



Universidad de Chile

**Facultad de Ciencias Químicas y
Farmacéuticas**

**RELACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE
METABOLITOS Y LA ACTIVIDAD
FENOLOXIDASA DE LÍQUENES DEL
GÉNERO *Peltigera* CON SUS
COMUNIDADES BACTERIANAS
ASOCIADAS**

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

DIEGO LEIVA CÁCERES

DIRECTORAS DE TESIS

Dra. Julieta Orlando

Dra. Margarita Carú

Santiago-Chile

2015

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 Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por el candidato

DIEGO LEIVA CÁCERES

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, área de especialización de Bioquímica Ambiental y Título de Bioquímico, en el examen público rendido el día _____

Directora de Tesis:

Julieta Orlando

Co-directora de Tesis:

Margarita Carú

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Davor Cotoras

Dr. Sergio Álvarez

Dr. Francisco Chávez

A quienes me han enseñado.

AGRADECIMIENTOS

Quiero aprovechar este espacio para agradecer a todas las personas que han contribuido para llegar a este hito en mi formación académica.

Primero que todo le agradezco a mis padres, que vieron en la educación el mejor legado que podrían entregarme, junto con su formación valórica que agradezco siempre. Aprecio profundamente el hecho de que me permitieran tomar mis propias decisiones académicas, confiando en el resultado de su crianza y dándome la libertad para decidir según mi vocación, incluso con algún arrepentimiento de por medio.

No puedo dejar de mencionar a otros miembros de mi familia que estuvieron siempre apoyándome y dándome consejos en este largo camino. A mi hermana Poly y mi cuñado Pato, más aún desde que se vinieron a la capital, a la Manena y el Tata por el apoyo durante mi educación básica y media, y a los primos y tíos que han entregado una palabra de aliento a lo largo de estos años.

Párrafo aparte para mi compañera hace ya 9 años, la Yayita, que me ha aconsejado y apoyado en los buenos y no tan buenos momentos que han surgido en mi carrera académica y sobre todo en el desarrollo de esta tesis. También agradezco a su familia que ha sido un apoyo fundamental en este proceso, a los “tíos”, al Papo y la Nata, y a la Pauli por recibirme como parte de su familia.

Entrando ya en el ámbito escolar, quiero agradecer a mis profesores del colegio en Linares, especialmente a la profe Loli por su exactitud en la enseñanza del idioma, al profe Ricardo por la excelente base en inglés, a la profe Corina por su exigencia en la química, al profe Jano por su pasión científica y al profe Milton por las discusiones y cuestionamientos lógicos. Fue en Linares también donde comenzamos a tramitar la venida a Santiago con el Negro, Nico y Roderick, gracias a ustedes también por los buenos momentos y la compañía en ese proceso de maduración.

Luego de algunas vueltas para decidir mi carrera universitaria, elegí seguir la carrera de investigación partiendo con Bioquímica en la Chile, proceso que ahora termina con la publicación de esta tesis. En este lugar tuve la suerte de contar con grandes compañeros: Bárbara, Chahín, Mabe, Foncho, Gran, Lucho, Mikel, Nacho, Nano, Nico “el BQ”, Noni, Pancha, Pelao, Vicho y Waldo, con quienes compartimos muchos momentos de estrés y des-estrés, y afortunadamente para nuestra salud mental seguimos compartiendo de estos últimos. También agradecer al grupito del CEFaQ donde aprendimos e intentamos aportar a la organización estudiantil de la facultad: Cami, Isa, Pablo y Pinedo.

Además quiero agradecer a los excelentes profesores que tuve en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, especialmente a los del área de Biología Molecular y Microbiología, mis ramos preferidos, ya que gracias a su vocación logré identificar mi gusto por la microbiología ambiental.

Buscando un laboratorio que se adecuara a mis intereses de investigación básica en el área de la microbiología ambiental, llegué al de Ecología Microbiana de la Facultad de Ciencias, y acá me quiero detener ya que es a sus miembros pasados y presentes a quienes les debo los mayores agradecimientos por el desarrollo de esta tesis. Partiendo por Merly, quien me recibió y adoctrinó en la ecología microbiana con el estudio de las invasoras *Eschschozia*, y luego sería un apoyo fundamental en los aspectos químicos y bioquímicos que se desarrollaron en la tesis. Luego fui reclutado por el Equipo Liquécnico liderado por Julieta, cuyo trabajo arduo como tutora ha sido indiscutible, gracias por la confianza y el empuje para que esta tesis saliera adelante. Gracias también a la profe Margarita, por sus dedicadas revisiones y sus conocimientos para darle sentido biológico a los resultados de la tesis. Agradezco también a los otros integrantes del equipo, a José Luis que participó en la recolección de las muestras, a la Cata Zúñiga por su conocimiento y por ayudarme en la identificación molecular de los líquenes, a la Lía por su conocimiento y amor hacia los líquenes y a la Claudia porque gracias a su trabajo pudimos cumplir con un objetivo de esta tesis. Gracias a los compañeros de laboratorio que estuvieron aportando con discusiones en cada ensayo y presentación de resultados, y en cada celebración también: Aracely, Cami Morales, Cami Saldías, Cata Aranda, Cata Zúñiga, Gabriel, Jaime, Kike, Lauris, Lía, Made, Marcos, Stefanía, Ricardo y Vale. Y por supuesto al alma de la fiesta y el laboratorio, la Juanita, sin su apoyo esto no sería posible.

Gracias también a mis compañeros de doctorado por los momentos de aprendizaje y distracción que hemos compartido desde el año pasado: Mali, Nancho, Nani, Pía, Penny, y Tami, son los mejores y peores a la vez.

Finalmente quiero agradecer a los profesores Davor Cotorás, Sergio Álvarez y Francisco Chávez por sus valiosos consejos como miembros de la comisión, a lo largo del desarrollo de esta tesis.

La presente tesis dio origen a las siguientes comunicaciones:

Presentaciones orales en Congresos Nacionales

Diego Leiva, Margarita Carú, Julieta Orlando. Estudio filogenético de los simbioses de cianolíquenes del género *Peltigera* de la Reserva Nacional Coyhaique. VIII Reunión Anual Sociedad Chilena de Evolución, CHILE, Puerto Varas, 2014.

Presentaciones en poster en Congresos Internacionales

Diego Leiva, Catalina Zúñiga, Felipe Farías, Margarita Carú, Julieta Orlando. Especificidad y selectividad en cianolíquenes bipartitos del género *Peltigera* del sur de Chile y la Antártica, V Reunión Binacional de Ecología, CHILE, Puerto Varas, 2013.

Diego Leiva, Merly de Armas, Margarita Carú, Julieta Orlando. Phenoloxidase activity and its relationship with the specificity and selectivity in bipartite cyanolichens of the genus *Peltigera*. XII PABMB Congress, CHILE, Puerto Varas, 2013.

Artículo en Revista Internacional Indexada

Catalina Zúñiga, **Diego Leiva**, Lía Ramírez-Fernández, Margarita Carú, Rebecca Yahr, Julieta Orlando. Phylogenetic diversity of *Peltigera* cyanolichens and their photobionts in Southern Chile and Antarctica. *Microbes and Environments*. 2015. <http://doi.org/10.1264/jsme2.ME14156>

TABLA DE CONTENIDO

Portada	I
Calificaciones	II
Dedicatoria	III
Agradecimientos	IV
Comunicaciones	VI
Tabla de Contenido	VII
Índice de Figuras	X
Índice de Tablas	XII
Abreviaturas	XIV
Resumen	XV
Abstract	XVIII
1. Introducción	1
2. Hipótesis	6
3. Objetivos	7
3.1. Objetivo General.....	7
3.2. Objetivos Específicos.....	7
3.2. Esquema General de Objetivos.....	8
4. Materiales y Métodos	10
4.1. Toma de muestras.....	10
4.2. Identificación molecular de los componentes simbióticos de los cianolíquenes del género <i>Peltigera</i> de dos bosques de la Reserva Nacional Coyhaique.....	11

4.2.1. Extracción de DNA desde el talo liquénico.....	11
4.2.2. Amplificación por PCR de marcadores para micobiontes y cianobiontes.....	11
4.2.3. Análisis de los productos de PCR.....	12
4.2.4. Definición de OTUs y muestras compuestas.....	13
4.2.5. Análisis filogenéticos de los simbioses.....	13
4.3. Determinación del perfil de metabolitos de los extractos liquénicos.....	14
4.3.1. Cromatografía en capa fina de dos dimensiones (TLC-2D).....	14
4.3.2. Análisis de los datos del perfil de metabolitos.....	15
4.4. Cuantificación de la actividad fenoloxidasa de los extractos de líquenes.....	16
4.4.1. Preparación de las muestras.....	16
4.4.2. Ensayo de actividad fenoloxidasa.....	16
4.5. Determinación de la estructura genética de la comunidad bacteriana asociada a los líquenes y la presente en el sustrato donde ellos crecen..	17
4.5.1. Extracción del DNA desde el sustrato asociado al cianolíquen.....	18
4.5.2. Amplificación del gen del rRNA 16S.....	18
4.5.3. Perfiles de TRFLP.....	19
4.6. Determinación de la estructura metabólica de la comunidad bacteriana asociada a los líquenes y la presente en el sustrato donde ellos crecen..	20
4.6.1. Suspensión microbiana a partir de las muestras de líquenes y sustratos.....	21
4.6.2. Perfiles de CLPP.....	21
4.7. Análisis de la relación entre los metabolitos, la actividad fenoloxidasa y la estructura de las comunidades bacterianas asociadas a los líquenes.....	22
5. Resultados.....	24
5.1. Identificación molecular de los componentes simbióticos de los cianolíquenes del género Peltigera de dos bosques de la Reserva Nacional Coyhaique.....	24
5.2. Determinación de los metabolitos producidos por los organismos liquénicos.....	34
5.3. Cuantificación de la actividad fenoloxidasa de los extractos de líquenes.....	36
5.4. Determinación de la estructura genética de la comunidad bacteriana asociada a los líquenes y la presente en el sustrato donde ellos crecen..	38

5.4.1. Determinación de la estructura genética de la comunidad bacteriana asociada al talo liquénico.....	38
5.4.2. Determinación de la estructura genética de la comunidad bacteriana presente en el sustrato.....	43
5.4.3. Comparación de la estructura genética de la comunidad bacteriana presente en el talo liquénico y en el sustrato.....	47
5.5. Determinación de la estructura metabólica de la comunidad bacteriana asociada a los líquenes y la presente en el sustrato donde ellos crecen..	52
5.6. Análisis de la relación entre los metabolitos, la actividad fenoloxidasa y la estructura de las comunidades bacterianas asociadas a los líquenes	62
5.6.1. Correlación de la producción de metabolitos con la estructura genética y metabólica de las comunidades bacterianas asociadas a los líquenes y el sustrato donde ellos crecen.....	62
5.6.2. Correlación de la actividad fenoloxidasa con la estructura genética y metabólica de las comunidades bacterianas asociadas a los líquenes y el sustrato donde ellos crecen.....	65
6. Discusión.....	70
6.1. Identificación molecular de los componentes simbióticos.....	70
6.2. Determinación de los metabolitos producidos por los organismos liquénicos.....	72
6.3. Cuantificación de la actividad fenoloxidasa de los extractos de líquenes	73
6.4. Determinación de la estructura genética de la comunidad bacteriana asociada a los líquenes y la presente en el sustrato donde ellos crecen..	75
6.5. Determinación de la estructura metabólica de la comunidad bacteriana asociada a los líquenes y la presente en el sustrato donde ellos crecen..	80
6.6. Relación entre los metabolitos, la actividad fenoloxidasa y la estructura de las comunidades bacterianas asociadas a los líquenes.....	82
7. Conclusiones.....	85
8. Referencias.....	87

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Esquema representativo de los factores y variables a estudiar en esta tesis.....	8
Figura 2: Fotografías y datos de latitud, longitud y altitud asociados a cada muestra del sitio bosque 1 de la Reserva Nacional Coyhaique....	25
Figura 3: Fotografías y datos de latitud, longitud y altitud asociados a cada muestra del sitio bosque 2 de la Reserva Nacional Coyhaique....	26
Figura 4: Electroforesis en geles de agarosa al 0,8% del DNA genómico obtenido desde las 50 muestras de talo líquénico.....	27
Figura 5: Productos de PCR visualizados en geles de agarosa al 1,2%.....	28
Figura 6: Árbol filogenético de micobiontes.....	31
Figura 7: Árbol filogenético de cianobiontes.....	32
Figura 8: Árboles filogenéticos de cianobiontes y micobiontes.....	33
Figura 9: Diversidad de metabolitos de los extractos líquénicos.....	35
Figura 10: Actividad fenoloxidasa de los extractos líquénicos.....	37
Figura 11: Perfiles de TRFLP obtenidos a partir de las muestras de líquenes.....	40
Figura 12: Análisis de PCA basado en los perfiles de TRFLP obtenidos a partir de las muestras de líquenes con ambas parejas de partidores.....	42
Figura 13: Perfiles de TRFLP obtenidos a partir de las muestras de sustratos de líquenes.....	44
Figura 14: Análisis de PCA basado en los perfiles de TRFLP obtenidos a partir de las muestras de sustratos de líquenes con ambas parejas de partidores.....	46
Figura 15: Perfiles de CLPP obtenidos a partir de las muestras de líquenes y sustratos.....	48
Figura 16: Análisis de PCA basado en los perfiles de CLPP obtenidos a partir de las muestras de líquenes y sustrato.....	49
Figura 17: Ejemplo de curva de desarrollo de color en placas Ecoplate, ajustada según el modelo de Gompertz modificado.....	52

Figura 18: Curvas de desarrollo de color en las placas EcoPlate en el tiempo, ajustadas según el modelo de Gompertz modificado.....	54
Figura 19: Perfiles de CLPP obtenidos a partir de las muestras de líquenes y sustratos.....	57
Figura 20: Análisis de PCA basado en los perfiles de CLPP obtenidos a partir de las muestras de líquenes y sustrato.....	58
Figura 21: Clasificación de las fuentes de carbono disponibles en las placas EcoPlate.....	63
Figura 22: Esquema representativo de la relación entre los factores y variables estudiados en esta tesis.....	69

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Haplotipos obtenidos a partir de las secuencias concatenadas del rRNA 18S y rRNA 28S de micobiontes.....	29
Tabla 2: Haplotipos obtenidos a partir de las secuencias del rRNA 16S de cianobiontes.....	30
Tabla 3: Conformación de las muestras compuestas.....	34
Tabla 4: Análisis de similitud de los perfiles de TRFLP obtenidos a partir de las muestras de líquenes.....	42
Tabla 5: Análisis de similitud de los perfiles de TRFLP obtenidos a partir de las muestras sustratos de líquenes.....	46
Tabla 6: Análisis de similitud de los perfiles de TRFLP obtenidos a partir de las muestras de líquenes y sustratos.....	50
Tabla 7: Análisis de similitud de los perfiles de TRFLP obtenidos a partir de las muestras de líquenes y sustratos agrupados por bosque.....	51
Tabla 8: Análisis de similitud de los perfiles de CLPP obtenidos a partir de las muestras de líquenes y sustratos agrupados por micobionte.....	51
Tabla 9: Análisis de similitud de los perfiles de CLPP obtenidos a partir de las muestras de líquenes y sustratos agrupados por cianobionte.....	54
Tabla 10: Parámetros cinéticos calculados a partir de las curvas de desarrollo de color en las placas EcoPlate en el tiempo.....	55
Tabla 11: Análisis de similitud de los perfiles de CLPP obtenidos a partir de las muestras de líquenes y sustratos.....	58
Tabla 12: Análisis de similitud de los perfiles de CLPP obtenidos a partir de las muestras de líquenes y sustratos agrupados por bosque.....	60
Tabla 13: Análisis de similitud de los perfiles de CLPP obtenidos a partir de las muestras de líquenes y sustratos agrupados por micobionte.....	60
Tabla 14: Análisis de similitud de los perfiles de CLPP obtenidos a partir de las muestras de líquenes y sustratos agrupados por cianobionte.....	61
Tabla 15: Valores de las correlaciones lineales entre la diversidad de metabolitos y los índices de diversidad de Shannon calculados para los perfiles de TRFLP y de CLPP.....	63

Tabla 16: Valores de las correlaciones lineales entre la diversidad de metabolitos y los índices de diversidad de Shannon calculados para los perfiles de CLPP considerando las categorías de fuentes de carbono nitrogenadas y no nitrogenadas.....	64
Tabla 17: Valores de las correlaciones lineales entre la diversidad de metabolitos y los índices de diversidad de Shannon calculados para los perfiles de CLPP considerando las sub-categorías de fuentes de carbono no nitrogenadas.....	64
Tabla 18: Valores de las correlaciones lineales entre la actividad fenoloxidasa y los índices de diversidad de Shannon calculados para los perfiles de TRFLP y de CLPP.....	66
Tabla 19: Valores de las correlaciones lineales entre la actividad fenoloxidasa y los índices de diversidad de Shannon calculados para los perfiles de CLPP considerando las categorías de fuentes de carbono nitrogenadas y no nitrogenadas.....	67
Tabla 20: Valores de las correlaciones lineales entre la actividad fenoloxidasa y los índices de diversidad de Shannon calculados para los perfiles de CLPP considerando las sub-categorías de fuentes de carbono no nitrogenadas.....	67

ABREVIATURAS

% (p/v)	Porcentaje peso/volumen
6-FAM	6-Carboxifluoresceína
ABTS	Ácido 2'2-azino-bis-[3-etilbenzotiazol-6-sulfónico]
ANOSIM	Análisis de similitud
ANOVA	Análisis de varianza
CLPP	Perfiles fisiológicos a nivel comunitario
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxinucleótido trifosfato
GPS	Sistema de posicionamiento global
LAR1	Rizobios asociados a líquenes 1
NCBI	Centro nacional para la información biotecnológica
OTU	Unidad taxonómica operacional
PBS	Buffer fosfato salino
PCA	Análisis de componentes principales
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
rRNA	Ácido ribonucleico ribosomal
SIMPER	Porcentaje de similitud
TLC-2D	Cromatografía en placa fina en 2 dimensiones
TRFLP	Polimorfismo del largo de los fragmentos de restricción terminales

RESUMEN

Los líquenes son asociaciones simbióticas entre 2 o 3 organismos, entre los cuales hay siempre un hongo o micobionte y uno o dos fotobiontes. El fotobionte puede corresponder a un alga fotosintética o a una cianobacteria, y ambos están presentes en el caso de los líquenes tripartitos, donde el alga es el organismo fotosintético principal. En los cianolíquenes, la cianobacteria aporta los fotosintatos y además, con la fijación de nitrógeno atmosférico.

Recientemente se ha descrito que los ensamblajes microbianos que se desarrollan formando biopelículas sobre el talo del liquen pueden ser considerados un componente adicional en estas simbiosis. Sin embargo, aún no se han definido el o los factores que determinan la estructura de dicha microbiota asociada.

En general, los líquenes se caracterizan por poseer un metabolismo secundario muy activo, cuyos productos son principalmente compuestos fenólicos, obtenidos por diversas vías, como las del polimalonato, siquimato y mevalonato. Dada esta alta producción de metabolitos, se propone estudiar si la comunidad bacteriana asociada íntimamente al talo del cianoliquen *Peltigera* se relaciona con la diversidad de estos compuestos, aunque para este género de líquenes no se ha descrito una elevada producción de los mismos. Además, diversas actividades enzimáticas se han cuantificado en líquenes, y en el caso

particular de *Peltigera*, las fenoloxidasas han sido las más estudiadas. Esta actividad podría estar relacionada con la estructuración de la comunidad bacteriana asociada al talo liquénico, ya que la generación de compuestos oxidantes se sugiere está asociada a defensa contra patógenos y propiedades antibióticas.

Las 50 muestras de líquenes del género *Peltigera* y el sustrato asociado, provienen de dos bosques de la Reserva Nacional Coyhaique. Con el fin de identificar y agrupar filogenéticamente a los simbiontes muestreados, se obtuvieron las secuencias de los genes rRNA 18S y 28S de hongos y del gen del rRNA 16S de cianobacterias, a partir de los cuales se encontraron 6 haplotipos de micobionte y 5 de cianobionte, con los que se definieron las OTUs y 11 muestras compuestas.

Por otra parte, los metabolitos de las muestras compuestas se analizaron usando técnicas de cromatografía en placa fina en dos dimensiones (TLC-2D), la actividad fenoloxidasa asociada a cada muestra liquénica compuesta se determinó espectrofotométricamente mediante el monitoreo de la oxidación del ácido 2'2'-azino-bis-[3-etilbenzotiazol-6-sulfónico] (ABTS) a 436 nm. Finalmente, la estructura genética de la comunidad bacteriana relacionada a los líquenes y a los sustratos, se determinó mediante el uso de la técnica del polimorfismo en el largo de los fragmentos terminales de restricción (TRFLP), mientras que la estructura metabólica se determinó mediante los perfiles fisiológicos a nivel comunitario (CLPP) a través del uso de placas EcoPlate (BioLog®). Los perfiles

genéticos y metabólicos fueron diferentes en su estructura dependiendo de la identidad de los simbioses y el bosque del que provenían. Se encontraron correlaciones de la diversidad de metabolitos de los líquenes con la estructura genética de las comunidades asociadas a éstos y las presentes en el sustrato, y de la actividad fenoloxidasa de las muestras de líquenes con la estructura metabólica de la comunidad bacteriana obtenida desde el talo.

Los resultados de esta tesis sugieren que tanto la producción de metabolitos como la actividad fenoloxidasa, ambos factores atribuibles al líquen, cumplirían un papel en determinar la diversidad genética y metabólica de la comunidad bacteriana asociada al talo de líquenes del género *Peltigera* y al sustrato donde ellos crecen.

ABSTRACT

Lichens are symbiotic associations between 2 or 3 organisms, including a fungus and one or two photobionts. A photosynthetic algae or a cyanobacterium can be the photobiont in these associations, and both are present in tripartite lichens, where the algae is the main photosynthetic organism. In cyanolichens, the cyanobacterium provides with photosynthates and with atmospheric nitrogen fixation.

Recently, it has been described that microbial assembles, that develop forming biofilms upon the lichen thallus, can be considered an additional component in these symbioses. However, the factors determining the structure of this associated microbiota have not yet been defined.

In general, lichens are characterized by their very active secondary metabolism, whose products are mainly phenolic compounds obtained by different metabolic pathways, such as the polymalonate, shikimic acid and mevalonate ones. Given this high production of metabolites, it is propose to study if the bacterial community intimately associated to *Peltigera* cyanolichens thallus is related to the diversity of these compounds, even though this particular lichen genera has not been associated with a high production of these compounds. Moreover, different enzymatic activities have been quantified in lichens, and in the *Peltigera* particular case, phenoloxidases have been the more studied

enzymes. This activity could be related with the structuration of lichen thallus associated bacterial community, because the production of oxidant compounds has been related to defense against pathogens and to antibiotic activities.

The 50 lichen samples of the genus *Peltigera* and their corresponding associated substrates derived from two forests of the Coyhaique National Reserve. With the aim of identifying and phylogenetically grouping the sampled symbionts, sequences of fungal 18S and 28S rRNA and cyanobacterial 16S rRNA genes were obtained, from which 6 mycobiont and 5 cyanobiont haplotypes were found, defining the corresponding OTUs and 11 composite samples.

On the other hand, metabolites of composite samples were analyzed using bi-dimensional thin layer chromatography (TLC-2D), whilst phenoloxidase activity of each lichen composite sample was spectrophotometrically determined by monitoring the oxidation of 2,2'-azino-bis-[3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid] (ABTS) at 436 nm. Finally, genetic structures of the bacterial communities, related to lichens and substrates, were determined by terminal restriction fragment length polymorphism (TRFLP), while metabolic structures were determined by community-level physiological profiling, using EcoPlates (Biolog®). Genetic and metabolic profiles were different in structure, depending on the symbiont identity and the forest from where they derived. Correlations were founded between diversity of lichen metabolites and genetic structures of bacterial communities associated to both lichen and substrate, and between lichen

phenoloxidase activities and the metabolic structure of the thallus associated bacterial community.

Results of this thesis suggest that metabolite production and phenoloxidase activity, both factors attributable to lichen, would have a role in determining the genetic and metabolic diversity of the bacterial communities associated to *Peltigera* lichen thalli and to the substrate where they grow.

1. INTRODUCCIÓN

Los líquenes son asociaciones simbióticas entre 2 o 3 organismos, entre los cuales hay siempre un hongo o micobionte y uno o dos fotobiontes. El fotobionte puede corresponder a un alga fotosintética o a una cianobacteria, y ambos están presentes en el caso de los líquenes tripartitos, donde el alga es el organismo fotosintético principal. Cuando una cianobacteria está presente, se habla de cianolíquenes, pudiendo éstos ser bi o tripartitos (Nash, 2008).

