (*Helianthus annuus L.*): isolation, characterization, and production of jasmonates and abscisic acid in culture medium. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76, 1145-1152.

- Forchetti, G., Masciarelli, O., Izaguirre, M. J., Alemanno, S., Alvarez, D., & Abdala, G. (2010). Endophytic bacteria improve seedling growth of sunflower under water stress, produce salicylic acid, and inhibit growth of pathogenic fungi. *Current Microbiology*, *61*, 485-493.
- Frébortová, J., & Frébort, I. (2021). Biochemical and structural aspects of cytokinin biosynthesis and degradation in bacteria. *Microorganisms*, *9*(6), 1314.
- Fukuda, H., Ogawa, T., & Tanase, S. (1993). Ethylene production by microorganisms. *Advances in Microbial Physiology*, *35*, 275-306.
- Gao, C. H., Yu, G., & Cai, P. (2021). ggVennDiagram: an intuitive, easy-to-use, and highly customizable R package to generate Venn diagram. *Frontiers in Genetics*, 1598.
- Garcia Salamone, I. E. D., Hynes, R. K., & Nelson, L. M. (2005). Role of cytokinins in plant growth promotion by rhizosphere bacteria. *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*, 173-195.
- Gashaw A, Theerawitaya C, Samphumphuang T, Cha-um S, Supaibulwatana K (2014) CPPU elevates photosynthetic abilities, growth performances and yield traits in salt stressed rice (*Oryza sativa* L. spp. *indica*) via free proline and sugar accumulation. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 108, 27–33
- González, M., Higuera, F., Madriaga, C., Suárez, M., Almendras, K., & Orlando, J. (2023). Physicochemical parameters of soils and substrates associated with *Peltigera* lichens in southern Chile [Data set]. *Zenodo*.
- Grimm, M., Grube, M., Schiefelbein, U., Zühlke, D., Bernhardt, J., & Riedel, K. (2021). The lichens' microbiota, still a mystery?. *Frontiers in Microbiology*, *12*, 714.
- Grube, M., & 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. V., Müller, H., & Berg, G. (2009). Species-specific structural and functional diversity of bacterial communities in lichen symbioses. *The ISME Journal*, *3*(9), 1105-1115.
- Grube, M., Cernava, T., Soh, J., Fuchs, S., Aschenbrenner, I., Lassek, C., ... & Berg, G. (2015). Exploring functional contexts of symbiotic sustain within lichen-associated bacteria by comparative omics. *The ISME Journal*, *9*(2), 412-424.
- Hawksworth, D. L., & Grube, M. (2020). Lichens redefined as complex ecosystems. *The New Phytologist*, *227*(5), 1281.
- Hodkinson, B. P., Gottel, N. R., Schadt, C. W., & 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.
- Hönig M, Plíhalová L, Husičková A, Nisler J, Doležal K (2018) Role of cytokinins in senescence, antioxidant defence and photosynthesis. *International Journal of Molecular Sciences* 19(12), 4045.
- Ji, C., Tian, H., Wang, X., Song, X., Ju, R., Li, H., ... & Liu, X. (2020). *Bacillus subtilis* HG-15, a halotolerant rhizoplane bacterium, promotes growth and salinity tolerance in wheat (*Triticum aestivum*). *BioMed Research International*, 2022, 16.
- Johansson, N., Quehl, P., Norbeck, J., & Larsson, C. (2013). Identification of factors for improved ethylene production via the ethylene forming enzyme in chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories*, 12, 1-7.
- Karadeniz, A. S. U. M. A. N., Topcuoğlu, Ş. F., & İnan, S. Ü. H. E. Y. L. A. (2006). Auxin, gibberellin, cytokinin and abscisic acid production in some bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22, 1061-1064.
- Kanehisa, M. (2017). Enzyme annotation and metabolic reconstruction using KEGG. *Protein Function Prediction: Methods and Protocols*, 1611, 135-145.
- Kazan, K. (2015). Diverse roles of jasmonates and ethylene in abiotic stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 20(4), 219-229.
- Kerbarh, O., Ciulli, A., Howard, N. I., & Abell, C. (2005). Salicylate biosynthesis: overexpression, purification, and characterization of Irp9, a bifunctional salicylate synthase from *Yersinia enterocolitica*. *Journal of Bacteriology*, 187(15), 5061-5066.
- Kirk PM, Cannon PF, David JC, Stalpers JA (2001) Dictionary of the Fungi. *CABI Publishing*. Wallingford, UK, 9 ed, 120, 447.
- Kohlen, W., Charnikhova, T., Liu, Q., Bours, R., Domagalska, M. A., Beguerie, S., ... & Ruyter-Spira, C. (2011). Strigolactones are transported through the xylem and play a key role in shoot architectural response to phosphate deficiency in nonarbuscular mycorrhizal host *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 155(2), 974-987.
- Kour, J., Kohli, S. K., Khanna, K., Bakshi, P., Sharma, P., Singh, A. D., ... & Sharma, A. (2021). Brassinosteroid signaling, crosstalk and, physiological functions in plants under heavy metal stress. *Frontiers in Plant Science*, 12, 608061.
- Lê, S., Josse, J., & Husson, F. (2008). FactoMineR: an R package for multivariate analysis. *Journal of Statistical Software*, 25, 1-18.
- Leiva, D., Clavero-León, C., Carú, M., & Orlando, J. (2016). Intrinsic factors of *Peltigera* lichens influence the structure of the associated soil bacterial microbiota. *FEMS Microbiology Ecology*, 92(11), fiw178.

