



UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE CIENCIAS - ESCUELA DE PREGRADO

“Identificación de cianolíquenes del género *Peltigera* en dos contextos ambientales de la Reserva Nacional Coyhaique y determinación de las fracciones de fósforo en sus sustratos”

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

KARLA NAYARETT VEAS MATTHEOS

Director del Seminario de Título: Julieta Orlando

Co-Directora: Margarita Carú Marambio

Agosto 2019

Santiago – Chile

UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE CIENCIAS - ESCUELA DE PREGRADO



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

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

KARLA NAYARETT VEAS MATTHEOS

“Identificación de cianolíquenes del género *Peltigera* en dos contextos ambientales de la Reserva Nacional Coyhaique y determinación de las fracciones de fósforo en sus sustratos”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniería en Biotecnología Molecular

Dra. Julieta Orlando

Director Seminario de Título: _____

Dra. Margarita Carú Marambio

Co-Director Seminario de Título: _____

Comisión Revisora y Evaluadora

Presidente Comisión: _____

Evaluador: _____

Santiago de Chile, agosto de 2019

A mi madre, padre y mis hermanos

Agradecimientos

Por su apoyo incondicional, a mi familia quienes me han acompañado y guiado en todos los aspectos posibles. Agradecer por su confianza en mí y sus enseñanzas, que me han permitido enfrentar mis desafíos. A mi mamá y mi papá, agradecer por su amor infinito y preocupación, por confiar en mi incluso en los momentos más difíciles, por acompañarme desde siempre en mis estudios y decisiones, gracias por todo desde siempre. A mis hermanos por su apoyo, por su gran paciencia, por sus risas y por su amor, no solo frente a este desafío, sino desde siempre. Gracias a todos aquellos que se han preocupado, a mis hermosas primas, quienes me apoyaron de mil y un maneras a lo largo de mi carrera, a Pieri por su preocupación, apoyo y risas. A mi familia y cercanos por su apoyo, preocupación e interés en mi quehacer.

Agradecer a mis amigos, a los locos que me han acompañado desde el primer año, desde esos laboratorios de zoo I con filo plumas y ranas, y clases de biología celular (Debo, perdón por hacerte faltar a esa clase, pero no salió tan mal). Kelo, Debo y Sasa, gracias por todas las risas y apoyo, por las largas noches de estudios, con risas y ridiculeces, con recuerdos absurdos e inolvidables. Por los viajes, los retos, las fiestas, los amigos, el cariño y sobre todo el apoyo en los momentos difíciles. Gracias a aquellos que me acompañaron de mil y una manera a lo largo de mi carrera, a quienes tuve la alegría de conocer, Andrés, Cami, Fafi, Naty, Pasta, Nicov, Tropa, Lauris. Gracias por su compañía, por sus risas, enseñanzas, almuerzos, fiestas, disfraces y todos los recuerdos. Gracias a Tania, por los años y las experiencias, las risas, las penas y las infinitas conversaciones. Gracias a Javier, por acompañarme desde el inicio de este desafío, por su apoyo en los buenos y malos momentos, por las muchas risas, preocupación y cariño.

Gracias a mis tutoras, Julieta Orlando y Margarita Carú, por abrirme las puertas del laboratorio, y apoyarme a lo largo de este proceso. Gracias por su guía y preocupación,

por confiar en mí e incluirme en este increíble equipo de trabajo. Agradecer a todo el equipo del laboratorio, quienes me apoyaron de las mil maneras diferentes en que lo necesite. Agradecer a Katy, con quien enfrentamos las penas y alegrías de este desafío, por su apoyo, enseñanza y guía. Por las risas y la comprensión, muchas gracias. Agradecer también a Camila y Ceci, quienes me enseñaron y guiaron en dificultades del camino, por su paciencia y enseñanzas, muchas gracias. Gracias a todos mis compañeros de laboratorio, Juanita, Diego, Mati, Mitza, Yosvany, Karlita, Claudio, gracias por las risas, las enseñanzas, por su apoyo, y este lugar increíble.

Finalmente, agradecer a la profesora Jennifer por sus recomendaciones y orientación, en el proceso final de este desafío.

Agradecimientos: FONDECYT 1181510

Índice de Contenidos

Dedicatoria.....	ii
Agradecimientos.....	iii
Índice de Tablas.....	vii
Índice de Figuras.....	vii
Abreviaturas.....	viii
Resumen.....	1
Abstract.....	3
1. Introducción.....	5
1.1. Disponibilidad de fósforo en el suelo.....	5
1.2. El ciclo del fósforo en el suelo.....	7
1.3. El fósforo en un gradiente altitudinal.....	10
1.4 Líquenes y fósforo.....	11
1.5 Líquenes en Chile.....	14
1.6. Propuesta de estudio.....	15
2. Objetivos.....	16
2.1 Objetivo General.....	16
2.2 Objetivo Específico.....	16
3. Métodos y materiales.....	17
3.1 Sitios de estudio.....	17
3.2 Toma de muestras.....	18
3.3 Identificación de los componentes simbióticos.....	19
3.3.1 Pre-tratamiento de las muestras.....	19
3.3.2 Extracción de DNA desde el talo liquénico.....	19
3.3.3 Amplificación por PCR de los marcadores moleculares de los simbioses.....	20
3.3.4 Análisis de los productos de PCR.....	21
3.3.5 Análisis filogenético.....	22
3.3.6 Perfiles de RFLP.....	23
3.4 Fraccionamiento de fósforo en sustratos de líquenes <i>Peltigera</i>	24
3.4.1 Elección de las muestras para fraccionamiento de fósforo.....	24

3.4.2 Fraccionamiento de fósforo.....	24
3.4.3 Comparación estadística de las fracciones de fósforo	27
4. Resultados.....	28
4.1 Caracterización de los sitios de estudio.....	28
4.2 Identificación de los componentes simbióticos	29
4.3 Fracciones de fósforo en los sustratos de cianolíquenes <i>Peltigera</i>	38
5. Discusión.....	43
5.1 Identificación de los componentes simbióticos de los líquenes.....	43
5.1.1 Micobionte	44
5.1.2 Cianobionte.....	48
5.1.3 Asociación entre simbioses.....	50
5.1.4 Identificación de haplotipos.....	52
5.2 Fracciones de fósforo en los sustratos de cianolíquenes.....	55
6. Conclusiones.....	63
7. Bibliografía.....	64
8. Anexo.....	76

Índice de Tablas

Tabla 1. Partidores utilizados para la amplificación de cada región y su respectiva secuencia, y tamaño aproximado del fragmento esperado para cada gen.

Tabla 2. Programas y condiciones utilizadas para la amplificación de las regiones rRNA 16S, rRNA 28S e ITS.

Tabla 3. Cantidad y sitio de recolección de parejas de líquenes *Peltigera* identificadas mediante los marcadores moleculares rRNA 16S y 28S, para *micobionte* y *cianobionte* respectivamente.

Tabla 4. Enzimas de restricción utilizadas en las digestiones enzimáticas de la región ITS de *micobiontes* M3 asociados a C17.

Índice de Figuras

Figura 1. Ciclo biogeoquímico del P en el suelo, considerando las especies orgánicas e inorgánicas en las diferentes fracciones de *P soluble*, *P lábil*, *P moderadamente lábil* y *P no lábil*.

Figura 2. Metodología utilizada para determinar las distintas fracciones de P en los sustratos, basado en el fraccionamiento de Hedley et al. (1982) modificada por Do Nascimento et al. (2015).

Figura 3. Localización de los sitios de estudio.

Figura 4. Reconstrucción filogenética obtenida por máxima Verosimilitud (MV) del gen del rRNA 28S de las OTUs de *micobionte*.

Figura 5. Reconstrucción filogenética obtenida por máxima Verosimilitud (MV) del gen del rRNA 16S de las OTUs de *cianobionte*.

Figura 6. Digestión enzimática del amplicón de la región ITS de *micobionte*, para muestras identificadas como *Peltigera sp.*

Figura 7. Cantidad de P en las diferentes fracciones en sustratos de cianolíquenes *Peltigera*, obtenido por fraccionamiento de Hedley et al. (1982) modificado por Do Nascimento et al. (2015).

Figura 8. (A) Stock de P y sus fracciones en sustrato de cianolíquenes *Peltigera*. **(B)** Porcentajes de *P_o* y *P_i* lábil y moderadamente lábil para sustratos de cianolíquenes de Bosque y Pradera.

Abreviaturas

AIC	Criterio de información de Akaike
Al	Aluminio
ATP	Adenosín trifosfato
BIC	Criterio de Información Bayesiano
BLAST	Herramienta de búsqueda de alineamiento local básica
°C	Celsius
Ca	Calcio
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Fe	Hierro
g	Gramo
GTP	Guanosín trifosfato
IB	Inferencia Bayesiana
ITS	Internal transcribed spacer (Espaciador transcrito interno)
Kg	Kilogramo
KH₂PO₄	Potasio dihidrogenofosfato
Km	Kilómetros
M	Molar
Min	Minutos
mg	Miligramos
ml	Mililitros
m.s.n.m	Metros sobre el nivel del mar
MV	Máxima Verosimilitud
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NaHCO₃	Bicarbonato de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
NCBI	Centro nacional para la información biotecnológica

nm	Nanómetros
OTU	Unidad taxonómica operativa
P	Fósforo
Pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Pi	Fósforo inorgánico
Po	Fósforo orgánico
p/v	Porcentaje peso a volumen
<i>rbcLX</i>	Región intergénica de la RuBisCo
RFLP	Polimorfismo del largo de los fragmentos de restricción
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
rRNA	Ácido ribonucleico ribosomal
SD	Desviación estándar
SF	Suma de las fracciones
TAE	Tris Acetato EDTA

Resumen

Tradicionalmente, los líquenes se definen como una asociación simbiótica mutualista entre un hongo y uno o dos organismos fotosintéticos (alga y/o cianobacteria). Investigaciones actuales han descrito una comunidad bacteriana asociada al talo liquénico conformando una biopelícula altamente estructurada, la cual se ha sugerido compondría un nuevo integrante simbiótico. Esta comunidad bacteriana estaría cumpliendo un rol esencial en el éxito ecológico del individuo al cumplir funciones relacionadas a la resistencia de estrés, fijación de nitrógeno, suministro de nutrientes, entre otros. Dentro de estas funciones, el reciclaje de nutrientes y su rol en el ecosistema circundante ha llamado la atención de diversas áreas de estudio, al participar como un proceso clave en el ciclo biogeoquímico de distintos elementos.

El fósforo (P) es un nutriente esencial y limitante para el crecimiento y desarrollo de los organismos. En el suelo puede encontrarse asociado a diferentes moléculas, a partir de lo cual ha sido clasificado en diferentes fracciones de acuerdo a la naturaleza de las moléculas, *orgánica* o *inorgánica*, o según su disponibilidad para el consumo por los organismos, *soluble*, *lábil* o *no lábil*. Se ha visto que el P cumpliría un rol relevante como macronutriente en el crecimiento de los líquenes, razón por la que diversos estudios se han centrado en la descripción de la microbiota asociada a éste, y su rol en los procesos de solubilización de P.

En el presente trabajo se estudiaron las distintas fracciones de fósforo biodisponible (*Psoluble*, *lábil* y *moderadamente lábil*) en los sustratos asociados a líquenes del género *Peltigera* en dos diferentes contextos ambientales, un bosque de *Nothofagus* (*Bosque*) y una pradera altoandina sobre el límite arbóreo (*Pradera*) en la Reserva Nacional Coyhaique, con el fin de comprender de mejor manera la dinámica del P y sus distintas fracciones en los sustratos asociados a líquenes.

Los resultados revelaron un total de 5 OTUs de *micobionte* y 6 de *cianobionte*, entre los cuales se seleccionaron para el fraccionamiento de P las parejas más abundantes para cada sitio, *Peltigera frigida* en *Bosque* y *Peltigera sp.* en *Pradera*. Se observó en sustratos de *P. frigida* creciendo en *Bosque* una mayor cantidad de P que en sustratos de *Peltigera sp.* creciendo en *Pradera*. La fracción de P soluble correspondió a la fracción más pequeña, mientras que el P moderadamente lábil resultó la más abundante, completando sobre el 80% del P de la suma de fracciones en ambos sitios. Por otro lado, se detectó una mayor cantidad de P inorgánico en *Bosque* que en *Pradera*, mientras que las formas orgánicas de P no fueron significativamente diferentes entre los sustratos de los dos sitios y predominó en las fracciones de P lábil y moderadamente lábil en *Pradera*. Esto sugiere una acumulación de materia orgánica similar en los sustratos de líquenes en los diferentes sitios, a pesar de las diferentes cantidades de P disponible, y un enriquecimiento de P orgánico en sitios pobres en P. Estos resultados sugieren que los líquenes estarían actuando como filtros ambientales al reclutar microorganismos involucrados la solubilización de P en sitios en los que este nutriente está poco biodisponible, y por tanto, cumplirían un importante rol en la dinámica del P en el suelo, principalmente en sitios donde predomina la biota criptogámica, como son los sitios de altura.

Abstract

Traditionally, lichens are defined as a mutualistic symbiotic association between a fungus and one or two photosynthetic organisms (algae and / or cyanobacteria). Current research has described a bacterial community associated with the lichen tallus forming a highly structured biofilm, which has suggested a new symbiotic member. This bacterial community would be fulfilling an essential role in the ecological success of the individual to perform functions related to stress resistance, a source of nitrogen, a supply of nutrients, and others. Within these functions, the recycling of food and its role in the surrounding ecosystem has attracted the attention of various study areas, by participating as a key process in the biogeochemical cycle of the different elements.

Phosphorus (P) is an essential and limiting nutrient for the growth and development of organisms. In the soil, it can be associated to different molecules, from which it has been classified into different fractions according to the nature of the molecules, *organic* or *inorganic*, or according to their availability for consumption by organisms, *soluble*, *labile* or *not labile*. It has been seen that P could play a relevant role as a macronutrient in the growth of lichens, which is why several studies have focused on the description of the microbiota associated with it, and its role in the processes of solubilization of P.

In the present work, the different fractions of bioavailable phosphorus (*soluble*, *labile* and *moderately labile* P) in the substrates associated with *Peltigera* lichens were studied in two different environmental contexts, a *Nothofagus* forest and a high Andean Scrub-grassland, both in the Coyhaique National Reserve, in order to better understand the dynamics of P and its different fractions in substrates associated with lichens.