La función del micobionte es entregar un sustento adecuado para el o los fotobiontes, mientras que estos últimos se encargan de la producción de fuentes de carbono y otros productos metabólicos. Además, en los cianolíquenes la cianobacteria aporta con la fijación de nitrógeno atmosférico, formando en los líquenes tripartitos estructuras especializadas llamadas cefalodios (Fedrowitz *et al.*, 2011).

Debido a que pueden soportar ambientes extremos, los líquenes son considerados colonizadores primarios, probablemente como consecuencia de una reducción de su metabolismo a un nivel mínimo. Se ha visto que soportan intensa radiación solar, completa deshidratación o temperaturas extremas e incluso han sobrevivido luego de ser expuestos a las condiciones del espacio exterior (De Vera, 2012; Lutzoni *et al.*, 2001; Nash, 2008). Es por estas características que presentan múltiples potencialidades para el manejo de

superficies recientemente expuestas, en particular los cianolíquenes que aportan además con la fijación del nitrógeno en ambientes pobres en nutrientes (Chapman & Margulis, 1998).

Los líquenes se clasifican de acuerdo al componente fúngico, y en el caso particular de este trabajo, se utilizaron cianolíquenes bipartitos cuyo micobionte pertenece al género *Peltigera*, el cual se asocia a cianobacterias del género *Nostoc*. Cabe destacar que estas cianobacterias se han encontrado tanto en vida libre como en simbiosis, sin embargo el micobionte *Peltigera* sólo se ha descrito en su forma liquenizada (O'Brien *et al.*, 2005).

Dado que no existe un consenso en la sistemática microbiana para definir la unidad biológica fundamental de diversidad (Pedrós-Alió, 2006; Rosselló-Mora, 2005), una gran parte de las publicaciones basadas en técnicas moleculares adoptan el nombre de unidad taxonómica operacional (OTU) para definir los taxones. Esta terminología se aplica a cualquier taxón definido de manera pragmática y que no necesariamente cumple con todos los requisitos de la definición de especie (Pedrós-Alió, 2006). Para la identificación del componente fúngico perteneciente al género *Peltigera* se han utilizado como marcadores moleculares, entre otros, los genes que codifican los RNAs ribosomales rRNA 18S (Miadlikowska & Lutzoni, 2004) y rRNA 28S (Miadlikowska *et al.*, 2003). Mientras que para la identificación de los fotobiontes del género *Nostoc* es ampliamente utilizado como marcador molecular el gen que codifica la subunidad pequeña del RNA ribosomal (rRNA 16S) (O'Brien *et al.*, 2005).

En general, los líquenes son eficaces productores de metabolitos secundarios, de hecho la caracterización química (quimiotaxonomía) se ha utilizado como un criterio adicional para la identificación de especies al igual que las caracterizaciones genética y morfológica; sin embargo, los líquenes del género *Peltigera* no se caracterizan por una alta producción de estos metabolitos (Miadlikowska & Lutzoni, 2000). Existe una gran cantidad de información acerca de la producción de metabolitos secundarios en líquenes, encontrándose compuestos con alta capacidad oxidativa o actividad antibiótica (Karagoz *et al.*, 2009). Dentro de estos metabolitos se han descrito compuestos fenólicos, dibenzofuranos y ácidos úsnicos, dépsidos, depsidonas, depsonas, lactonas, quinonas y derivados del ácido pulvínico, siendo productos de diversas vías metabólicas como las del polimalonato, siquimato y mevalonato, principalmente (Boustie & Grube, 2005).

Asimismo, en diversas especies de líquenes se han cuantificado actividades enzimáticas, y en el caso particular de *Peltigera* dicha actividad podría dar un indicio de que la función de las denominadas “sustancias liquénicas” se ve compensada por una alta producción enzimática, asociada probablemente a defensa contra patógenos (Lisov *et al.*, 2012). Las enzimas más estudiadas en líquenes de este género corresponden a lacasa y tirosinasa, siendo ambas fenoloxidasas, que por lo tanto generan una especie fenólica oxidada como producto. Estos productos oxidados son los que tendrían un efecto tóxico contra

patógenos o también actuarían como antibióticos contra distintas especies bacterianas (Karagoz *et al.*, 2009; Laufer *et al.*, 2006; Lisov *et al.*, 2012).

En este trabajo se propuso cuantificar la actividad fenoloxidasa e identificar el patrón de metabolitos de *Peltigera*, con el propósito de establecer si estos factores cumplen un rol en la estructuración de la comunidad bacteriana asociada al talo del líquen.

Esta propuesta se debe a que actualmente se describe un tercer componente líquénico, además del micobionte y el fotobionte, el cual consistiría de ensamblajes microbianos altamente estructurados, formando una biopelícula sobre el talo del líquen (Grube & Berg, 2009). Es probable que estas comunidades microbianas cumplan un rol clave en el sustento biológico de los simbioses principales, ya que existen algunos grupos de bacterias, por ejemplo las alfa-proteobacterias, que están presentes en altas proporciones en la gran mayoría de los líquenes estudiados hasta ahora (Cardinale *et al.*, 2008; Bates *et al.*, 2011; Cardinale *et al.*, 2012b; Maier *et al.*, 2014). Además, existen bacterias que han sido descritas únicamente asociadas a este tipo de interacción simbiótica (LAR1), lo que da cuenta de la particularidad de las comunidades bacterianas asociadas a líquenes (Hodkinson & Lutzoni, 2009; Bates *et al.*, 2011; Hodkinson *et al.*, 2012).

Es posible que el rol de este microbioma se relacione principalmente al reciclaje de nutrientes, así como también a la producción de compuestos antagónicos contra ciertos grupos microbianos (Grube *et al.*, 2015). Existen aparentes contradicciones sobre los factores más importantes que determinan la

estructura de la microbiota asociada al líquen, encontrándose como posibles predictores la biogeografía y el contexto ambiental (Cardinale *et al.*, 2008; Cardinale *et al.*, 2012a; Hodkinson *et al.*, 2012; Printzen *et al.*, 2012; Ramírez-Fernández *et al.*, 2014), el tipo de fotobionte (Hodkinson *et al.*, 2012), la identidad del micobionte (Bates *et al.*, 2011; Grube & Berg, 2009), la edad del talo (Mushegian *et al.*, 2011; Cardinale *et al.*, 2012b).

Considerando los antecedentes expuestos, en esta tesis se analizaron muestras del cianolíquen *Peltigera* y los sustratos donde ellos se desarrollan, provenientes de dos bosques cercanos entre sí, ubicados en la Reserva Nacional Coyhaique. Por lo tanto, el propósito de la tesis fue relacionar la estructura genética y metabólica de la comunidad bacteriana asociada íntimamente al líquen con la actividad fenoloxidasa y el perfil de los metabolitos, bajo el supuesto de que éstos cumplen un papel en la estructuración de la comunidad bacteriana del líquen y por lo tanto se espera que ésta dependa de la identidad del organismo simbionte. Por el contrario, se espera que las comunidades bacterianas de los sustratos dependan principalmente de las condiciones geográficas y ambientales, y no tanto de la identidad o de los metabolitos del líquen.

2. HIPÓTESIS

La comunidad bacteriana asociada a líquenes del género *Peltigera* es distinta, en términos de las estructuras genética y metabólica, a la comunidad bacteriana del sustrato donde éstos se desarrollan, estando la primera relacionada principalmente con la producción de metabolitos y la actividad fenoloxidasa del cianoliquen y la segunda con el contexto ambiental donde el liquen crece.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

Relacionar el perfil de metabolitos y la actividad fenoloxidasa de líquenes del género *Peltigera* de dos bosques de la Reserva Nacional Coyhaique, con la estructura genética y el perfil metabólico de la comunidad bacteriana asociada a cada cianoliquen y aquella derivada del sustrato donde éste se desarrolla.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1. Identificar molecularmente los componentes simbióticos de cianolíquenes del género *Peltigera* de dos bosques de la Reserva Nacional Coyhaique.

3.2.2. Determinar el perfil de metabolitos de los extractos de líquenes.

3.2.3. Cuantificar la actividad fenoloxidasa de los extractos de líquenes.

3.2.4. Determinar la estructura genética de la comunidad bacteriana asociada a los líquenes y la presente en el sustrato donde ellos crecen.

3.2.5. Determinar la estructura metabólica de la comunidad bacteriana asociada a los líquenes y la presente en el sustrato donde ellos crecen.

3.3. ESQUEMA GENERAL DE OBJETIVOS

En la Figura 1 se muestra en forma gráfica los distintos factores y variables a abordar con los distintos objetivos especificados anteriormente.

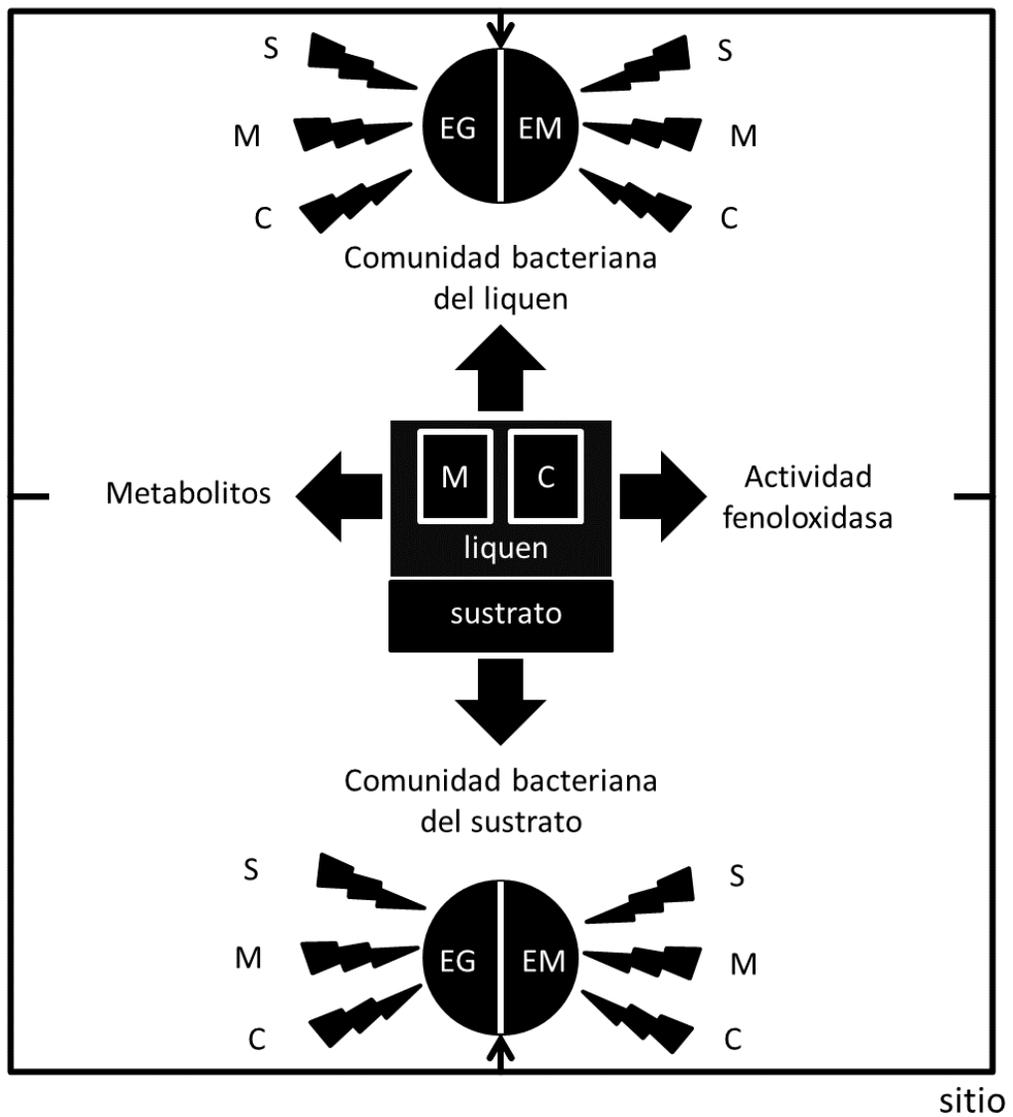


Figura 1 (figura en página anterior). Esquema representativo de los factores y variables a estudiar en esta tesis. **M** y **C** corresponden a la identidad del micobionte y el cianobionte del líquen, respectivamente. **S** corresponde al sitio en el cual se encuentra el líquen (bosque 1 o bosque 2). Las comunidades bacterianas del líquen y del sustrato se encuentran representadas por sus estructuras genéticas (**EG**) y metabólicas (**EM**). La relación de S, M, C, metabolitos y actividad fenoloxidasa con la estructuración de las comunidades bacterianas del líquen y el sustrato se muestra con flechas.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Toma de muestras

Las muestras de líquenes se recolectaron en 2 bosques de *Nothofagus pumilio* (Poepp. & Endl.) Krasser 1896 de la Reserva Nacional Coyhaique, Región de Aysén. Los permisos correspondientes fueron obtenidos con la Corporación Nacional Forestal (CONAF). La identificación macroscópica de las muestras, junto con el reconocimiento de las principales estructuras que caracterizan a estos líquenes, se realizó utilizando como referencia una base de datos fotográfica construida desde galerías virtuales de *Peltigera* (e.g. www.waysofenlichenment.net/lichens/Peltigera/; www.stridvall.se/la/galleries.php#lichens). Las muestras consistieron en fragmentos del talo de los líquenes y del sustrato asociado a ellos. En cada bosque se colectó un total de 25 individuos y 25 muestras del sustrato asociado. Las muestras se colocaron en bolsas de papel, para evitar su deterioro y disminuir la humedad, y se transportaron en recipientes tipo *cooler*, a baja temperatura. En el laboratorio, las muestras de liquen se guardaron en bolsas de papel a temperatura ambiente, con baja humedad, mientras que las muestras de sustrato (i.e. suelo) se tamizaron y almacenaron en tubos plásticos a 4 °C hasta el momento de su uso. Los líquenes y sus sitios de muestreo se fotografiaron y geo-referenciaron mediante GPS.

4.2. Identificación molecular de los componentes simbióticos de los cianolíquenes del género *Peltigera* de dos bosques de la Reserva Nacional Coyhaique

4.2.1. Extracción de DNA desde el talo liquénico

Previo a la extracción del DNA se realizó la limpieza de la superficie del talo de los líquenes, utilizando un pincel y una espátula para remover los restos de sustrato adheridos. Posteriormente, las muestras se lavaron con agua estéril. Para la extracción de DNA se fraccionaron mecánicamente 100 mg del talo utilizando un mini-mortero. El DNA se extrajo utilizando el “Power soil DNA Isolation Kit” (MoBio Laboratories, Inc) según las indicaciones del fabricante. El DNA extraído se visualizó en geles de agarosa al 0,8% (p/v) teñidos con GelRed™ (Biotium) para determinar la calidad e integridad de éste. Todas las muestras de DNA se almacenaron en buffer TE (Tris-HCl 10 mM y EDTA 1 mM [pH 8,0]) a -20 °C hasta el momento de su uso.

4.2.2. Amplificación por PCR de marcadores para micobiontes y cianobiontes

Para la identificación de los simbiontes se amplificaron, mediante PCR, los marcadores moleculares rRNA 18S (partidores *EF4* y *EF3*; Smit *et al.*, 1999) y rRNA 28S (partidores *LIC24R* y *LR7*; Miadlikowska & Lutzoni, 2000) con partidores para hongos, y rRNA 16S con partidores específicos para

cianobacterias (partidores *PCR1* y *PCR18*; Wilmotte *et al.*, 1993). Los programas utilizados para la amplificación fueron: 3 min a 94 °C, 30 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 48 °C y 3 min a 72 °C, y finalmente 10 min a 72 °C para el rRNA 18S de hongos; 1 min a 94 °C, 30 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 52 °C y 1 min 30 s a 72 °C, y finalmente 4 min a 72 °C para el rRNA 28S de hongos; y 1 min a 94 °C, 30 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 55 °C y 4 min a 72 °C, y finalmente 7 min a 72 °C para el rRNA 16S de cianobacterias.

Todas las mezclas de reacción se prepararon utilizando “GoTaq® Green Master Mix” (GoTaq® DNA polimerasa en buffer de reacción Green GoTaq® [pH 8,5], 200 µM de cada dNTP y MgCl₂ 1,5 mM) (Promega) y todas las amplificaciones se llevaron a cabo en un termocilador Maxygene II (Axygen).

4.2.3. Análisis de los productos de PCR

El tamaño de los productos de PCR se determinó por electroforesis en geles de agarosa al 1,2% (p/v) en buffer TAE 1X (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA [pH 8,0]) y teñidos con GelRed™ (Biotium). Posteriormente, los amplicones se secuenciaron en un sentido con el partidor *forward* correspondiente, utilizando un Analizador Genético 3730 (Applied Biosystems; Macrogen Inc.). Las secuencias se verificaron y editaron individualmente en el programa MEGA v5.0 (Tamura *et al.*, 2011). La identidad de los simbiontes se determinó utilizando la herramienta bioinformática BLASTn (Altschul *et al.*, 1990) comparando las secuencias

obtenidas con las que se encuentran depositadas en la base de datos de secuencias nucleotídicas GenBank del NCBI (Benson *et al.*, 2011).

4.2.4. Definición de OTUs y muestras compuestas

Las secuencias concatenadas de los marcadores rRNA 18S y 28S de hongos y las del marcador rRNA 16S de cianobacterias se alinearon por el método Muscle (Edgar, 2004) y luego se agruparon con el criterio de 100% de identidad en el programa MEGA v5.0. Las secuencias 100% idénticas se definieron como pertenecientes a una OTU, por lo tanto cada OTU corresponde a un haplotipo diferente. De acuerdo a las características de cada muestra según procedencia e identidad de los simbioses que la componen, se generaron muestras compuestas para llevar a cabo los siguientes objetivos (medición de metabolitos secundarios, actividad fenoloxidasa, y estructura genética y metabólica de la comunidad bacteriana).

4.2.5. Análisis filogenéticos de los simbioses

Utilizando un representante por cada OTU encontrada en cada ambiente, se realizó un análisis filogenético de inferencia bayesiana (5.000.000 de generaciones) en el programa MrBayes v3.2.2 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003), utilizando las secuencias de los rRNA 18S y rRNA 28S concatenados para los micobioses y del rRNA 16S para los cianobioses. El mejor modelo de sustitución nucleotídica se determinó mediante el programa jModelTest v2.1.3 (Darriba *et al.*,

2012). Además, el soporte en los nodos se calculó con el método de *bootstrap* (Felsenstein, 1985). La representación gráfica de los árboles se obtuvo con el programa FigTree v1.4.0 (Rambaut, 2012).

4.3. Determinación del perfil de metabolitos de los extractos liquénicos

4.3.1. Cromatografía en capa fina de dos dimensiones (TLC-2D)

Los metabolitos de las muestras se analizaron usando técnicas de cromatografía en placa fina en dos dimensiones (TLC-2D) descritas por Culberson (1972) y modificadas por Menlove (1974). Los compuestos se extrajeron en hexano por 5 min, se sembraron en placas de aluminio de gel de sílice 60 F₂₅₄ (Merck) y se resolvieron en el sistema de solventes EHF (dietil éter : hexano : ácido fórmico; 300:100:3 v/v/v) y TA (tolueno : ácido acético; 20:3 v/v), como primera y segunda dimensión, respectivamente (Tønnsberg & Holtan–Hartwig, 1983). Los compuestos presentes se revelaron a la luz del día, bajo luz ultravioleta (350 nm) y se fijaron rociando la placa con ácido sulfúrico al 10% y luego secándola en un horno a 110 °C por 5 min (Miadlikowska & Lutzoni, 2000). Finalmente se midieron las migraciones y coloraciones de cada mancha.

4.3.2. Análisis de los datos del perfil de metabolitos

Una vez obtenidos los datos de migración, coloración y revelado por ácido sulfúrico de cada mancha, se tabularon y se calculó el factor de retención (Rf) para cada una en ambos ejes, en relación a una mancha que todas las placas presentaron, la cual aparecía en el mismo sector de la placa y tenía el mismo color a luz visible. Teniendo los datos normalizados, se procedió a definir los grupos de manchas mediante un análisis de agrupamiento de Neighbor Joining en el programa PAST v2.17c (Hammer *et al.*, 2001). Además, la abundancia de estos grupos en cada muestra se utilizó para el cálculo de diversidad por el índice de Shannon ($H = - \sum p_i * \log p_i$, donde p_i es la abundancia relativa de cada grupo; Shannon, 1948). A partir del valor de este índice para cada muestra, se determinó el intervalo de confianza dentro del cual puede variar el dato para generar así 3 valores para cada muestra en total (valor calculado, y los límites superior e inferior del intervalo de confianza). Los cálculos de diversidad se realizaron en el programa PAST v2.17c (Hammer *et al.*, 2001). Luego, se calculó si existían diferencias significativas en este valor tanto entre las muestras sin agrupar como entre aquellas agrupadas por la identidad del bosque, micobionte, o cianobionte al que pertenecían, utilizando ANOVA de una vía con un post-test de Tukey en el programa GraphPad Prism v5.01 (Graphpad Software).

4.4. Cuantificación de la actividad fenoloxidasa de los extractos de líquenes

4.4.1. Preparación de las muestras

Previamente a la medición de la actividad fenoloxidasa (lacasa y tirosinasa) de las muestras de líquenes, se procedió a optimizar un método de lectura en placas de 96 pocillos, el cual consistió en cuantificar el producto de la oxidación del ácido 2'2'-azino-bis-[3-etilbenzotiazol-6-sulfónico] (ABTS) a 436 nm. Para ello se adaptó un método de ensayos en cubetas de 1 mL (Laufer *et al.*, 2006, Zavarzina & Zavarzin, 2006). Desde cada muestra compuesta se homogeneizaron 8 mg de talo liquénico usando un micro-pistilo y se suspendieron en 300 μ L de amortiguador acetato de sodio 25 mM (pH=6). Dicho homogeneizado se centrifugó a 7000 x g por 5 min. El sobrenadante se almacenó en glicerol al 20% a -20 °C hasta su uso.

4.4.2. Ensayo de actividad fenoloxidasa

El ensayo enzimático se realizó con 500 ng de proteína total. Se agregaron 200 μ L de buffer acetato de sodio y se incubó 10 min a 22 °C, luego se agregaron 50 μ L de ABTS 2,5 mM (concentración final 0,5 mM). Además, se realizó un control abiótico para cada muestra, al cual se le agregaron 50 μ L de azida de sodio 5 mM (concentración final 1 mM) y 150 μ L de amortiguador acetato de sodio, luego se realizó una incubación de 10 minutos a 22 °C y se agregaron 50 μ L de ABTS 2,5 mM.

La unidad (U) de actividad fenoloxidasa se definió como los micromoles de ABTS oxidados enzimáticamente (restando el control abiótico) por minuto, cuya coloración verde se midió a 436 nm ($\epsilon_{436} = 29 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) en un lector de microplacas (Epoch, BioTek). Dicha actividad se normalizó por la cantidad de proteína en cada extracto (cuantificada mediante el método de Bradford; Bradford, 1976). Por cada muestra se analizaron 2 réplicas biológicas en ensayos independientes. Para determinar la existencia de diferencias entre la actividad de cada muestra, se realizó ANOVA de una vía, primero para todas las muestras en duplicado y luego agrupando los datos según el bosque, el micobionte y el cianobionte al que pertenecían.

4.5. Determinación de la estructura genética de la comunidad bacteriana asociada a los líquenes y la presente en el sustrato donde ellos crecen

La estructura genética de la comunidad bacteriana se determinó mediante la técnica del Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción Terminal (TRFLP) de la región variable V1-V3 del gen del rRNA 16S amplificada a partir del DNA genómico del talo liquénico así como del DNA extraído del sustrato asociado a cada líquen (ver sección 4.2.1.).

4.5.1. Extracción del DNA desde el sustrato asociado al cianoliquen

El DNA se obtuvo a partir de los sustratos de una manera similar a la utilizada para obtener el DNA a partir del talo liquénico, utilizando el kit de extracción “Power Soil DNA Isolation” (MoBio laboratorios, Inc.) y se guardó en buffer TE a -20 °C hasta el momento de su uso. La concentración y calidad del DNA se determinó por electroforesis en geles de agarosa al 0,8% en buffer TAE 1X, y se visualizó por tinción con GelRed™.