- Leiva, D. (2019). Selectividad de líquenes por grupos bacterianos de su microbioma. Tesis de Doctorado. Universidad de Chile.
- Leiva, D., Fernández-Mendoza, F., Acevedo, J., Carú, M., Grube, M., & Orlando, J. (2021). The bacterial community of the foliose macro-lichen *Peltigera frigida* is more than a mere extension of the microbiota of the subjacent substrate. *Microbial Ecology*, 81, 965–976.
- Leveau, J. H., & Lindow, S. E. (2005). Utilization of the plant hormone indole-3-acetic acid for growth by *Pseudomonas putida* strain 1290. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(5), 2365-2371.
- Liba, C. M., Ferrara, F. I. D. S., Manfio, G. P., Fantinatti-Garboggini, F., Albuquerque, R. C., Pavan, C., ... & Barbosa, H. R. (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 of Applied Microbiology*, 101(5), 1076-1086.
- Lievens, L., Pollier, J., Goossens, A., Beyaert, R., & Staal, J. (2017). Abscisic acid as pathogen effector and immune regulator. *Frontiers in Plant Science*, 8, 587.
- Lyons, R., Manners, J. M., & Kazan, K. (2013). Jasmonate biosynthesis and signaling in monocots: a comparative overview. *Plant Cell Reports*, 32, 815-827.
- Maršálek, B., Zahradníčková, H., & Hronková, M. (1992). Extracellular abscisic acid produced by cyanobacteria under salt stress. *Journal of Plant Physiology*, 139(4), 506-508.
- Martínez, I., Burgaz, A. R., Vitikainen, O., & Escudero, A. (2003). Distribution patterns in the genus *Peltigera* Willd. *The Lichenologist*, 35(4), 301-323.
- Mashiguchi, K., Seto, Y., & Yamaguchi, S. (2021). Strigolactone biosynthesis, transport and perception. *The Plant Journal*, 105(2), 335-350.
- McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PloS One*, 8(4), e61217.
- Mishra, A. K., & Baek, K. H. (2021). Salicylic acid biosynthesis and metabolism: a divergent pathway for plants and bacteria. *Biomolecules*, 11(5), 705.
- Gironés Mompó, F. J. (2019). Evaluación de las predicciones climáticas de modelos globales en Chile. Tesis de Máster. Universitat Politècnica de València.
- Miadlikowska J, Magain N, Medeiros ID, ... & Lutzoni, F. Towards a nomenclatural clarification of the *Peltigera ponojensis/monticola* clade including metagenomic sequencing of type material and the introduction of *P. globulata* Miadl. & Magain sp. nov. *The Lichenologist*, 55(5):315-324.

- Morris, R. O. (1986). Genes specifying auxin and cytokinin biosynthesis in phytopathogens. *Annual Review of Plant Physiology*, 37(1), 509-538.
- Morrone, D., Chambers, J., Lowry, L., Kim, G., Anterola, A., Bender, K., & Peters, R. J. (2009). Gibberellin biosynthesis in bacteria: separate ent-copalyl diphosphate and ent-kaurene synthases in *Bradyrhizobium japonicum*. *FEBS Letters*, 583(2), 475-480.
- Muster, C. (2019). Microorganismos solubilizadores de fosfato asociados a cianolíquenes, sus sustratos y los suelos aledaños en un gradiente de recuperación de bosque nativo de lenga mediante regeneración natural y reforestación con pinos. Tesis de Magíster. Universidad de Chile.
- Nash T. 2008. Lichen Biology, Cambridge University Press. United Kingdom. 2, 486.
- Nazem-Bokaei, H., Hom, E. F. Y., Warden, A. C., Mathews, S., & Gueidan, C. (2021). Towards a systems biology approach to understanding the lichen symbiosis: opportunities and challenges of implementing network modelling. *Frontiers in Microbiology*, 12, 667864.
- Nett, R. S., Montanares, M., Marcassa, A., Lu, X., Nagel, R., Charles, T. C., ... & Peters, R. J. (2017). Elucidation of gibberellin biosynthesis in bacteria reveals convergent evolution. *Nature Chemical Biology*, 13(1), 69-74.
- Ochoa, M. C., Madrigal, R. P., Martínez, M. T., & Carreón, A. (2010). Plantas, hongos micorrízicos y bacterias: su compleja red de interacciones. *Biológicas*, 12(1), 65-71.
- Oksanen J, Simpson G, Blanchet F, Kindt R, Legendre P, Minchin P, O'Hara R, Solymos P, Stevens... & Weedon J (2022). Vegan: Community Ecology Package. R package version 2.6-4.
- Orlando, J., Almendras, K., Veas-Mattheos, K., Pezoa, M., & Carú, M. (2021). *Peltigera* cyanolichens from Southern Chile. Version 1.4. Laboratory of Microbial Ecology (Laboratorio de Ecología Microbiana) - Universidad de Chile. Occurrence dataset.
- Ott S, Krieg T, Spanier U, Schieleit P (2000) Phytohormones in lichens with emphasis on ethylene biosynthesis and functional aspects on lichen symbiosis. *Phyton Horn* 40:83–94
- Parks, D., Chuvochina, M., Waite, D., Rinke, C., Skarshewski, A., Chaumeil, P., & Hugenholtz, P. (2018). A standardized bacterial taxonomy based on genome phylogeny substantially revises the tree of life. *Nature Biotechnology*, 36, 996–1004.