The results revealed a total of 5 OTUs of mycobionts and 6 of cyanobionts, among which the most abundant pairs were selected for the P fractionation for each site, *Peltigera*

frigida in *Forest* and *Peltigera sp.* in *Scrub-grassland*. A greater amount of P was observed in substrates of *P. frigida* growing in *Forest* than in substrates of *Peltigera sp.* growing in *Scrub-grassland*. The *soluble P* was the smallest fraction, while the *moderately labile P* was the most abundant, completing over 80% of the sum of fractions of P in both sites. On the other hand, a greater amount of inorganic P was detected in *Forest* than in *Scrub-grassland*, while organic forms of P were not significantly different between the substrates of the two sites and predominated in the fractions of *labile P* and *moderately labile P* in *Scrub-grassland*. This suggests an accumulation of similar organic matter in lichen substrates at different sites, despite the different amounts of available P, and an enrichment of organic P in sites poor in P. These results suggest that lichens would act as environmental filters by recruiting microorganisms involved in P solubilization in sites where this nutrient is poorly bioavailable, and therefore, they would play an important role in the soil P dynamics, mainly in places where the cryptogamic biota predominates, such as the high-altitude sites.

1. Introducción

El fósforo (P) es un elemento químico esencial para la vida, siendo considerado como uno de los principales macronutrientes involucrados en el crecimiento y desarrollo de los organismos (Elser & Bennett, 2009; Sindhu et al., 2014) el cual forma parte de moléculas claves en procesos genéticos, energéticos y estructurales de la célula, como son DNA, RNA, proteínas, fosfolípidos, ATP, GTP, NADPH, entre otras moléculas (Jones & Oburger, 2011). A pesar de su gran importancia, el P es uno de los elementos menos abundantes de la litosfera, representando apenas un 0,1% de la corteza terrestre (Filippelli, 2008), y con ello, uno de los nutrientes limitantes en la productividad biológica en los diversos ecosistemas (Plante, 2007; Yadav & Verma, 2012; Yang & Post, 2011).

1.1. Disponibilidad de fósforo en el suelo

En el suelo, el P se encuentra unido a diferentes moléculas, lo que según su naturaleza permite definir diferentes formas o especies inorgánicas y orgánicas (Kruse et al., 2015). Los compuestos de P inorgánico (*Pi*) se encuentran principalmente como minerales primarios, derivados directamente del material parental, y minerales secundarios, como formas amorfas y cristalinas de Al, Fe y Ca (Sims & Pierzynski, 2005). Por otra parte, los compuestos de P orgánico (*Po*) forman parte de ácidos nucleicos, fosfolípidos, fosfatos de azúcares, entre otros. Éstos pueden ser susceptibles al consumo biológico y degradación bacteriana, como desechos biológicos; o pueden ser estables y altamente resistentes a la actividad microbiana, como son las denominadas sustancias húmicas (Negassa & Leinweber, 2009; Sims & Pierzynski, 2005; Yadav & Verma, 2012).

Así como el P del suelo puede ser clasificado según su naturaleza inorgánica u orgánica, éste también ha sido definido de acuerdo a su disponibilidad para las plantas y microorganismos en las siguientes fracciones: (i) *P soluble*, (ii) *P lábil*, y (iii) *P no lábil* (Picone & Zamuner, 2002). La fracción de *P soluble* (o *biodisponible*) abarca una porción

muy pequeña en la solución del suelo, 1% del P total aproximadamente, y se encuentra conformada por distintos ortofosfatos, como PO_4^{-3} , HPO_4^{-2} y $\text{H}_2\text{PO}_4^{-}$ (Sims & Pierzynski, 2005; Yadav & Verma, 2012). Esta fracción es la que se encuentra disponible para el consumo de plantas y microorganismos, por lo que presenta una alta demanda, y un constante reabastecimiento (Busman et al., 2017; Sindhu et al., 2014). Por otro lado, el *P lábil* se compone del P incorporado a la materia orgánica (*Po*) fácilmente solubilizable, como moléculas de DNA, azúcares, entre otros (Filippelli, 2008; Sims & Pierzynski, 2005) y como fosfatos asociados débilmente a pequeñas partículas de suelo o en reacción con minerales secundarios de Al, Fe y Ca (*Pi*). Dependiendo de qué tan estrechamente se encuentre asociado el P a estas moléculas, el P puede presentar mayor o menor labilidad, subdividiendo la fracción en el P sorbido débilmente a las moléculas, denominado *P lábil*, y el P que forma parte de moléculas de difícil degradación (p.e. inositol fosfato), conocido como *P moderadamente lábil*. La naturaleza de estas moléculas permite un equilibrio dinámico entre el *P soluble* y *P lábil* a través de transformaciones rápidas dadas por reacciones químicas influenciadas principalmente, de manera directa o indirecta, por los microorganismos presentes en el suelo (Busman et al., 2002; Picone & Zamuner, 2002). Finalmente, la fracción de *P no lábil* corresponde a moléculas con P estrechamente unido a partículas del suelo que no se encuentran disponibles para el consumo de la biota, entre ellas se encuentran compuestos inorgánicos muy insolubles, como los minerales primarios, y compuestos orgánicos resistentes a la solubilización, como las sustancias húmicas. Esta fracción también se encuentra en equilibrio dinámico con las otras fracciones, aunque su velocidad de reacción es mucho más lenta, provocando que el *P no lábil* pueda permanecer por años sin estar disponible (Busman et al., 2002; Cross & Schlesinger, 1995).

La cuantificación de las distintas formas de fósforo en los suelos se ha llevado a cabo mediante una gran variedad de métodos, los cuales permiten evaluar la cantidad de fósforo disponible, de fósforo total, o de sus diversas fracciones (McKean, 1993). Aunque algunos autores han descrito al *P biodisponible* como un buen predictor de la limitación de P en los sitios (Kitayama et al., 2000; Silver, 1994), el método desarrollado por Hedley et al. (1982) es el más utilizado para estudiar la dinámica de P en los suelos, ya que permite dividir el P del suelo en las distintas fracciones de *P_i* y *P_o* según su biodisponibilidad (Negassa & Leinweber, 2009; Yang & Post, 2011). Este procedimiento consta de la extracción secuencial de las distintas formas de P desde el suelo, utilizando extractantes con diferentes propiedades químicas (Cross & Schlesinger, 1995).

1.2. El ciclo del fósforo en el suelo

El ciclo del P en el suelo es un fenómeno complejo, dinámico y sumamente lento que involucra el suelo y su biota circundante (Figura 1) (Filippelli, 2008; Kruse et al., 2015). Cuando el suelo comienza su desarrollo durante la pedogénesis, todo el P del suelo está en forma de mineral primario en la roca parental, principalmente como apatita. Con el tiempo, el desgaste de los minerales primarios da lugar al P en varias otras formas, siendo ésta la fuente principal de entrada de *P_i* a los sistemas ecológicos (Kruse et al., 2015; Sims & Pierzynski, 2005; Yang & Post, 2011). Otras fuentes de entrada de P a los ecosistemas naturales son los residuos vegetales, animales y microbianos, y en menor medida desde fuentes atmosféricas (Kruse et al., 2015; Tipping et al., 2014).

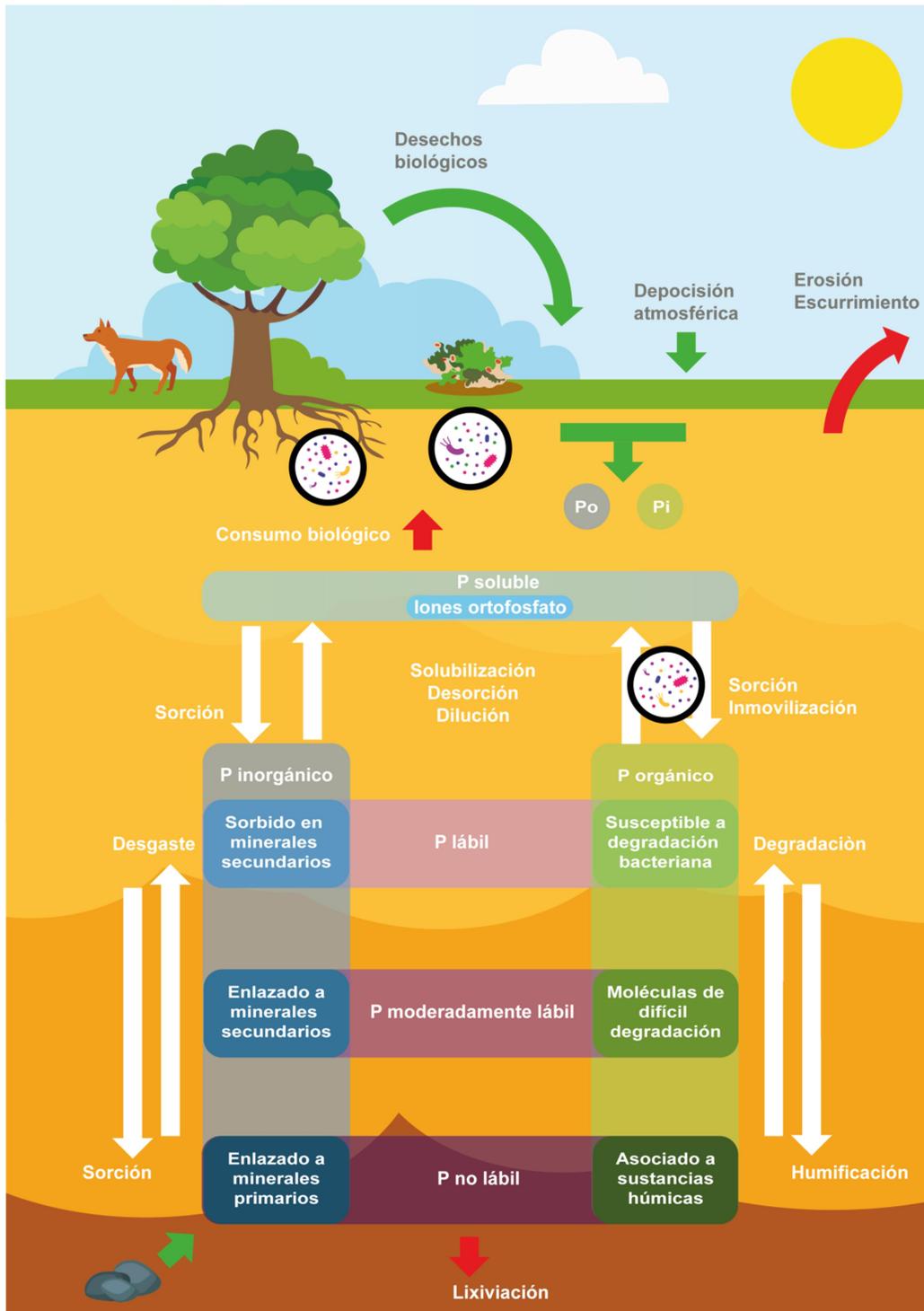


Figura 1. Ciclo biogeoquímico del P en el suelo, considerando las especies orgánicas e inorgánicas en las diferentes fracciones de *P soluble*, *P lábil*, *P moderadamente lábil* y *P no lábil*. Se muestran las fuentes (flechas verdes), salidas (flechas rojas) y reacciones de transformación (flechas blancas) del P. Modificado de Kruse et al. (2015), Sims & Pierzynski (2005) y Plante (2007).

El fósforo se encuentra en constante dinámica, incorporándose o saliendo del sistema, y cambiando de forma en las diferentes fracciones (*P soluble*, *P lábil*, y *P no lábil*), gracias a reacciones de sorción y desorción, disolución y precipitación, e inmovilización y solubilización (Jones & Oburger, 2011; Kruse et al., 2015). Los procesos de sorción y precipitación han sido denominados como “fijación de P”, y constan de la reacción de intercambio de ligando del fosfato con grupos funcionales en la superficie del suelo, como pueden ser los minerales de Fe y Al (Frossard et al., 2010; Sui & Thompson, 2000); si la solución del suelo presenta condiciones de abundancia de compuestos libres, como Al o Ca, entonces puede ocurrir precipitación (Henríquez, 2005). De forma contraria, los procesos de desorción y disolución corresponden a fenómenos transformadores de *Pi* y *Po lábil* a *P soluble*, y sus cinéticas de reacción estarán determinadas principalmente por las características intrínsecas del suelo (Rossi, 2011; R. S. Yadav et al., 2012).

Por otro lado, los procesos de inmovilización y solubilización se encuentran principalmente guiados por la actividad de los microorganismos (Jones & Oburger, 2011). Los microorganismos inmovilizadores de P permiten incorporar el *P soluble* a la biomasa microbiana al asimilarlo en constituyentes celulares orgánicos, o promoviendo la formación de precipitados inorgánicos, inmovilizando temporalmente el P (Plante, 2007). Finalmente, la solubilización es un proceso donde los microorganismos solubilizadores de fosfato convierten el *P lábil* insoluble en formas solubles mediante procesos de acidificación, quelación e intercambio iónico (Plante, 2007). Para llevar a cabo este proceso, los microorganismos utilizan mecanismos como la producción de compuestos disolventes de minerales (como ácidos orgánicos, iones hidroxilo o protones) y liberación de enzimas extracelulares (Jones & Oburger, 2011).

Por último, la salida de P del sistema puede deberse a factores como: (i) erosión, donde la pérdida de P puede resultar en la entrada de P a otra fracción; (ii) lixiviación, por

el arrastre de aguas subterráneas (Sims & Pierzynski, 2005; Yang & Post, 2011); y (iii) el consumo de P por parte de las plantas y microorganismos (Filippelli, 2008; Kruse et al., 2015). De este modo, el equilibrio entre las distintas especies y fracciones de P se sostiene gracias a la acción combinada de diversos mecanismos (Lambers et al., 2008), en donde los microorganismos cumplen un rol esencial en los principales procesos que componen el ciclo del P (Jones & Oburger, 2011).

1.3. El fósforo en un gradiente altitudinal

Las concentraciones de P total y la dinámica entre sus diferentes fracciones, dependen del conjunto de factores bióticos y abióticos presentes en los ecosistemas, tales como el tipo de suelo y su material parental, el tiempo y el desarrollo de la pedogénesis, la profundidad, el pH, el clima y el uso del suelo, así como los organismos que lo habitan (Jones & Oburger, 2011; Kruse et al., 2015; Sims & Pierzynski, 2005).