4.5.2. Amplificación del gen del rRNA 16S

A partir del DNA extraído, tanto desde los talos liquénicos como del sustrato asociado a cada uno de ellos, se amplificó el gen del rRNA 16S con 2 parejas de partidores, *fD1-rP2** y *895F-rP2** (* = partidore con fluoróforo 6-FAM) (Weisburg *et al.*, 1991; Hodkinson & Lutzoni, 2009). La primera pareja amplifica DNA bacteriano en general (TRFLP-B), mientras que la segunda excluye las secuencias de cianobacterias (TRFLP-sC); esto con el objetivo de analizar a la comunidad bacteriana sin considerar la presencia del cianobionte, cuyos TRFs podrían ocultar los de la comunidad bacteriana asociada. Los programas utilizados en el termociclador fueron: 3 min a 94 °C, 30 ciclos de 1 min a 94 °C, 30 s a 57 °C y 2 min a 72 °C, y finalmente 7 min a 72 °C para la pareja *fD1-rP2**; y 3 min a 94 °C, 30 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 42 °C y 1 min 30 s a 72 °C, y finalmente 10 min a 72 °C para la pareja *895F-rP2**.

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

4.5.3. Perfiles de TRFLP

Los amplicones se purificaron mediante el uso del kit “Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System” (Promega) y se incubaron por 16 h a 37 °C con 3 enzimas de restricción distintas independientemente: *AluI*, *BstUI* y *HhaI* (Fermentas) siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente se realizó una precipitación alcohólica del DNA, cuyo producto se re-suspendió en buffer TE y se analizaron los fragmentos por electroforesis capilar (Macrogen Inc). El tamaño en pares de bases (pb) de los fragmentos terminales de restricción (TRFs), y la altura y el área de los picos en los electroferogramas, se determinaron con el programa GeneMapper v3.0 (Applied Biosystems).

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

esperable en los tamaños de los fragmentos debido a la electroforesis. Con los datos corregidos se determinó la fluorescencia relativa de cada TRF.

El grado de relación de las comunidades bacterianas determinadas mediante TRFLP se determinó mediante un análisis de componentes principales (PCA) utilizando el índice de disimilitud de Bray-Curtis (Bray & Curtis, 1957). Asimismo, se realizó un análisis de similitud (ANOSIM) para determinar el coeficiente R, que cuanto más grande y positivo (hasta 1) indica mayor disimilitud entre los grupos comparados. Finalmente, se calcularon los porcentajes de similitud entre los grupos (SIMPER). Todos estos análisis se llevaron a cabo en la herramienta PAST v2.17c (Hammer *et al.*, 2001).

4.6. Determinación de la estructura metabólica de la comunidad bacteriana asociada a los líquenes y la presente en el sustrato donde ellos crecen

La estructura metabólica de la comunidad bacteriana se determinó mediante la obtención del Perfil Fisiológico a Nivel Comunitario (CLPP) a partir de una suspensión de las muestras del talo liquénico, así como del sustrato asociado a cada líquen, inoculadas en placas EcoPlate™ (BioLog®), que consisten en microplacas de 96 pocillos con 31 fuentes de carbono distintas en triplicado.

4.6.1. Suspensión microbiana a partir de las muestras de líquenes y sustratos

La suspensión de bacterias desde el talo liquénico se realizó a partir de 100 mg de talo por muestra compuesta, los cuales se homogeneizaron en 15 mL de PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 8 mM, KH₂PO₄ 2 mM) y se agitaron toda la noche a 150 rpm y 25 °C. De manera similar, la suspensión de la comunidad bacteriana desde el sustrato se realizó a partir de 2 g de suelo, los cuales se agitaron a 150 rpm y 25 °C por 1 h en 20 mL de PBS.

4.6.2. Perfiles de CLPP

Las suspensiones microbianas se filtraron y se inocularon 100 µL de los filtrados en cada pocillo de las placas. Luego, se incubaron las placas a 25 °C por una semana en una cámara húmeda. La utilización por la comunidad bacteriana de una fuente de carbono determinada reduce un colorante de tetrazolium, cuya coloración púrpura es monitoreada diariamente durante 7 días a 590 nm en un lector de microplacas Epoch (BioTek).

Los datos obtenidos se procesaron restando la absorbancia del tiempo cero para todas las placas, para minimizar la interferencia de color de la muestra (Insam & Goberna, 2004), y la absorbancia del pocillo control sin fuente de carbono. Para los análisis se consideraron como positivas, según el límite de detección del equipo, las absorbancias mayores a 0,1.

Con esos datos se calculó el desarrollo promedio de color en las placas (Garland & Mills, 1991). Posteriormente, se analizaron los parámetros cinéticos λ (tiempo de latencia), μ_m (tasa máxima de desarrollo de color) y A (absorbancia máxima) de los perfiles comunitarios, ajustando los datos a la ecuación de Gompertz modificada (Zwietering *et al.*, 1990) con el programa OriginPro v8.07 (OriginLab Corporation).

Utilizando los parámetros anteriores se definió el tiempo en el cual todas las comunidades se encontraban en fase exponencial de desarrollo de color, y de forma similar al análisis de los datos de TRFLP, se calculó el consumo relativo de cada fuente de carbono en el tiempo elegido. A partir de ese perfil de consumo, se calculó el índice de diversidad de Shannon para cada muestra, además de los análisis de similitud ANOSIM y SIMPER en el programa PAST v2.17c (Hammer *et al.*, 2001).

4.7. Relación entre los metabolitos, la actividad fenoloxidasa y la estructura de las comunidades bacterianas asociadas a los líquenes

Con el objetivo de integrar la información obtenida de los 4 análisis anteriores (diversidad de metabolitos, nivel de actividad fenoloxidasa, estructura genética y estructura metabólica), se calculó el índice de correlación de Pearson entre la diversidad de metabolitos o el nivel de actividad fenoloxidasa, como variables independientes, con la diversidad genética (TRFLP) así como con la diversidad

metabólica (CLPP), como variables dependientes. Estos análisis se realizaron en el programa PAST v2.17c (Hammer *et al.*, 2001) y permitieron relacionar estas características de cada muestra para dar cuenta de la hipótesis planteada.

5. RESULTADOS

5.1. Identificación molecular de los componentes simbióticos de los cianolíquenes del género *Peltigera* de dos bosques de la Reserva Nacional Coyhaique

Se recolectaron 50 muestras de talo liquénico y del sustrato asociado a ellos en dos bosques de *Nothofagus pumilio* distantes aproximadamente 300 m entre sí, dentro de la Reserva Nacional Coyhaique, Región de Aysén (Figuras 2 y 3). El sitio de estudio corresponde a bosques secundarios de *N. pumilio* originados luego de un incendio antropogénico ocurrido cerca del año 1950. Están ubicados a 45°32' de latitud sur y 72°02' de longitud oeste, con un promedio de altitud de 700 m aproximadamente (bosque 1: 45°31'39''S, 72°02'03''O, 709 m de altitud en promedio; bosque 2: 45°31'47''S, 72°01'40''O, 705 m de altitud promedio). El suelo deriva de depósitos de ceniza volcánica y la zona recibe 1350 mm de lluvia anual promedio (Till-Bottraud *et al.*, 2012).

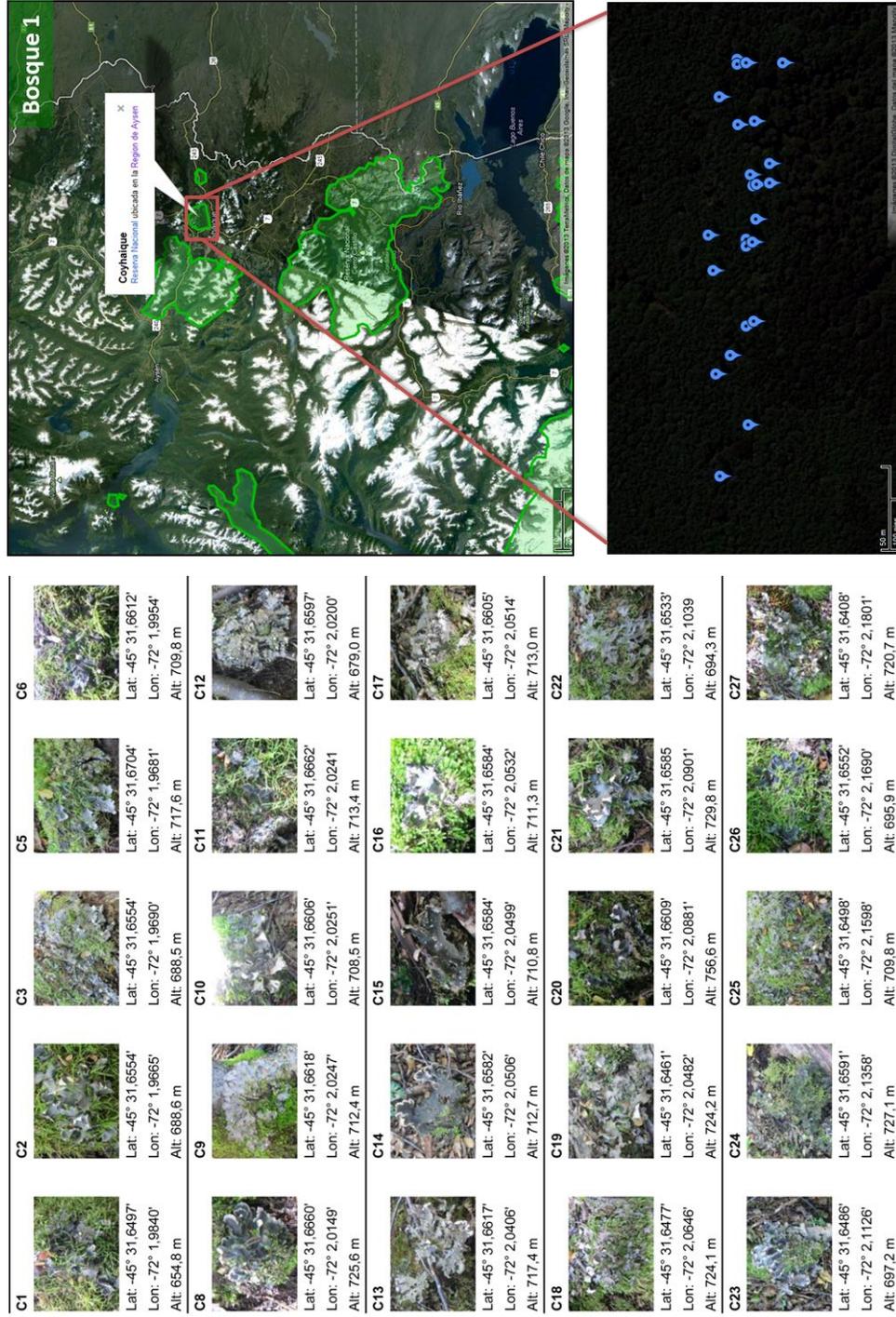


Figura 2. Fotografías y datos de latitud, longitud y altitud asociados a cada muestra del sitio bosque 1 de la Reserva Nacional Coyañaique (B1, n=25).

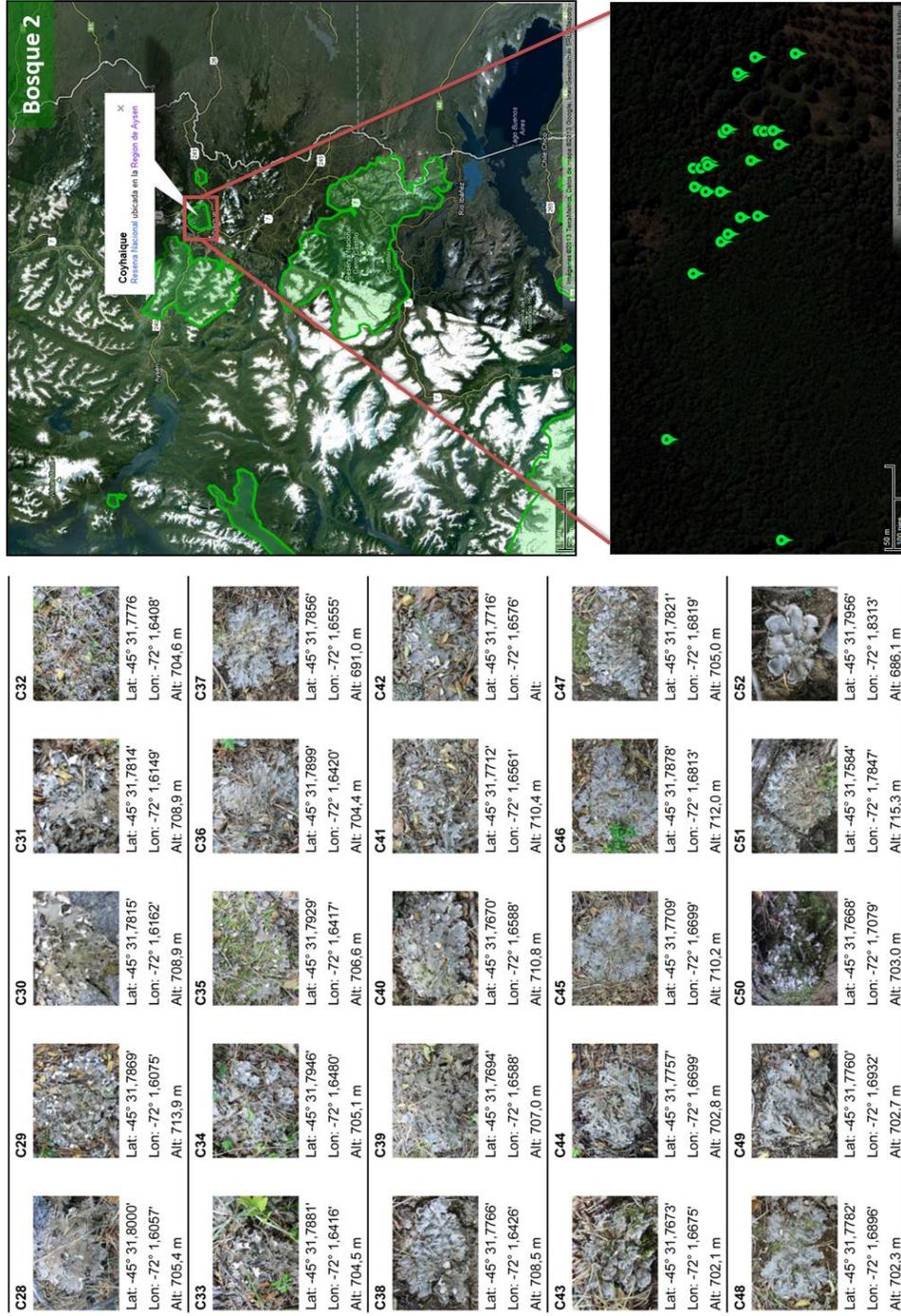


Figura 3. Fotografías y datos de latitud, longitud y altitud asociados a cada muestra del sitio bosque 2 de la Reserva Nacional Cuyhaique (B2, n=25).

Para identificar los simbiosntes principales del liquen se extrajo DNA desde los 50 talos muestreados. La integridad del DNA extraído y los productos de PCR de los marcadores amplificados para la identificación de los simbiosntes se verificó por electroforesis en geles de agarosa (Figura 4). Para los 3 marcadores amplificados, rRNA 18S (1,8 Kb) y rRNA 28S (1,5 Kb) de hongos y rRNA 16S (1,5 Kb) de cianobacterias, se obtuvo el tamaño de amplicón esperado, en todos los casos como una banda única (Figura 5).

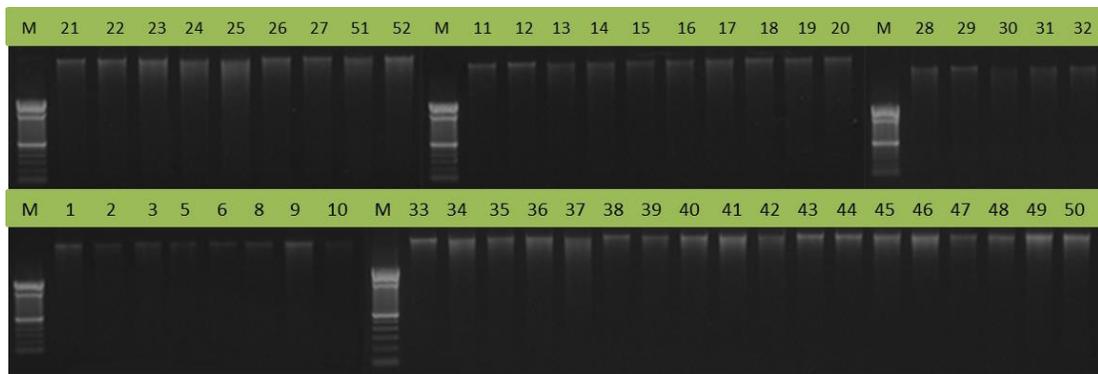


Figura 4. Electroforesis en geles de agarosa al 0,8% del DNA genómico obtenido desde las 50 muestras de talo liquénico M: marcador de peso molecular **2072-1500-600-100 pb.**

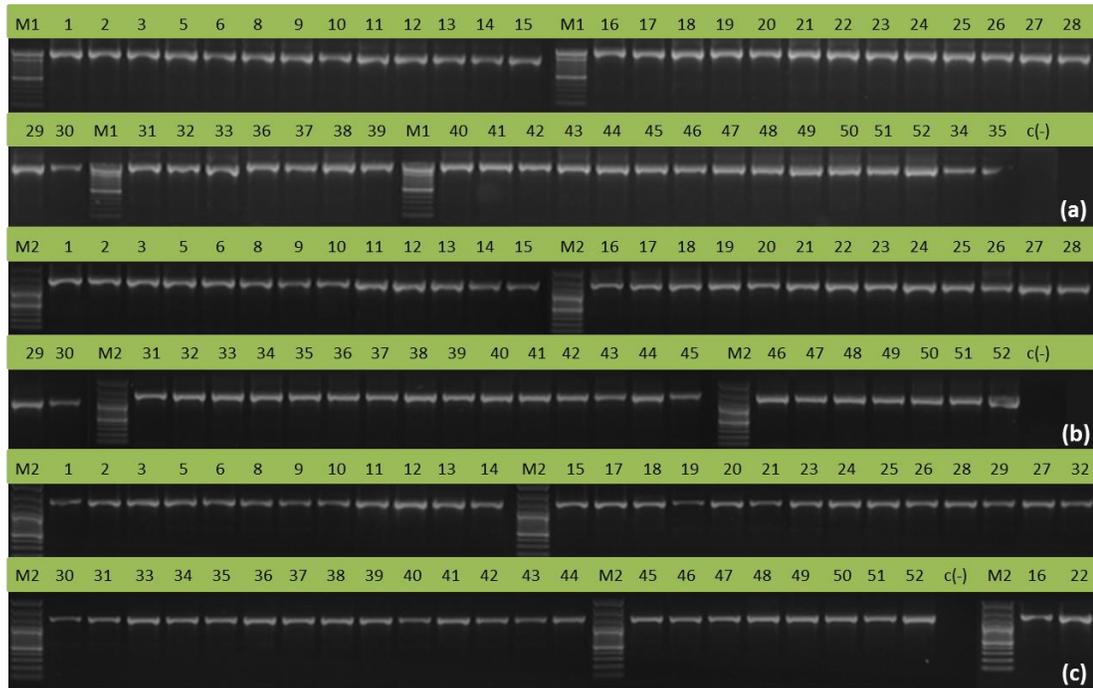


Figura 5. Productos de PCR visualizados por electroforesis en geles de agarosa al 1,2%: (a) rRNA 16S de cianobacterias; (b) rRNA 18S de hongos; (c) rRNA 28S de hongos. M1: **2072-1500-600-100** pb; M2: 3000-**1000-500-100** pb.

Las 50 secuencias de los marcadores moleculares de micobiontes, rRNA 18S y rRNA 28S, se asociaron a secuencias de representantes del género *Peltigera*. Mediante el análisis de ambos marcadores concatenados se definieron como OTUs los diferentes haplotipos (i.e. los grupos de secuencias 100% idénticas). Se diferenciaron 6 haplotipos de micobionte (M1, M2, M4, M5, M6 y M8), 3 de los cuales (M1, M5 y M8) se encontraron en ambos bosques (B1 y B2) (Tabla 1). Considerando 2 haplotipos más encontrados en otras zonas del sur de Chile y la Antártica, se construyó un árbol filogenético con las secuencias del rRNA 28S usando los métodos de máxima verosimilitud e inferencia bayesiana (Zúñiga et

al., 2015) y se determinó a qué especie de *Peltigera* se asocia cada OTU con mayor cercanía: M1 fue más cercano a *P. ponojensis*, M2 a *P. extenuata*, M4 a *P. rufescens*, M5 al grupo de *P. canina* (especies *P. evansiana*, *P. canina*, *P. "fuscopraetextata"*, *P. "pallidorufescens"*, *P. praetextata* y *P. "boreorufescens"*), M6 a *P. frigida* y M8 al grupo de *P. hymenina* (especies *P. polydactylon*, *P. occidentalis*, *P. scabrosella*, *P. pacifica*, *P. hymenina* y *P. pulverulenta*).

Tabla 1. Haplotipos obtenidos a partir de las secuencias concatenadas del rRNA 18S y rRNA 28S de micobiontes.

Haplotipo ¹	N° de muestras representadas	Secuencia tipo ²	N° de acceso (rRNA 18S-28S) ³
B1M1	11	Cm01	KF774003-KF718515
B1M5	12	Cm05	KF774007-KF718519
B1M8	2	Cm21	KF774022-KF718534
B2M1	14	Cm28	KF774029-KF718541
B2M5	6	Cm29	KF774030-KF718542
B2M2	2	Cm32	KF774033-KF718545
B2M6	1	Cm33	KF774034-KF718546
B2M4	1	Cm43	KF774044-KF718556
B2M8	1	Cm51	KF774052-KF718564

¹ Haplotipo de micobionte (M) por sitio de muestreo (B).

² Secuencia del haplotipo utilizada en los análisis filogenéticos.

³ Números de acceso de las secuencias en la base de datos GenBank.

Por su parte, las 50 secuencias del rRNA 16S de cianobacterias se asociaron a secuencias de representantes del género *Nostoc*, las cuales se diferenciaron en 5 haplotipos de cianobionte (C01, C04, C05, C07 y C12), de los cuales sólo C01 se encontró representado en ambos bosques (B1 y B2) (Tabla 2). Considerando 10 haplotipos más encontrados en otras zonas del sur de Chile y

la Antártica, se construyó un árbol filogenético con las secuencias del rRNA 16S usando los métodos de máxima verosimilitud e inferencia bayesiana (Zúñiga *et al.*, 2015) y se determinó que C01 y C12 se asocian con mayor cercanía a cianobiontes de *Peltigera* de Sudamérica, mientras que C04, C05 y C07 a cianobiontes de *Peltigera* y cianobacterias de vida libre de Norteamérica y Europa.

Tabla 2. Haplotipos obtenidos a partir de las secuencias del rRNA 16S de cianobiontes.

Haplotipo ¹	N° de muestras representadas	Secuencia tipo ²	N° de acceso (rRNA 16S) ³
B1C01	22	Cc01	KF718389
B1C12	2	Cc21	KF718408
B1C04	1	Cc25	KF718412
B2C01	17	Cc28	KF718415
B2C07	7	Cc32	KF718419
B2C05	1	Cc51	KF718438

¹ Haplotipo de cianobionte (C) por sitio de muestreo (B).

² Secuencia del haplotipo utilizada en los análisis filogenéticos.

³ Números de acceso de las secuencias en la base de datos GenBank.

Posteriormente, se seleccionó la secuencia de un representante por haplotipo encontrado en cada ambiente para realizar análisis filogenéticos. La filogenia basada en las secuencias de los micobiontes (Figura 6), indica que éstos se agrupan monofiléticamente con un soporte de nodo de un 100%, formándose además dentro de este clado, 2 grupos hermanos, el conformado por el micobionte M8 y el que agrupa a los micobiontes restantes (M1, M2, M4, M5 y

M6). Además, se puede observar que se agrupan los micobiontes de los diferentes ambientes pertenecientes al mismo haplotipo (M1, M5 y M8).

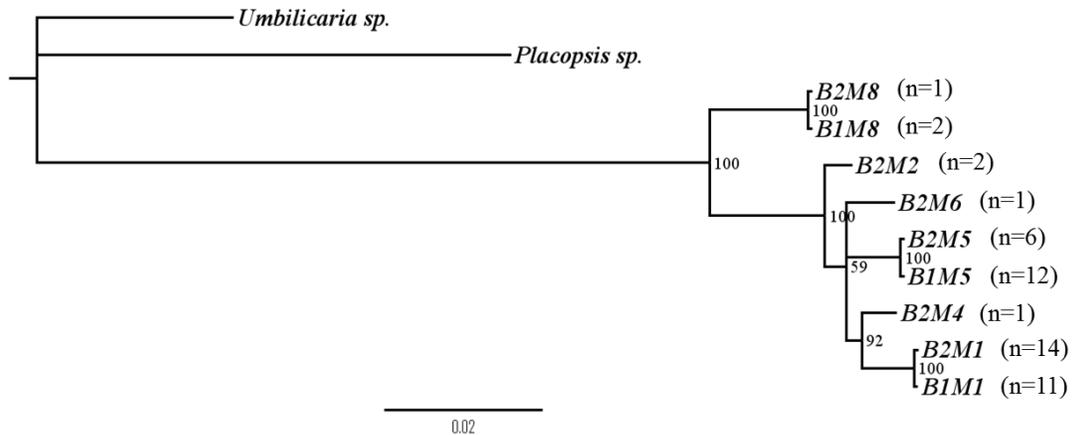


Figura 6. Árbol filogenético de micobiontes obtenido mediante inferencia bayesiana, se muestra el soporte de *bootstrap* en los nodos. Se indica entre paréntesis la cantidad de muestras representadas por cada secuencia. Se utilizaron las secuencias de *Umbilicaria sp.* y *Placopsis sp.* como grupo externo. La barra indica la distancia genética.