- Peng J, Li Z, Wen X, Li W, Shi H, Yang L, Zhu H, Guo H (2014) Salt-induced stabilization of EIN3/EIL1 confers salinity tolerance by deterring ROS accumulation in *Arabidopsis*. *PLoS Genetics*, 10(10), e1004664.
- Pezoa, M. (2021). Microorganismos solubilizadores de fosfato y mineralizadores de fósforo asociados a líquenes *Peltigera* del Parque Nacional Patagonia. Tesis de Magíster. Universidad de Chile.
- Pichler, G., Stöggel, W., Trippel, D., Candotto Carniel, F., Muggia, L., Ametrano, C. G., ... & Kranner, I. (2020). Phytohormone release by three isolated lichen mycobionts and the effects of indole-3-acetic acid on their compatible photobionts. *Symbiosis*, 82(1), 95-108.
- Pichler, G., Stöggel, W., Candotto Carniel, F., Muggia, L., Ametrano, C. G., Holzinger, A., ... & Kranner, I. (2020). Abundance and Extracellular Release of Phytohormones in Aero-terrestrial Microalgae (*Trebouxiophyceae*, Chlorophyta) As a Potential Chemical Signaling Source. *Journal of Phycology*, 56(5), 1295-1307.
- Prasanna, R., Joshi, M., Rana, A., & Nain, L. (2010). Modulation of IAA production in cyanobacteria by tryptophan and light. *Polish Journal of Microbiology*, 59(2), 99.
- Printzen, C., Fernández-Mendoza, F., Muggia, L., Berg, G., & Grube, M. (2012). Alphaproteobacterial communities in geographically distant populations of the lichen *Cetraria aculeata*. *FEMS Microbiology Ecology*, 82(2), 316–325.
- Quilhot, W., Cuellar, M., Díaz, R., Riquelme, F., & Rubio, C. (2012). Lichens of Aisen, Southern Chile. *Gayana Botánica*, 69(1), 57–87.
- Ramírez-Fernández, L., Zúñiga, C., Méndez, M. A., Carú, M., & 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.
- Rodríguez-Andrade, O., Bernal, P., Martínez-Contreras, R. D., Morales-García, Y. E., Molina-Romero, D., Marín-Cevada, V., ... & Muñoz-Rojas, J. (2018). Estrategias bacterianas para contrarrestar el estrés causado por frío y/o por congelación-descongelación y panorama de tolerancia de las rizobacterias. *Alianzas y Tendencias-BUAP*, 3 (10), 1-13.
- Salazar-Cerezo, S., Martínez-Montiel, N., García-Sánchez, J., Pérez-y-Terrón, R., & Martínez-Contreras, R. D. (2018). Gibberellin biosynthesis and metabolism: A convergent route for plants, fungi and bacteria. *Microbiological Research*, 208, 85-98.
- Sánchez-Jardón, L., Acosta-Gallo, B., Del Pozo, A., Casado, M. A., Ovalle, C., & de Miguel, J. M. (2014). Variability of herbaceous productivity along *Nothofagus*

- pumilio* forest-open grassland boundaries in northern Chilean Patagonia. *Agroforestry Systems*, 88, 397-411.
- Santini, G., Biondi, N., Rodolfi, L., & Tredici, M. R. (2021). Plant biostimulants from cyanobacteria: An emerging strategy to improve yields and sustainability in agriculture. *Plants*, 10(4), 643.
- Santner, A., Calderon-Villalobos, L. I. A., & Estelle, M. (2009). Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. *Nature Chemical Biology*, 5(5), 301-307.
- Sargsyan, R. R., Tsurykau, A., & Panosyan, H. (2021). Lichen Microbiome: Diversity Biological Role and Biotechnological Application. *Microbes in Microbial Communities: Ecological and Applied Perspectives*, 1 ed, 195-213.
- Sauer, M., Robert, S., & Kleine-Vehn, J. (2013). Auxin: simply complicated. *Journal of Experimental Botany*, 64(9), 2565-2577.
- Sergeeva, E., Liaimer, A., & Bergman, B. (2002). Evidence for production of the phytohormone indole-3-acetic acid by cyanobacteria. *Planta*, 215, 229-238.
- Shan, X., Yan, J., & Xie, D. (2012). Comparison of phytohormone signaling mechanisms. *Current Opinion in Plant Biology*, 15(1), 84-91.
- Sigurbjörnsdóttir, M., Andrésson, Ó. S., & Vilhelmsson, O. (2016). Nutrient scavenging activity and antagonistic factors of non-photobiont lichen-associated bacteria: a review. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32, 1-11.
- Spaepen, S., Vanderleyden, J., & Remans, R. (2007). Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Reviews*, 31(4), 425-448.
- Spaepen, S., & Vanderleyden, J. (2011). Auxin and plant-microbe interactions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(4), a001438.
- Sridharan, S., Howard, N., Kerbarh, O., Błaszczuk, M., Abell, C., & Blundell, T. L. (2010). Crystal structure of *Escherichia coli* enterobactin-specific isochorismate synthase (EntC) bound to its reaction product isochorismate: implications for the enzyme mechanism and differential activity of chorismate-utilizing enzymes. *Journal of Molecular Biology*, 397(1), 290-300.
- Stolpe, N., & Undurraga, P. (2016). Long term climatic trends in Chile and effects on soil moisture and temperature regimes. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 76(4), 487-496.
- Su, Y. H., Liu, Y. B., & Zhang, X. S. (2011). Auxin–cytokinin interaction regulates meristem development. *Molecular Plant*, 4(4), 616-625.

- Su, Y., Xia, S., Wang, R., & Xiao, L. (2017). Phytohormonal quantification based on biological principles. *Hormone Metabolism and Signaling in Plants*, 13, 431-470.
- Takezawa, D., Komatsu, K., & Sakata, Y. (2011). ABA in bryophytes: how a universal growth regulator in life became a plant hormone?. *Journal of Plant Research*, 124, 437-453.
- Tarabini, M., Gomez, F., Calderón, M. Á., & La Manna, L. (2021). Role of abiotic factors in *Nothofagus pumilio* forest mortality: The sensitivity of ecotones. *Forest Ecology and Management*, 494, 119316.
- Tatusov, R. L., Galperin, M. Y., Natale, D. A., & Koonin, E. V. (2000). The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 33-36.
- Toole, D. R., Zhao, J., Martens-Habbena, W., & Strauss, S. L. (2021). Bacterial functional prediction tools detect but underestimate metabolic diversity compared to shotgun metagenomics in southwest Florida soils. *Applied Soil Ecology*, 168, 104129.
- Troncoso, J. M. H. (2004). Estado de la turba esfagnosa en Magallanes. Los Turbales de la Patagonia: Bases para su inventario y la conservación de su biodiversidad. Wetlands International, Buenos Aires, 93-103.
- Van de Poel, B., Cooper, E. D., Delwiche, C. F., & Chang, C. (2015). An evolutionary perspective on the plant hormone ethylene. *Ethylene in Plants*, Springer, Dordrecht, The Netherlands, 2015, 109-134.
- Veas Mattheos, K. (2022). Bacterias solubilizadoras de fosfato asociadas a cianolíquenes *Peltigera rufescens* creciendo en praderas del sur de Chile. Tesis de magister. Universidad de Chile.
- Vega, A., O'Brien, J. A., & Gutiérrez, R. A. (2019). Nitrate and hormonal signaling crosstalk for plant growth and development. *Current Opinion in Plant Biology*, 52, 155-163.
- Wakabayashi, T., Ueno, K., & Sugimoto, Y. (2022). Structure elucidation and biosynthesis of orobanchol. *Frontiers in Plant Science*, 13, 835160.
- Wan, S., & Xin, X. F. (2022). Regulation and integration of plant jasmonate signaling: a comparative view of monocot and dicot. *Journal of Genetics and Genomics*. 49, 704-714.
- Wang, Y., Han, K. S., Wang, X. Y., Koh, Y. J., & Hur, J. S. (2009). Effect of ribitol and plant hormones on aposymbiotical growth of the lichenforming fungi of *Ramalina farinacea* and *Ramalina fastigiata*. *Mycobiology*, 37(1), 28-30.