A lo largo de la pendiente de una montaña, podemos encontrar una sucesión ordenada y comprimida de diferentes condiciones climáticas y diversidad de macro y microorganismos, presentándose una serie consecutiva de diferentes ecosistemas (Lomolino, 2001; Wolf, 1993). La variación de las comunidades se encuentra fuertemente ligada a las condiciones climáticas, las cuales presentan cambios abruptos a cortas distancias en gradientes altitudinales, influenciando la presencia y características de las especies que ahí habitan (Abdala-Roberts et al., 2016; Grytnes et al., 2006; Wolf, 1993). Este cambio puede ser fácilmente apreciado al observar el límite del crecimiento de árboles o "*límite arbóreo*" que surge en las cumbres de las montañas, donde las condiciones ecológicas extremas evitan el crecimiento de árboles, los cuales son afectados principalmente por las temperaturas extremas que sufre la cumbre del relieve, como vientos fríos y heladas nocturnas (Cabrera, 1996; Tanner et al., 1998), y una serie

de otros factores asociados a la altura como la irradiación solar, comportamiento del viento y precipitaciones (Bendix et al., 2008).

Estudios realizados en gradientes altitudinales de montañas, han mostrado que existe una tendencia al aumento de P en sitios de baja altitud, probablemente relacionado a la presencia de árboles, y por ende, a la caída de hojarasca de la cobertura vegetal, así como al desgaste de la roca madre, fenómenos que disminuyen su intensidad cumbre arriba (Beck et al., 2008; Kitayama et al., 2000). De manera similar, en bosques de *Nothofagus* y *Pinus* del sur de Chile se encontró que el *P disponible* en la superficie de los suelos forestales resultó ser significativamente mayor que en suelos sin cobertura vegetal, como son sitios que sufrieron incendios o se utilizan con fines agrícolas (Fajardo & Gundale, 2015), fenómeno que se repite en diferentes localidades (Fabre et al., 2006; Gerding & Thiers, 2002; Negassa & Leinweber, 2009). En estos trabajos se sugiere que la cobertura arbórea participaría tanto como un factor de entrada de P al sistema a través de la caída de hojarasca, como una barrera natural para la erosión de suelos y la consecuente salida de fósforo, teniendo un efecto sinérgico en la mantención del P en ecosistemas cubiertos.

1.4 Líquenes y fósforo

Los líquenes son asociaciones simbióticas mutualistas entre un hongo, denominado *micobionte*, y uno o dos compañeros con capacidades fotosintéticas, nombrados *fotobiontes*, los cuales pueden ser un alga verde (*clorobionte*) o una cianobacteria (*cianobionte*). En el caso de que el líquen contenga este último, es conocido como cianolíquen. Mientras el *micobionte* provee un hábitat para el compañero fotosintético, el *fotobionte* fija carbono mediante fotosíntesis (Nash, 2008). Investigaciones recientes, han descrito que comunidades bacterianas asociadas al talo líquénico conformarían una biopelícula altamente estructurada, que se ha sugerido compondría un

nuevo integrante simbiótico. Es así, como en los últimos años esta definición de líquen ha evolucionado de ser considerada como una asociación bi o tripartita, a ser definida actualmente como una simbiosis multi-especies (Aschenbrenner et al., 2016). Estas comunidades bacterianas asociadas al talo liquénico no serían solo una mera extensión de lo encontrado en el sustrato donde crece el líquen (Bates et al., 2011; Cardinale et al., 2012; Leiva, 2015; Printzen et al., 2012), sino que corresponderían a un microbioma bacteriano y fúngico específico del hospedero (Aschenbrenner et al., 2016; Spribille et al., 2016), que variaría su composición tanto por factores extrínsecos, como son las condiciones abióticas, como por factores intrínsecos, como la identidad de los componentes simbióticos (Ramírez-Fernández et al., 2013; Leiva et al., 2016). La cantidad de bacterias que se encuentran asociadas a los líquenes es sorprendentemente alta, y se ha visto que sus principales funciones son la provisión de nutrientes, la degradación de las partes más antiguas del talo del líquen, la protección contra el estrés biótico y abiótico, entre otras funciones (Aschenbrenner et al., 2016; Grube et al., 2015).

Los líquenes son colonizadores primarios en medios ambientes hostiles, con altas temperaturas, desecación o alta salinidad, llegando a colonizar casi todos los ecosistemas terrestres, desde el trópico a zonas polares, y de costas a hábitats de gran altitud (Aschenbrenner et al., 2016; Chapman & Margulis, 1998). El género de líquenes *Peltigera* comprende alrededor de 90 especies (Goward et al., 1995; Martínez et al., 2003; Vitikainen, 2006), las cuales pueden ser bipartitas, compuestas por el hongo y una cianobacteria del género *Nostoc*, o tripartitas, incorporando un alga verde del género *Coccomyxa* como el principal fotobionte. Son líquenes foliosos (i.e. con forma de hojas) terrícolas (i.e. crecen sobre suelo) y muscícolas (i.e. crecen sobre musgos) que se encuentran distribuidos en la mayoría de los continentes, entre ellos, Sudamérica (Martínez et al., 2003; Miadlikowska & Lutzoni, 2000; Zuñiga et al., 2015).

El P como elemento esencial, se ha visto que cumple un rol relevante como macronutriente limitante en el crecimiento y actividad de los líquenes; se ha observado por ejemplo, que una sola inmersión en solución de fosfato puede doblar el crecimiento anual de *Lobaria pulmonaria* (McCune & Caldwell, 2009), así como también que las fertilizaciones con P podrían incrementar la fijación de nitrógeno en cianolíquenes *Peltigera aphotosa* y *P. polydactyla* (Weiss et al., 2005). Considerando la relevancia del P en el desarrollo de líquenes que contienen cianobacterias como *fotobionte* (cianolíquenes), distintos autores se han interesado por el posible rol que estaría cumpliendo la microbiota del líquen en funciones relacionadas con los procesos de solubilización del P. Con respecto al tema, se han realizado análisis del metagenoma asociado al líquen *Peltigera membranacea*, lo cual reveló un gran número de *contigs* bacterianos relacionados con el metabolismo del P, donde genes de las enzimas involucradas en la solubilización de P_i y de las fosfatasas alcalinas encargadas de la solubilización de P_o , se encontraron altamente representados (Sigurbjörnsdóttir et al., 2015). De este modo, el reservorio bacteriano asociado al talo líquénico sería uno de los principales agentes responsables de la dinámica del P y sus diferentes formas biodisponibles en el sustrato adyacente a los líquenes. En un estudio sobre la dinámica del P en sustratos de líquenes *Peltigera frigida* creciendo en un bosque con gradiente de recuperación de bosque nativo de lenga en la Reserva Nacional Coyhaique, se determinó que los sustratos de los líquenes en los diferentes contextos no presentaron diferencias significativas entre las fracciones de P soluble, P_o lábil y P_i lábil, a pesar de que los diferentes sitios presentaban un distinto comportamiento de las fracciones de P en sus suelos (Muster, 2019). De este modo se plantea que los líquenes podrían estar actuando como filtros ambientales, ejerciendo una presión selectiva sobre su microbiota involucrada en el ciclo biogeoquímico del P, y sugiriendo que podrían ser agentes relevantes en el

ciclo biogeoquímico del suelo, especialmente en sitios donde prevalece la biota criptogámica, como son las praderas y cumbres montañosas.

1.5 Líquenes en Chile

Los líquenes son un importante componente de la biota criptogámica, entre los cuales las distintas especies presentan diferentes distribuciones de acuerdo a sus necesidades nutricionales y tolerancia a diferentes condiciones bióticas y abióticas que presentan los variados paisajes en donde estos organismos habitan (Nash, 2008). En particular, la región de Aysén, Patagonia Chilena, se caracteriza por presentar varios hábitats disponibles para la colonización por líquenes, ya que su amplio rango climático favorece su desarrollo tanto en términos de diversidad como biomasa (Quilhot et al., 2012), entre ellos destaca una amplia variedad de especímenes correspondientes al género de líquenes *Peltigera* (Martinez et al., 2003; Quilhot et al., 2012; Zúñiga et al., 2015; Magain et al., 2018).

Estudios sobre la diversidad de este género al sur de Chile han reportado la presencia solo de cianolíquenes bipartitos, entre los cuales se han observado especies con una distribución exclusiva en estos ambientes del sur de Sudamérica, como es *P. frigida*, que presenta una prevalencia en ambientes boscosos (Zúñiga et al., 2015; Magain et al., 2018). Además, es sabido que *Peltigera* es capaz de colonizar hábitats hostiles con bajas temperaturas y disponibilidad de recursos, como son los sitios en las cumbres montañosas. Sin embargo, el alto grado de endemismo que tienden a presentar las especies en sitios de alta montaña y los pocos estudios realizados sobre la distribución de líquenes en estos sitios al sur de Chile, han llevado a que las especies capaces de colonizar sitios de pradera altoandina aún sean desconocidas.

1.6. Propuesta de estudio

En la búsqueda por tener un mejor entendimiento sobre la dinámica y comportamiento del P que rodea al líquen y su microbiota asociada, es que en este trabajo proponemos estudiar las poblaciones predominantes de líquenes presentes en dos ecosistemas con características abióticas y bióticas contrastantes, como son (i) un bosque de *Nothofagus* con diferente estado de conservación y (ii) una pradera altoandina sobre el límite arbóreo, ambos en la Reserva Nacional Coyhaique (Región de Aysén), y las distintas fracciones de fósforo, incluyendo *P soluble*, *P lábil* y *P moderadamente lábil*, en los sustratos asociados a dichos líquenes.

2. Objetivos

2.1 Objetivo General

Identificar poblaciones predominantes de líquenes *Peltigera* en dos contextos ambientales con condiciones contrastantes, bosque y pradera, y determinar las diferentes fracciones de fosfato presentes en sus sustratos.

2.2 Objetivo Específico

1. Identificar molecularmente los cianolíquenes *Peltigera*.
2. Cuantificar las fracciones de *P orgánico e inorgánico* en los sustratos de los cianolíquenes *Peltigera*.
3. Comparar las distintas fracciones de P presentes en los sustratos de los cianolíquenes en los distintos contextos ambientales.

3. Métodos y materiales

3.1 Sitios de estudio

La región de Aysén, ubicada al extremo austral de Chile, recibe durante todo el año una fuerte influencia del frente polar que se sitúa sobre ella, provocando bajas temperaturas (0-12°C promedio) y frecuentes lluvias (promedio anual de precipitación aproximado de 1350 mm) (Recorre Aysen, 2019; Till-Bottraud et al., 2012). En esta región se ubica la Reserva Nacional Coyhaique, de 2150 hectáreas de superficie, sobre suelos derivados de depósitos de ceniza volcánica (Till-Bottraud et al., 2012) colonizados principalmente por bosques patagónicos típicos del sur de Chile dominados por especies de *Nothofagus* (Fajardo & De Graaf, 2004; Donoso et al. 2004).

Los sitios de bosque nativo de este sector (44° - 49° S) sufrieron incendios intencionales de gran escala, entre los años 1930 y 1950, a fin de obtener terrenos para el asentamiento y cultivo (Quintanilla, 2008). Como consecuencia, cerca de 3 millones de hectáreas de bosque de *Nothofagus* fueron destruidas. Con el tiempo, los bosques remanentes de *Nothofagus pumilio* permitieron la regeneración del mismo, dando lugar a densos bosques naturales de crecimiento secundario de lenga (Fajardo & McIntire, 2010). A partir de 1948 se iniciaron planes de reforestación en la Reserva Nacional Coyhaique, plantando árboles exóticos de rápido crecimiento, como algunas especies de coníferas del género *Pinus*. De este modo, el paisaje de la Reserva consta de un mosaico de cobertura arbórea de bosque nativo maduro remanente, bosque nativo secundario, plantaciones de coníferas y pastizales (Fajardo & Gundale, 2015).

Los sitios del presente estudio se localizan en el cerro Cinchao, uno de los relieves de la Reserva Nacional Coyhaique (- 45° 30` S y 72° 02` O). El primero de ellos corresponde a un bosque caducifolio mixto de crecimiento secundario dominado por *N. pumilio* (lenga) acompañado por plantaciones exóticas de diversas clases de pino

(CONAF, 2019), que se encuentra ubicado a los pies del relieve, al cual nos referiremos desde ahora como *Bosque*.

El segundo sitio corresponde a una pradera altoandina ubicada sobre el límite arbóreo en la cima del mismo relieve, con una diferencia de 600 m de altitud con el sitio de *Bosque*, al cual nos referiremos desde ahora como *Pradera*. Este sitio, debido principalmente a su localización en la cumbre del relieve, se expone a condiciones climáticas extremas, como son fuertes vientos, heladas nocturnas, altos índices de irradiación solar, entre otros (Bendix et al., 2008; Cabrera, 1996; Tanner et al., 1998) y presenta un ecosistema en mosaico con zonas de escoria y comunidad vegetal rica en pastos, hierbas y arbustos prosperando sobre sustratos inestables (Moreno, 1997; Veblen et al., 1977).

3.2 Toma de muestras

El muestreo realizado en *Bosque* fue dirigido para la selección de líquenes *Peltigera frigida*, considerando los antecedentes sobre su predominancia en ambientes boscosos de la zona, y su amplia distribución y abundancia al sur de Chile (Zúñiga et al., 2015; Leiva et al., 2016; Almendras et al., 2018). Por otro lado, los pastizales andinos corresponden a zonas poco descritas en la literatura chilena, por tanto, la selección de muestras en *Pradera* se enfocó en la recolección de especímenes identificados como integrantes del género *Peltigera*.

En ambos sitios la identificación macroscópica de las muestras se realizó a través del reconocimiento de estructuras características de los líquenes, utilizando los datos de galerías fotográficas y claves taxonómicas (Brodo et al., 2001; Zúñiga, 2015), reconociendo a los especímenes de *Peltigera frigida* por su corteza superior no tomentosa brillante, venas y rizinas cortas, y apotecios planos horizontales (Muster, 2019), y a los

individuos del género *Peltigera* identificados en *Pradera*, principalmente por su morfología foliosa, con tonalidades verde marrón, la presencia de rizinas y de apotecios característicos en caso de estar presentes y recolectando sólo aquellos creciendo sobre suelo (Brodo et al., 2001).

Cada muestra constó de un fragmento de talo liquénico y su respectivo sustrato adyacente, las cuales fueron almacenadas en bolsas de papel para disminuir la humedad y conservar el espécimen. En *Bosque* se recolectaron 22 líquenes (Pf1-22), mientras que en *Pradera* se recolectaron 30 muestras (Ps1-30). La ubicación de cada líquen muestreado fue georreferenciado mediante GPS (Anexo Tabla 1A), y fueron transportados en recipientes tipo *cooler* a baja temperatura.

3.3 Identificación de los componentes simbióticos

3.3.1 Pre-tratamiento de las muestras

Las muestras se limpiaron manualmente utilizando pinza y pincel, separando el talo de su sustrato. Los líquenes fueron almacenados en bolsas de papel a temperatura ambiente, mientras que el sustrato adyacente se mantuvo en tubos falcón de 50 ml a 4°C.