La filogenia propuesta para los cianobiontes (Figura 7), indica que las secuencias de éstos se agrupan monofiléticamente con un alto soporte de *bootstrap* (100%), permaneciendo juntas las secuencias representativas de los cianobiontes que comparten el mismo haplotipo del rRNA 16S en los 2 bosques (C01). El cianobionte C01 es relativamente el más ancestral de este grupo de estudio, y también el que tiene más representantes en ambos bosques (22 en B1 y 17 en B2), lo que da indicios de su éxito ecológico en la zona.

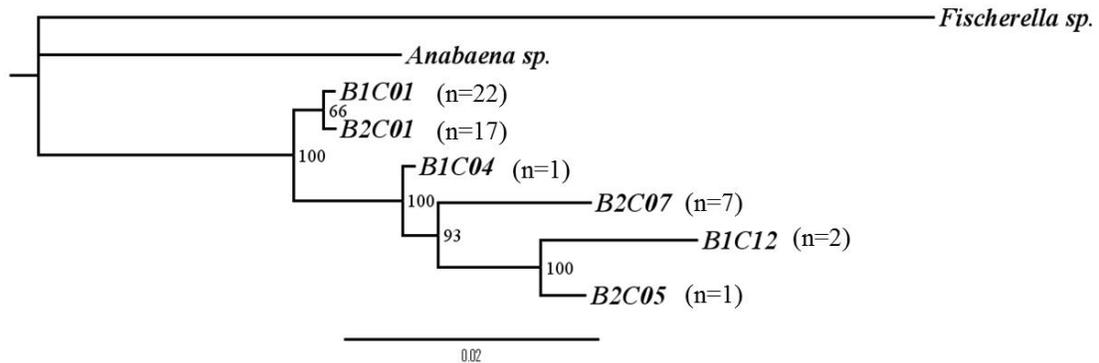


Figura 7. Árbol filogenético de cianobiontes obtenido mediante inferencia bayesiana, se muestra el soporte de *bootstrap* en los nodos. Se indica entre paréntesis la cantidad de muestras representadas por cada secuencia. Se utilizaron las secuencias de *Fischerella sp.* y *Anabaena sp.* como grupo externo. La barra indica la distancia genética.

A modo de visualizar las relaciones entre los simbiontes identificados anteriormente, se realizó un enfrentamiento de los árboles de cianobiontes y micobiontes (Figura 8). En esta figura se puede observar la gran frecuencia de asociaciones que presenta el cianobionte más cercano al ancestro común C01, como también la promiscuidad del cianobionte C07. Además se observan asociaciones restringidas a grupos de simbiontes, como la del micobionte más cercano al ancestro común M8 con los cianobiontes del clado más reciente C05-C12, o las de los cianobiontes C01 y C07 con el clado de micobiontes no-M8.

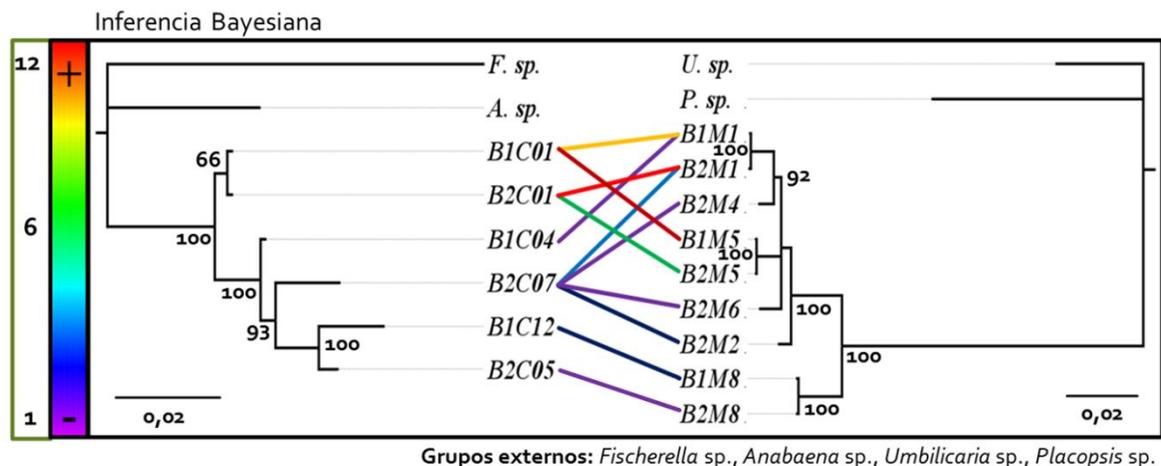


Figura 8. Árboles filogenéticos de cianobiontes (izquierda) y micobiontes (derecha) obtenidos mediante inferencia bayesiana, se muestra el soporte de *bootstrap* en los nodos. Se indica con líneas de colores la asociación de cada pareja de simbiontes y el color de la línea indica su frecuencia, desde 1 a 12 según la escala mostrada a la izquierda. Se utilizaron las secuencias de *Fischerella* sp. (*F. sp.*) y *Anabaena* sp. (*A. sp.*) como grupo externo para los cianobiontes y las de *Umbilicaria* sp. (*U. sp.*) y *Placopsis* sp. (*P. sp.*) para los micobiontes.

Para llevar a cabo los objetivos posteriores se prepararon muestras compuestas, tanto del talo liquénico como del sustrato asociado, agrupadas por sitio (B1 y B2), tipo de micobionte (M) y tipo de cianobionte (C). En total se generaron 11 muestras compuestas que se muestran en la Tabla 3, donde la nomenclatura para cada una indica el bosque (B1 o B2), luego el micobionte (M1, M2, M4, M5, M6 o M8) y el cianobionte (C01, C04, C05, C07 o C12) que representa a cada muestra individual.

Tabla 3. Conformación de las muestras compuestas.

Sitio	Micobionte	Cianobionte	Muestra compuesta	n
B1	M1	C01	B1M1C01	10
		C04	B1M1C04	1
	M5	C01	B1M5C01	12
	M8	C12	B1M8C12	2
B2	M1	C01	B2M1C01	11
		C07	B2M1C07	3
	M2	C07	B2M2C07	2
	M4	C07	B2M4C07	1
	M5	C01	B2M5C01	6
	M6	C07	B2M6C07	1
	M8	C05	B2M8C05	1

5.2. Determinación de los metabolitos producidos por los organismos liquénicos

El perfil de metabolitos para cada muestra compuesta se realizó mediante TLC-2D. Según el R_f, coloración a luz visible y exposición a H₂SO₄, se detectaron 8 tipos de manchas, las cuales se asignaron a grupos de la A a la H, definidos realizando un análisis de agrupamiento de Neighbor Joining con las características de cada una de ellas. Luego de tabular la abundancia de cada mancha para las muestras, es decir la cantidad de manchas de un mismo grupo presentes en cada muestra, se calculó la diversidad de Shannon para cada una (incluyendo como valores para los análisis estadísticos los extremos del intervalo

de confianza de cada índice por muestra). Luego, con el propósito de determinar si existen diferencias significativas entre las 11 muestras compuestas, se realizó un ANOVA de una vía con un post Test de Tukey (Figura 9a). Debido a que al analizar todas las muestras por separado no se observó un patrón de diferenciación por sitio o componente simbiótico, éstas se agruparon por bosque (Figura 9b), por micobionte (Figura 9c) y por cianobionte (Figura 9d). Sin embargo, tampoco se observaron diferencias significativas entre bosque 1 y bosque 2 ni entre micobiontes o cianobiontes.

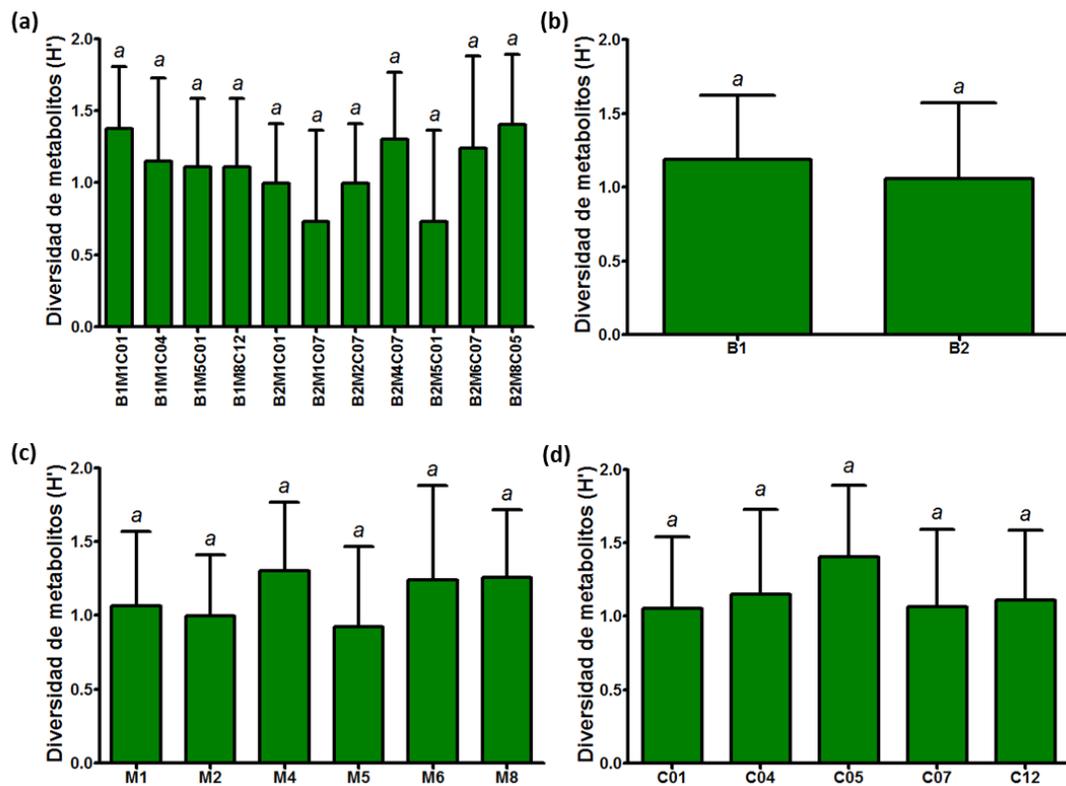


Figura 9 (figura en página anterior). Diversidad de metabolitos de los extractos liquénicos. Muestras compuestas analizadas estadísticamente de manera independiente (a), agrupadas por sitio (b), agrupadas por micobionte (c) y agrupadas por cianobionte (d). Se muestran las medias y los límites de los intervalos de confianza como barras de error. Letras diferentes representan valores significativamente diferentes según la prueba HSD de Tukey ($p \leq 0.05$).

5.3. Cuantificación de la actividad fenoloxidasa de los extractos de líquenes

Utilizando el ensayo de cuantificación de la oxidación del ABTS en microplacas, se determinó el nivel de actividad fenoloxidasa para cada muestra compuesta en duplicado. Los valores variaron desde 9 hasta 113 U/g de proteína total, con un promedio de 60 U/g de proteína total. Con el objetivo de determinar si existen diferencias significativas entre las actividades enzimáticas medidas desde las 11 muestras compuestas, se realizó un ANOVA de una vía con un post Test de Tukey (Figura 10a). Se observa que la actividad de la muestra B1M1C04 (Bosque 1, Micobionte 1, Cianobionte 04) es significativamente menor a la de las muestras B1M8C12, B2M4C07 y B2M8C05 ($p < 0,05$). Debido a que al analizar todas las muestras por separado no se observa un patrón de diferenciación por sitio o componente simbiótico, éstas se agruparon por bosque (Figura 10b), por micobionte (Figura 10c) y por cianobionte (Figura 10d). No se observan diferencias significativas entre bosque 1 y bosque 2 ni entre micobiontes. Sin embargo, al agrupar las muestras según el cianobionte, se observa que las

muestras que contienen al C04 tienen menor actividad fenoloxidasa que las que contienen a C05 y C12.

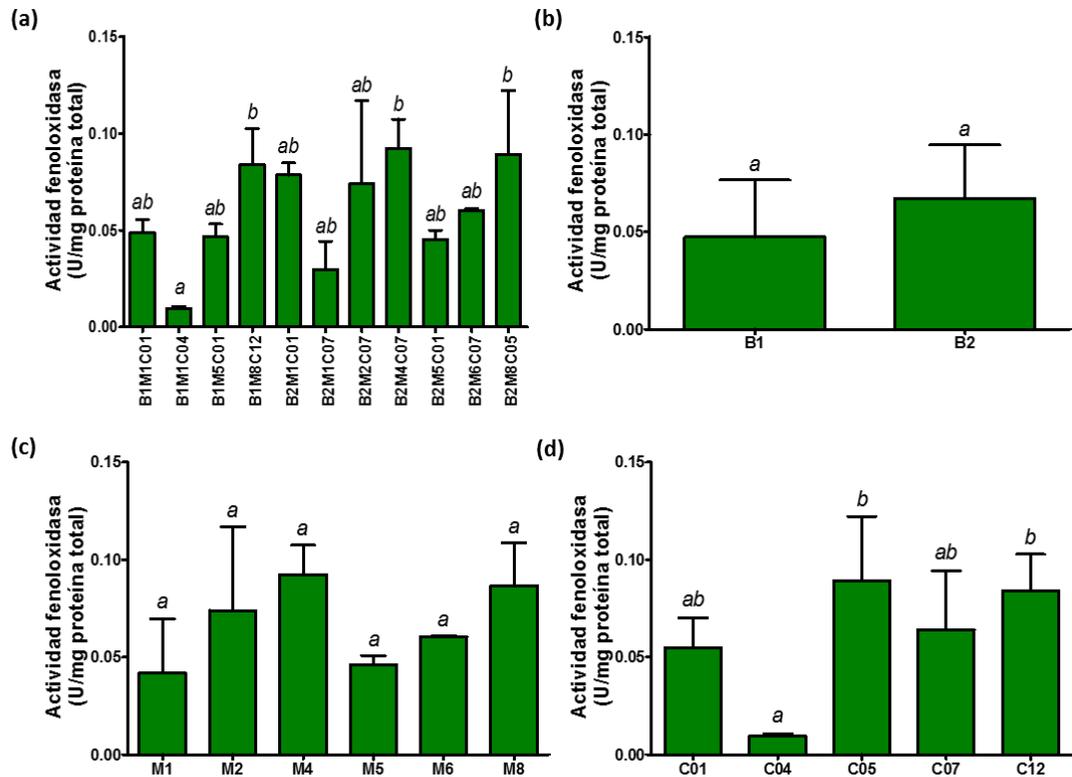


Figura 10. Actividad fenoloxidasa de los extractos liquénicos. Muestras compuestas analizadas estadísticamente de manera independiente (a), agrupadas por sitio (b), agrupadas por micobionte (c) y agrupadas por cianobionte (d). Se muestran las medias y la desviación estándar de las medidas por duplicado. Letras diferentes representan valores significativamente diferentes según la prueba HSD de Tukey ($p \leq 0.05$).

5.4. Determinación de la estructura genética de la comunidad bacteriana asociada a los líquenes y la presente en el sustrato donde ellos crecen

La diversidad genética se determinó mediante TRFLP, para ello se extrajo DNA de cada muestra compuesta, tanto del talo como del sustrato, se amplificó el marcador rRNA 16S con los partidores para bacterias en general y con los partidores que excluyen a las cianobacterias. Luego de purificar los amplicones, se digirieron independientemente con 3 enzimas de restricción distintas (*AluI*, *BstUI* y *HhaI*), obteniendo un electroferograma para cada una de las digestiones, 6 por cada muestra compuesta en total (considerando el talo liquénico y el sustrato). En cada electroferograma, la presencia e intensidad de cada TRF, son indicativos de la riqueza y la abundancia de la comunidad bacteriana, respectivamente.

5.4.1. Determinación de la estructura genética de la comunidad bacteriana asociada al talo liquénico

Los patrones de TRFs de los talos liquénicos entregados por cada enzima de restricción se muestran según su abundancia relativa en la Figura 11, tanto para los fragmentos obtenidos desde la amplificación de bacterias en general (denominados como LB) (Figura 11a) como para los obtenidos con partidores que excluyen cianobacterias (denominados como LsC) (Figura 11b). Se obtuvo

un total de 23 TRFs con las 3 enzimas utilizadas (9 con *AluI*, 7 con *BstUI* y 7 con *HhaI*) para los amplificadores de bacterias en general (LB), y 31 TRFs para el caso de la amplificación que excluye cianobacterias (LsC) (9 con *AluI*, 9 con *BstUI* y 13 con *HhaI*). Los 8 TRFs extras presentes en LsC son los únicos exclusivos de esta amplificación, los otros 23 son los mismos para ambas parejas de partidores, y corresponden a los TRFs B-173, B-577, H-82, H-142, H-234, H-294, H-330 y H-628. Los fragmentos más representados para LB (Figura 11a) fueron B-123, H-66 y A-147, mientras que los con menor abundancia relativa fueron H-381, A-131 y B-84. Para el caso de los fragmentos LsC (Figura 11b) los más abundantes fueron también B-123, H-66 y A-147, y los menos representados B-173, H-330 y A-131. Dos TRFs presentaron una disminución considerable de su representación relativa (a menos del 50%) entre la amplificación LB y LsC, éstos corresponden a los TRFs H-222 y H-125, que disminuyeron de un 3,9% a un 1,1% y desde un 5,8% a un 2,7% de abundancia relativa, respectivamente.

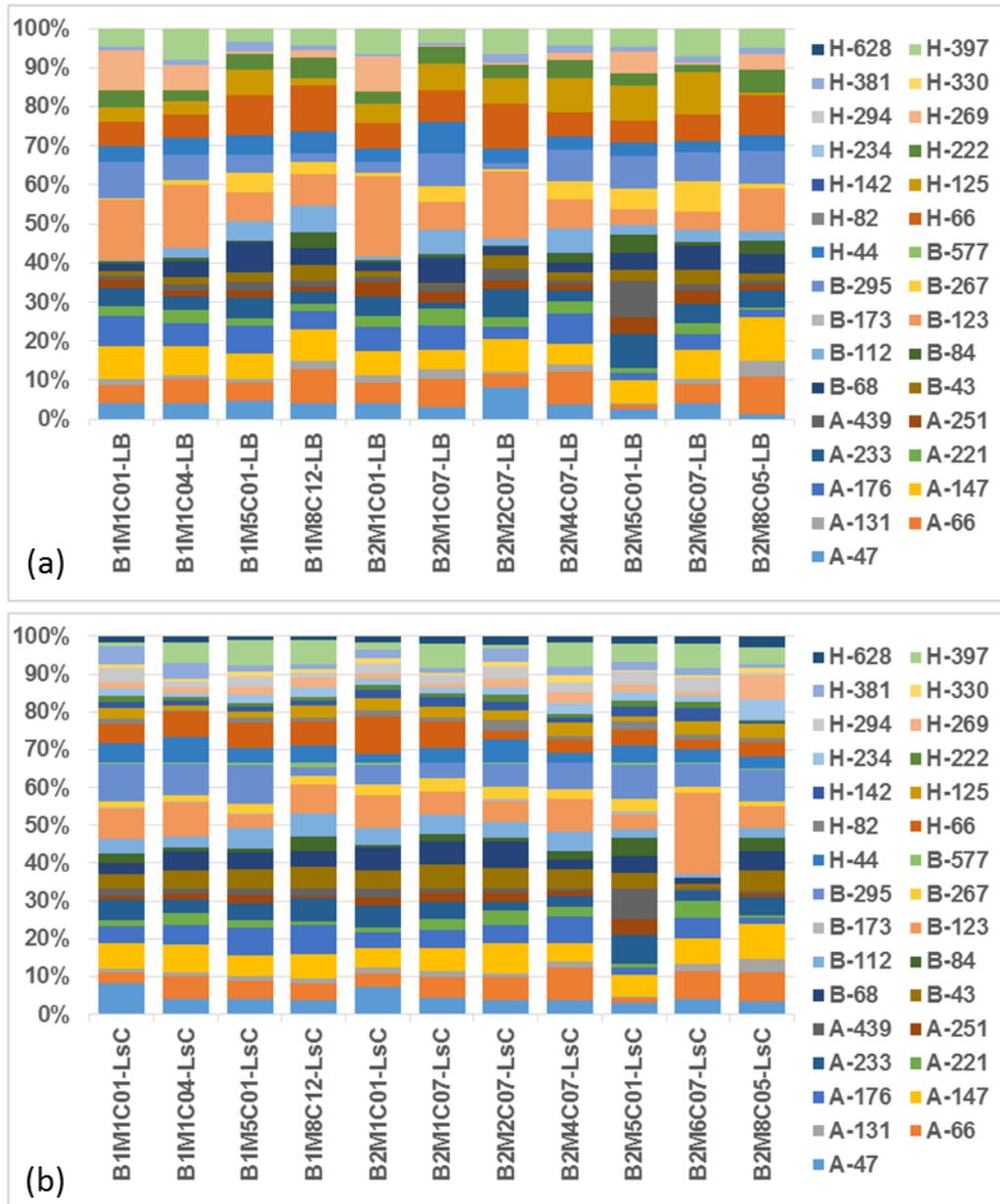


Figura 11. Perfiles de TRFLP obtenidos a partir de las muestras de líquenes con las enzimas de restricción *AluI* (TRFs indicados en la leyenda por una A seguida de un número), *BstI* (TRFs indicados en la leyenda por una B seguida de un número) y *HhaI* (TRFs indicados en la leyenda por una H seguida de un número). (a) Perfiles obtenidos con los partidores para bacterias en general (LB); (b) perfiles obtenidos con los partidores que excluyen cianobacterias (LsC).

En la Figura 12 se muestra el resultado de los análisis de componentes principales (PCA) con los datos obtenidos de las amplificaciones con ambas parejas de partidores, donde se presentan en rojo los patrones provenientes de los amplificadores para bacterias en general y en azul los que excluyen cianobacterias. Al comparar los patrones de TRFLP obtenidos por ambos tipos de amplificaciones mediante ANOSIM, se observa que estos grupos presentan una diferencia significativa ($p=0,0001$), mientras que un análisis de SIMPER entrega una disimilitud de 30,15% entre ellos (Tabla 4). Estos resultados indican que la presencia de cianobacterias influye en la estructura de la comunidad bacteriana, debido probablemente a su alta prevalencia en la muestra de DNA genómico extraído desde el talo liquénico. De los ocho TRFs presentes en las muestras amplificadas con los partidores que excluyen cianobacterias, pero ausentes cuando se utilizan los partidores para bacterias en general (B-173, B-577, H-82, H-142, H-234, H-294, H-330 y H-628), los que presentaron una correlación positiva con el componente 2, a lo largo del cual se separan las muestras, son los TRFs H-628 (0,83), H-234 (0,75) y H-330 (0,74).