- Weingart, H., Völksch, B., & Ullrich, M. S. (1999). Comparison of ethylene production by *Pseudomonas syringae* and *Ralstonia solanacearum*. *Phytopathology*, 89(5), 360-365.
- Wenz, J., Davis, J. G., & Storteboom, H. (2019). Influence of light on endogenous phytohormone concentrations of a nitrogen-fixing *Anabaena* sp. cyanobacterium culture in open raceways for use as fertilizer for horticultural crops. *Journal of Applied Phycology*, 31(6), 3371-3384.
- Xercavins, A. (1984). Notas sobre el clima de Magallanes (Chile). *Revista de geografía*, 95-110.
- Yamaguchi, S. (2008). Gibberellin metabolism and its regulation. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 225-251.
- You, Y., Wang, Y., Zhang, S., Sun, X., Liu, H., Guo, E. Y., & Du, S. (2022). Different pathways for exogenous ABA-mediated down-regulation of cadmium accumulation in plants under different iron supplies. *Journal of Hazardous Materials*, 440, 129769.
- Zúñiga, C., Leiva, D., Ramírez-Fernández, L., Carú, M., Yahr, R., & Orlando, J. (2015). Phylogenetic diversity of *Peltigera* cyanolichens and their photobionts in Southern Chile and Antarctica. *Microbes and Environments*, 30(2), 172-179.

## 9. ANEXOS

**Tabla A1. Georreferencia de las muestras de talo y sustratos recolectadas de las cuatro especies de cianolíquenes *Peltigera* en cuatro sitios del sur de Chile.**

Código	Sitio	Ambiente	Especie	Latitud	Longitud	Altitud (m)
COY18-011	Coyhaique	Bosque	<i>P. frigida</i>	-45.52949	-72.02851	652
COY18-012	Coyhaique	Bosque	<i>P. frigida</i>	-45.52948	-72.02838	651
COY18-013	Coyhaique	Bosque	<i>P. frigida</i>	-45.52968	-72.02808	655
COY18-016	Coyhaique	Bosque	<i>P. frigida</i>	-45.52996	-72.02789	655
COY18-018	Coyhaique	Bosque	<i>P. frigida</i>	-45.52985	-72.02800	655
COY18-019	Coyhaique	Bosque	<i>P. frigida</i>	-45.52982	-72.02761	658
COY13-048	Coyhaique	Bosque	<i>P. frigida</i>	-45.52964	-72.02816	702
COY13-050	Coyhaique	Bosque	<i>P. frigida</i>	-45.52945	-72.02847	703
COY13-030	Coyhaique	Bosque	<i>P. fuscopraetextata</i>	-45.52969	-72.02694	708
COY13-039	Coyhaique	Bosque	<i>P. fuscopraetextata</i>	-45.52949	-72.02765	707
COY13-040	Coyhaique	Bosque	<i>P. fuscopraetextata</i>	-45.52945	-72.02765	710
COY13-041	Coyhaique	Bosque	<i>P. fuscopraetextata</i>	-45.52952	-72.02760	710
COY13-042	Coyhaique	Bosque	<i>P. fuscopraetextata</i>	-45.52953	-72.02763	703
COY13-045	Coyhaique	Bosque	<i>P. fuscopraetextata</i>	-45.52952	-72.02783	710
COY13-046	Coyhaique	Bosque	<i>P. fuscopraetextata</i>	-45.52980	-72.02802	712
COY13-049	Coyhaique	Bosque	<i>P. fuscopraetextata</i>	-45.52960	-72.02822	702
COY19-001	Coyhaique	Pradera	<i>P. ponojensis/monticola</i> 11	-45.53626	-72.02087	670
COY19-006	Coyhaique	Pradera	<i>P. ponojensis/monticola</i> 11	-45.53626	-72.01990	669
COY19-007	Coyhaique	Pradera	<i>P. ponojensis/monticola</i> 11	-45.53632	-72.01990	668
COY19-010	Coyhaique	Pradera	<i>P. ponojensis/monticola</i> 11	-45.53600	-72.02019	671
COY19-011	Coyhaique	Pradera	<i>P. ponojensis/monticola</i> 11	-45.53600	-72.02038	673
COY19-012	Coyhaique	Pradera	<i>P. ponojensis/monticola</i> 11	-45.53599	-72.02060	676
COY19-015	Coyhaique	Pradera	<i>P. ponojensis/monticola</i> 11	-45.53611	-72.02063	674
COY19-020	Coyhaique	Pradera	<i>P. ponojensis/monticola</i> 11	-45.53618	-72.02065	674
COY19-002	Coyhaique	Pradera	<i>P. rufescens</i>	-45.53626	-72.01979	670
COY19-016	Coyhaique	Pradera	<i>P. rufescens</i>	-45.53610	-72.02058	673
COY19-019	Coyhaique	Pradera	<i>P. rufescens</i>	-45.53592	-72.02076	675
COY19-022	Coyhaique	Pradera	<i>P. rufescens</i>	-45.53612	-72.02056	706
COY19-023	Coyhaique	Pradera	<i>P. rufescens</i>	-45.53621	-72.02059	706
COY19-027	Coyhaique	Pradera	<i>P. rufescens</i>	-45.53642	-72.02056	700
COY19-028	Coyhaique	Pradera	<i>P. rufescens</i>	-45.53612	-72.02075	705
COY19-030	Coyhaique	Pradera	<i>P. rufescens</i>	-45.53593	-72.02083	705
TAM19-003	Tamango	Bosque	<i>P. frigida</i>	-47.21473	-72.52855	774
TAM19-020	Tamango	Bosque	<i>P. frigida</i>	-47.21469	-72.52840	774
TAM19-082	Tamango	Bosque	<i>P. frigida</i>	-47.21065	-72.52798	960
TAM19-083	Tamango	Bosque	<i>P. frigida</i>	-47.21072	-72.52804	959
TAM19-085	Tamango	Bosque	<i>P. frigida</i>	-47.21080	-72.52813	958
TAM19-091	Tamango	Bosque	<i>P. frigida</i>	-47.21104	-72.52817	946
TAM19-099	Tamango	Bosque	<i>P. frigida</i>	-47.21167	-72.52812	931
TAM19-005	Tamango	Bosque	<i>P. frigida</i>	-47.21460	-72.52835	784
TAM19-007	Tamango	Bosque	<i>P. fuscopraetextata</i>	-47.21446	-72.52843	790
TAM19-078	Tamango	Bosque	<i>P. fuscopraetextata</i>	-47.20987	-72.52827	983
TAM19-079	Tamango	Bosque	<i>P. fuscopraetextata</i>	-47.21026	-72.52815	976
TAM19-080	Tamango	Bosque	<i>P. fuscopraetextata</i>	-47.21032	-72.52832	975
TAM19-089	Tamango	Bosque	<i>P. fuscopraetextata</i>	-47.21089	-72.52821	952
TAM19-095	Tamango	Bosque	<i>P. fuscopraetextata</i>	-47.21116	-72.52848	944
TAM19-096	Tamango	Bosque	<i>P. fuscopraetextata</i>	-47.21121	-72.52867	942