3.3.2 Extracción de DNA desde el talo liquénico

Para la extracción de DNA de las muestras, se fragmentó mecánicamente aproximadamente 100 mg de talo liquénico utilizando un mini-mortero. La extracción de DNA se realizó con el “*DNeasy PowerSoil Kit*” (Qiagen) según las indicaciones del fabricante y modificaciones del equipo de laboratorio. Con el fin de evaluar la calidad e integridad del DNA obtenido, las muestras se visualizaron en geles de agarosa al 2% (p/v) en amortiguador TAE (tris-acetato 40 mM, EDTA 1mM, pH 8,0), teñidos con GelRed™ (Biotium).

Finalmente, el DNA obtenido se cuantificó y evaluó su pureza por espectrometría, utilizando el equipo Epoch™ (BioTeK) midiendo a longitudes de onda de 260 nm y 280 nm.

3.3.3 Amplificación por PCR de los marcadores moleculares de los simbios

Para la identificación de los *micobiontes* se utilizó como marcador molecular el gen del rRNA 28S (referido desde ahora como 28S), gen que codifica para la subunidad mayor del ribosoma de hongos. La amplificación se realizó utilizando los partidores específicos LIC24R y LR7 (Tabla 1). Además, se amplificó la región ITS (*Internal Transcribed Spacer*), marcador molecular de excelencia para identificación de hongos, con los partidores ITS4 e ITS1F (Tabla 1).

Paralelamente, los *cianobiontes* fueron identificados utilizando el gen codificante para la subunidad menor del ribosoma de cianobacterias rRNA 16S (referido desde ahora como 16S). Para la amplificación se utilizaron los partidores PCR1 y PCR18 (Tabla 1). Las mezclas para las todas reacciones se prepararon utilizando “GoTaq® Green Master Mix” (GoTaq® DNA polimerasa en amortiguador de reacción Green GoTaq® [pH 8,5], 200 µM de cada dNTP y MgCl₂ 1,5 mM) (Promega), y las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador Maxygene II (Axygen). Las condiciones para cada set de partidores se muestran en la Tabla 2.

Tabla 1. Partidores utilizados para la amplificación de cada región y su respectiva secuencia, y tamaño aproximado del fragmento esperado para cada gen.

Gen	Partidores	Secuencia nucleotídica 5' - 3'	Tamaño del fragmento	Referencia
28S hongo	LIC24R	GAAACCAACAGGGATTG	1200 pb	Miadlikowska & Lutzoni, 2000
	LR7	TACTACCACCAAGATCT		Moncalvo et al., 1993
16S cianobacteria	PCR1	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	1900 pb	(Wilmotte et al., 1993)
	PCR18	TTTGCGGCCGCTCTGTGTGCCT AGGTATCC		
Región ITS Hongo	ITS1F	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	800 pb	Gardes & Bruns, 1993
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC		White et al., 1990

Tabla 2. Programas y condiciones utilizadas para la amplificación de las regiones rRNA 16S, rRNA 28S e ITS.

Organismo	Gen	Inicio	Programa (Tiempo min; Temperatura °C)			Final	Número de ciclos
			Ciclo				
			Desnaturación	Alineamiento	Extensión		
Cianobacteria	16S	01:00	01:00	01:00	04:00	07:00	30
		94	94	55	72	72	
Hongo	28S	01:00	00:30	00:30	01:30	04:00	30
		94	94	52	72	72	
	Región ITS	05:00	00:45	01:30	01:30	10:00	35
		95	95	52	72	72	

3.3.4 Análisis de los productos de PCR

Se determinó el tamaño y pureza de los productos PCR por electroforesis, en geles de agarosa al 2% (p/v) en amortiguador TAE 1X teñidos con GelRed™ (Biotium). Para las muestras que mostraron amplificación inespecífica, se purificó la banda de interés desde el gel de agarosa, usando el kit “Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up System” (Promega) según las indicaciones del fabricante.

Los amplicones obtenidos fueron secuenciados utilizando un analizador genético 3730 (Applied Biosystems; Macrogen Inc., Corea). Las secuencias obtenidas se revisaron

y editaron manualmente utilizando el programa *SnapGene® software* (GSL Biotech), y se identificó a los simbiontes utilizando la herramienta bioinformática Blastn (Altschul et al., 1990) al comparar las secuencias obtenidas con las depositadas en la base de datos de secuencias nucleotídicas del GenBank (Benson et al., 2011), considerando sólo secuencias fehacientemente identificadas por especialistas del área (Miadlikowska & Lutzoni, 2000; Miadlikowska et al., 2003; Zúñiga et al., 2015; Magain et al., 2018).

3.3.5 Análisis filogenético

La identificación de *micobiontes* y *cianobiontes* se determinó de manera independiente, alineando las secuencias obtenidas por el método ClustalW (Thompson et al., 1994) mediante el programa MEGA7 (Tamura et al., 2011). Las secuencias se compararon con una base de datos compuesta por especímenes previamente trabajados por el equipo de laboratorio con líquenes del género *Peltigera* del sur de Chile y Antártica (Zúñiga et al., 2015). Se realizó un análisis filogenético, agrupando las secuencias de acuerdo a su similitud, y se definieron como OTUs (*Unidad Taxonómica Operativa*) los grupos de individuos con origen monofiléticos y soporte de ramas confiable (Bootstrap > 75).

Se seleccionó una secuencia representante de cada OTU para realizar un alineamiento mediante MUSCLE (Edgar, 2004) junto con secuencias descritas previamente por el equipo de laboratorio y secuencias cercanas de acuerdo a la base de datos de GenBank del NCBI fehacientemente identificadas por otros autores (Goffinet et al., 2003; Miadlikowska & Lutzoni, 2000; Zúñiga et al., 2015). Se utilizó el software MEGAX para identificar el mejor modelo evolutivo para el conjunto de secuencias (Tamura et al., 2011) utilizando valores de (i) el criterio de información bayesiano (BIC) (Schwarz, 1978) y (ii) el criterio de información de Akaike (AIC) (Hurvich & Tsai, 1989).

Para el diseño de los árboles filogenético basados en el método de Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987) se utilizó el valor del parámetro gamma y modelos recomendados.

Tras la identificación de las parejas simbiontes, se seleccionó la OTU más abundante en cada sitio como modelo de estudio para el presente trabajo.

3.3.6 Perfiles de RFLP

Debido a que no se logró obtener secuencias de alta calidad de la región ITS para llevar a cabo un análisis filogenético para las muestras provenientes de *Pradera*, se realizó la digestión de la región ITS de las muestras identificadas como *Peltigera sp.* y *Peltigera ponojensis*, con el fin de distinguir los especímenes pertenecientes a diferentes haplotipos. A partir del DNA extraído, se amplificó la región ITS, y los amplicones fueron resueltos en geles de agarosa al 2% (p/v) en amortiguador TAE 1X teñidos con GelRed™ (Biotium).

La banda de interés para el amplicón ITS se purificó a partir del gel utilizando el kit “Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up System” (Promega) según las indicaciones del fabricante. El amplicón purificado se cuantificó y evaluó su pureza por espectrometría, utilizando el equipo Epoch™ (BioTeK) midiendo a longitudes de onda de 260 nm y 280 nm. Además se corroboró la pureza de la región de interés, resolviendo el purificado en gel de agarosa 2% (p/v) en amortiguador TAE 1X teñidos con GelRed™ (Biotium), y cuantificando con el software ImageJ (Schneider et al., 2012).

Las secuencias parciales obtenidas de la región ITS de las muestras de interés se sometieron a un análisis *in silico*, evaluando los posibles sitios de digestión por una librería de enzimas disponibles (Anexo tabla A2) en el programa *SnapGene® software* (GSL Biotech).

Con base en dicho análisis, los amplicones se sometieron a digestión enzimática, utilizando las enzimas *DraI*, *HhaI* e *HinfI* (Thermo Fisher) para las muestras identificadas como *Peltigera sp.* y *Clal* y *HhaI* para *Peltigera ponojensis*, según las indicaciones del fabricante para cada enzima. Finalmente, las digestiones se resolvieron en geles de agarosa al 2% (p/v) en amortiguador TAE 1X teñidos con GelRed™ (Biotium).

3.4 Fraccionamiento de fósforo en sustratos de líquenes *Peltigera*

3.4.1 Elección de las muestras para fraccionamiento de fósforo

Se seleccionaron 6 muestras de *Peltigera frigida* para *Bosque*, y 6 muestras de *Peltigera sp.* para *Pradera*, de modo que cada grupo presentara el mismo haplotipo *micobionte* y *cianobionte*, M6C1 para *Bosque* y M3C17 para *Pradera*.

3.4.2 Fraccionamiento de fósforo

Para obtener las fracciones de P en el sustrato de los cianolíquenes, se utilizó la metodología de Hedley et al. (1982) modificada por Do Nascimento et al. (2015).

Se tomaron 0,5 g de sustrato adherido a los líquenes, el cual fue tamizado y secado por 72 hrs a 60°C. Las fracciones se obtuvieron mediante la extracción secuencial de los reactivos químicos: (i) Agua desionizada, (ii) NaHCO₃ 0,5 M, y (iii) NaOH 0,1 M. Después de cada extracción, las suspensiones de suelo se centrifugaron a 5.500 rpm durante 15 minutos para recolección de los sobrenadantes.

Las fracciones tratadas con NaHCO₃ y NaOH fueron precipitadas incubando la solución con ácido sulfúrico 0,9 M por 30 min a 4°C, centrifugando a 5.500 rpm, y rescatando el sobrenadante. Además estas fracciones fueron digeridas con ácido sulfúrico concentrado y persulfato de amonio, por dos horas a 121°C en autoclave. Las muestras digeridas fueron neutralizadas, utilizando el indicador paranitrofenol 0,1% (p/v), y soluciones de NaOH 8M y ácido sulfúrico 0,9 M.

Finalmente, el contenido de fósforo se determinó mediante el método colorimétrico de Murphy & Riley (1962), midiendo la absorbancia a 880 nm por espectrometría (BioTeK). Se diseñó una curva de calibración con concentraciones conocidas de KH_2PO_4 en solución ácida, para la calibración de las mediciones en el equipo y posterior cuantificación de las fracciones. Cada una de las mediciones fue realizada en duplicado con un coeficiente de variación menor al 5% entre medidas. La concentración para cada fracción se obtuvo considerando la absorbancia, la pendiente de la curva de calibración y las consecutivas diluciones. Para las mediciones donde se obtuvo una absorbancia menor al límite de cuantificación ($0,15 \mu\text{g/ml}$), el fraccionamiento se realizó con 0,7 g de sustrato y 7 ml de solución (H_2O desionizada).

El fósforo orgánico se obtuvo de la diferencia entre el fósforo total de cada fracción con el fósforo inorgánico (Figura 2).

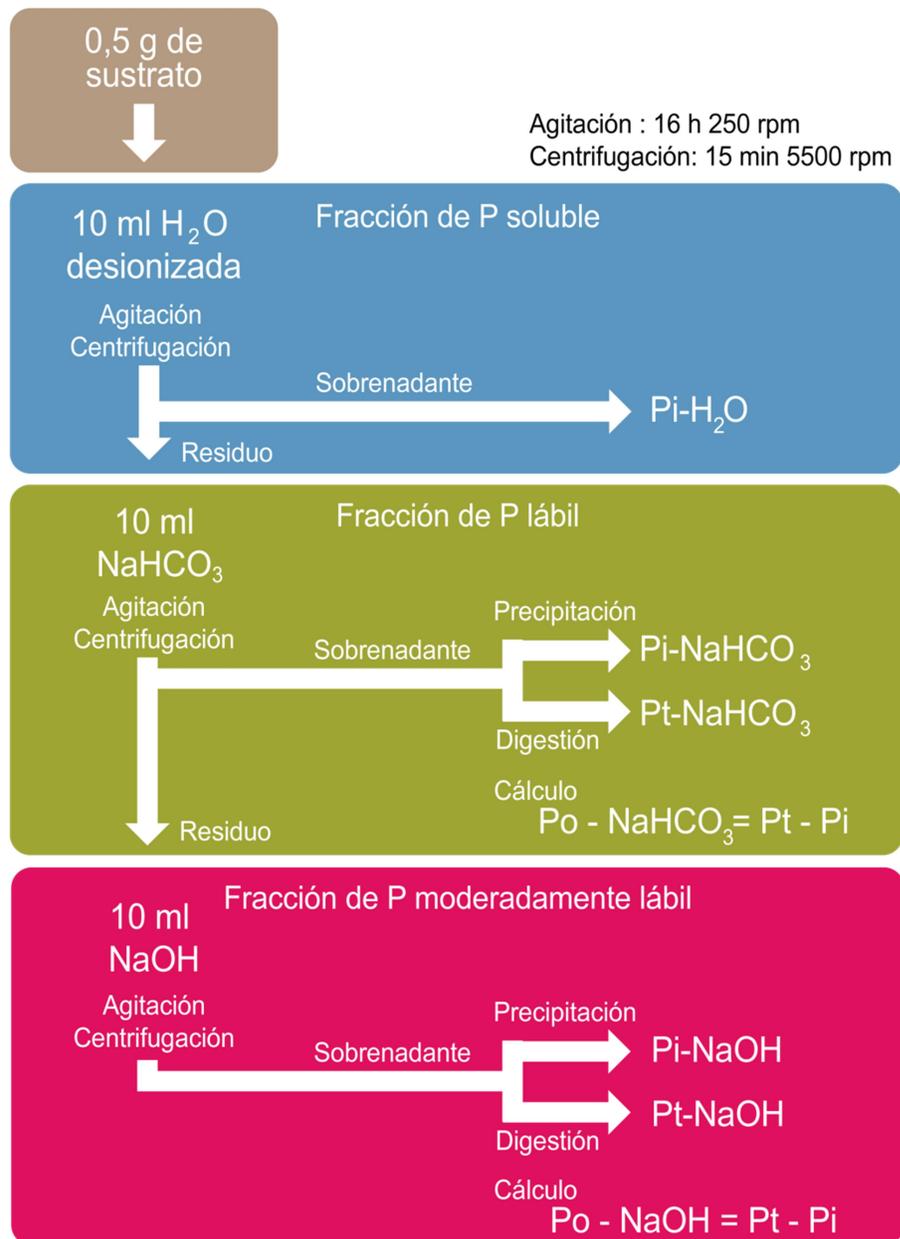


Figura 2. Metodología utilizada para determinar las distintas fracciones de P en los sustratos, basado en el fraccionamiento de Hedley et al. (1982) modificada por Do Nascimento et al. (2015).