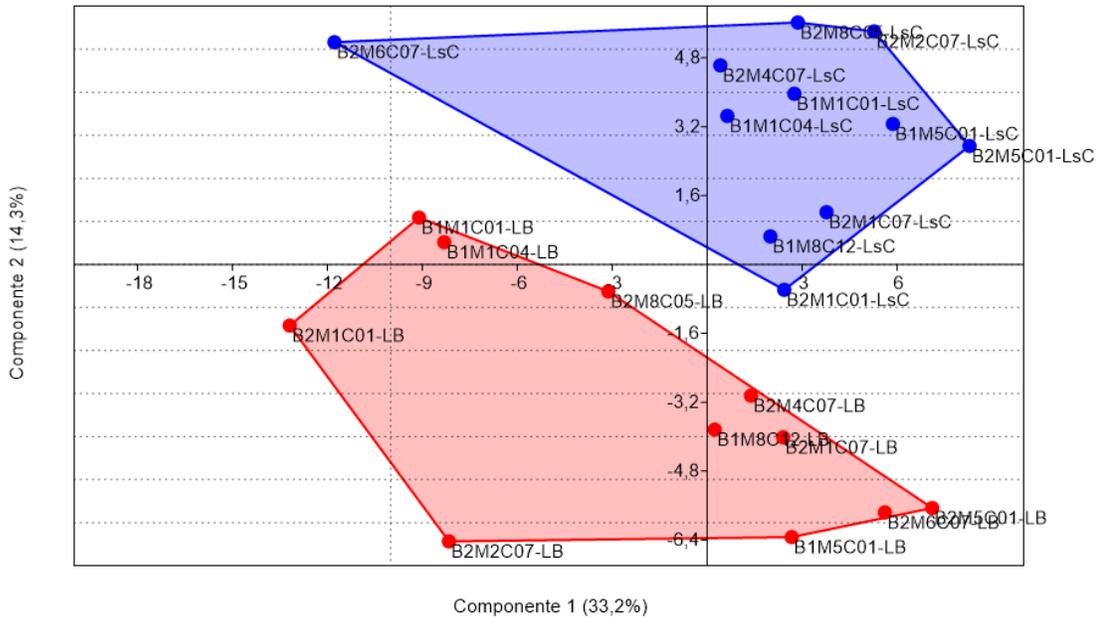


Figura 12. Análisis de componentes principales (PCA) basado en los perfiles de TRFLP obtenidos a partir de las muestras de líquenes con los partidores para bacterias en general (rojo; -LB) y con los partidores que excluyen cianobacterias (azul; -LsC).

Tabla 4. Análisis de similitud de los perfiles de TRFLP obtenidos a partir de las muestras de líquenes con los partidores para bacterias en general (TRFLP-LB) y con los partidores que excluyen cianobacterias (TRFLP-LsC). Los valores de R y p derivan de las comparaciones ANOSIM y los porcentajes de disimilitud de las comparaciones SIMPER; ambos análisis usando el índice de Bray-Curtis.

Muestras	R	p	disimilitud (%)
TRFLP-LB	0,5411	0,0001	32,04
TRFLP-LsC			

5.4.2. Determinación de la estructura genética de la comunidad bacteriana presente en el sustrato

Los patrones de TRFs de los sustratos entregados por cada enzima de restricción se muestran según su abundancia relativa en la Figura 13, tanto para los fragmentos obtenidos desde la amplificación de bacterias en general (denominados como SB) (Figura 13a) como para los obtenidos con partidores que excluyen cianobacterias (denominados como SsC) (Figura 13b). Se obtuvo un total de 16 TRFs con las 3 enzimas utilizadas (6 con *AluI*, 5 con *BstUI* y 5 con *HhaI*) para los amplificadores de bacterias en general (SB), y los mismos TRFs se encontraron para el caso de la amplificación que excluye cianobacterias (SsC). Los fragmentos más representados entre los TRFs-SB (Figura 13a) fueron B-123, H-397 y A-176, mientras que los con menor abundancia relativa fueron A-233, H-269 y B-267. Para el caso de los TRFs-SsC (Figura 13b) los más abundantes fueron B-123, H-66 y A-176, y los menos representados B-43, H-222 y A-233.

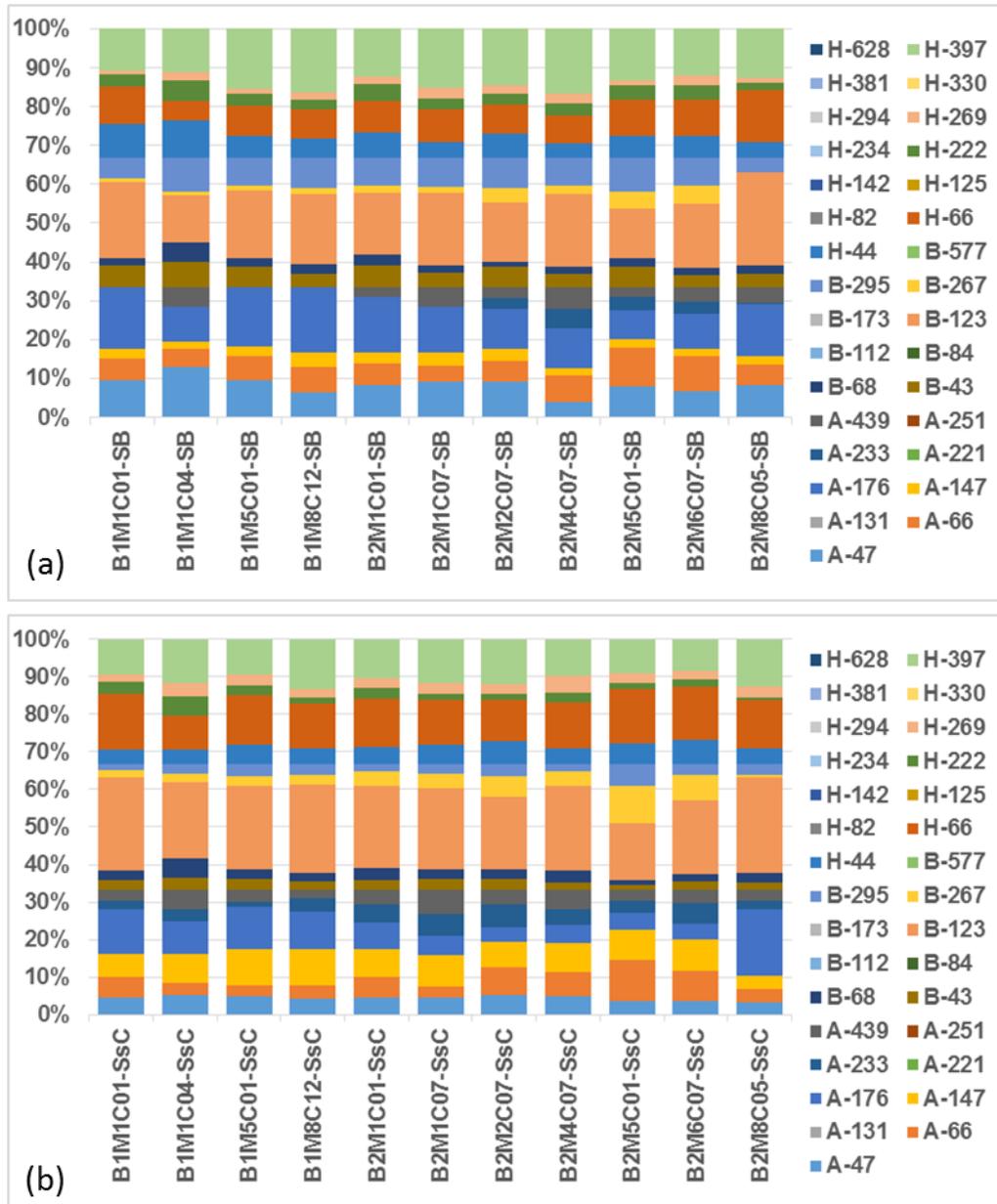


Figura 13. Perfiles de TRFLP obtenidos a partir de las muestras de sustratos de líquenes con las enzimas de restricción *AluI* (TRFs indicados en la leyenda por una A seguida de un número), *BstUI* (TRFs indicados en la leyenda por una B seguida de un número) y *HhaI* (TRFs indicados en la leyenda por una H seguida de un número). (a) Perfiles obtenidos con los partidores para bacterias en general (SB); (b) perfiles obtenidos con los partidores que excluyen cianobacterias (SsC).

En la Figura 14 se muestra el resultado de los análisis de componentes principales (PCA) con los datos obtenidos de ambos tipos de amplificaciones, donde se presentan en rojo los patrones provenientes de los amplificados para bacterias en general y en azul los que excluyen cianobacterias. Al comparar los patrones de TRFLP obtenidos mediante ANOSIM, se observa que estos grupos presentan una diferencia significativa ($p=0,0001$), mientras que un análisis de SIMPER entrega una disimilitud de 24,47% entre los patrones provenientes de las distintas amplificaciones (Tabla 5). Los 3 TRFs que más correlación presentaron con el componente 1, a lo largo del cual se separaron las muestras, fueron B-123 (0,80), A-176 (0,72) y H-66 (0,28).

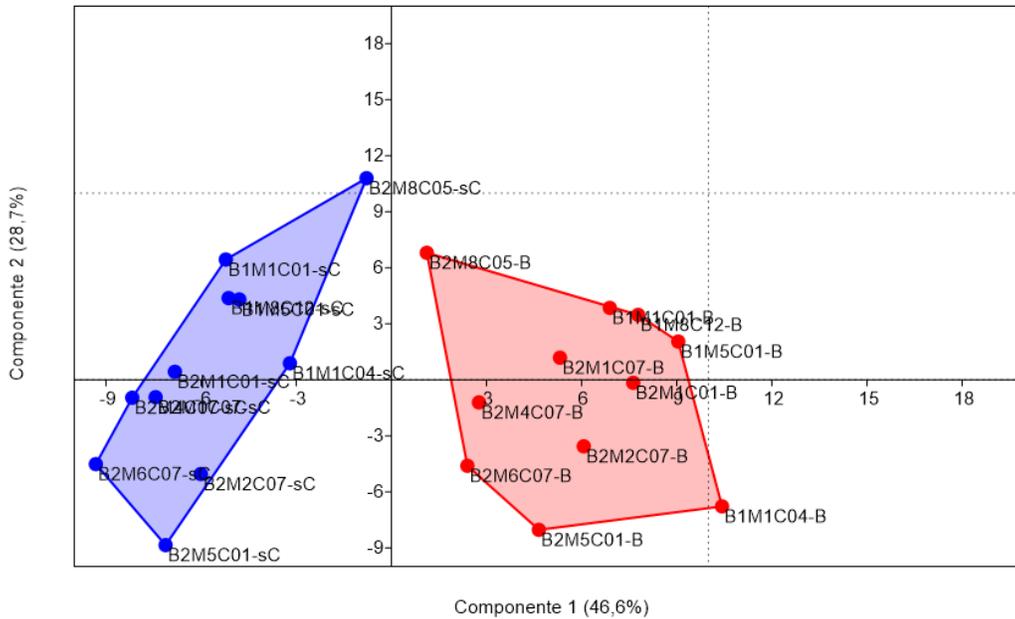


Figura 14. Análisis de componentes principales (PCA) basado en los perfiles de TRFLP obtenidos a partir de las muestras de sustratos de líquenes con los partidores para bacterias en general (rojo; -SB) y con los partidores que excluyen cianobacterias (azul; -SsC).

Tabla 5. Análisis de similitud de los perfiles de TRFLP obtenidos a partir de las muestras de sustratos de líquenes con los partidores para bacterias en general (TRFLP-SB) y con los partidores que excluyen cianobacterias (TRFLP-SsC). Los valores de R y *p* derivan de las comparaciones ANOSIM y los porcentajes de disimilitud de las comparaciones SIMPER; ambos análisis usando el índice de Bray-Curtis.

Muestras	R	<i>p</i>	disimilitud (%)
TRFLP-SB	0,8006	0,0001	24,47
TRFLP-SsC			

5.4.3. Comparación de la estructura genética de la comunidad bacteriana presente en el talo liquénico y en el sustrato

Teniendo en consideración que la amplificación de las muestras de líquenes con partidores para bacterias en general entregó un menor número de TRFs comparado con la otra pareja de partidores, debido probablemente al enmascaramiento producido por la cianobacteria presente como simbiote del liquen, se decidió realizar el análisis comparativo entre liquen y sustrato solo con los datos obtenidos de la amplificación con los partidores que excluyen cianobacterias.

Los patrones de TRFs de los talos liquénicos y de los sustratos entregados por cada enzima de restricción se muestran según su abundancia relativa (Figura 15). Se obtuvieron más TRFs para las muestras provenientes del talo liquénico que para las de sustrato: 31 y 16 fragmentos en total, respectivamente. Se detectaron 15 TRFs presentes únicamente en las muestras de líquenes: A-131, A-221, A251, B-84, B-112, B-173, B-577, H-82, H-125, H-142, H-234, H-294, H-330, H-381 y H-628. De ellos, los más abundantes fueron B-123, A-147 y H-66, y los menos representados B-173, H-330 y A-131. Por otra parte, en el caso del sustrato, los fragmentos más abundantes fueron B-123, A-176 y H-66, y los menos representados B-43, H-222 y A-233.

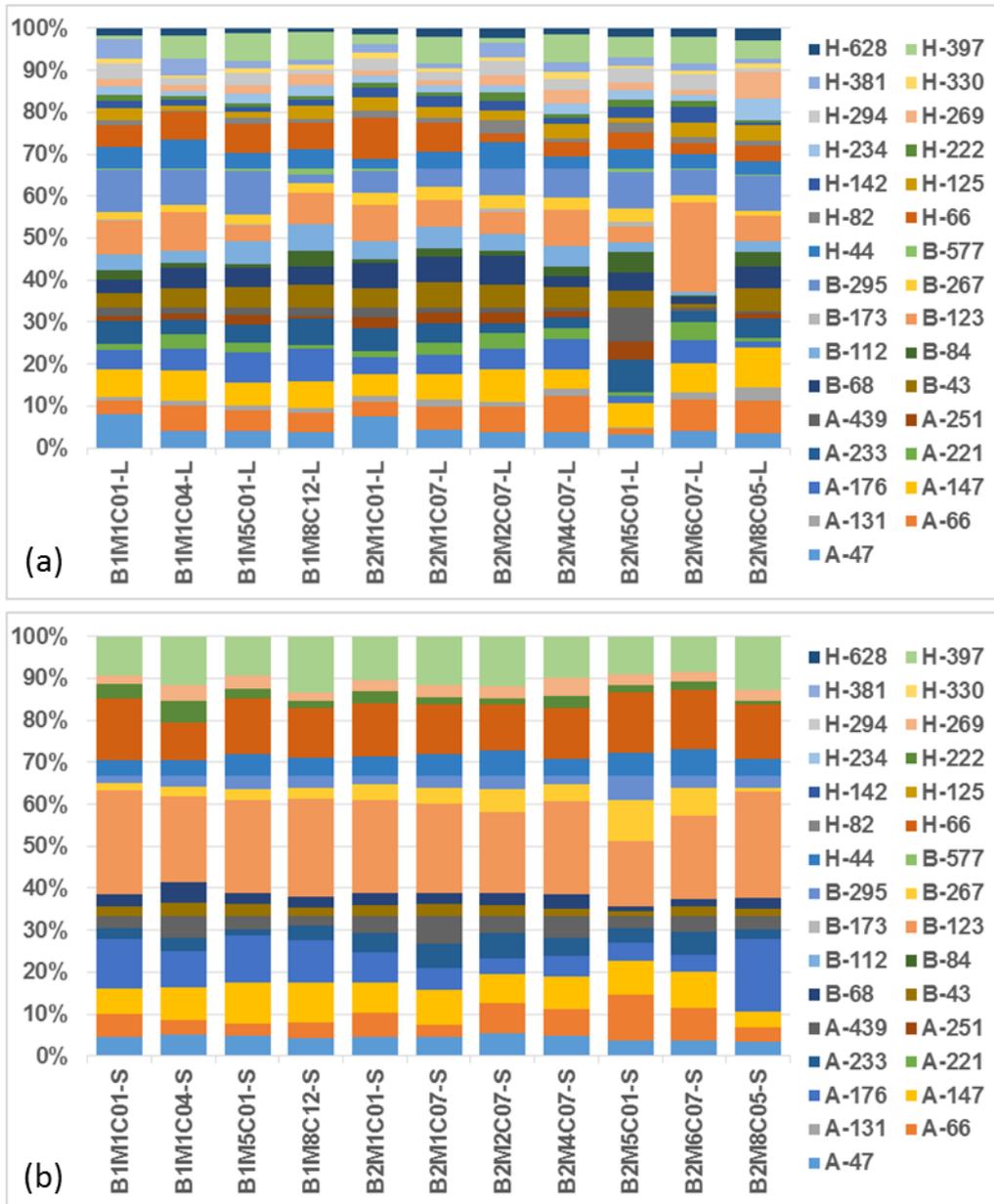


Figura 15. Perfiles de TRFLP provenientes de las muestras de líquenes (a) y sustratos (b) obtenidos utilizando las enzimas de restricción *AluI* (TRFs indicados en la leyenda por una A seguida de un número), *BstI* (TRFs indicados en la leyenda por una B seguida de un número) y *HhaI* (TRFs indicados en la leyenda por una H seguida de un número).

En la Figura 16 se muestra el resultado de los análisis de componentes principales (PCA), donde se presentan en rojo los patrones provenientes del talo liquénico y en azul los obtenidos desde el sustrato. Al comparar los patrones de TRFLP obtenidos mediante ANOSIM, se observa que estos grupos presentan una diferencia significativa ($p=0,0001$), mientras que un análisis de SIMPER entrega una disimilitud de 42,38% entre ellos (Tabla 6).

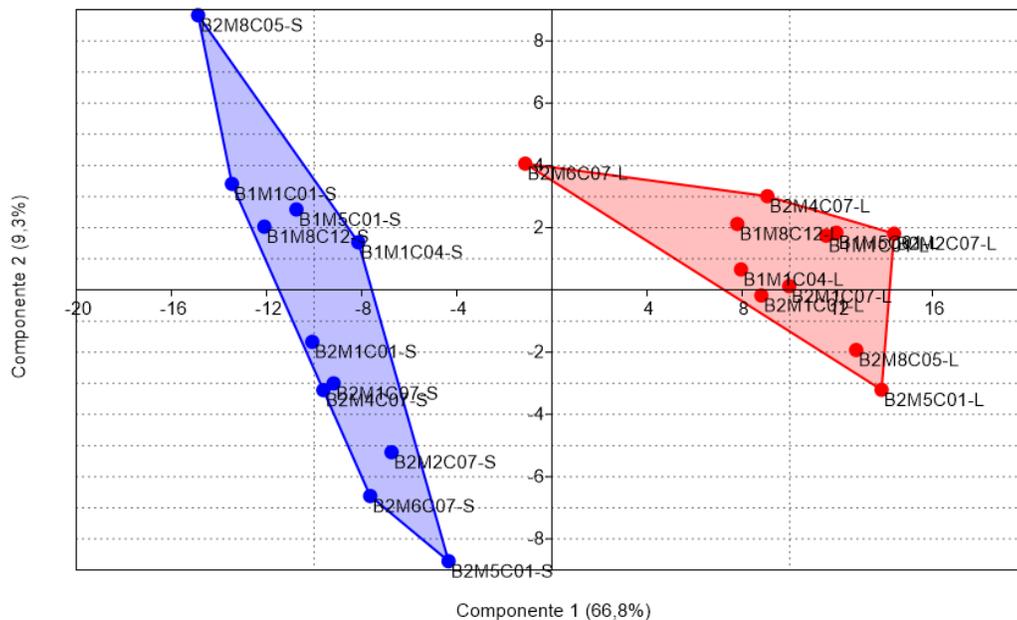


Figura 16. Análisis de componentes principales (PCA) basado en los perfiles de TRFLP obtenidos a partir de las muestras de líquenes (rojo; -L) y sustrato (azul; -S).

Tabla 6. Análisis de similitud de los perfiles de TRFLP obtenidos a partir de las muestras de líquenes (TRFLP-L) y sustratos (TRFLP-S). Los valores de R y p derivan de las comparaciones ANOSIM y los porcentajes de disimilitud de las comparaciones SIMPER; ambos análisis usando el índice de Bray-Curtis.

Muestras	R	p	disimilitud (%)
TRFLP-L	0,9905	0,0001	42,38
TRFLP-S			

Al analizar la similitud por ANOSIM y SIMPER de los patrones de TRFLP, agrupados por bosque (Tabla 7), micobionte (Tabla 8) y cianobionte (Tabla 9), se observan diferencias significativas ($p=0,04$) al agrupar los TRFs provenientes del talo liquénico según el micobionte (Tabla 8), y los provenientes del sustrato al agruparlos según la identidad del cianobionte (Tabla 9). En todos los casos el porcentaje de disimilitud calculado por SIMPER fue, aproximadamente, de un 24% para las muestras de líquenes y de un 15% para las del sustrato.

Tabla 7. Análisis de similitud de los perfiles de TRFLP obtenidos a partir de las muestras de líquenes (TRFLP-L) y sustratos (TRFLP-S), agrupados por bosque. Los valores de R y p derivan de las comparaciones ANOSIM y los porcentajes de disimilitud de las comparaciones SIMPER; ambos análisis usando el índice de Bray-Curtis.

Muestras	R	p	disimilitud (%)
TRFLP-L-B1			
TRFLP-L-B2	-0,1429	0,81	23,22
TRFLP-S-B1			
TRFLP-S-B2	0,1984	0,10	15,37

Tabla 8. Análisis de similitud de los perfiles de TRFLP obtenidos a partir de las muestras de líquenes (TRFLP-L) y sustratos (TRFLP-S), agrupados por micobionte. Los valores de R y p derivan de las comparaciones ANOSIM y los porcentajes de disimilitud de las comparaciones SIMPER; ambos análisis usando el índice de Bray-Curtis.

Muestras	R	p	disimilitud (%)
TRFLP-L-M1			
TRFLP-L-M2			
TRFLP-L-M4	0,4734	0,04	24,78
TRFLP-L-M5			
TRFLP-L-M6			
TRFLP-L-M8			
TRFLP-S-M1			
TRFLP-S-M2			
TRFLP-S-M4	0,2340	0,18	15,05
TRFLP-S-M5			
TRFLP-S-M6			
TRFLP-S-M8			

Tabla 9. Análisis de similitud de los perfiles de TRFLP obtenidos a partir de las muestras de líquenes (TRFLP-L) y sustratos (TRFLP-S), agrupados por cianobionte. Los valores de R y p derivan de las comparaciones ANOSIM y los porcentajes de disimilitud de las comparaciones SIMPER; ambos análisis usando el índice de Bray-Curtis.

Muestras	R	p	disimilitud (%)
TRFLP-L-C01			
TRFLP-L-C04			
TRFLP-L-C05	0,1705	0,20	24,50
TRFLP-L-C07			
TRFLP-L-C12			
TRFLP-S-C01			
TRFLP-S-C04			
TRFLP-S-C05	0,3798	0,04	15,50
TRFLP-S-C07			
TRFLP-S-C12			

5.5. Determinación de la estructura metabólica de la comunidad bacteriana asociada a los líquenes y la presente en el sustrato donde ellos crecen

A partir de los datos de utilización de las fuentes de carbono disponibles en las placas EcoPlate (BioLog), se obtuvieron las curvas de absorbancia promedio total vs. el tiempo de incubación y se ajustaron según el modelo de Gompertz modificado (Figura 17), para determinar la lectura de las placas a la cual la utilización de las fuentes de carbono por las comunidades se encontraba en la etapa exponencial, y realizar con esos datos los análisis posteriores.

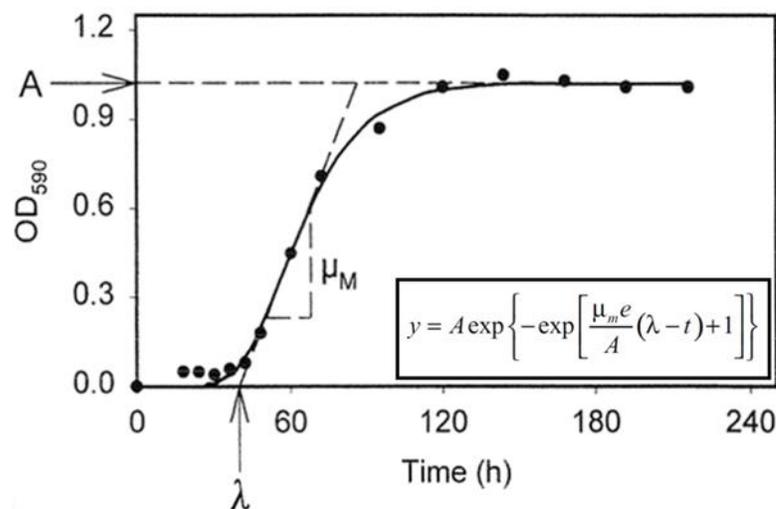


Figura 17. Ejemplo de la curva de desarrollo de color en las placas EcoPlate (Biolog) en el tiempo, ajustada según el modelo de Gompertz modificado (inserto). A, absorbancia máxima; μ_M , tasa máxima de desarrollo de color; λ , tiempo de latencia (fase lag). Modificada de: Verschueren *et al.*, 1998.