Código	Sitio	Ambiente	Especie	Latitud	Longitud	Altitud (m)
TAM19-022	Tamango	Pradera	<i>P. fuscopraetextata</i>	-47.22217	-72.53136	434
TAM19-024	Tamango	Pradera	<i>P. ponojensis/monticola</i> 11	-47.22188	-72.53130	441
TAM19-026	Tamango	Pradera	<i>P. ponojensis/monticola</i> 11	-47.22181	-72.53128	443
TAM19-027	Tamango	Pradera	<i>P. ponojensis/monticola</i> 11	-47.22176	-72.53137	446
TAM19-040	Tamango	Pradera	<i>P. ponojensis/monticola</i> 11	-47.22172	-72.53138	451
TAM19-041	Tamango	Pradera	<i>P. ponojensis/monticola</i> 11	-47.22151	-72.53129	450
TAM19-049	Tamango	Pradera	<i>P. ponojensis/monticola</i> 11	-47.22176	-72.53142	447
TAM19-050	Tamango	Pradera	<i>P. ponojensis/monticola</i> 11	-47.22179	-72.53121	442
TAM19-023	Tamango	Pradera	<i>P. ponojensis/monticola</i> 11	-47.22211	-72.53133	435
TAM19-029	Tamango	Pradera	<i>P. rufescens</i>	-47.22173	-72.53137	447
TAM19-030	Tamango	Pradera	<i>P. rufescens</i>	-47.22166	-72.53139	447
TAM19-042	Tamango	Pradera	<i>P. rufescens</i>	-47.22157	-72.53128	449
TAM19-043	Tamango	Pradera	<i>P. rufescens</i>	-47.22158	-72.53131	450
TAM19-046	Tamango	Pradera	<i>P. rufescens</i>	-47.22155	-72.53153	448
TAM19-048	Tamango	Pradera	<i>P. rufescens</i>	-47.22173	-72.53147	447
TAM19-053	Tamango	Pradera	<i>P. rufescens</i>	-47.22150	-72.53135	410
KAR20-045	Karukinka	Bosque	<i>P. frigida</i>	-54.12704	-68.70909	158
KAR20-049	Karukinka	Bosque	<i>P. frigida</i>	-54.12699	-68.70913	160
KAR20-050	Karukinka	Bosque	<i>P. frigida</i>	-54.12697	-68.70909	160
KAR20-052	Karukinka	Bosque	<i>P. frigida</i>	-54.12702	-68.70890	158
KAR20-053	Karukinka	Bosque	<i>P. frigida</i>	-54.12701	-68.70888	158
KAR20-054	Karukinka	Bosque	<i>P. frigida</i>	-54.12694	-68.70892	158
KAR20-055	Karukinka	Bosque	<i>P. frigida</i>	-54.12696	-68.70889	158
KAR20-057	Karukinka	Bosque	<i>P. frigida</i>	-54.12699	-68.70896	159
KAR20-065	Karukinka	Bosque	<i>P. fuscopraetextata</i>	-54.12699	-68.70975	164
KAR20-068	Karukinka	Bosque	<i>P. fuscopraetextata</i>	-54.12694	-68.70968	164
KAR20-071	Karukinka	Bosque	<i>P. fuscopraetextata</i>	-54.12691	-68.70961	166
KAR20-074	Karukinka	Bosque	<i>P. fuscopraetextata</i>	-54.12696	-68.70963	167
KAR20-080	Karukinka	Bosque	<i>P. fuscopraetextata</i>	-54.12682	-68.70959	169
KAR20-170	Karukinka	Bosque	<i>P. fuscopraetextata</i>	-54.12714	-68.70987	167
KAR20-190	Karukinka	Bosque	<i>P. fuscopraetextata</i>	-54.12715	-68.70991	167
KAR20-197	Karukinka	Bosque	<i>P. fuscopraetextata</i>	-54.12715	-68.70978	168
KAR20-277	Karukinka	Pradera	<i>P. ponojensis/monticola</i> 11	-54.12645	-68.70860	153
KAR20-363	Karukinka	Pradera	<i>P. ponojensis/monticola</i> 11	-54.12648	-68.70839	257
KAR20-387	Karukinka	Pradera	<i>P. ponojensis/monticola</i> 11	-54.12639	-68.70835	238
KAR20-389	Karukinka	Pradera	<i>P. ponojensis/monticola</i> 11	-54.12648	-68.70832	168
KAR20-391	Karukinka	Pradera	<i>P. ponojensis/monticola</i> 11	-54.12644	-68.70835	169
KAR20-404	Karukinka	Pradera	<i>P. ponojensis/monticola</i> 11	-54.12641	-68.70829	169
KAR20-406	Karukinka	Pradera	<i>P. ponojensis/monticola</i> 11	-54.12638	-68.70837	170
KAR20-273	Karukinka	Pradera	<i>P. ponojensis/monticola</i> 11	-54.12640	-68.70860	153
KAR20-279	Karukinka	Pradera	<i>P. rufescens</i>	-54.12644	-68.70855	154
KAR20-283	Karukinka	Pradera	<i>P. rufescens</i>	-54.12639	-68.70852	155
KAR20-295	Karukinka	Pradera	<i>P. rufescens</i>	-54.12635	-68.70847	154
KAR20-403	Karukinka	Pradera	<i>P. rufescens</i>	-54.12639	-68.70829	169
KAR20-411	Karukinka	Pradera	<i>P. rufescens</i>	-54.12638	-68.70842	171
KAR20-413	Karukinka	Pradera	<i>P. rufescens</i>	-54.12636	-68.70836	170
KAR20-415	Karukinka	Pradera	<i>P. rufescens</i>	-54.12636	-68.70833	168
NAV20-093	Navarino	Bosque	<i>P. frigida</i>	-54.95481	-67.63186	369
NAV20-094	Navarino	Bosque	<i>P. frigida</i>	-54.95483	-67.63183	357
NAV20-100	Navarino	Bosque	<i>P. frigida</i>	-54.95483	-67.63208	314
NAV20-110	Navarino	Bosque	<i>P. frigida</i>	-54.95486	-67.63229	284
NAV20-118	Navarino	Bosque	<i>P. frigida</i>	-54.95484	-67.63276	270