3.4.3 Comparación estadística de las fracciones de fósforo

Se realizaron las pruebas Shapiro-Wilk y Jarque-Bera para el análisis de normalidad ($p < 0,05$) con el software PAST (Hammer et al., 2001). Las muestras no paramétricas fueron analizadas con el software R Project (R core Team, 2013) en gráficos de cajas y bigote para identificar y remover los valores desviados (*outliers*). Una vez excluidos los valores, los conjuntos de datos fueron nuevamente analizados con las pruebas de normalidad. Para determinar la homogeneidad de varianza de los pares de muestras a comparar, se utilizó la prueba de Levene basado en los promedios ($p < 0,05$) con el software PAST (Hammer et al., 2001). Comprobados los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza, se llevó a cabo una prueba t de student con corrección de Welch utilizando el software GraphPrism 6 (GraphPad Software), para determinar diferencias significativas entre las distintas fracciones de P de *P. frigida* y *Peltigera* sp. ($p < 0,05$). Para calcular los porcentajes de P *orgánico* e *inorgánico*, la suma de las fracciones *soluble*, *lábil* y *moderadamente lábil* respectivas, fue considerada operacionalmente como el 100% y denominada *Suma de las Fracciones* (SF).

4. Resultados

4.1 Caracterización de los sitios de estudio

Las muestras de líquenes y sustrato asociado se recolectaron en la Reserva Nacional Coyhaique, ubicada en la Región de Aysén, Chile. Dentro de la reserva se determinaron dos sitios de estudio con diferentes contextos ambientales (Figura 3). El primero de ellos correspondió al sitio denominado *Bosque*, ubicado a una altura de 680 m s.n.m ($-45^{\circ} 31' S$ y $-72^{\circ} 02' O$). Este sitio se caracteriza por ser un área forestal con densa cobertura arbórea, compuesta principalmente por bosque decíduo de *Nothofagus pumilio* (lenga), conocida como una especie endémica de los bosques templados de Sudamérica que puede llegar a alcanzar los 30 m de altura, tamaño que decrece progresivamente con la altitud (CONAF, 2019). Este bosque presenta una variedad de estados de conservación, encontrándose zonas de bosque primario maduro, de bosque secundario renoval y zonas con presencia de coníferas (*Pinus sp.*). El segundo sitio se denominó *Pradera*, y corresponde a la zona de pradera altoandina, la cual está ubicada sobre el límite arbóreo con una altitud promedio de 1.200 m s.n.m ($-45^{\circ} 30' S$ y $-72^{\circ} 02' O$). El paisaje se presenta libre de cobertura arbórea, con escasa vegetación y presencia predominante de pastos bajos debido a las condiciones climáticas adversas y una perturbación antrópica casi nula.

En el sitio de *Bosque* se recolectaron 22 muestras, denominadas Pf1 a Pf22 (por *Peltigera frigida*), mientras que en el sitio de *Pradera* se recolectaron 30 muestras, denominadas Ps1 a Ps30 (por *Peltigera sp.*).

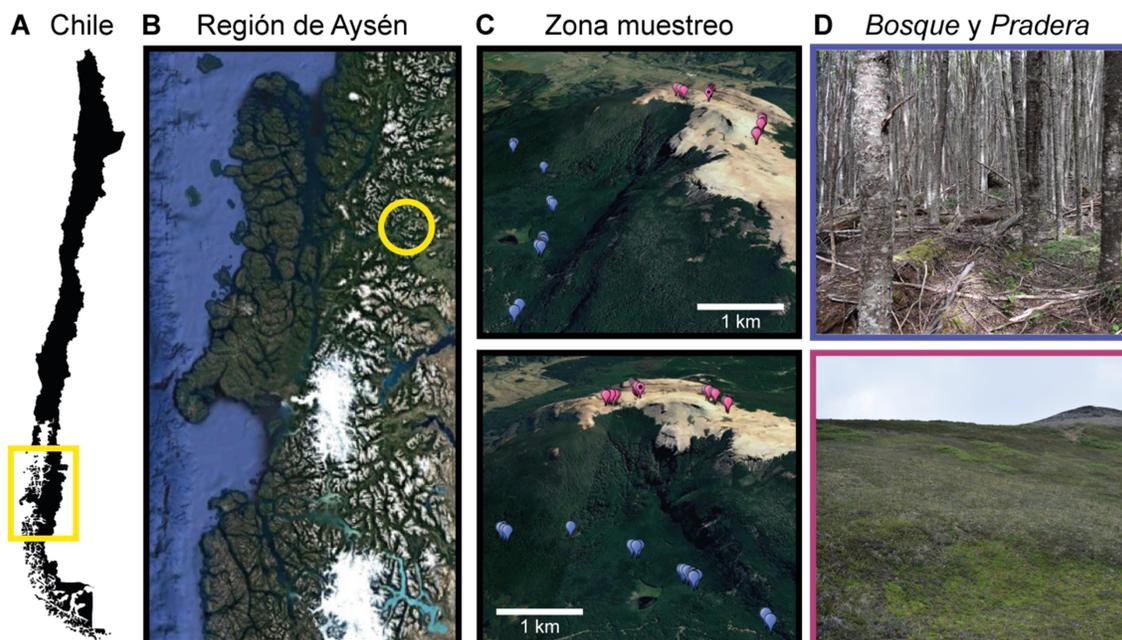


Figura 3. Localización de los sitios de estudio. **(A)** Mapa de Chile, la región de Aysén se indica en rectángulo amarillo. **(B)** Región de Aysén, la Reserva Nacional Coyhaique se indica en círculo amarillo. **(C)** Mapa de zonas de muestreos: sitio de *Bosque* en azul y sitio de *Pradera* en rosa. Distancia de referencia de 1 km indicada en barra blanca. **(D)** Sitios de muestreo: *Bosque* con marco azul (superior) y *Pradera* con marco rosa (inferior).

4.2 Identificación de los componentes simbióticos

Las extracciones de DNA genómico desde los talos liquénicos, fueron de óptima calidad e integridad como se muestra en la electroforesis en geles de agarosa (Anexo Figura A1). Las reacciones de PCR para los marcadores moleculares 16S, 28S e ITS mostraron bandas inespecíficas en alguna de las muestras (Anexo Figura A2), por lo que éstas fueron separadas en geles de agarosa al 2%, y posteriormente las bandas del tamaño esperado cortadas y purificadas.

El marcador 28S se secuenció exitosamente en 51 muestras de un total de 52, la muestra cuya secuenciación no fue exitosa presentó un cromatograma poco precisos (p.e. múltiples picos para una misma posición nucleotídica) y correspondió a uno de los

líquenes recolectado en pradera (Ps28). El análisis de las secuencias de buena calidad mediante la herramienta BLASTn permitió corroborar que las muestras recolectadas son del género *Peltigera*. La construcción del árbol filogenético Neighbor-Joining se realizó con secuencias de una longitud de 715 pares de bases, con el método de sustitución Kimura 2 parámetros y un valor de la distribución gamma de 0,13 (K2+G). Los resultados mostraron que las muestras analizadas pertenecen a OTUs anteriormente encontrados por nuestro grupo en estudios del sur de Chile (Aranda, 2016; Zúñiga et al., 2015). Las OTUs fueron nombradas M1, M3, M5 y M6, manteniendo la nomenclatura utilizada en Zúñiga et al. (2015) y Aranda (2016) (refiriéndose a M de *micobionte*), e incorporando a M10 como un haplotipo no identificado previamente. Las OTUs se asociaron con las secuencias de las siguientes especies o linajes: M1 con *P. ponojensis*, M3 con *Peltigera* sp., M5 con el linaje *P. canina*, M6 con *P. frigida*, y M10 con *P. retifoveata*. De este modo, se encontraron 5 OTUs de micobionte pertenecientes al género *Peltigera*, de los cuales M1, M3, M5 y M6 se encuentran dentro de la sección *Peltigera*, y M10 en la sección *Retifoveatae* (Figura 4).

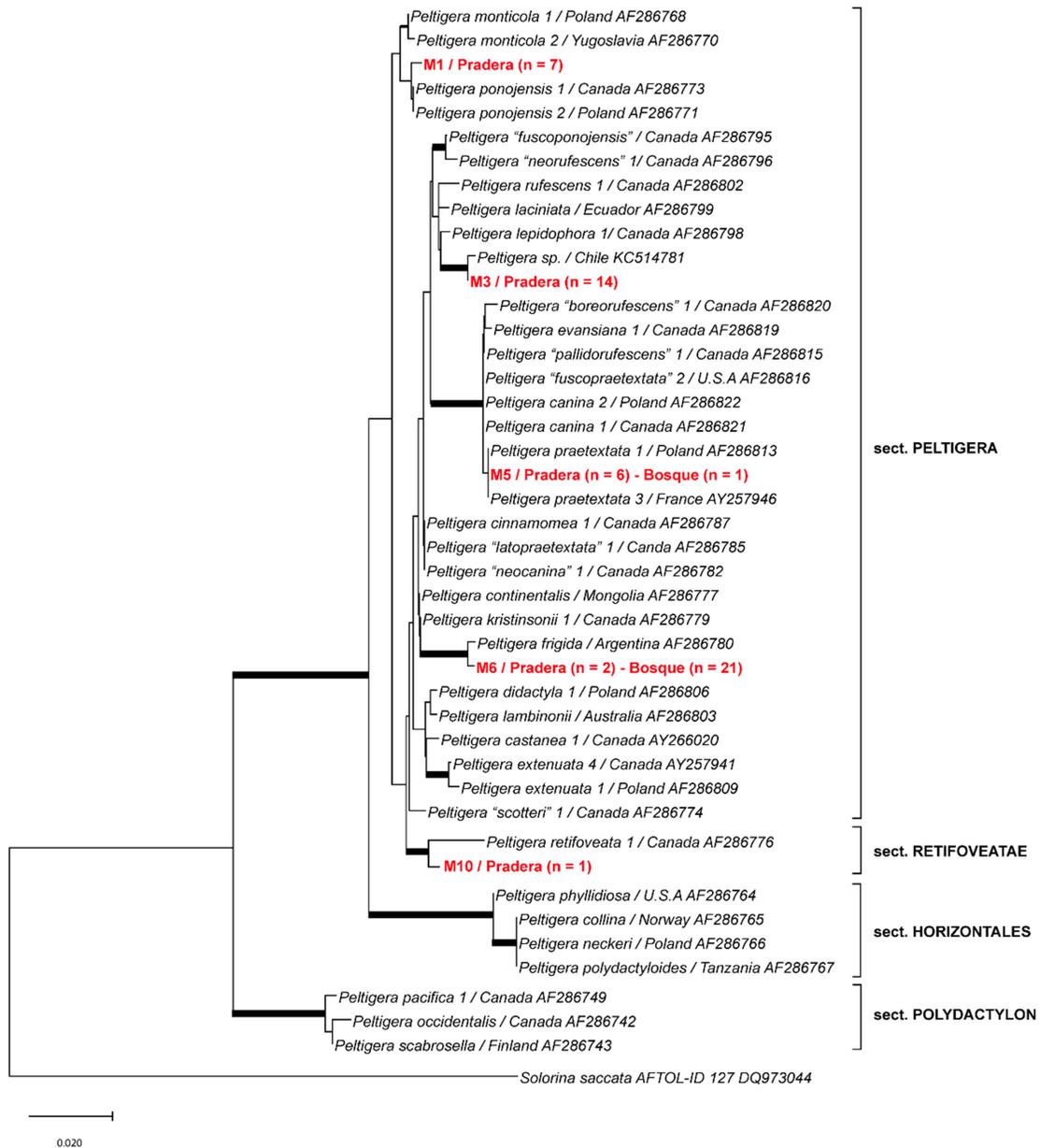


Figura 4. Reconstrucción filogenética obtenida por máxima Verosimilitud (MV) del gen del rRNA 28S de las OTUs de *micobionte* encontrados (M1-M3-M5-M6-M10), junto con secuencias de representantes del género *Peltigera*. Se indica el soporte de los nodos del análisis, con ramas gruesas para valores de *bootstrap* ≥ 75 . Para cada secuencia se indica su origen geográfico y el número de acceso. La secuencia *Solorina saccata* se incluye como raíz. La división de especies en secciones corresponde a la clasificación propuesta por Miadlikowska & Lutzoni (2000).

La identificación molecular del *cianobionte* se realizó mediante la secuenciación del marcador 16S, para el cual se logró una secuenciación exitosa de 47 muestras de un total de 52. Las cinco muestras cuyos cromatogramas presentaron múltiples picos para una misma posición nucleotídica o largos insuficientes para el análisis filogenético provenían del sitio de pradera (Ps18, Ps19, Ps20, Ps25, Ps27).

Para la identificación de OTUs se construyó un árbol filogenético basado en el método Neighbor-Joining con secuencias de una longitud de 675 pares de bases, con el método de sustitución Kimura 2 parámetros y un valor de la distribución gamma de 0,44 (K2+G). Los resultados mostraron que las muestras analizadas pertenecen en su mayoría a OTUs anteriormente reportados por nuestro grupo en estudios del sur de Chile (Zúñiga et al., 2015), por lo que fueron nombradas en base a la nomenclatura utilizada en Zúñiga et al. (2015), incorporando tres OTUs no identificadas previamente, C16, C17 y C18 (refiriéndose a C de *cianobionte*). Todas las muestras se asociaron con el género *Nostoc*, definiéndose 6 OTUs diferentes, C1, C2, C15, C16, C17 y C18. Las secuencias de las OTUs se analizaron con la herramienta bioinformática BLASTn y se seleccionaron las secuencias más cercanas para incorporarlas a la construcción del árbol filogenético (Arima et al., 2012; Zúñiga et al., 2015). El análisis evolutivo final para la construcción del árbol se realizó con una selección de 19 secuencias descargadas de la base de datos GenBank, todas pertenecientes al clado II de acuerdo a la clasificación de O'Brien (Figura 5).