Dicho análisis permitió determinar que a las 48 h, todas las comunidades se encontraban en la etapa exponencial. Al comparar los parámetros cinéticos λ (tiempo de latencia), μ_M (tasa máxima de desarrollo de color) y A (absorbancia máxima) de la comunidad bacteriana asociada a los líquenes y la presente en los sustratos, se observó que solo en un caso ambas comunidades bacterianas (la asociada al talo liquénico vs. la asociada al sustrato) presentaban diferencias en estos tres parámetros (B2M4C07); mientras que en la mayoría de las muestras las diferencias se presentaron en μ_M y en A, pero no en λ (Figura 18). Para el caso de A en el bosque 1 no se obtuvieron diferencias entre las comunidades de liquen o sustrato, mientras que para el bosque 2 este valor fue siempre mayor en el sustrato. Al comparar μ_M se observó que 5 de las 7 muestras del bosque 2 mostraron un valor mayor para los sustratos, mientras que en 2 muestras del bosque 1 se observa que μ_M es mayor para la comunidad proveniente del liquen. Por último, el parámetro λ fue diferente para las comunidades del liquen y del sustrato solo en una muestra del bosque 2 (B2M4C07), siendo mayor para el caso del primero. Al realizar esta misma comparación considerando un mismo parámetro para todas las muestras de cada comunidad, se observaron numerosas diferencias, excepto para el λ de las comunidades asociadas al talo liquénico (Tabla 10).

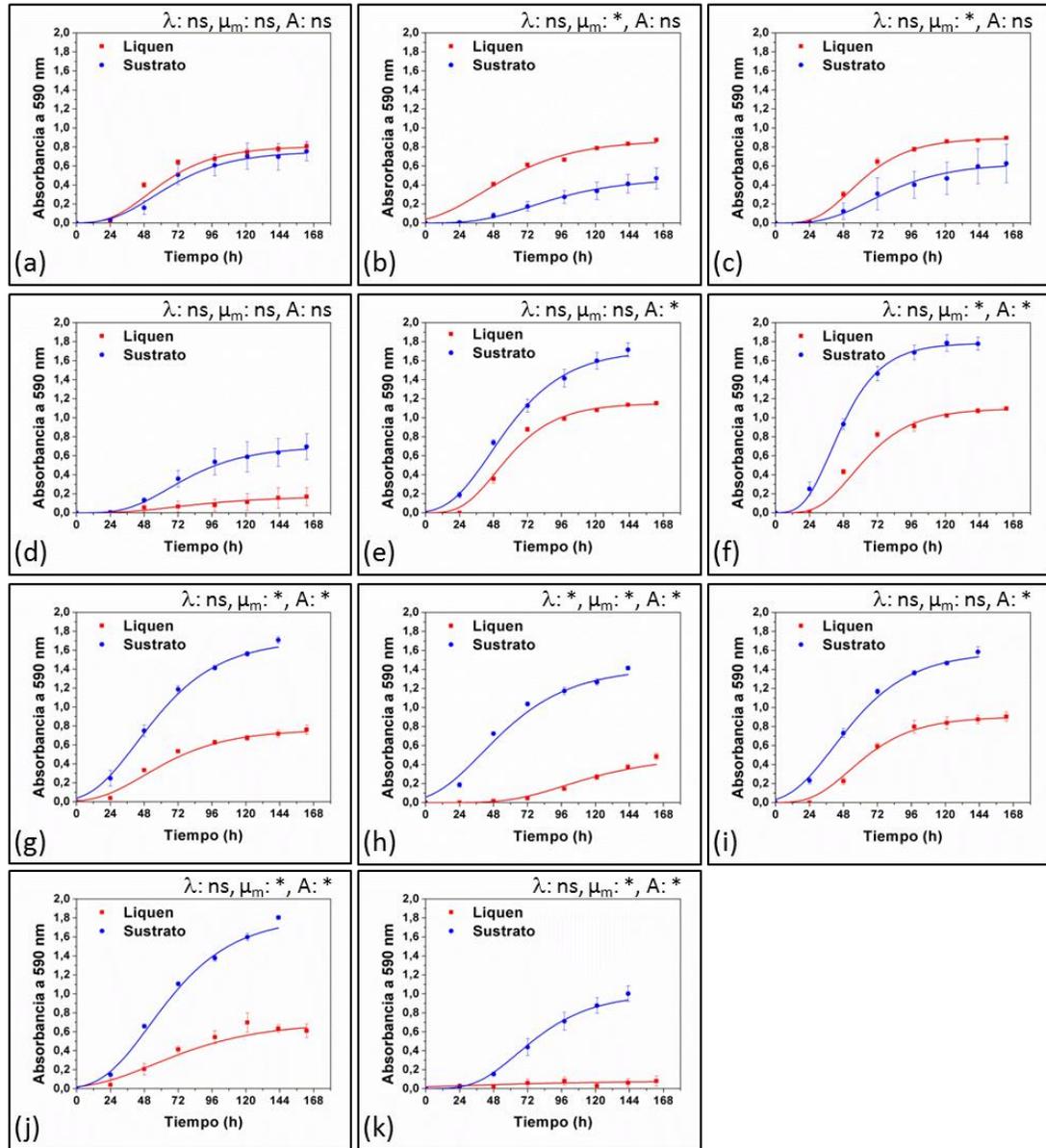


Figura 18. Curvas de desarrollo de color en las placas EcoPlate (Biolog) en el tiempo, ajustadas según el modelo de Gompertz modificado. λ , tiempo de latencia (fase lag); μ_m , tasa máxima de desarrollo de color; A, absorbancia máxima. (a) B1M1C01, (b) B1M1C04, (c) B1M5C01, (d) B1M8C12, (e) B2M1C01, (f) B2M1C07, (g) B2M2C07, (h) B2M4C07, (i) B2M5C01, (j) B2M6C07, (k) B2M8C05. Se indican con un asterisco los valores significativamente diferentes ($p \leq 0.05$) para cada uno de los parámetros al comparar las cinéticas de los líquenes (rojo) y los sustratos (azul) (ANOVA).

Tabla 10. Parámetros cinéticos calculados a partir de las curvas de desarrollo de color en las placas EcoPlate (Biolog) en el tiempo, ajustadas según el modelo de Gompertz modificado. A, absorbancia máxima; μ_m , tasa máxima de desarrollo de color; λ , tiempo de latencia (fase lag). Se muestran las medias y la desviación estándar de las medidas por triplicado. Letras diferentes de una misma columna representan valores significativamente diferentes según la prueba HSD de Tukey ($p \leq 0.05$).

	A	μ_m	λ
Muestra	Liquen		
B1M1C01	0,76±0,03 abd	0,02±0,00 af	25,56± 0,19 a
B1M1C04	0,83±0,02 ad	0,01±0,00 aef	22,02± 0,70 a
B1M5C01	0,88±0,01 ad	0,02±0,00 aef	29,63± 3,04 a
B1M8C12	0,39±0,43 bc	0,00±0,00 b	63,11±73,04 a
B2M1C01	1,12±0,01 d	0,02±0,00 c	32,65± 3,65 a
B2M1C07	1,06±0,01 ad	0,02±0,00 ac	26,81± 1,17 a
B2M2C07	0,73±0,03 abd	0,01±0,00 fg	20,60± 0,78 a
B2M4C07	0,84±0,18 ad	0,01±0,00 bdg	73,57± 3,23 a
B2M5C01	0,89±0,05 ad	0,02±0,00 afh	34,12± 2,99 a
B2M6C07	0,66±0,04 ab	0,01±0,00 degh	26,72±10,17 a
B2M8C05	0,07±0,05 c	0,00±0,00 bd	30,05±35,47 a
Muestra	Sustrato		
B1M1C01	0,73±0,12 a	0,02±0,01 aef	36,53± 4,80 a
B1M1C04	0,64±0,29 a	0,00±0,00 bcg	35,00± 13,42 ab
B1M5C01	0,68±0,20 a	0,01±0,00 bcg	32,49± 11,67 abcd
B1M8C12	0,69±0,12 a	0,01±0,00 acg	32,68± 8,06 abcd
B2M1C01	1,76±0,08 b	0,02±0,00 e	15,13± 0,12 cf
B2M1C07	1,81±0,07 b	0,03±0,00 d	17,43± 3,91 bcde
B2M2C07	1,72±0,04 bc	0,02±0,00 e	13,27± 3,86 ef
B2M4C07	1,36±0,01 cd	0,02±0,00 e	14,11± 2,21 bdf
B2M5C01	1,58±0,04 bc	0,02±0,00 e	14,24± 1,82 df
B2M6C07	1,88±0,02 b	0,02±0,00 ef	17,35± 0,45 bcf
B2M8C05	1,15±0,13 d	0,01±0,00 fg	36,99± 1,26 a

El porcentaje relativo al que contribuye el promedio de absorbancia para cada fuente de carbono a las 48 h se graficó en la Figura 19 tanto para las muestras obtenidas del talo liquénico (Figura 19a) como para las del sustrato (Figura 19b). Para el caso de las comunidades obtenidas del talo liquénico las fuentes más consumidas, en promedio, fueron L-Serina, L-Asparagina y D-Manitol, mientras que las menos consumidas fueron α -D-Lactosa, i-Eritritol y α -Ciclodextrina. Al revisar el consumo de las comunidades provenientes del sustrato, las fuentes más consumidas fueron también L-Serina, L-Asparagina y D-Manitol, y las menos consumidas fueron α -Ciclodextrina, L-Fenilalanina y D-Ácido málico.

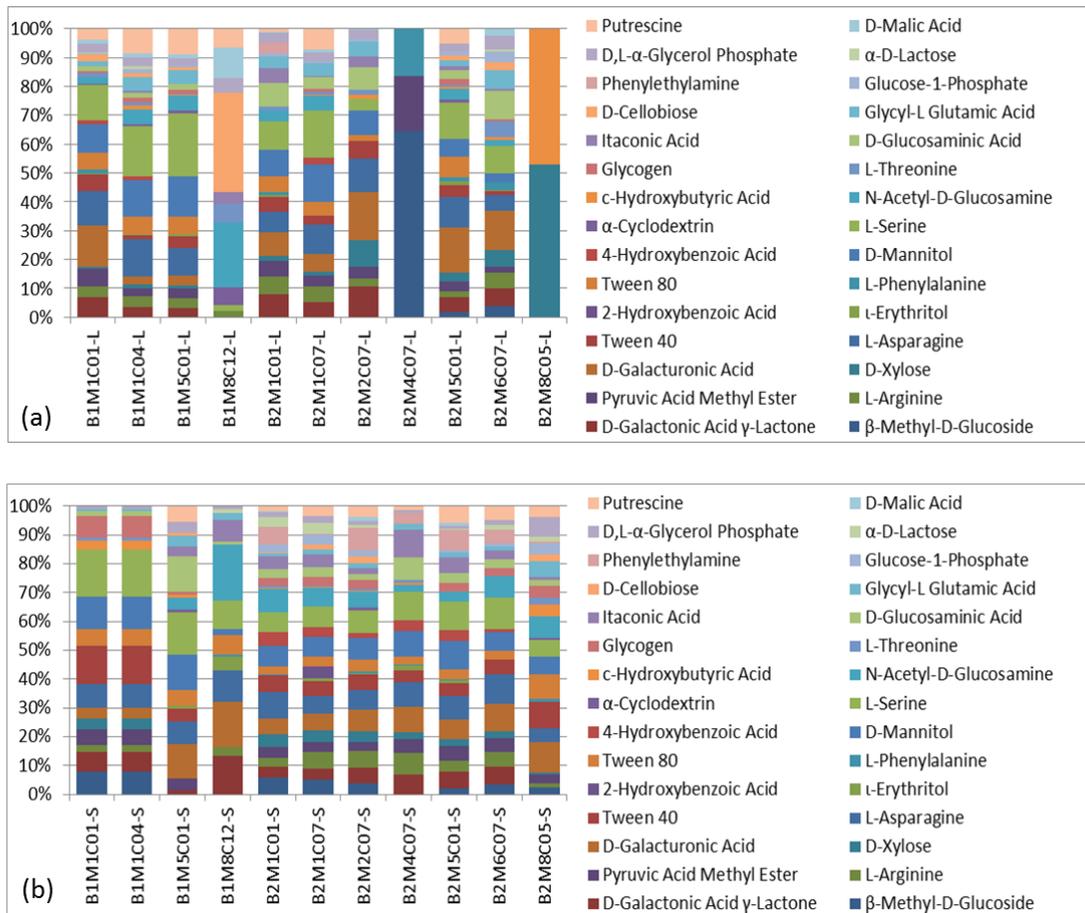


Figura 19. Perfiles de CLPP obtenidos a partir de las muestras de (a) líquenes (-L) y (b) sustratos (-S). En la leyenda se indican las diferentes fuentes de carbono ensayadas. Se muestran las medias de los ensayos por triplicado luego de 48 h de incubación de las placas.

Los niveles de consumo de cada fuente de carbono se analizaron en un gráfico de componentes principales (Figura 20) donde se muestran en rojo los patrones provenientes de las muestras de liquen y en azul las de sustrato, cabe destacar que el análisis de similitud por ANOSIM no mostró diferencias significativas entre estos grupos (Tabla 11), aunque sí un alto porcentaje de disimilitud por SIMPER (59,79%). Sin embargo, al realizar esta misma comparación separando según el

bosque del que provenían las muestras se obtienen diferencias significativas entre líquen y sustrato en ambos casos, con porcentajes aproximados de disimilitud de 63% ($p=0,03$) para el bosque 1 y 61% ($p=0,01$) para el bosque 2.

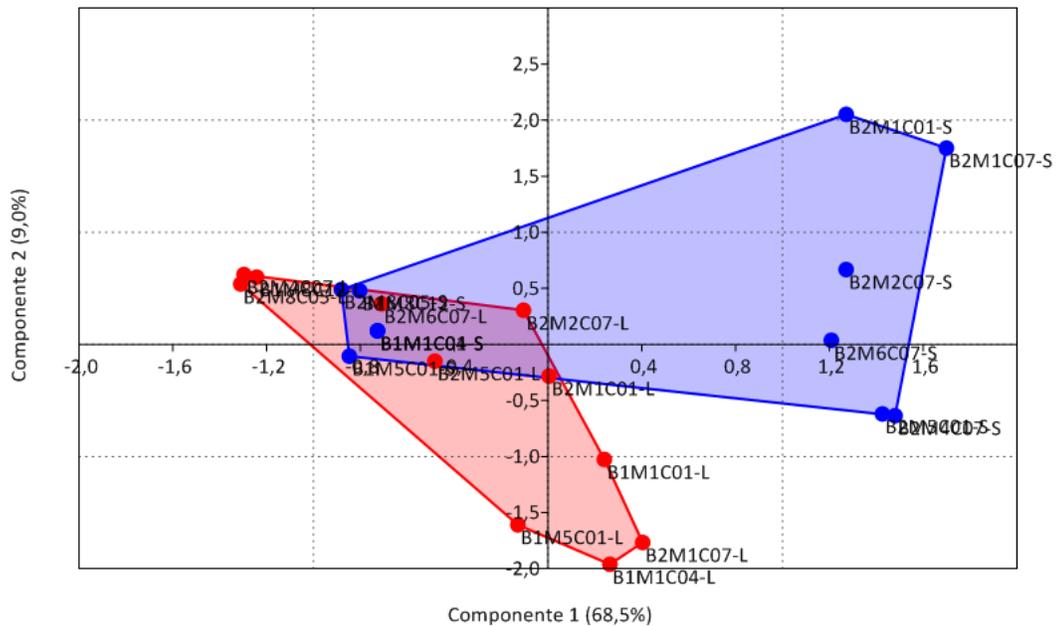


Figura 20. Análisis de componentes principales (PCA) basado en los perfiles de CLPP obtenidos a partir de las muestras de líquenes (rojo; -L) y sustrato (azul; -S).

Tabla 11. Análisis de similitud de los perfiles de CLPP obtenidos a partir de las muestras de líquenes (CLPP-L) y sustratos (CLPP-S). Los valores de R y p derivan de las comparaciones ANOSIM y los porcentajes de disimilitud de las comparaciones SIMPER; ambos análisis usando el índice de Bray-Curtis.

Muestras	R	p	disimilitud (%)
CLPP-L	0,0364	0,1581	59,79
CLPP-S			

Estos datos se analizaron por SIMPER y ANOSIM agrupándolos por bosque (Tabla 12), micobionte (Tabla 13) o cianobionte (Tabla 14). El análisis de ANOSIM mostró diferencias significativas al comparar los perfiles metabólicos de las muestras agrupadas por bosque, aunque solo en las correspondientes al sustrato, lo que indica que las características metabólicas de esta comunidad bacteriana son más bien dependientes del ambiente. También se observaron diferencias significativas al agrupar las muestras por micobionte para los perfiles metabólicos de las muestras de líquen, indicando que la identidad del micobionte es un factor determinante del consumo metabólico de la comunidad bacteriana íntimamente asociada al talo líquénico. Por otra parte, el análisis de SIMPER entregó porcentajes de similitud cercanos al 60% en promedio, y analizando cada agrupamiento por separado, se observa que al agrupar por bosque existe una disimilitud similar en las muestras de líquenes y en las de sustrato (Tabla 12), mientras que al agrupar por micobionte (Tabla 13) y cianobionte (Tabla 14) este porcentaje es aproximadamente un 15% mayor para el caso de los líquenes.

Tabla 12. Análisis de similitud de los perfiles de CLPP obtenidos a partir de las muestras de líquenes (CLPP-L) y sustratos (CLPP-S), agrupados por bosque. Los valores de R y *p* derivan de las comparaciones ANOSIM y los porcentajes de disimilitud de las comparaciones SIMPER; ambos análisis usando el índice de Bray-Curtis.

Muestras	R	<i>p</i>	disimilitud (%)
CLPP-L-B1	-0,0053	0,43	62,63
CLPP-L-B2			
CLPP-S-B1	0,6958	0,01	65,49
CLPP-S-B2			

Tabla 13. Análisis de similitud de los perfiles de CLPP obtenidos a partir de las muestras de líquenes (CLPP-L) y sustratos (CLPP-S), agrupados por micobionte. Los valores de R y *p* derivan de las comparaciones ANOSIM y los porcentajes de disimilitud de las comparaciones SIMPER; ambos análisis usando el índice de Bray-Curtis.

Muestras	R	<i>p</i>	disimilitud (%)
CLPP-L-M1	0,6436	0,01	68,33
CLPP-L-M2			
CLPP-L-M4			
CLPP-L-M5			
CLPP-L-M6			
CLPP-L-M8			
CLPP-S-M1			
CLPP-S-M2			
CLPP-S-M4	-0,0213	0,50	51,47
CLPP-S-M5			
CLPP-S-M6			
CLPP-S-M8			

Tabla 14. Análisis de similitud de los perfiles de CLPP obtenidos a partir de las muestras de líquenes (CLPP-L) y sustratos (CLPP-S), agrupados por cianobionte. Los valores de R y *p* derivan de las comparaciones ANOSIM y los porcentajes de disimilitud de las comparaciones SIMPER; ambos análisis usando el índice de Bray-Curtis.

Muestras	R	<i>p</i>	disimilitud (%)
CLPP-L-C01			
CLPP-L-C04			
CLPP-L-C05	0,2868	0,10	67,34
CLPP-L-C07			
CLPP-L-C12			
CLPP-S-C01			
CLPP-S-C04			
CLPP-S-C05	0,3081	0,09	54,62
CLPP-S-C07			
CLPP-S-C12			

5.6. Relación entre los metabolitos, la actividad fenoloxidasa y la estructura de las comunidades bacterianas asociadas a los líquenes

5.6.1. Correlación de la producción de metabolitos con la estructura genética y metabólica de las comunidades bacterianas asociadas a los líquenes y el sustrato donde ellos crecen

Con el objetivo de determinar si existe una relación entre la producción de metabolitos y la estructura de las comunidades bacterianas, se correlacionaron los índices de diversidad de Shannon calculados tanto para la estructura genética como metabólica (variables dependientes), con los datos de la diversidad de producción de metabolitos (variable independiente) medidos para cada muestra compuesta.

En la Tabla 15, se observa que existe una correlación entre la producción de metabolitos y la estructura genética de las comunidades bacterianas analizadas mediante los perfiles de TRFLP tanto asociada al líquen (TRFLP-L) como la presente en el sustrato (TRFLP-S). No se observa una correlación con los índices de diversidad calculados para los datos de CLPP desde líquenes (CLPP-L) ni desde los sustratos donde ellos crecen (CLPP-S).

Tabla 15. Valores de las correlaciones lineales entre la diversidad de metabolitos (variable independiente) y los índices de diversidad de Shannon (variables dependientes) calculados para los perfiles de TRFLP y de CLPP obtenidos a partir de las muestras de líquenes (TRFLP-L y CLPP-L, respectivamente) y sustratos (TRFLP-S y CLPP-S, respectivamente).

Variable	Pendiente	Error	Intercepto	Error	R	p
TRFLP-L	-0,30	0,09	3,54	0,11	-0,7591	0,0067
TRFLP-S	-0,24	0,10	2,80	0,01	-0,6124	0,0452
CLPP-L	-1,10	1,23	3,75	1,62	-0,2848	0,3960
CLPP-S	-0,63	0,36	3,64	0,48	-0,4968	0,1201

Para determinar con más detalle si algunas fuentes de carbono pudieran dar cuenta de alguna correlación, las fuentes de carbono incluidas en las placas EcoPlate (Biolog), se agruparon en fuentes con nitrógeno (cN) y sin nitrógeno (sN); asimismo, las fuentes no nitrogenadas se dividieron en 3 subgrupos: carbohidratos (CH), ácidos carboxílicos (AC) y otros (O) (Figura 21).

Control	β -Metil-D-Glucósido	γ -Lactona de Ácido D-Galactónico	L-Arginina
Metil Éster de Ácido Pirúvico	D-Xilosa	Ácido D-Galacturónico	L-Asparagina
Tween 40	<i>l</i> -Eritritol	Ácido 2-Hidroxibenzoico	L-Fenilalanina
Tween 80	D-Manitol	Ácido 4-Hidroxibenzoico	L-Serina
α -Ciclodextrina	N-Acetil-D-Glucosamina	Ácido γ -Hidroxibutírico	L-Treonina
Glicógeno	Ácido D-Glucosamínico	Ácido Itacónico	Ácido Glicil-L Glutámico
D-Celobiosa	Glucosa-1-Fosfato	Ácido α -Cetobutírico	Feniletilamina
α -D-Lactosa	D,L- α -Glicerol Fosfato	Ácido D-Málico	Putrescina

Figura 21. Clasificación de las fuentes de carbono disponibles en las placas EcoPlate (Biolog). Violeta: fuentes nitrogenadas; Verde: fuentes no nitrogenadas (verde oscuro: carbohidratos, verde intermedio: ácidos carboxílicos, verde claro: otras fuentes no nitrogenadas).

En la Tabla 16 se observa que no existe correlación al agrupar las fuentes con ni sin nitrógeno; aunque al analizar estas últimas por sub-categorías, se observa una correlación negativa significativa entre la diversidad de los ácidos carboxílicos consumidos y la diversidad de metabolitos detectada en los extractos liquénicos (Tabla 17).

Tabla 16. Valores de las correlaciones lineales entre la diversidad de metabolitos (variable independiente) y los índices de diversidad de Shannon (variables dependientes) calculados para los perfiles de CLPP obtenidos a partir de las muestras de líquenes (CLPP-L) y sustratos (CLPP-S) considerando las categorías de fuentes de carbono nitrogenadas (cN) y no nitrogenadas (sN).

Variable	Pendiente	Error	Intercepto	Error	R	p
CLPP-L-sN	-0,79	1,07	2,89	1,41	-0,2391	0,4789
CLPP-L-cN	-0,02	0,35	1,82	0,47	-0,0223	0,9480
CLPP-S-sN	-0,69358	0,39327	3,2893	0,51679	-0,50679	0,1116
CLPP-S-cN	-0,50873	0,46844	2,4513	0,61557	-0,34039	0,3057

Tabla 17. Valores de las correlaciones lineales entre la diversidad de metabolitos (variable independiente) y los índices de diversidad de Shannon (variables dependientes) calculados para los perfiles de CLPP obtenidos a partir de las muestras de líquenes (CLPP-L) y sustratos (CLPP-S) considerando las sub-categorías de fuentes de carbono no nitrogenadas (CH: carbohidratos; AC: ácidos carboxílicos; O: otros).

Variable	Pendiente	Error	Intercepto	Error	R	p
CLPP-L-CH	-0,05	0,67	1,03	0,88	-0,0250	0,9418
CLPP-L-AC	-0,23	0,44	1,42	0,58	-0,1691	0,6191
CLPP-L-O	-0,36	0,39	1,88	0,51	-0,3002	0,3697
CLPP-S-CH	-0,48	0,49	1,78	0,64	-0,3119	0,3504
CLPP-S-AC	-1,12	0,23	2,69	0,31	-0,8477	0,0010
CLPP-S-O	-0,43	0,62	2,07	0,81	-0,2257	0,5046

5.6.2. Correlación de la actividad fenoloxidasa con la estructura genética y metabólica de las comunidades bacterianas asociadas a los líquenes y el sustrato donde ellos crecen

Con el objetivo de determinar si existe una relación entre la actividad enzimática medida y la estructura de las comunidades bacterianas, se correlacionaron los índices de diversidad de Shannon calculados tanto para la estructura genética como metabólica (variables dependientes), con los datos de la actividad fenoloxidasa (variable independiente) medidos para cada muestra compuesta.