Código	Sitio	Ambiente	Especie	Latitud	Longitud	Altitud (m)
NAV20-120	Navarino	Bosque	<i>P. frigida</i>	-54.95483	-67.63273	270
NAV20-136	Navarino	Bosque	<i>P. frigida</i>	-54.95480	-67.63292	269
NAV20-138	Navarino	Bosque	<i>P. frigida</i>	-54.95490	-67.63309	267
NAV20-103	Navarino	Bosque	<i>P. fuscopraetextata</i>	-54.95489	-67.63223	297
NAV20-107	Navarino	Bosque	<i>P. fuscopraetextata</i>	-54.95486	-67.63223	290
NAV20-109	Navarino	Bosque	<i>P. fuscopraetextata</i>	-54.95483	-67.63227	287
NAV20-114	Navarino	Bosque	<i>P. fuscopraetextata</i>	-54.95488	-67.63254	279
NAV20-125	Navarino	Bosque	<i>P. fuscopraetextata</i>	-54.95481	-67.63281	269
NAV20-129	Navarino	Bosque	<i>P. fuscopraetextata</i>	-54.95489	-67.63282	270
NAV20-130	Navarino	Bosque	<i>P. fuscopraetextata</i>	-54.95484	-67.63285	269
NAV20-133	Navarino	Bosque	<i>P. fuscopraetextata</i>	-54.95485	-67.63295	270
NAV20-225	Navarino	Pradera	<i>P. ponojensis/monticola</i> 11	-54.93626	-67.65533	4
NAV20-226	Navarino	Pradera	<i>P. ponojensis/monticola</i> 11	-54.93626	-67.65533	3
NAV20-227	Navarino	Pradera	<i>P. ponojensis/monticola</i> 11	-54.93625	-67.65531	4
NAV20-228	Navarino	Pradera	<i>P. ponojensis/monticola</i> 11	-54.93626	-67.65530	3
NAV20-230	Navarino	Pradera	<i>P. ponojensis/monticola</i> 11	-54.93622	-67.65525	3
NAV20-233	Navarino	Pradera	<i>P. ponojensis/monticola</i> 11	-54.93623	-67.65513	1
NAV20-234	Navarino	Pradera	<i>P. ponojensis/monticola</i> 11	-54.93623	-67.65508	2
NAV20-237	Navarino	Pradera	<i>P. ponojensis/monticola</i> 11	-54.93629	-67.65510	1
NAV20-193	Navarino	Pradera	<i>P. rufescens</i>	-54.93653	-67.65531	166
NAV20-194	Navarino	Pradera	<i>P. rufescens</i>	-54.93653	-67.65532	166
NAV20-201	Navarino	Pradera	<i>P. rufescens</i>	-54.93648	-67.65537	81
NAV20-207	Navarino	Pradera	<i>P. rufescens</i>	-54.93640	-67.65539	50
NAV20-208	Navarino	Pradera	<i>P. rufescens</i>	-54.93640	-67.65540	48
NAV20-209	Navarino	Pradera	<i>P. rufescens</i>	-54.93638	-67.65540	45
NAV20-210	Navarino	Pradera	<i>P. rufescens</i>	-54.93640	-67.65539	43
NAV20-214	Navarino	Pradera	<i>P. rufescens</i>	-54.93635	-67.65539	24