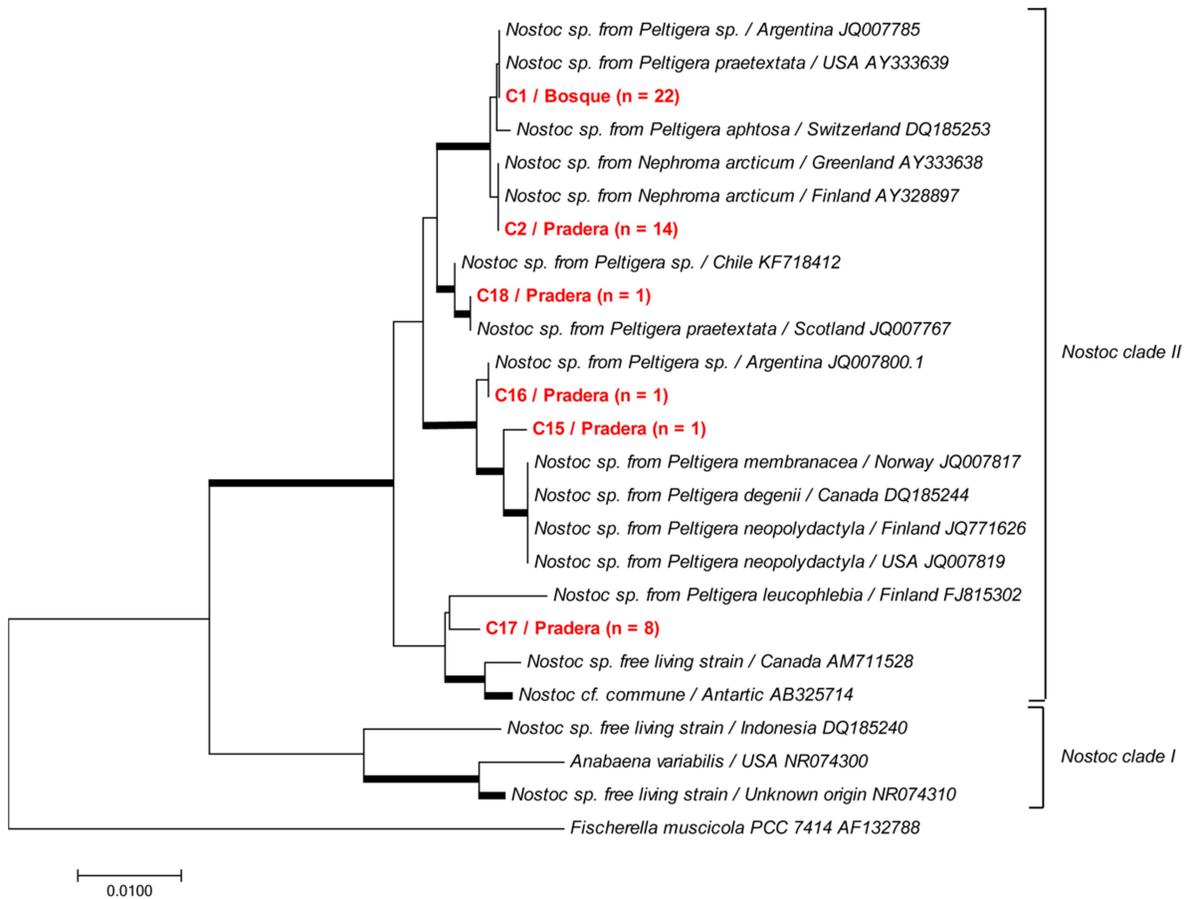


Figura 5. Reconstrucción filogenética obtenida por máxima Verosimilitud (MV) del gen del rRNA 16S de las OTUs de *cianobionte* encontradas, junto con representantes del género *Nostoc*. Se indica el soporte de los nodos, con ramas gruesas para valores de *bootstrap* \geq 75. Para cada secuencia se indica su origen geográfico y el número de acceso. La secuencia *Fischerella muscicola* se incluye como raíz. La división de las especies en los clados *Nostoc* I y II corresponde a la clasificación propuesta por O'Brien et al. (2005).

En el sitio de *Bosque* se identificaron dos OTUs de *micobionte* (M5 y M6), de las cuales la pareja simbiote más abundante correspondió a M6 (relacionado con *P. frigida*) asociada al único *cianobionte* reportado en el sitio, C1. Por otro lado, en el sitio de *Pradera* se encontraron 7 diferentes parejas, entre las cuales las más abundantes correspondieron a M3C17 (asociado a *Peltigera* sp.) y M1C2 (asociado a *P. ponojensis*), cada una con 7 representantes. Para 6 de las muestras de *Pradera* solo se determinó uno de los

integrantes del líquen, *micobionte* para 5 de ellos (M3) y *cianobionte* para uno (C17) (Tabla 3).

Tabla 3. Cantidad y sitio de recolección de parejas de líquenes *Peltigera* identificadas mediante los marcadores moleculares del gen del rRNA 16S y 28S, para *micobionte* y *cianobionte* respectivamente. Las parejas para las cuales solo se identificó uno de los integrantes simbióticos se muestran en gris.

Pareja simbiote	Cantidad	Sitio
M5C1	1	<i>Bosque</i>
M6C1	21	
M1C2	7	
M3C15	1	
M3C17	7	
M5C2	6	<i>Pradera</i>
M6C2	1	
M6C18	1	
M10C16	1	
M3 -	5	
- C17	1	

En el presente estudio se decidió trabajar con líquenes compuestos por los mismos compañeros simbiotes con el fin de minimizar los factores liquénicos intrínsecos que pueden afectar la composición de la microbiota, y con ello el comportamiento del gremio involucrado en la dinámica del P. Con ello en consideración, y sumado a que el *micobionte* no se pudo clasificar a nivel de especie con el marcador 28S, se amplificó y secuenció la región ITS del *micobionte* de las parejas más abundantes en la zona de *Pradera*, M3C17 y M1C2. Debido a la imposibilidad de obtener secuencias de calidad para este marcador molecular, se realizó un análisis de perfiles de RFLP utilizando para M3 las enzimas de restricción *DraI*, *HhaI* e *HinfI*, y para M1 las enzimas *Clal* y *HhaI*. Ya que las secuencias de la región ITS de las OTUs obtenidas eran secuencias parciales, la selección de enzimas se realizó bajo dos criterios: (i) un análisis *in silico* de los posibles

sitios de corte de las secuencias parciales de la región ITS utilizando una librería de enzimas disponibles, y (ii) priorizando la diversidad en los sitios de reconocimiento de la secuencia, seleccionando enzimas con sitios de corte variados, como *DraI* con un sitio de reconocimiento rico en Adenina y Timina, *HhaI* en Guanina y Citocina, y *HinfI* y *ClaI* con nucleótidos variados, y uno inespecífico para *HinfI* (N del inglés “*aNy nucleotide*”) (Tabla 4).

La digestión del grupo de muestras M1C2 con la enzima *ClaI* mostró que dos de las muestras (Ps29 y Ps30) presentaron patrones de bandas diferentes al resto de las muestras (Anexo Figura A4). Para el grupo M3C17, la digestión con la enzima *HhaI* mostró que la muestra Ps10 presentó su banda de mayor masa molecular (Anexo Figura A3) al de las otras muestras M3C17, razón por la cual fue descartada para los siguientes análisis.

De este modo, de acuerdo a los perfiles obtenidos y a la identificación de los componentes simbióticos, se seleccionaron 6 muestras de parejas M3C17 (Ps1 – Ps4 – Ps5 – Ps14 – Ps24 – Ps26) con perfiles de RFLP idénticos para cada enzima de restricción (Figura 6). De manera independiente, las tres digestiones resultaron en dos fragmentos de restricción de pesos moleculares similares entre las diferentes enzimas, donde *DraI* mostró fragmentos de 190 y 450 pb, *HhaI* de 230 y 480 pb, y *HinfI* de 230 y 450 pb, aproximadamente (Tabla 4) (Figura 6).

Tabla 4. Enzimas de restricción utilizadas en las digestiones enzimáticas de la región ITS de *micobiontes* M3 asociados a C17 y M1 asociado a C2, sus sitios de reconocimiento de secuencias nucleotídicas de acuerdo a la nomenclatura IUPAC y fragmentos de restricción obtenidos para las digestiones de M3.

Enzima	Sitio de corte	Fragmentos de restricción para M3
<i>Clal</i>	5' ...AT↓CGAT... 3' 3' ...TAGC↑TA... 5'	-
<i>DraI</i>	5' ...TTT ↓AAA... 3' 3' ...AAA↑ TTT... 5'	190+450
<i>HhaI</i>	5' ...GC G↓C... 3' 3' ...C↑G CG... 5'	230+480
<i>HinfI</i>	5' ...G↓ANTC... 3' 3' ...CTNA↑G... 5'	230+450

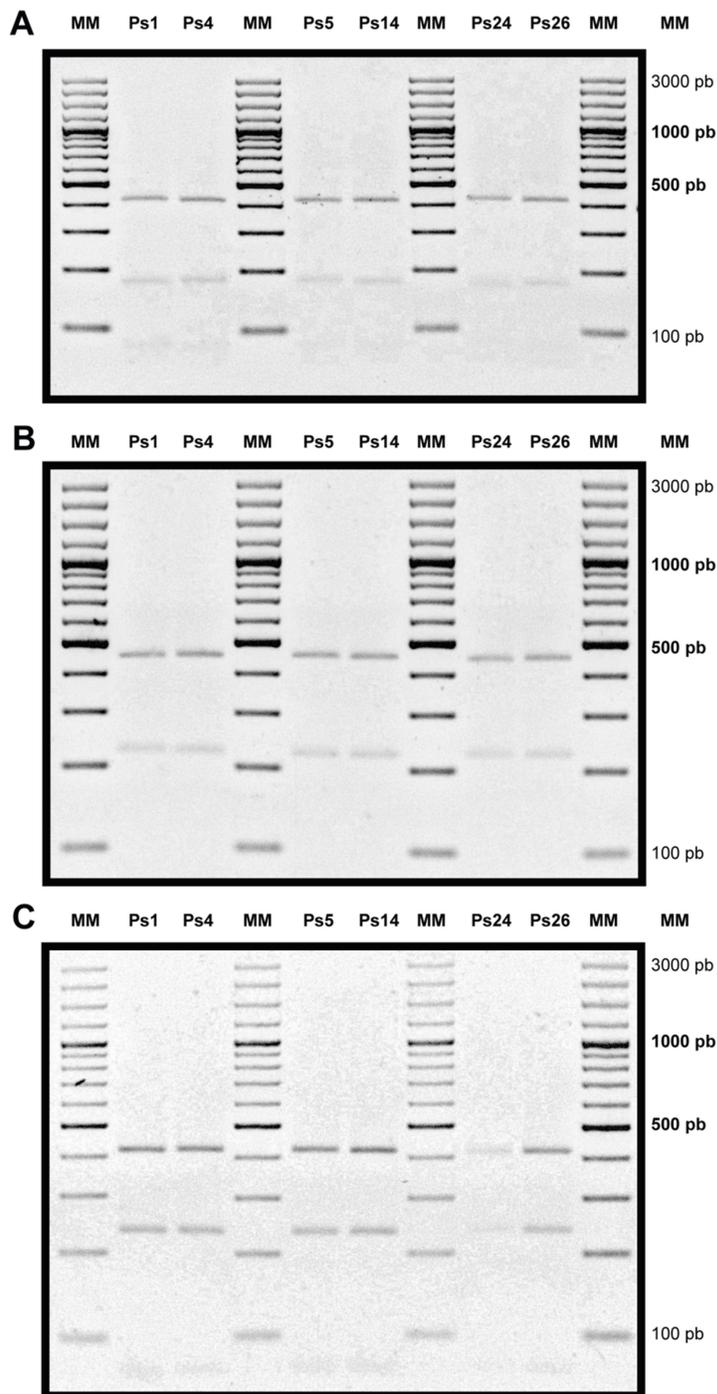


Figura 6. Digestión enzimática del amplicón de la región ITS de *micobionte*, para muestras identificadas como *Peltigera sp. M3* (Ps1 – Ps4 – Ps5 – Ps14 – Ps24 – Ps26). Las enzimas utilizadas fueron: **(A)** *DraI*, **(B)** *HhaI* y **(C)** *HinfI*. **(MM)** Marcador de peso molecular “GeneRuler™ 100 bp plus DNA Ladder” (Thermo Scientific™)

4.3 Fracciones de fósforo en los sustratos de cianolíquenes *Peltigera*

Para el fraccionamiento de fósforo se seleccionaron 6 muestras de líquenes identificados con un mismo *micobionte* y *cianobionte* para cada sitio de muestreo; (i) 6 líquenes *P. frigida* con el cianobionte C1 en *Bosque* y (ii) 6 líquenes *Peltigera sp.* con el cianobionte C17 en *Pradera* (Anexo Tabla A1).

El protocolo de extracción de fósforo fue modificado para la cuantificación de las muestras con muy baja concentración de fósforo (e.g. fracción extraída con H₂O desionizada para muestras de *Pradera*), realizando la incubación de las muestras con 0,7 g de sustrato y 0,7 ml de H₂O desionizada.

La fracción de *P soluble* (P-H₂O) en sitios de *Bosque* y *Pradera* fue de 18,3 y 2,8 mg P/Kg de suelo respectivamente, siendo significativamente diferentes de acuerdo a la prueba t de Student ($p = 0,000579$). Tras el análisis de normalidad, se detectaron dos muestras con valores desviados (*outliers*) de *P soluble* en *Bosque* (Pf9 con 29,6 mg Pi/Kg de suelo y Pf19 con 9,6 mg Pi/Kg de suelo) y uno en *Pradera* (Ps24 con 7,1 mg Pi/Kg de suelo), por lo que estos valores fueron descartados de los análisis posteriores. Además, las cantidades de P obtenidas en *Bosque* resultaron ser más dispersas que en *Pradera*, presentando una desviación estándar de 2,6 para las medidas de *Bosque* y 0,9 para *Pradera* (Figura 7A).

La fracción de *P lábil* (P-NaHCO₃) fue de 163,6 mg P/Kg de suelo en *Bosque* y 53,4 mg P/Kg de suelo en *Pradera*. Al evaluar las cantidades de *Pi* de la fracción *lábil* (Pi-NaHCO₃), en *Bosque* resultó ser de 109,5 mg P/Kg de suelo, siendo significativamente mayor que el *Pi* en *Pradera*, el cual no superó los 16,5 mg P/Kg de suelo ($p = 5,7 \cdot 10^{-5}$). En esta fracción, las medidas en *Bosque* (SD = 19,2) también mostraron una mayor dispersión en relación a las de *Pradera* (SD = 2,9) (Figura 7B). Por otro lado, la fracción

orgánica del *P lábil* (Po-NaHCO₃) no resultó significativamente diferente de acuerdo a lo obtenido en el test t de Student ($p = 0,1377$), alcanzando valores promedio de 54,1 mg P/Kg de suelo en *Bosque* y de 37,1 mg P/Kg de suelo en *Pradera* (Figura 7B). Tanto la fracción inorgánica como orgánica del *P lábil* de *Pradera*, presentaron los valores de la muestra Ps24 como valores fuera del rango (116,6 mg Po/Kg de suelo y 35,14 mg Pi/Kg de suelo), y por tanto fueron removidos de los análisis posteriores. Los valores de desviación estándar fueron de 22,5 en *Bosque* y 9,4 en *Pradera*, presentando una mayor dispersión de medidas en *Bosque*.