En la Tabla 18, se observa que no existe una correlación entre la actividad enzimática y la estructura genética de las comunidades bacterianas analizadas mediante los perfiles de TRFLP; sin embargo, al correlacionar la actividad fenoloxidasa con la estructura metabólica, se observa una correlación negativa significativa entre los índices de diversidad calculados para los datos de CLPP desde líquenes (CLPP-L) pero no para aquellos medidos desde los sustratos donde ellos crecen (CLPP-S).

Tabla 18. Valores de las correlaciones lineales entre la actividad fenoloxidasa (variable independiente) y los índices de diversidad de Shannon (variables dependientes) calculados para los perfiles de TRFLP y CLPP obtenidos a partir de las muestras de líquenes (TRFLP-L y CLPP-L, respectivamente) y sustratos (TRFLP-S y CLPP-S, respectivamente).

Variable	Pendiente	Error	Intercepto	Error	R	<i>p</i>
TRFLP-L	0,00	1,03	3,16	0,07	0,0015	0,9965
TRFLP-S	-0,18	0,95	2,56	0,06	-0,3818	0,2466
CLPP-L	-20,30	7,58	3,54	0,49	-0,6659	0,0253
CLPP-S	1,08	3,31	2,76	0,21	0,1087	0,7503

Para determinar con más detalle las fuentes que pudieran dar cuenta de esta relación, las fuentes de carbono incluidas en las placas EcoPlate (Biolog), se agruparon en fuentes con nitrógeno (cN) y sin nitrógeno (sN); asimismo, las fuentes no nitrogenadas se dividieron en 3 subgrupos: carbohidratos (CH), ácidos carboxílicos (AC) y otros (O) (Figura 21).

En la Tabla 19 se observa que existe una correlación negativa significativa entre la actividad enzimática y la estructura metabólica relacionada con el consumo de las fuentes no nitrogenadas, aunque al analizar estas últimas por sub-categorías no se observa una correlación significativa (Tabla 20).

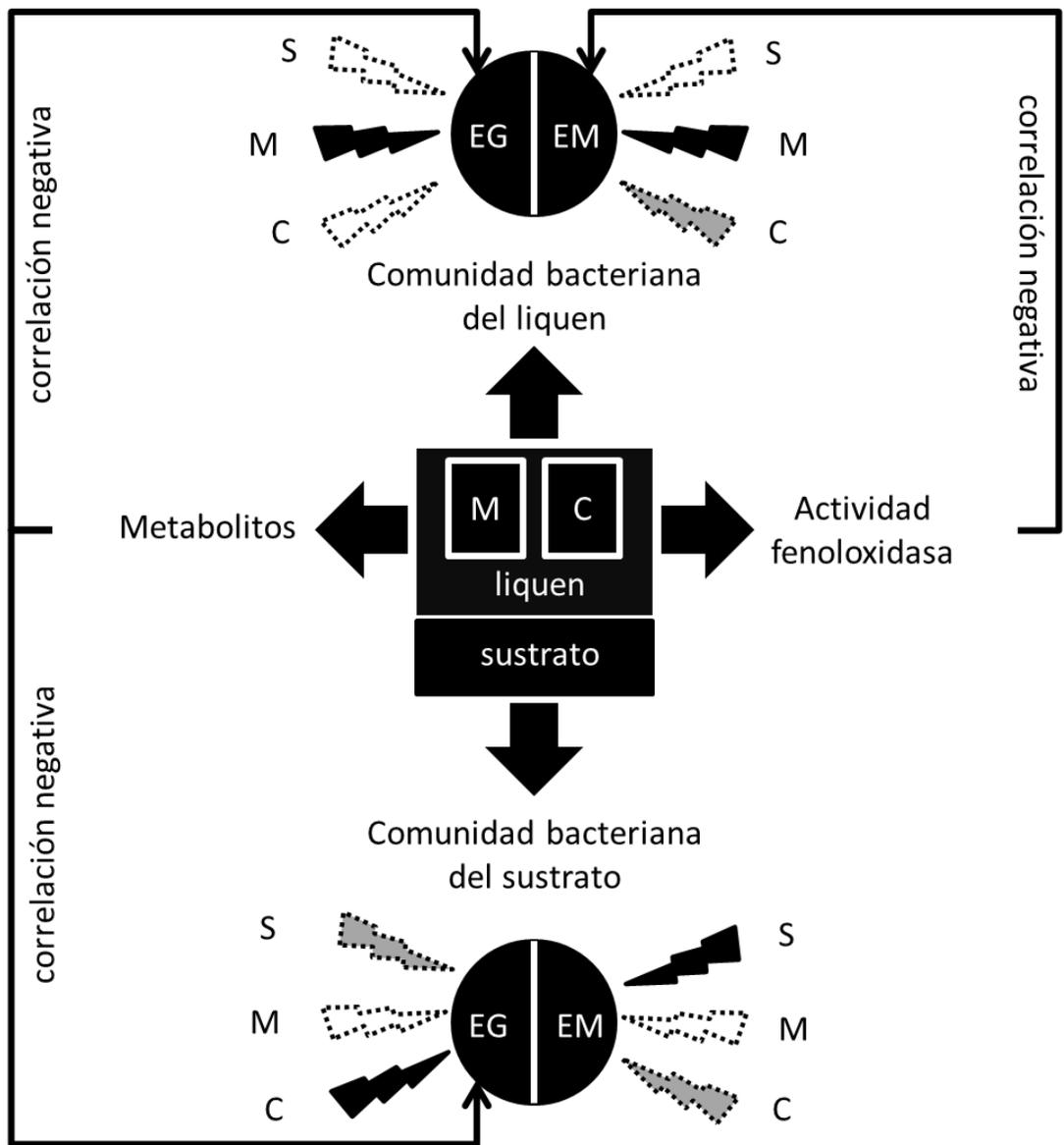
Tabla 19. Valores de las correlaciones lineales entre la actividad fenoloxidasa (variable independiente) y los índices de diversidad de Shannon (variables dependientes) calculados para los perfiles de CLPP obtenidos a partir de las muestras de líquenes (CLPP-L) y sustratos (CLPP-S) considerando las categorías de fuentes de carbono nitrogenadas (cN) y no nitrogenadas (sN).

Variable	Pendiente	Error	Intercepto	Error	R	p
CLPP-L-sN	-18,90	6,04	3,00	0,39	-0,7218	0,0121
CLPP-L-cN	-1,66	2,75	1,89	0,18	-0,1970	0,5615
CLPP-S-sN	-1,58	3,57	2,48	0,23	-0,1456	0,6692
CLPP-S-cN	5,99	3,39	1,43	0,22	0,5072	0,1113

Tabla 20. Valores de las correlaciones lineales entre la actividad fenoloxidasa (variable independiente) y los índices de diversidad de Shannon (variables dependientes) calculados para los perfiles de CLPP obtenidos a partir de las muestras de líquenes (CLPP-L) y sustratos (CLPP-S) considerando las sub-categorías de fuentes de carbono no nitrogenadas (CH: carbohidratos; AC: ácidos carboxílicos; O: otros).

Variable	Pendiente	Error	Intercepto	Error	R	p
CLPP-L-CH	-4,69	5,03	1,24	0,33	-0,2963	0,3764
CLPP-L-AC	-6,06	2,91	1,49	0,19	-0,5702	0,0670
CLPP-L-O	-3,96	2,92	1,65	0,19	-0,4128	0,2070
CLPP-S-CH	0,68	4,07	1,11	0,26	0,0558	0,8706
CLPP-S-AC	-0,65	3,48	1,27	0,23	-0,0622	0,8559
CLPP-S-O	-3,40	4,90	1,71	0,32	-0,2255	0,5050

En la Figura 24 se muestra un resumen gráfico de los principales resultados obtenidos en esta tesis, según el esquema general mostrado en la sección de Objetivos (Sección 3.3).



sitio

Figura 24 (figura en página anterior). Esquema representativo de la relación entre los factores y variables estudiados en esta tesis. **M** y **C** corresponden a la identidad del micobionte y el cianobionte del líquen, respectivamente. **S** corresponde al sitio en el cual se encuentra el líquen (bosque 1 o bosque 2). Las comunidades bacterianas del líquen y del sustrato se encuentran representadas por sus estructuras genética (**EG**) y metabólica (**EM**). La relación de los factores M, C y S sobre las comunidades bacterianas se muestra con flechas: si dichas relaciones son significativas ($p < 0,05$) se muestran con relleno negro; si son cercanas a la significancia ($0,05 < p < 0,10$) están dibujadas con relleno gris y borde punteado; y si no hay relación con el factor indicado se muestra con relleno blanco y línea punteada. La correlación negativa entre los metabolitos y la actividad fenoloxidasa sobre las comunidades bacterianas del líquen y el sustrato se muestra con flechas en el borde de la figura.

6. DISCUSIÓN

6.1. Identificación molecular de los componentes simbióticos

La identificación de los componentes de los líquenes basada en caracteres morfológicos representa una dificultad debido a la existencia de especies crípticas, las cuales no poseen características morfológicas diferenciadoras que permitan su identificación y asignación taxonómica (Lumbsch & Leavit, 2011), por lo que ésta se realizó mediante marcadores moleculares. Además, este tipo de herramientas son las únicas que permiten identificar el fotobionte presente en estos organismos. Los marcadores utilizados corresponden a genes conservados con valor taxonómico y filogenético, por lo que son adecuados para la identificación de los pares simbióticos. La utilización de esta herramienta permitió distinguir 6 haplotipos de micobiontes y 5 de cianobiontes en 2 bosques de la Reserva Nacional Coyhaique.

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

Existen pocos estudios sobre la diversidad de líquenes del género *Peltigera* en la región de Aysén, lugar de procedencia de las muestras (Martínez *et al.* 2003; Quilhot *et al.*, 2012). De las especies identificadas, *P. ponojensis* no había sido reportada por ninguno de estos autores, y se había descrito en la zona sur de Chile solo en trabajos previos de nuestro laboratorio realizados en el Parque Natural Karukinka (Región de Magallanes), donde existe una gran diversidad de líquenes pero aún son poco estudiados (Ramírez-Fernández *et al.*, 2013; Ramírez-Fernández *et al.*, 2014). Por el contrario, y debido probablemente a su poca abundancia, no se encontraron otras 8 especies de este género ya descritas en la región de Aysén mediante identificaciones morfológicas (Quilhot *et al.* 2012).

En cuanto a los cianobiontes encontrados, todos pertenecen a cianobacterias del género *Nostoc* dentro del grupo *Peltigera* definido por Rikkinen *et al.* (2002) y el clado *Nostoc* II propuesto por O'Brien *et al.* (2005). Todos los cianobiontes asociados a *Peltigera* se encuentran en este grupo según los autores, incluyendo otros simbioses y cepas de vida libre. Con respecto a su distribución geográfica, C1 y C12 ya habían sido descritos exclusivamente en Sudamérica, mientras que los otros 3 se encontraron solo en Europa y América del Norte (Kaasalainen *et al.*, 2012).

6.2. Determinación de los metabolitos producidos por los organismos liquénicos

Dado que los líquenes son conocidos por producir una gran variedad de metabolitos secundarios (Stocker-Wörgötter, 2008), la mayoría de ellos exclusivos de este tipo de organismos, y considerando la existencia de técnicas simples de detección de estas sustancias, se caracterizó la diversidad de metabolitos producidos por las muestras compuestas de líquenes. Estos compuestos provienen de diversas vías metabólicas, por lo que presentan una gran diversidad de estructuras y de posibles funciones (Boustie & Grube, 2005), dentro de las que se proponen protección UV, antibiosis, protección contra patógenos y alelopatía, entre otras (Karagoz *et al.*, 2009; Molnar *et al.*, 2010).

La técnica de cromatografía en placa fina ha sido utilizada ampliamente para la identificación de líquenes dada su producción diferencial y característica de determinados metabolitos (Tønsberg & Holtan–Hartwig, 1983; Miadlikowska & Lutzoni, 2000). En el caso de los líquenes del género *Peltigera*, en un análisis realizado por Miadlikowska & Lutzoni (2000) que incluyó, entre otras, las especies identificadas en esta tesis, encontraron en solo uno de ellos (M8, *P. hymenina*) la presencia de metabolitos. Sin embargo, en esta tesis se observó la presencia de metabolitos en todas las muestras estudiadas, en contradicción con los autores del estudio mencionado anteriormente. Probablemente la diferencia se deba a la cantidad de extracto cargado en la placa, la que no se detalla en la

referencia pero que en nuestro caso consistió en todo el extracto obtenido a partir de 30 mg de talo liquénico en 1 mL, aplicado mediante repetidas descargas con el capilar. La otra distinción es que los autores mencionan una doble elución de las placas en ambas dimensiones, mientras que en esta tesis se realizó una vez por dimensión; y cabe destacar que la coloración de las manchas observadas se perdía luego de poco tiempo mientras se realizaba el secado de las placas al aire.

6.3. Cuantificación de la actividad fenoloxidasa de los extractos de líquenes

Aunque aún no está claro cuál es el rol que cumplen las enzimas fenoloxidasas en la fisiología del liquen, existen algunas teorías sobre su función, basadas fundamentalmente en caracterizaciones de enzimas similares en hongos de vida libre (Hoegger *et al.*, 2006; Beckett *et al.*, 2013b). Algunos autores sugieren que los productos de estas enzimas compensarían la baja producción de metabolitos por los líquenes del género *Peltigera*, generando especies reactivas de oxígeno (ROS) extracelulares (Beckett *et al.*, 2003) que podrían actuar contra patógenos fúngicos o bacterianos. Asimismo, se ha propuesto que estas enzimas podrían actuar incrementando la disponibilidad de fuentes de carbono al degradar lignocelulosa desde el sustrato en ocasiones de escasez de este nutriente, como por ejemplo si hay una baja producción de fotosintatos otorgados por el fotobionte, o en el caso de un rápido crecimiento del talo (Yagüe & Estévez, 1988). Esta última función se relacionaría además con el proceso de formación

del suelo (pedogénesis), ya que como productos de estas reacciones de deslignificación se obtendrían sustancias húmicas, que participan en la estabilización a largo plazo del carbono orgánico en el suelo (Zavarzina & Zavarzin, 2006). También se ha asociado a las lacasas con la captación de metales como cobre y hierro, lo que ayudaría tanto a la sobrevivencia del hongo en ambientes pobres en estos nutrientes como a disminuir la citotoxicidad en suelos ricos en estos metales (Hoegger *et al.*, 2006). La presencia de estos compuestos en la vecindad del líquen generarían un ambiente propicio para la colonización de comunidades microbianas específicas afines a estos metabolitos, similar al efecto que se produce en la rizósfera de las plantas (Philippot *et al.*, 2013).

En el caso de la metodología utilizada para la determinación de los niveles de actividad fenoloxidasa de las muestras compuestas de líquenes, cabe destacar que ésta fue adaptada a un ensayo en pocillos de microplacas desde metodologías en cubetas (Laufer *et al.*, 2006; Zavarzina & Zavarzin, 2006), lo que a nuestro saber corresponde al primer ensayo de este tipo realizado con líquenes del género *Peltigera*.

Los valores de actividad enzimática determinados en este trabajo, normalizados por peso seco de líquen, varían entre 0,6 U/g y 5,6 U/g, con 3,7 U/g de promedio entre las 11 muestras compuestas. Estos valores son un poco más bajos, aunque dentro del mismo orden de magnitud, que los de otras determinaciones realizadas en líquenes del orden taxonómico *Peltigerales* (Beckett *et al.*, 2013a).

Uno de los resultados llamativos corresponde a la diferencia observada en la actividad fenoloxidasa de los líquenes al agrupar los datos por el tipo de cianobionte al que pertenecen. Esta asociación entre el tipo de cianobionte y la actividad fenoloxidasa medida en el talo liquénico podría deberse a que dicha oxidación fuera llevada a cabo por enzimas de la cianobacteria. Sin embargo, este tipo de actividad enzimática ha sido principalmente descrita en organismos fúngicos (Baldrian, 2006; Halaouli *et al.*, 2006), incluso en líquenes del género *Peltigera* (Beckett *et al.*, 2013b), y solo existen escasos reportes de cianobacterias marinas, de géneros distintos a *Nostoc*, para los que se ha cuantificado actividad fenoloxidasa medida con los compuestos Poly R-478 y L-Dopa, distintos al utilizado en esta tesis (ABTS) (Shashirekha *et al.*, 1997; Swaminathan *et al.*, 2010).

6.4. Determinación de la estructura genética de la comunidad bacteriana asociada a los líquenes y la presente en el sustrato donde ellos crecen

La riqueza de TRFs obtenida desde las muestras de sustrato fue menor a la obtenida directamente desde el liquen con ambas parejas de partidores, probablemente debido a que las comunidades bacterianas del talo se encuentran más estructuradas por la interacción más directa con el talo liquénico comparadas con aquellas del sustrato (Grube *et al.*, 2009; Bates *et al.*, 2011). Asimismo, la comparación mediante ANOSIM entre la estructura genética de la

comunidad bacteriana presente en el talo liquénico comparada con la del sustrato entregó diferencias significativas. Dado que la amplificación que excluye cianobacterias entregó una mayor diversidad de TRFs, se decidió realizar los análisis de agrupamiento solo con estos datos, sin considerar la amplificación de bacterias en general.

En el caso de la amplificación que excluye cianobacterias (sC) los datos provenientes del talo liquénico se diferencian al agruparlos por micobionte, indicando que la comunidad bacteriana íntimamente asociada al líquen estaría siendo estructurada por efecto de características relacionadas al genotipo del micobionte allí presente. Este tipo de estructuración de la comunidad bacteriana asociada dependiente del micobionte presente en el líquen ya había sido descrita por Bates *et al.* (2011) usando ensayos de secuenciación masiva para la determinación de la diversidad bacteriana de la comunidad, e incluía también miembros del mismo género en el análisis (*Umbilicaria americana* y *U. phaea*). Además, se observaron diferencias de estructura en la comunidad bacteriana del sustrato al agrupar según la identidad del cianobionte, esta asociación entre el tipo de fotobionte y la estructura de la comunidad bacteriana había sido advertida por Hodkinson *et al.* (2012) utilizando ensayos de genoteca y secuenciación masiva en líquenes de distintos géneros, aunque estudiando solo las comunidades íntimamente asociadas a ellos. En dicha publicación los autores agrupan a los fotobiontes según si se trata de cianobacterias, algas verdes, o ambos (i.e. asociaciones tripartitas), por lo que esta tesis aporta un grado mayor

de profundidad a esta posible asociación, al analizarse varias muestras con solo un tipo de fotobionte (cianolíquenes bipartitos). Hodkinson *et al.* (2012), discuten además sobre las razones que podrían explicar esta diferenciación de las comunidades, entre las que se encuentran la diferencia que pueden presentar estos fotobiontes en sus tasas fotosintéticas y la capacidad de las cianobacterias para fijar nitrógeno. Esto se traduciría en diferentes concentraciones de C y N según el fotobionte presente en el líquen, lo que llevaría a una diferenciación de las comunidades allí presentes. Aunque en esta tesis se analizaron solo líquenes que contienen cianobiontes del género *Nostoc* como fotobiontes, estos organismos podrían presentar diferencias metabólicas intragenéricas. Otra posible explicación para estos resultados corresponde a una cuestión metodológica, dado que la presencia del cianobionte como organismo de vida libre en el suelo (Paulsrud, 2001) podría producir un sesgo en la amplificación por PCR dada su alta abundancia en la extracción de DNA, ya que la fracción correspondiente a la comunidad bacteriana se vería distintamente representada según el cianobionte presente en el líquen, posiblemente porque la cianobacteria podría estar en distintas abundancias según su identidad.

Utilizando la metodología de TRFLP, Ramírez-Fernández *et al.* (2014) demostraron que las diferencias entre las comunidades bacterianas asociadas al líquen dependen en parte del contexto ambiental (bosque maduro, bosque joven y pradera) en el que se presentaban. En nuestro caso, cuando se agruparon las muestras por lugar geográfico (bosque) no se observaron diferencias,

probablemente porque se trata del mismo contexto ambiental (bosque joven) y están muy cercanos geográficamente. Asimismo, nuestros resultados tampoco son coincidentes con los resultados obtenidos anteriormente por Cardinale *et al.* (2012a) y Hodkinson *et al.* (2012). En el primero de estos trabajos se demuestra, también por técnicas de *fingerprinting* genómico (SSCP), que la comunidad de alfa-proteobacterias asociadas a líquenes se correlaciona con la ubicación geográfica de las muestras, aunque distantes entre 100 y 3300 Km entre ellas; mientras que en el segundo, utilizando secuenciación masiva y genotecas, se sugiere que las comunidades bacterianas de líquenes de distintos géneros estarían influenciadas, entre otros factores, por el lugar en que se encuentran, considerando que las distancias entre los sitios de muestreo variaban desde 800 hasta 7700 Km. Cabe destacar que el hecho de que en esta tesis se trabaje con líquenes del mismo género le otorga un menor rango de variabilidad a las muestras en cuanto al genotipo del micobionte. Tal como ocurre con los perfiles de TRFLP provenientes del talo liquénico, en las muestras de sustrato no se observa una diferenciación en la estructura cuando se agrupan los datos por el bosque del que provienen las muestras, sin embargo el valor de p para sustratos fue mucho más cercano a 0,05 que en el caso del talo liquénico, lo que hace pensar que la estructura de la comunidad del sustrato estaría más influenciada por las condiciones ambientales y quizás por la metodología ocupada no fue posible resolver estas diferencias (Nocker *et al.*, 2007; Su *et al.*, 2012).

6.5. Determinación de la estructura metabólica de la comunidad bacteriana asociada a los líquenes y la presente en el sustrato donde ellos crecen

De cada muestra compuesta derivada del talo liquénico como del sustrato se obtuvieron datos del consumo promedio de 31 fuentes de carbono. Estos datos se utilizaron para determinar, mediante un ajuste de Gompertz, el tiempo al cual todas las muestras se encontraban en la fase exponencial de desarrollo del color, para así poder comparar el consumo relativo de cada fuente de carbono por las comunidades bacterianas de cada muestra. Al realizar la comparación, hubo una clara separación entre las estructuras metabólicas de las comunidades asociadas al talo liquénico y las del sustrato donde los líquenes se encuentran, siendo el β -metil-D-glucósido el factor que más influye en dicha separación, el cual ha sido descrito previamente como un buen indicador de la estructura bioquímica de la comunidad (Kunito *et al.*, 2009; Teng *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2013). Al realizar análisis de ANOSIM, se observaron diferencias al agrupar por bosque los datos de perfiles metabólicos provenientes del sustrato, y no así los del líquen, estos resultados indicarían que las condiciones ambientales son las que explicarían mejor las diferencias en la estructura metabólica de las comunidades del sustrato. Otros autores han utilizado el mismo tipo de ensayo de perfiles comunitarios para llegar a resultados similares, esto es que la estructura metabólica de la comunidad bacteriana se asocia a factores del lugar geográfico en el que se encuentra (Juck *et al.*, 2000; Blackwood & Buyer, 2004). En cambio, al agrupar por la identidad del micobionte, es la comunidad asociada a los líquenes la que

se diferencia en su estructura metabólica, esta relación podría asemejarse al efecto que ejercen los exudados de raíces de plantas sobre la comunidad bacteriana de la rizósfera (Miethling *et al.*, 2000; Baudoin *et al.*, 2003). Cabe destacar que esta diferencia se mantiene al excluir del análisis a los micobiontes M4 y M8 (resultados no mostrados), esto teniendo en cuenta que los datos de consumo obtenidos de estas muestras presentaron una muy baja diversidad de fuentes de carbono metabolizadas.

6.6. Relación entre los metabolitos, la actividad fenoloxidasa y la estructura de las comunidades bacterianas asociadas a los líquenes

Un análisis de correlaciones nos permitió evaluar si la producción de metabolitos o la actividad fenoloxidasa del líquen influyen sobre la estructura de las comunidades bacterianas asociadas a éste.

La diversidad de producción de metabolitos de los líquenes mostró una correlación negativa con la estructura genética de la comunidad bacteriana del talo como con la comunidad bacteriana del sustrato. Los valores de R y p obtenidos con este análisis fueron mayores para el caso de la comunidad asociada íntimamente al líquen, demostrando que el efecto de estos compuestos es mayor en las comunidades más cercanas al talo. La influencia de metabolitos sobre una comunidad bacteriana ha sido previamente observada utilizando el metabolito bromoheptanona, del alga roja *Bonnemaisonia hamifera*, el cual en condiciones fisiológicas ($0,02 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) fue capaz de producir cambios en la estructura genética (medida por TRFLP) de una comunidad bacteriana en ensayos de cultivo (Persson *et al.*, 2011).