**Tabla A2. Variables edáficas medidas en el sustrato de cada muestra recolectada.**

Muestra	Contenido hídrico (%)	pH	Carbono orgánico (%)	Amonio (µg/g suelo)	Nitrato (µg/g suelo)	Fósforo (µg/g suelo)
COY18-011	NA	NA	NA	NA	NA	NA
COY18-012	11,5	5,4	57,4	61	152	53,6
COY18-013	4,8	6,3	10,8	20,9	157,1	32,8
COY18-016	5,6	6,2	22,2	36,8	216,4	145,9
COY18-018	11,6	5,8	52,6	59,4	284,5	94
COY18-019	4,5	NA	NA	NA	NA	86,7
COY13-048	NA	NA	NA	NA	NA	NA
COY13-050	4,3	5,7	26,8	80,6	70,8	80,5
COY13-030	NA	NA	NA	NA	NA	NA
COY13-039	11,3	5,6	54,3	107,6	199,4	91,6
COY13-040	8,9	5,2	53,7	76,1	642	NA
COY13-041	NA	NA	NA	NA	NA	NA
COY13-042	8,5	NA	51,8	NA	NA	122,3
COY13-045	9,2	5,5	47,7	60,3	782,6	67,3
COY13-046	9,5	5,6	53	84,4	NA	137,7
COY13-049	6,1	6	24,3	49,1	NA	107,6
COY19-002	5,8	6,2	15,9	15	9,4	23,8
COY19-016	9,2	6,3	30,6	38,1	15,7	66,5
COY19-019	4,2	6,6	6,4	8,8	15,7	16,1
COY19-022	6,5	6,3	19,1	17	17,3	48,1
COY19-023	4,6	6,9	12,1	17,4	17,6	13,7
COY19-027	3,5	6,5	3,6	6,9	15,7	11,2
COY19-028	NA	NA	NA	NA	NA	NA
COY19-030	2,9	6,8	3,4	5,4	17,3	25,8
COY19-001	4,3	6,7	5,8	5,1	30	20,9
COY19-006	6,4	6,7	15	15,9	10,8	30,5
COY19-007	4,8	6,5	11,1	12,1	14,6	13,8
COY19-010	5,5	6,6	9,3	12,9	25,9	34,4
COY19-011	NA	NA	NA	NA	NA	NA
COY19-012	5	6,5	9,7	8,7	25,3	27,6
COY19-015	5,6	6,7	10,4	10,6	41,7	18,4
COY19-020	6,6	7,2	13,3	11,7	54,8	30,3
TAM19-003	7,7	4,6	48,6	50,6	170,7	106,6
TAM19-020	4,1	5,6	18,2	13	27,9	38,3
TAM19-082	4,6	5,7	24,3	27,6	331,7	56
TAM19-083	4,6	5,7	19,1	30	165	63,2
TAM19-085	4	4,5	21,5	13,7	127,7	59,4
TAM19-091	4,3	4,7	22,9	11,7	132,2	66,9
TAM19-099	4,3	5,7	20,1	18	127	7,8
TAM19-005	5,8	5,8	21,3	10,1	107,8	72,9
TAM19-007	6,2	6,4	28	15,4	136	70,9
TAM19-078	5,6	6,3	15,8	14,7	621,1	46,7
TAM19-079	4,5	5,9	7,6	10	80,7	10,4
TAM19-080	5,6	6	11,9	17	159,5	25,2
TAM19-089	4,5	6	12	14	209,5	113,2
TAM19-095	5,2	5,6	13,5	36,2	165,1	122,9
TAM19-096	7,4	6,1	33,3	36,6	352	229,2
TAM19-023	3,5	6,4	8,6	0,9	12,2	27,4
TAM19-029	2,7	6,6	5,2	2,4	20,4	23,1
TAM19-030	2,4	6,3	6,4	3,4	11,5	12,1

Muestra	Contenido hídrico (%)	pH	Carbono orgánico (%)	Amonio (µg/g suelo)	Nitrato (µg/g suelo)	Fósforo (µg/g suelo)
TAM19-042	3,3	6,7	11,4	3,6	34,5	16,6
TAM19-043	2,8	6,3	12,4	4,1	19,4	14,6
TAM19-046	3,8	6,1	16,1	10,1	32,7	27,2
TAM19-048	5,2	6,5	14,6	2	22,6	45,6
TAM19-053	4,9	6,3	21,6	11,6	20,5	24,9
TAM19-022	4,8	6,5	12,3	9,9	29,9	24,9
TAM19-024	3,4	6,4	11,3	6,5	33,6	26,7
TAM19-026	6,3	6,4	18,1	6,8	19,2	36,6
TAM19-027	3,4	5,5	7,4	8	16,2	50,4
TAM19-040	4,4	6,3	17,8	17,1	47,9	28
TAM19-041	3,3	6,3	12,5	8,1	39,1	24,8
TAM19-049	2,4	6,8	6,2	4,6	55,8	21
TAM19-050	2,8	6,6	11,8	15,6	76,1	28,2
KAR20-045	4,5	4,3	16,1	13,8	34	83,1
KAR20-049	4,1	6	11,4	15,3	6,8	73,9
KAR20-050	5,2	6,2	16,8	19,2	7,7	75,1
KAR20-052	10,3	5,8	50,3	108,1	39,6	93,6
KAR20-053	11,8	5,4	48,6	89,4	18,2	138,2
KAR20-054	11,8	5,9	56,5	75,1	16,9	126,5
KAR20-055	9,4	5,3	47,5	113,9	27	170,9
KAR20-057	7,8	6,1	33,2	25,6	20	145,2
KAR20-065	8,6	4,4	53,2	39,1	432,6	81,4
KAR20-068	5	5	23	18,2	186,7	121,1
KAR20-071	5,2	4,7	27,1	18,6	448,6	70,5
KAR20-074	4,9	5,2	25,2	18,4	687,7	135,2
KAR20-080	4,1	5,7	19	9,7	69,7	181,2
KAR20-170	4	4,8	29,6	21,9	527,5	81,9
KAR20-190	4,8	4,6	34,5	22,2	261,7	48,3
KAR20-197	3,7	4,5	23,8	11	385,8	45,6
KAR20-273	8,1	5,3	35,9	11,7	34,7	38,2
KAR20-279	11,1	5,7	46,3	45,2	39,7	158,9
KAR20-283	9,5	5,7	42,6	18	36	87,6
KAR20-295	9,1	5,7	42,3	30,9	38,2	105
KAR20-403	8,2	5,7	37,5	22,8	45	51,8
KAR20-411	7,7	5,7	29,3	31,1	55,6	67,5
KAR20-413	8,8	5,6	37,5	34,8	57,4	53,9
KAR20-415	8,1	5,8	49,1	31,4	70,2	122
KAR20-277	8,9	5,5	43,5	100,6	33,6	128,8
KAR20-363	7,4	6	34,5	30,7	30,2	93,9
KAR20-387	6,9	6,9	19	44,7	53,8	116,8
KAR20-389	8	7	32,3	49	49,8	176,1
KAR20-391	7,3	5,7	36,5	29	78,4	85,4
KAR20-404	6,7	5,6	30,2	35,6	32,6	66,5
KAR20-406	5,6	6,4	26,3	27,2	44,8	89,6
NAV20-093	3,7	5,2	7,6	7,5	39,7	5,8
NAV20-094	4,8	5,1	29,4	10,6	16,6	11,2
NAV20-100	3,9	3,4	12	9,4	205,1	16,4
NAV20-110	3,7	4,9	12,5	3,5	174,3	7,6
NAV20-118	4,6	5,2	17,7	15,7	188,4	12
NAV20-120	4,6	5	15,8	10,3	179,8	5,8
NAV20-136	5,6	5,8	22	12,5	348,1	37,3