La fracción más abundante en ambos sitios resultó ser el *P moderadamente lábil* (P-NaOH), alcanzando un total de 958 mg P/Kg de suelo en *Bosque* y de 418,6 mg P/Kg de suelo en *Pradera*. La fracción inorgánica (Pi-NaOH) resultó ser significativamente mayor ($p = 0,0056$) en *Bosque* que en *Pradera*, con valores de 714,0 y 255,4 mg P/Kg de suelo, respectivamente (Figura 7C). Solo el sitio de *Pradera* presentó valores desviados, los que pertenecieron a las muestras Ps24 (152,6 mg P/Kg de suelo) y Ps5 (313,14 mg P/Kg de suelo). En esta fracción, las mediciones de *Bosque* (SD = 242,5) resultaron ser más dispersas que en *Pradera* (SD = 14,9), al igual que en los casos anteriores. Por el contrario, la fracción de *Po moderadamente lábil* (Po-NaOH) no resultó ser significativamente diferente ($p = 0,0540$) entre *Bosque* (244,3 mg P/Kg de suelo) y *Pradera* (163,2 mg P/Kg de suelo), y presentaron una dispersión de valores muy similar, con una desviación estándar de 62,4 para *Bosque* y 66,2 para *Pradera* (Figura 7C).

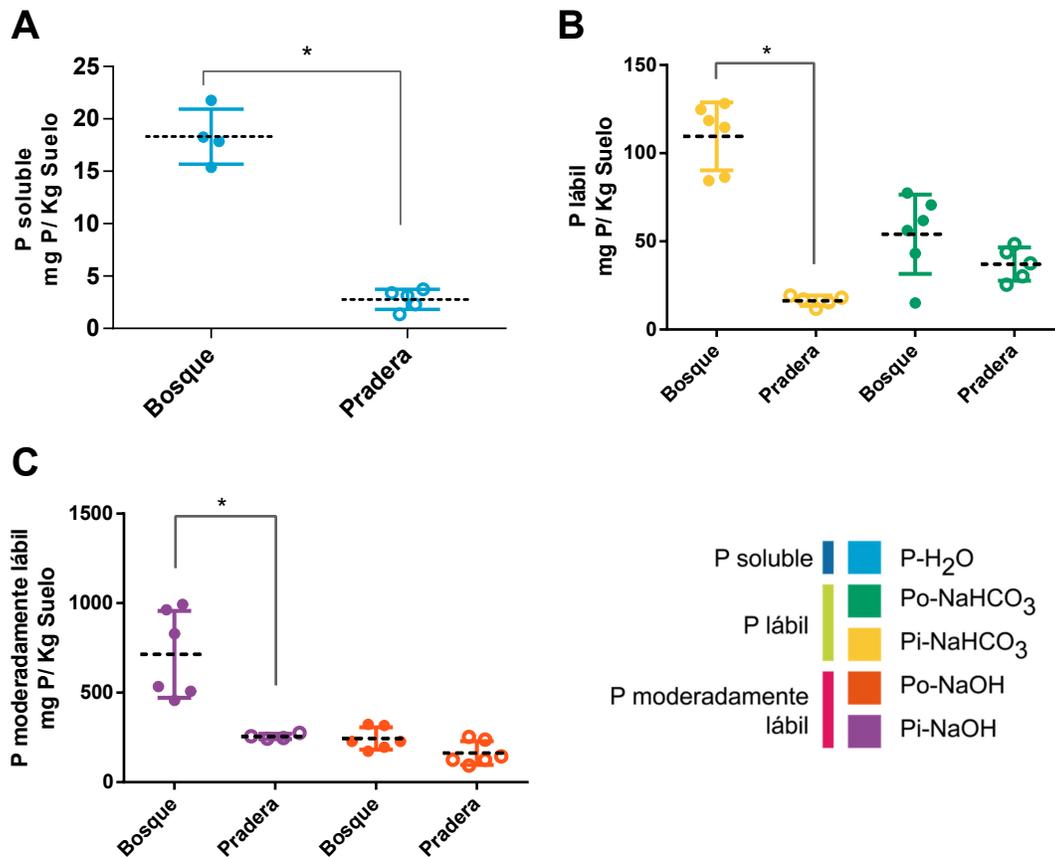


Figura 7. Cantidad de P en las diferentes fracciones en sustratos de cianolíquenes *Peltigera*, obtenido por fraccionamiento de Hedley et al. (1982) modificado por Do Nascimento et al. (2015). Con asterisco negro se indican los pares con diferencias significativas entre sitios de *Bosque* y *Pradera* de acuerdo a la prueba t de Student con corrección de Welch.

La suma de las fracciones (SF) de fósforo medidas en el presente trabajo (*P soluble*, *P lábil* y *P moderadamente lábil*) se definió operacionalmente como el 100% para cada sitio. Al considerar la SF, se observó que el conjunto de P en *Bosque* (1140,2 mg P/Kg suelo) es aproximadamente 2,5 veces mayor que en *Pradera* (474,8 mg P/Kg suelo) (Figura 8A). En ambos casos, tanto en *Bosque* como en *Pradera*, la fracción de *P soluble* resultó la más pequeña de las fracciones medidas, alcanzando un 0,6% de la SF de P en

Pradera y un 1,6% en *Bosque*. Por otro lado, la fracción de *P lábil* representó un 14,3% de la *SF* de *P* en *Bosque* y un 11,3% en *Pradera*. Y finalmente, en ambos casos la fracción de *P moderadamente lábil* superó el 80% de la *SF* (Figura 8A).

Al evaluar los porcentajes de *Pi* y *Po* en las fracciones *lábil* y *moderadamente lábil*, se observó que el *Pi* predomina en *Bosque* para ambas fracciones lábiles (NaOH y NaHCO₃), alcanzando sobre el 60% en la fracción *lábil* y sobre el 70% en la fracción *moderadamente lábil*. Mientras, en el sitio *Pradera*, la fracción *moderadamente lábil* (NaOH) se encuentra repartida en proporciones similares de *Pi* y *Po*, con un leve predominio de *Pi* (61%), mientras que en la fracción *lábil* el *Po* predomina sobre el *Pi*, representando sobre el 70% de la fracción (Figura 8B).

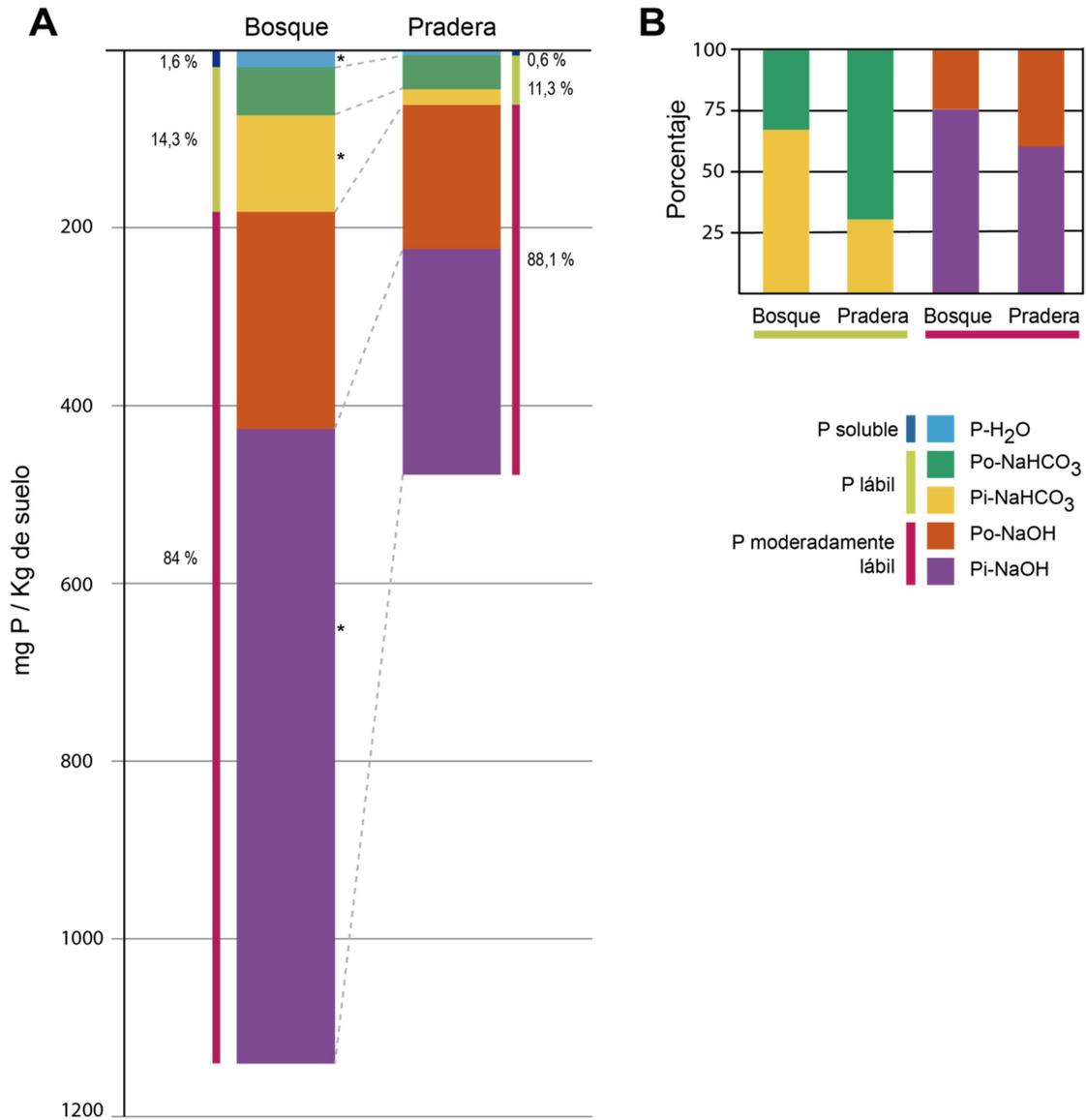


Figura 8. (A) Stock de P y sus fracciones en sustrato de cianolíquenes *Peltigera*. Se indican con asterisco negro las fracciones que fueron significativamente diferentes entre *Bosque* y *Pradera* de acuerdo a la prueba t de Student con corrección de Welch. **(B)** Porcentajes de *Po* y *Pi* lábil y moderadamente lábil para sustratos de cianolíquenes de *Bosque* y *Pradera*. Nota: La suma de las fracciones de P se consideró operativamente como el 100% de P en las muestras, no representando el P total de las mismas.

5. Discusión

5.1 Identificación de los componentes simbióticos de los líquenes

Considerando los antecedentes de la biota líquénica al sur de Chile y su diferente distribución de acuerdo a las características de los ecosistemas, en el presente trabajo se determinó el género *Peltigera* como modelo de estudio (Zúñiga et al., 2015; Magain et al., 2018).

Determinar la identidad de los componentes simbióticos de los líquenes ha presentado grandes dificultades debido a la existencia de especies crípticas, es decir, especies que no poseen características morfológicas y químicas evidentemente diferenciadoras que permitan su identificación y asignación taxonómica (Crespo & Pérez-Ortega, 2009; Lumbsch & Leavitt, 2011). Es así como el enfoque de identificación basado en caracteres fenotípicos para el reconocimiento de especies por mucho tiempo ha subestimado el número de especies de líquenes (Lumbsch & Leavitt, 2011; Miadlikowska & Lutzoni, 2000, 2004). Las especies crípticas pueden encontrarse frecuentemente en líquenes foliosos y fruticosos, incluyendo varios géneros del orden de los *Peltigerales* (Lumbsch & Leavitt, 2011). Es por esta razón que ha sido necesaria la utilización de herramientas moleculares para determinar de manera más precisa la identidad de los componentes simbióticos de los líquenes en este y otros estudios (Miadlikowska & Lutzoni, 2000).

Desde los años 90, las herramientas moleculares han sido ampliamente utilizadas para la identificación de componentes simbióticos, usando como marcadores ciertos genes altamente conservados, con valor taxonómico y filogenético. Para el micobionte se utilizan habitualmente como marcadores los genes ribosomales del rRNA 18S y del rRNA 28S, los cuales codifican los RNAs de las subunidades pequeña y grande de los

ribosomas eucariontes, respectivamente (Miadlikowska & Lutzoni, 2004; Patwardhan et al., 2014); y los espaciadores transcritos intergénicos del operón ribosomal, conocida como la región ITS (Miadlikowska et al., 2003).

Además, este tipo de herramientas son las únicas que permiten identificar el fotobionte presente en estos organismos, para lo cual se suelen utilizar los marcadores moleculares como el gen del rRNA 16S, codificante para la subunidad pequeña del RNA ribosomal en bacterias (Nguyen et al., 2016), y la región *rbcLX*, que incluye parte de la región codificante de la RUBISCO, una chaperona y dos regiones espaciadoras intergénicas (Patwardhan et al., 2014). En el presente trabajo se utilizaron los marcadores moleculares 28S y 16S, para la identificación de los hongos y las cianobacterias, respectivamente. El análisis filogenético de las muestras basado en estos genes, permitió distinguir 5 OTUs fúngicos y 6 de cianobiontes.

5.1.1 Micobionte

El muestreo realizado incluyó un total de 52 especímenes provenientes desde los dos sitios, de los cuales 22 procedían del ambiente *Bosque* y 30 del ambiente *Pradera*. De ellos, 51 especímenes se agruparon en 5 OTUs de micobionte de acuerdo a su alta similitud de secuencia del gen del rRNA 28S con secuencias de especímenes identificados a nivel de especies que se incluyeron durante el análisis filogenético. El espécimen sin identificar correspondió a una de las muestras obtenidas en *Pradera*, para el cual no fue posible obtener secuencias de calidad para su identificación, probablemente debido a la amplificación inespecífica del marcador durante la reacción de PCR. A pesar de los esfuerzos, la estandarización del procedimiento aún continúa en desarrollo.

La reconstrucción filogenética se realizó en conjunto con representantes del género *Peltigera* provenientes tanto del Hemisferio Norte como Sur, incluyendo haplotipos

descritos al sur de Chile (Miadlikowska & Lutzoni, 2000, 2004; Zúñiga et al., 2015). El árbol filogenético obtenido se condice con estudios anteriores y más exhaustivos que indican que los hongos liquenizados del género *Peltigera* tienen un origen monofilético (Miadlikowska & Lutzoni, 2000, 2004).