Por su parte, los niveles de actividad fenoloxidasa se correlacionaron negativamente con la diversidad metabólica de la comunidad asociada al líquen. Estos resultados pueden deberse a que se mantenga la presencia de enzimas fenoloxidasas activas en el extracto líquénico sometido al ensayo metabólico, y que su mayor actividad en algunas muestras limite, de alguna forma, la diversidad

de fuentes consumidas por la comunidad bacteriana. Sin embargo, no se puede descartar que estas enzimas no se mantengan activas durante el ensayo, y que las comunidades a las que se les mide la actividad sean distintas tanto genética como metabólicamente, siendo la técnica de TRFLP poco resolutive para detectar estos cambios, no así el ensayo de CLPP (Chaer *et al.*, 2009). Cabe destacar que Beckett *et al.* (2003) correlacionaron, en líquenes de distintos géneros, la actividad de la enzima peroxidasa con diversos parámetros metabólicos del líquen, lo que podría estar afectando el metabolismo de las comunidades bacterianas asociadas.

Como se observa en estos análisis de correlación, los metabolitos afectarían la presencia de ciertos grupos bacterianos asociados íntimamente al líquen y en menor medida los presentes en el sustrato, pero no modificarían la función metabólica de la comunidad. En cambio, los productos de la actividad fenoloxidasa no cambiarían la diversidad genética de los grupos bacterianos presentes tanto en el líquen como en el sustrato, pero si modificarían el metabolismo que desarrollan estos organismos. Estos efectos distintos causados por los factores estudiados en esta tesis podría deberse a que los metabolitos que causan alguna remodelación de la estructura de una comunidad bacteriana suelen ser específicos para ciertos grupos de bacterias (Karazog *et al.*, 2009; Mitrovic *et al.*, 2011), lo que explicaría el efecto sobre la estructura genética de la comunidad; mientras que la existencia de redundancia funcional entre las bacterias presentes en la comunidad, es decir la existencia de funciones

ecosistémicas similares en distintos grupos bacterianos, se condeciría con la ausencia de correlación con la estructura metabólica. En cambio, el estrés oxidativo producido por la actividad de las enzimas fenoloxidasas sería un mecanismo más generalizado y contra el cual las bacterias tendrían mecanismos de protección, por lo que se explicaría que no haya correlación con la estructura genética, mientras que su efecto sobre la composición metabólica puede deberse a estos mismos mecanismos de protección que generan desregulaciones o cambios en las vías metabólicas convencionales. Estas observaciones complementan el conocimiento que existe acerca de los factores que afectan la estructura de las comunidades bacterianas asociadas a líquenes, ya que se estudia por primera vez su relación con características fenotípicas del líquen como son su diversidad de producción de metabolitos así como también los niveles de actividad fenoloxidasa de éstos. Estudios anteriores incluían factores ambientales como exposición al sol, tipo de sustrato, ubicación geográfica y estado de conservación del ambiente (Cardinale *et al.*, 2012; Hodkinson *et al.*, 2012; Ramírez-Fernández *et al.*, 2014), además de la identidad de los simbiosomas principales en el líquen (Bates *et al.*, 2011; Hodkinson *et al.*, 2012).

Además, en esta tesis se analizó la comunidad desde un punto de vista metabólico con perfiles fisiológicos a nivel comunitario, lo que constituye una nueva variable que refleja el comportamiento fenotípico de la comunidad bacteriana, el cual no se había tenido en cuenta para análisis anteriores del microbioma de líquenes. Los trabajos anteriores involucraron el estudio de estas

comunidades a través de herramientas moleculares (Bates *et al.*, 2011; Cardinale *et al.*, 2012; Hodkinson *et al.*, 2012; Ramírez-Fernández *et al.*, 2014) u otras de carácter enzimático y antagónico a partir del cultivo de bacterias provenientes de muestras de líquenes (Grube *et al.*, 2009; Grube *et al.*, 2015). El incluir análisis de perfiles metabólicos de la comunidad bacteriana, permitiría observar la funcionalidad de estos grupos microbianos al momento del análisis, mientras que los estudios basados en el material genético podrían incluir bacterias que no estarían activas en ese instante (Fierer & Lennon, 2011).

7. CONCLUSIONES

7.1. Se identificaron 6 haplotipos de micobiontes del género *Peltigera* y 5 de cianobiontes del género *Nostoc* desde las 50 muestras de cianolíquenes de 2 bosques de *Nothofagus pumilio* de la Reserva Nacional Coyhaique, los cuales tuvieron un origen monofilético.

7.2. La producción de metabolitos no presentó diferencias incluso al agrupar los datos según su origen a la identidad de los simbioses del líquen. Por otra parte, el nivel de actividad fenoloxidasa presentó diferencias de acuerdo al cianobionte identificado en el líquen.

7.3. Se logró una mayor resolución en el análisis de la estructura genética de las comunidades bacterianas asociadas a cianolíquenes del género *Peltigera* mediante el uso de partidores que excluyen la amplificación de secuencias de cianobacterias.

7.4. La identidad del micobionte se relacionó con la varianza observada en la estructura genética y metabólica de las comunidades bacterianas asociadas íntimamente a los líquenes. Por su parte, la identidad del cianobionte se relacionó

solo con la varianza observada en la estructura genética de las comunidades bacterianas presentes en los sustratos.

7.5. Las comunidades bacterianas presentes en los sustratos difirieron en su estructura metabólica según el bosque del que provienen y de la identidad del micobionte presente en los líquenes creciendo sobre ellos.

7.6. La diversidad de metabolitos producidos por los líquenes se correlacionó negativamente con la estructura genética de las comunidades bacterianas asociadas a los líquenes y a los sustratos donde ellos crecen.

7.7. Los niveles de actividad fenoloxidasa cuantificada en los líquenes se correlacionó negativamente con la estructura metabólica de las comunidades bacterianas asociadas a los talos liquénicos.

8. REFERENCIAS

1. ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E. W. y LIPMAN, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215(3):403–410.
2. BALDRIAN, P. 2006. Fungal laccases - occurrence and properties. *FEMS Microbiology Reviews* 30: 215–242.
3. BATES, S. T., CROUSEY, G. W. G., CAPORASO, J. G., KNIGHT, R. y FIERER, N. 2011. Bacterial communities associated with the lichen symbiosis. *Applied and Environmental Microbiology* 77(4):1309–1314.
4. BAUDOIN, E., BENIZRI, E. y GUCKERT, A. 2003. Impact of artificial root exudates on the bacterial community structure in bulk soil and maize rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry* 35:1183–1192.
5. BECKETT, R. P., MINIBAYEVA, F. V., VYLEGZHANINA, N. N. y TOLPYSHEVA, T. 2003. High rates of extracellular superoxide production by lichens in the suborder Peltigerineae correlate with indices of high metabolic activity. *Plant, Cell and Environment* 26(11):1827–1837.
6. BECKETT, R. P., MINIBAYEVA, F. V. y LIERS, C. 2013a. On the occurrence of peroxidase and laccase activity in lichens. *The Lichenologist* 45(2):277–283.
7. BECKETT, R. P., ZAVARZINA, A. G. y LIERS, C. 2013b. Oxidoreductases and cellulases in lichens: possible roles in lichen biology and soil organic matter turnover. *Fungal Biology* 117(6):431–438.
8. BENSON, D. A., KARSCH-MIZRACHI, I., LIPMAN, D. J., OSTELL, J. y SAYERS, E. W. 2011. GenBank. *Nucleic Acids Research* 39(Database issue):D32–D37.
9. BLACKWOOD, C. B. y BUYER, J. S. 2004. Soil microbial communities associated with Bt and non-Bt corn in three soils. *Journal of Environmental Quality* 33:832–836.
10. BOUSTIE, J. y GRUBE, M. 2005. Lichens - a promising source of bioactive secondary metabolites. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization* 3(2):273–287.

11. BRAY, J. y CURTIS, J. 1957. An ordination of the upland forest communities of southern Wisconsin. *Ecological Monographs* 27(4):325–349.
12. CARDINALE, M., VIEIRA DE CASTRO, J., MÜLLER, H., BERG, G. y GRUBE, M. 2008. *In situ* analysis of the bacterial community associated with the reindeer lichen *Cladonia arbuscula* reveals predominance of Alphaproteobacteria. *FEMS Microbiology Ecology* 66(1):63–71.
13. CARDINALE, M., GRUBE, M., VIEIRA DE CASTRO, J., MÜLLER, H. y BERG, G. 2012a. Bacterial taxa associated with the lung lichen *Lobaria pulmonaria* are differentially shaped by geography and habitat. *FEMS Microbiology Letters* 329(2):111–115.
14. CARDINALE, M., STEINOVÁ, J., RABENSTEINER, J., BERG, G. y GRUBE, M. 2012b. Age, sun and substrate: triggers of bacterial communities in lichens. *Environmental Microbiology Reports* 4(1):23–28.
15. CHAER, G. M., FERNANDES, M. F., MYROLD, D. D., y BOTTOMLEY, P. J. 2009. Shifts in Microbial Community Composition and Physiological Profiles across a Gradient of Induced Soil Degradation. *Soil Science Society of America Journal* 73(4):1327–1334.
16. CHAPMAN, M. J. y MARGULIS, L. 1998. Morphogenesis by symbiogenesis. *International Microbiology* 1(4):319–326.
17. CULBERSON, C. F. 1972. Improved conditions and new data for identification of lichen products by standardized thin-layer chromatographic method. *Journal of Chromatography* 72(1):113–125.
18. DARRIBA, D., TABOADA, G. L., DOALLO, R. y POSADA, D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9(8):772.
19. DE VERA, J.-P. 2012. Lichens as survivors in space and on Mars. *Fungal Ecology* 5(4):472–479.
20. DUNBAR, J., TICKNOR, L. O. y KUSKE, C. R. 2001. Phylogenetic specificity and reproducibility and new method for analysis of terminal restriction fragment profiles of 16S rRNA genes from bacterial communities. *Applied and Environmental Microbiology* 67(1):190–197.
21. EDGAR, R. C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32(5):1792–1797.

22. FEDROWITZ, K., KAASALAINEN, U. y RIKKINEN, J. 2011. Genotype variability of *Nostoc* symbionts associated with three epiphytic *Nephroma* species in a boreal forest landscape. *The Bryologist* 114(1):220–230.
23. FELSENSTEIN, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39(4):783–791.
24. GARLAND, J. L. y MILLS, A. L. 1991. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. *Applied and Environmental Microbiology* 57(8):2351–2359.
25. GRUBE, M. y BERG, G. 2009. Microbial consortia of bacteria and fungi with focus on the lichen symbiosis. *Fungal Biology Reviews* 23(3):72–85.
26. GRUBE, M., CARDINALE, M., DE CASTRO, J. V., MÜLLER, H. y BERG, G. 2009. Species-specific structural and functional diversity of bacterial communities in lichen symbioses. *The ISME Journal* 3(9):1105–1115.
27. GRUBE, M., CERNAVA, T., SOH, J., FUCHS, S., ASCHENBRENNER, I., LASSEK, C., WEGNER, U., BECHER, D., RIEDEL, K., SENSEN, C. W. y BERG, G. 2015. Exploring functional contexts of symbiotic sustain within lichen-associated bacteria by comparative omics. *The ISME Journal* 9:412–424.
28. HALAOULI, S., ASTHER, M., SIGOILLOT, J. C., HAMDY, M., y LOMASCOLO, A. 2006. Fungal tyrosinases: New prospects in molecular characteristics, bioengineering and biotechnological applications. *Journal of Applied Microbiology* 100: 219–232.
29. HAMMER, Ø., HARPER, D. y RYAN, P. 2001. PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1):1–9.
30. HODKINSON, B. P. y LUTZONI, F. 2010. A microbiotic survey of lichen-associated bacteria reveals a new lineage from the Rhizobiales. *Symbiosis* 49(3):163–180.
31. HODKINSON, B. P., GOTTEL, N. R., SCHADT, C. W. y LUTZONI, F. 2012. Photoautotrophic symbiont and geography are major factors affecting highly structured and diverse bacterial communities in the lichen microbiome. *Environmental Microbiology* 14(1):147–161.

32. HOEGGER, P. J., KILARU, S., JAMES, T. Y., THACKER, J. R. y KÜES, U. 2006. Phylogenetic comparison and classification of laccase and related multicopper oxidase protein sequences. *FEBS Journal* 273:2308–2326.
33. INSAM, H. y GOBERNA, M. 2004. Use of Biolog® for the community level physiological profiling (CLPPs) of environmental samples. En: KOWALCHUK, G. A., DE BRUIJN, F., HEAD, I. M., VAN DER ZIJPP, A. J., VAN ELSAS, J. D. (Eds.) *Molecular Microbial Ecology Manual*, 2nd ed. The Netherlands, Kluwer Academic Publishers. pp 853–860.
34. JUCK, D., CHARLES, T., WHYTE, L. G. y GREER, C. W. 2000. Polyphasic microbial community analysis of petroleum hydrocarbon-contaminated soils from two northern Canadian communities. *FEMS Microbiology Ecology* 33:241–249.
35. KAASALAINEN, U., FEWER, D. P., JOKELA, J., WAHLSTEN, M., SIVONEN, K. y RIKKINEN, J. 2012. Cyanobacteria produce a high variety of hepatotoxic peptides in lichen symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(15):5886–5891.
36. KARAGOZ, A., DOGRUOZ, N., ZEYBEK, Z. y ASLAN, A. 2009. Antibacterial activity of some lichen extracts. *Journal of Medicinal Plants Research* 3(12):1034–1039.
37. KUNITO, T. y NAGAOKA, K. 2009. Effects of plant litter type and additions of nitrogen and phosphorus on bacterial community-level physiological profiles in a brown forest soil. *Microbes and Environments* 24(1):68–71.
38. LAUFER, Z., BECKETT, R. P. y MINIBAYEVA, F. V. 2006. Co-occurrence of the multicopper oxidases tyrosinase and laccase in lichens in sub-order peltigerineae. *Annals of Botany* 98(5):1035–1042.
39. LISOV, A., ZAVARZINA, A., ZAVARZIN, A., DEMIN, V. y LEONTIEVSKY, A. 2012. Dimeric and monomeric laccases of soil-stabilizing lichen *Solorina crocea*: Purification, properties and reactions with humic acids. *Soil Biology and Biochemistry* 45:161–167.
40. LUMBSCH, H. T. y LEAVITT, S. D. 2011. Goodbye morphology? A paradigm shift in the delimitation of species in lichenized fungi. *Fungal Diversity* 50(1):59–72.
41. LUTZONI, F., PAGEL, M. y REEB, V. 2001. Major fungal lineages are derived from lichen symbiotic ancestors. *Nature* 411(6840):937–940.

42. MAIER, S., SCHMIDT, T. S. B., ZHENG, L., PEER, T., WAGNER, V. y GRUBE, M. 2014. Analyses of dryland biological soil crusts highlight lichens as an important regulator of microbial communities. *Biodiversity and Conservation* 23(7):1735–1755.
43. MARTÍNEZ, I. 2003. Distribution patterns in the genus *Peltigera* Willd. *The Lichenologist* 35(4):301–323.
44. MENLOVE, J. E. 1974. Thin-layer chromatography for the identification of lichen substances. *British Lichen Society Bulletin* 34:3–5.
45. MIADLIKOWSKA, J. Y LUTZONI, F. 2000. Phylogenetic revision of the genus *Peltigera* (lichen-forming Ascomycota) based on morphological, chemical, and large subunit nuclear ribosomal DNA data. *International Journal of Plant Sciences* 161(6):925–958.
46. MIADLIKOWSKA, J., LUTZONI, F., GOWARD, T., ZOLLER, S. y POSADA, D. 2003. New approach to an old problem: Incorporating signal from gap-rich regions of ITS and rDNA large subunit into phylogenetic analyses to resolve the *Peltigera canina* species complex. *Mycologia* 95(6):1181–1203.
47. MIADLIKOWSKA, J. y LUTZONI, F. 2004. Phylogenetic classification of peltigeralean fungi (Peltigerales, Ascomycota) based on ribosomal RNA small and large subunits. *American Journal of Botany* 91(3):449–464.
48. MIETHLING, R., WIELAND, G., BACKHAUS, H. y TEBBE, C. C. 2000. Variation of microbial rhizosphere communities in response to crop species, soil origin, and inoculation with *Sinorhizobium meliloti* L33. *Microbial Ecology* 41:43–56.
49. MITROVIĆ, T., STAMENKOVIĆ, S., CVETKOVIĆ, V., TOŠIĆ, S., STANKOVIĆ, M., RADOJEVIĆ, I., STEFANOVIĆ, O., ČOMIĆ, L., ĐAČIĆ, D., ĆURČIĆ, M., y MARKOVIĆ, S. 2011. Antioxidant, antimicrobial and antiproliferative activities of five lichen species. *International Journal of Molecular Science*, 12:5428–5448.
50. MOLNÁR, K., y FARKAS, E. 2010. Current results on biological activities of lichen secondary metabolites: A review. *Zeitschrift Für Naturforschung C: A Journal of Biosciences* 65(3-4):157–173.

51. MUSHEGIAN, A. A., PETERSON, C. N., BAKER, C. C. M. y PRINGLE, A. 2011. Bacterial diversity across individual lichens. *Applied and Environmental Microbiology* 77(12):4249–4252.
52. NASH, T. H. 2008. *Lichen Biology*. 2nd ed. Cambridge, Cambridge University Press. 486p.
53. NOCKER, A., BURR, M., y CAMPER, A. K. 2007. Genotypic microbial community profiling: A critical technical review. *Microbial Ecology* 54:276–289.
54. O'BRIEN, H. E., MIADLIKOWSKA, J. y LUTZONI, F. 2005. Assessing host specialization in symbiotic cyanobacteria associated with four closely related species of the lichen fungus *Peltigera*. *European Journal of Phycology* 40(4):363–378.
55. O'BRIEN, H. E., MIADLIKOWSKA, J. y LUTZONI, F. 2013. Assessing population structure and host specialization in lichenized cyanobacteria. *The New Phytologist* 198(2):557–566.
56. PAULSRUD, P. 2001. *The Nostoc Symbiont of Lichens: Diversity, Specificity and Cellular Modifications*. PhD Thesis. Uppsala, Uppsala University, Faculty of Science and Technology. 55p.
57. PEDRÓS-ALIÓ, C. 2006. Genomics and marine microbial ecology. *International Microbiology* 9(3):191–197.
58. PERSSON, F., SVENSSON, R., NYLUND, G. M., FREDRIKSSON, N. J., PAVIA, H. y HERMANSSON, M. 2011. Ecological role of a seaweed secondary metabolite for a colonizing bacterial community. *Biofouling* 27(6):579–588.
59. PHILIPPOT, L., RAAIJMAKERS, J. M., LEMANCEAU, P. y VAN DER PUTTEN, W. H. 2013. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Reviews. Microbiology* 11(11):789–799.
60. PRINTZEN, C., FERNÁNDEZ-MENDOZA, F., MUGGIA, L., BERG, G. y GRUBE, M. 2012. Alphaproteobacterial communities in geographically distant populations of the lichen *Cetraria aculeata*. *FEMS Microbiology Ecology* 82(2):316–325.
61. QUILHOT, W., CUELLAR, M., DÍAZ, R., RIQUELME, F. y RUBIO, C. 2012. Lichens of Aisen, Southern Chile. *Gayana Botanica* 69(1):57–87.

62. RAMBAUT, A. 2012. FigTree: Tree Figure Drawing Tool (Version 1.4.0) [en línea] <<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>> [consulta: 26 septiembre 2013]
63. RAMÍREZ-FERNÁNDEZ, L., ZÚÑIGA, C., MÉNDEZ, M. A., CARÚ, M. y ORLANDO, J. 2013. Genetic diversity of terricolous *Peltigera* cyanolichen communities in different conservation states of native forest from southern Chile. *International Microbiology* 16:243–252.
64. RAMÍREZ-FERNÁNDEZ, L., ZÚÑIGA, C., CARÚ, M. y ORLANDO, J. 2014. Environmental context shapes the bacterial community structure associated to *Peltigera* cyanolichens growing in Tierra del Fuego, Chile. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 30(3):1141–1144.
65. RIKKINEN, J., OKSANEN, I. y LOHTANDER, K. 2002. Lichen guilds share related cyanobacterial symbionts. *Science* 297(5580):357.
66. RIKKINEN, J. 2013. Molecular studies on cyanobacterial diversity in lichen symbioses. *MycKeys* 6:3–32.
67. RONQUIST, F. y HUELSENBECK, J. P. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19(12):1572–1574.
68. ROSSELLÓ-MORA, R. 2005. Updating prokaryotic taxonomy. *Journal of Bacteriology* 187(18):6255-6257.
69. SHANNON, C. E. 1948. A mathematical theory of communication. *The Bell System Technical Journal* 27:379-423.
70. SHASHIREKHA, S., UMA, L., y SUBRAMANIAN, G. 1997. Phenol degradation by the marine cyanobacterium *Phormidium valderianum* BDU 30501. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 19:130–133.
71. SMIT, E., LEEFLANG, P., GLANDORF, B., VAN ELSAS, J. D. y WERNARS, K. 1999. Analysis of fungal diversity in the wheat rhizosphere by sequencing of cloned PCR-amplified genes encoding 18S rRNA and temperature gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 65(6):2614–2621.
72. STOCKER-WÖRGÖTTER, E. 2008. Metabolic diversity of lichen-forming ascomycetous fungi: culturing, polyketide and shikimate metabolite production, and PKS genes. *Natural Product Reports* 25:188–200.

73. SU, C., LEI, L., DUAN, Y., ZHANG, K. Q., y YANG, J. 2012. Culture-independent methods for studying environmental microorganisms: Methods, application, and perspective. *Applied Microbiology and Biotechnology* 93:993–1003.
74. SWAMINATHAN, P., SAHA, S. K., y UMA, L. 2010. Laccase and polyphenol oxidase activities of marine cyanobacteria: A study with Poly R-478 decolourization. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 26:63–69.
75. TAMURA, K., PETERSON, D., PETERSON, N., STECHER, G., NEI, M. y KUMAR, S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28(10):2731–2739.
76. TENG, Y., LUO, Y., SUN, M., LIU, Z., LI, Z. y CHRISTIE, P. 2010. Effect of bioaugmentation by *Paracoccus* sp. strain HPD-2 on the soil microbial community and removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from an aged contaminated soil. *Bioresource Technology* 101(10):3437–3443.
77. TILL-BOTTRAUD, I., FAJARDO, A. y RIOUX, D. 2012. Multi-stemmed trees of *Nothofagus pumilio* second-growth forest in Patagonia are formed by highly related individuals. *Annals of Botany* 110(4):905–913.
78. TØNSBERG, T. y HOLTAN–HARTWIG, J. 1983. Phycotype pairs in *Nephroma*, *Peltigera* and *Lobaria* in Norway. *Nordic Journal of Botany* 3(6):681–688.
79. WEISBURG, W. G., BARNS, S. M., PELLETIER, D. A., y LANE, D. J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* 173(2):697–703.
80. WILMOTTE, A., VAN DER AUWERA, G. y DE WACHTER, R. 1993. Structure of the 16 S ribosomal RNA of the thermophilic cyanobacterium *Chlorogloeopsis* HTF (*'Mastigocladus laminosus* HTF') strain PCC7518, and phylogenetic analysis. *FEBS Letters* 317(1,2):96–100.
81. WU, L., LI, Z., LI, J., KHAN, M. A., HUANG, W., ZHANG, Z. y LIN, W. 2013. Assessment of shifts in microbial community structure and catabolic diversity in response to *Rehmannia glutinosa* monoculture. *Applied Soil Ecology* 67:1–9.

82. YAGÜE, E. y ESTÉVEZ, M. P. 1988. Regulation of β -1,4-Glucanase and β -Glucosidase production by glucose in *Evernia prunastri*. *Journal of Plant Physiology* 133:539–544.
83. ZAVARZINA, A. G. y ZAVARZIN, A. A. 2006. Laccase and tyrosinase activities in lichens. *Microbiology* 75(5):546–556.
84. ZÚÑIGA, C., LEIVA, D., RAMÍREZ-FERNÁNDEZ, L., CARÚ, M., YAHR, R. y ORLANDO, J. 2015. Phylogenetic diversity of *Peltigera* cyanolichens and their photobionts in Southern Chile and Antarctica. *Microbes and Environments*. En prensa.
85. ZWIETERING, M. H., JONGENBURGER, I., ROMBOUTS, F. M. y VAN 'T RIET, K. 1990. Modeling of the bacterial growth curve. *Applied and Environmental Microbiology* 56(6):1875–1881.