Muestra	Contenido hídrico (%)	pH	Carbono orgánico (%)	Amonio (µg/g suelo)	Nitrato (µg/g suelo)	Fósforo (µg/g suelo)
NAV20-138	3,7	5,7	8,6	4,6	255,8	14,3
NAV20-103	6	4,5	28,9	22,3	20,6	15,2
NAV20-107	8	4,8	35,5	21	148,5	34,8
NAV20-109	3,9	5,1	10,1	6,1	210,7	7,6
NAV20-114	6	4,1	24	16,5	93,5	31,6
NAV20-125	4,5	5,7	20,2	18,4	374	37,3
NAV20-129	4,3	4,7	18,5	7,4	35,7	18,9
NAV20-130	5,2	5,1	22	13,9	278,7	27,3
NAV20-133	6,1	6,1	29,7	11,3	341,9	28,1
NAV20-193	3,1	7,1	8,4	31,3	89,8	35,4
NAV20-194	3,6	7,4	11,3	36,6	78,4	41
NAV20-201	3,4	7	11,8	44,6	50,1	51,1
NAV20-207	1,6	6,6	5,2	10	30,5	17,6
NAV20-208	1,9	7	5,2	16,3	65,3	23,2
NAV20-209	3,6	6,8	12,8	24,8	59,6	21,5
NAV20-210	3,8	6,9	13,5	33,6	64,7	38,2
NAV20-214	4	6,6	16,5	28,2	55,4	32,9
NAV20-225	1,9	6,9	4,6	9,6	15,3	15,7
NAV20-226	4,2	6,6	14,1	25,4	22,1	40
NAV20-227	2,3	6,8	5,4	10,7	17	18,1
NAV20-228	1,7	6,9	5,8	15,5	26,6	17,6
NAV20-230	7,2	6,5	31,2	40,2	33,7	63
NAV20-233	5,2	6,3	15,7	21,2	25,2	54,8
NAV20-234	4,2	7	15,6	21,5	40,8	32,2
NAV20-237	4,3	6,6	20,2	22,1	33,7	38,4

**Tabla A3. Variables bioclimáticas para cada sitio/ambiente.**

Variable	Coyhaique		Tamango		Karukinka		Navarino	
	Pradera	Bosque	Pradera	Bosque	Pradera	Bosque	Pradera	Bosque
TMA	6,2	5,7	7	5,1	5	5	5,7	4,8
RTM	8,4	8,5	8,2	8,4	7,5	7,5	7,9	7,9
Iso	4,6	4,6	4,5	4,6	4,9	4,9	5,1	5,1
ET	366,8	367,1	368,3	367,1	291,5	291,5	287,2	281,9
TMa	16,1	15,6	16,7	14,8	13,4	13,4	13,9	13
TMi	-2	-2,6	-1,4	-3,4	-1,8	-1,8	-1,4	-2,3
RAT	18,1	18,2	18,1	18,2	15,2	15,2	15,3	15,3
TMTH	1,8	1,2	4,5	2,6	5	5	5,8	5
TMTS	8,3	9,8	9,2	9,7	5	5	3,9	3
TMTC	10,7	10,2	11,6	9,7	8,7	8,7	9,3	8,3
TMTF	1,2	0,7	2,2	0,3	1,2	1,2	1,9	1
PMA	1054	1084	693	685	495	495	526	533
PMa	160	152	86	74	50	50	52	53
PMi	51	50	35	39	28	28	30	31
EP	41	40	30	24	15	15	16	15
PMTH	432	416	226	217	145	145	150	151
PMTS	174	172	118	123	97	97	103	106
PMTC	177	173	119	123	132	132	143	146
PMTF	387	375	225	211	121	121	126	127

TMA: Temperatura media anual, RTM: Rango de temperatura media, Iso: Isoterma, ET: Temperatura estacional, TMa: Temperatura máxima, TMi: Temperatura mínima, RAT: Rango anual de temperatura, TMTH: Temperatura media del trimestre más húmedo, TMTS: Temperatura media del trimestre más seco, TMTC: Temperatura media del trimestre más cálido, TMTF: Temperatura media del trimestre más frío, PMA: Precipitación media anual, PMa: Precipitación máxima, PMi: Precipitación mínima, EP: Precipitación estacional, PMTH: Precipitación media del trimestre más húmedo, PMTS: Precipitación media del trimestre más seco, PMTC: Precipitación media del trimestre más cálido, PMTF: Precipitación media del trimestre más frío.

**Tabla A4. Porcentaje de varianza explicado por las variables edáficas según análisis de redundancia (RDA) para cada fitohormona en talos y sustratos.**

Microambiente	Ácido indol acético	Citoquininas	Ácido salicílico	Giberelinas	Etileno
Talo	11,2%	11,2%	11,3%	11,4%	10,5%
Sustrato	15,9%	15,9%	16%	16,2%	15,6%

**Tabla A5. Porcentaje de varianza explicado por las variables bioclimáticas según análisis de redundancia (RDA) para cada fitohormona en talos y sustratos.**

Microambiente	Ácido indol acético	Citoquininas	Ácido salicílico	Giberelinas	Etileno
Talo	20,2%	20,2%	20,6%	20,1%	20,2%
Sustrato	23,6%	23,6%	23,7%	23,4%	24%