Cuatro de las OTUs encontradas en este seminario de título ya habían sido previamente encontradas y descritas por nuestro equipo de laboratorio en el sur de Chile (M1, M3, M5 y M6), y la quinta de ellas se incorporó con una numeración consecutiva a las especies identificadas anteriormente (M10) (Aranda, 2016; Zúñiga et al., 2015). Todos ellos correspondieron a miembros bipartitos del género *Peltigera*, coincidiendo con los antecedentes registrados sobre la distribución biogeográfica del género, para los cuales no se han registrado especímenes tripartitos en esta región (Martinez et al., 2003; Quilhot et al., 2012; Ramírez-Fernández et al., 2013; Zúñiga et al., 2015).

El primer sitio de muestreo correspondió a un *Bosque* mixto con una densa cobertura arbórea, donde la selección de muestras fue dirigida con la intención de seleccionar morfológicamente a *Peltigera frigida*, utilizando claves taxonómicas descritas por otros autores para el género *Peltigera* (Brodo et al., 2001) y caracteres identificados en recolecciones previas por el equipo de laboratorio (Zúñiga, 2015). El muestreo dirigido fue exitoso, ya que 21 de las 22 muestras recolectadas resultaron asociadas a la especie *P. frigida* (M6), y solo una de ellas fue asociada al linaje de *P. canina* (M5). Estas OTUs han sido previamente descritas como las más abundantes en muestreos previos en la zona de *Bosque* de la Reserva Nacional Coyhaique (Zúñiga, 2015). *Peltigera frigida* es una especie para la cual se ha descrito una preferencia por hábitats boscosos (Quilhot et al., 2012) con una distribución restringida al sur de Chile y Argentina (Manoharan-Basil, Miadlikowska, Goward, Andrésson, & Miao, 2016). Trabajos realizados por el equipo de

laboratorio permitió corroborar la identificación a nivel de especie de los especímenes M6 a través de análisis filogenéticos de la región ITS (Muster, 2019).

La OTU M5, con solo un integrante, se asoció con el linaje *Peltigera canina* (Magain et al., 2018; Miadlikowska et al., 2003; O'Brien et al., 2009), uno de los grupos más emblemáticos de la sección *Peltigera*, debido a la presencia de especies complejas y crípticas (Manoharan-Basil et al., 2016). Estudios de la región ITS permiten asociar a los especímenes de esta OTU a la especie "*Peltigera fuscopraetextata*" (Almendras et al., 2018). Esta especie putativa se caracteriza por una distribución principalmente circumpolar, incluyendo especímenes en Canadá, Chile y Argentina (Magain et al., 2018), y ha sido previamente descritos más específicamente, en sitios de bosque en la Reserva Nacional de Coyhaique (Región de Aysén), la isla Navarino y el Parque Natural Karukinka (Región de Magallanes) (Almendras et al., 2018; Zúñiga, 2015).

El segundo sitio de muestreo en este trabajo correspondió a una zona de *Pradera* altoandina, libre de cobertura arbórea sobre los 1200 m.s.n.m., donde la recolección de muestras se orientó para seleccionar especímenes identificados como integrantes del género *Peltigera*. En este sitio se identificaron 4 de las 5 OTUs descritas en el trabajo (M1, M3, M5 y M10), entre las cuales 3 de ellas se incluyen en la sección *Peltigera* (M1, M3 y M5) y una en la sección *Retifoveata* (M10). La mayor diversidad de holobiontes en sitio de *Pradera* en comparación a los sitios de *Bosque*, contrario a lo encontrado por otros autores (Aranda, 2016; Ramírez-Fernández et al., 2013; Zúñiga, 2015), se explica por las diferentes técnicas de muestreo realizadas en los sitios, donde la selección de muestras fue dirigida en el sitio de *Bosque*.

El género *Peltigera* consta de 8 secciones (Miadlikowska & Lutzoni, 2000), de las cuales las secciones *Peltigera* y *Retifoveata* son consideradas secciones hermanas con perfiles químicos ricos y distintos (Holtan-Hartwig, 1993; Miadlikowska & Lutzoni, 2000), y

ambas integradas exclusivamente por cianolíquenes bipartitos (Miadlikowska & Lutzoni, 2000; Miadlikowska et al., 2003).

La OTU menos abundante identificada en *Pradera*, con solo un ejemplar correspondió a M10, la cual se asoció a *P. retifoveata*. Este haplotipo no había sido identificado previamente por el equipo de laboratorio en la Reserva Nacional Coyhaique, ni otros sitios muestreados al sur de Chile. La distribución de esta especie se restringe a la zona boreal, incluyendo especímenes en América del Norte (EEUU y Canadá), Europa (Rusia) y Asia (China) (Magain et al., 2018; Martínez et al., 2003). La existencia de pocos estudios sobre la diversidad de líquenes del género *Peltigera* en la región de Aysén, sumado a los altos niveles de endemismo que caracteriza a los bosques del sur de Chile (Galloway, 2008), podría explicar la presencia de haplotipos previamente no identificados en Chile.

Otras OTUs identificadas dentro de la sección *Peltigera* fue M5, la cual se relacionó con el linaje de *P. canina*, probablemente asociado a la especie *P. fuscopraetextata* (Almendras et al., 2018), siendo el tercer OTU más abundante (n = 6) en *Pradera*. Esta OTU también fue encontrada en el sitio de *Bosque* en el presente trabajo, y ha sido descrito como una de los linajes más exitosos ecológicamente y abundantes al sur de Chile con una amplia distribución a nivel global (Leiva et al., 2016; Magain et al., 2018; Zúñiga et al., 2015).

Otra de las OTUs presente en la zona de *Pradera*, la segunda más abundante, correspondió al micobionte M1, el cual se relacionó con *P. ponojensis*. Esta especie se encuentra principalmente en espacios abiertos y alterados, con suelos de baja retención hídrica y expuestos a altos niveles de radiación (Brodo et al., 2001), con una distribución circumpolar principalmente presente en sitios de mayor altura (Flakus & Bielczyk, 2006; Goward et al., 1995; Halici et al., 2018; Nimis et al., 2018), coincidente con las

características biogeográficas del sitio. Al sur de Chile ha sido reportado en el Parque Natural Karukinka (Región de Magallanes) (Ramírez-Fernández et al., 2013) y la Reserva Nacional de Coyhaique (Región de Aysén) (Zúñiga et al., 2015).

Finalmente, la OTU más abundante en *Pradera* correspondió a M3, la cual no se pudo relacionar a ninguna especie y sólo se identificó a nivel de sección, denominándola *Peltigera* sp. Este haplotipo ya se había identificado previamente por nuestro equipo de laboratorio en un estudio realizado en diversos sitios al sur de Chile, incluyendo la Reserva Nacional Coyhaique, el Parque Natural Karukinka, la Isla Navarino y la Isla Decepción (Zúñiga et al., 2015). A pesar de que Zúñiga et al. (2015) analizaron la diversidad de líquenes *Peltigera* en la Reserva Nacional Coyhaique, mismo sitio de estudio del presente trabajo, el haplotipo M3 no fue encontrado. Sino que fue encontrado en el Parque Natural Karukinka, con solo un representante de su tipo en un conjunto de 60 muestras, en un bosque maduro de *N. pumilio* a 153 m s.n.m. La poca información sobre el haplotipo debido a la falta de registros no permite aventurar una descripción de la posible distribución biogeográfica para la especie, aunque de acuerdo a estudios previos (Zúñiga et al., 2015) y a lo visto en el presente trabajo, M3 pareciera poseer una preferencia por sitios libres de cobertura, presentando mayor abundancia en el sitio de *Pradera* en contraste a sitios de *Bosque*.

5.1.2 Cianobionte

De un total de 52 especímenes se obtuvo una secuenciación exitosa del 16S para 47 de ellos. Interesantemente, las muestras para las cuales no se logró obtener secuencias de calidad correspondieron a ejemplares cianobionte con un compañero micobionte identificado como M3. Para los cianobiontes acompañantes de micobiontes M3, en la mayoría de los casos se presentó una amplificación inespecífica del gen del rRNA 16S, y se debió proceder a la purificación del amplicón de interés desde el gel de

agarosa. Esto sugiere que el procedimiento de amplificación aún no se encuentra estandarizado para este tipo de organismos, que por lo demás resultaron no estar previamente identificados (C17 y C18) (Anexo Tabla A1).

El árbol filogenético conseguido tras el análisis de las secuencias del gen del rRNA 16S se condice con estudios anteriores y más exhaustivos que indican que las cianobacterias del género *Nostoc* tienen un origen monofilético (O'Brien et al., 2013; Rikkinen, 2013). Todas las cepas simbióticas de *Nostoc* determinadas en este estudio se encuentran dentro del gremio *Peltigera* informado por Rikkinen et al. (2002) y dentro del Clado *Nostoc* II informado por O'Brien et al. (2005). Según estos autores, todas las cepas *Nostoc* que están asociadas simbióticamente con *Peltigera* pertenecen a este grupo, junto con otras cepas simbióticas y de vida libre, y es posible que todas pertenezcan a una sola especie. La estructura del árbol coincide con lo observado por Myllys et al. (2007) y O'Brien et al. (2005), donde el gremio de cianobiontes de líquenes *Peltigera* (análogo al Clado I por Myllys y Clado II por O'Brien) se subdivide en dos grupos, con un soporte significativo en el presente trabajo (bootstrap > 75), definiendo las ramas integradas por (i) especímenes *Nostoc commune* y (ii) *Nostoc* en su mayoría provenientes de *Peltigerales*.

Las secuencias de *Nostoc* obtenidas en el presente trabajo no se separaron de las secuencias descritas en el hemisferio norte que se obtuvieron de la base de datos, coincidiendo con resultados publicados por otros autores (Sarma, 2012; Stenroos et al., 2006), y sugiriendo que *Nostoc* se encuentra ampliamente distribuido y sin una distribución geográfica definida (Sarma, 2012).

En el presente trabajo se identificaron un total de 6 OTUs de cianobionte, entre las cuales 5 OTUs estuvieron presentes en el sitio de *Pradera* (C2, C15, C16, C19 y C20) y una en el sitio de *Bosque* (C1) (Anexo Tabla A1).

5.1.3 Asociación entre simbioses

Dentro de los especímenes recolectados, se observó que en el sitio de *Bosque* todas las muestras de líquenes, correspondientes a las OTUs M6 y M1, se encontraron asociados al cianobionte C1 ($n = 22$), representando la OTU de cianobacteria más abundante en el presente trabajo. C1 ha sido previamente identificado al sur de Chile, representando la OTU dominante en muestreos realizados en zonas forestales de la Reserva Nacional Coyhaique (Almendras et al., 2018; Zúñiga et al., 2015), y con un alto grado de similitud con cianobiontes descritos anteriormente en América del Sur, en particular de Argentina (Kaasalainen et al., 2012), y América del Norte (EEUU) (Lohtander et al., 2003). Interesantemente, ninguno de los especímenes estudiados en el sitio de *Pradera* presentó al cianobionte C1, a pesar de que los sitios se encontraban relativamente cercanos entre sí (1,5 Km aproximadamente). Este fenómeno podría ser parcialmente explicado al evaluar los factores que determinan la adquisición del cianobionte, donde no solo dependerá de la disponibilidad del fotobionte, sino también de la compatibilidad genética con los micobiontes (especificidad) y la preferencia de este último por un determinado sub-grupo de fotobionte (selectividad) (Zúñiga, 2015). De este modo, a pesar de la cercanía de los sitios, el factor determinante en este caso se propone sería la identidad del simbionte fúngico y su éxito ecológico en zonas abiertas y hostiles como es la cumbre del relieve (*Pradera*).

La poca variabilidad de fotobiontes en el sitio de *Bosque* es consistente con un conjunto común de fotobiontes que podrían estar formando una comunidad de líquenes ligados horizontalmente que crecen en el mismo hábitat (Cornejo & Scheidegger, 2016; Dal Grande et al., 2014; Rikkinen, 2003).

En el conjunto de cianobiones identificados en el sitio de *Pradera*, la OTU más abundante correspondió a C2 ($n = 14$) asociado principalmente a micobiontes M5 y M1.

Esta OTU, previamente encontrada en sitios de bosques jóvenes y maduros en el Parque Nacional Karukinka al sur de Chile (Zúñiga, 2015), también mostró preferencia por asociarse principalmente a los micobiontes mencionados, sugiriendo que la preferencia por la formación de estos holobiontes (M1C2 y M5C2) va más allá de las características biogeográficas de los sitios (*Bosque o Pradera*) y locación (Región de Aysén y Región de Magallanes).

La segunda OTU de cianobionte más abundante en *Pradera* correspondió a C17 con ocho representantes, todos ellos asociados al micobionte M3. Interesantemente, en Zúñiga et al. (2015), el espécimen M3 reportado se encontró asociado exclusivamente al cianobionte (C8) en relación “*uno es a uno*”; fenómeno de exclusividad que se repite en el presente trabajo, sugiriendo un alto grado de selectividad por parte del micobionte M3 y especificidad por parte del cianobionte C17.

La secuencia 16S obtenida para los cianobiontes C17 no se relacionó con ninguna de las especies registradas en la base de datos, sugiriendo la presencia de un nuevo haplotipo. En el análisis filogenético se observó que C17 se encontraría relacionado con más cercanía a los integrantes de la rama de *N. commune* (Myllys et al., 2007; O'Brien et al., 2005), hecho relevante, ya que todas las OTUs previamente reportados al sur de Chile por el equipo de laboratorio (Almendras et al., 2018; Aranda, 2016; Leiva et al., 2016; Zúñiga et al., 2015) se encontraron en la rama de *Nostoc* asociados a *Peltigerales* (Figura 6) (Myllys et al., 2007; O'Brien et al., 2005).

Otros tres haplotipos de cianobacteria fueron identificados con un solo representante para cada uno (C16, C15 y C18). Entre los cuales, dos de ellos habían sido previamente reportados al sur de Chile, C15 en el Parque Natural Karukinka, con tres ejemplares asociados a micobiontes M1 y M5 (Zúñiga et al., 2015), y C16 en datos no publicados por el equipo de laboratorio. En el presente trabajo, C15 se encontró

relacionado con M3, siendo el único ejemplar M3 que presenta un compañero distinto a C17, mientras C16 se encontró asociado al único espécimen M10 identificado. Debido al bajo número de ejemplares recolectados, no es posible especular sobre la preferencia de asociación para holobiontes de estas OTUs.

Finalmente, el cianobionte C18 no se relacionó con ninguna de las especies registradas en la base de datos, sugiriendo la presencia de un nuevo haplotipo. Tras el análisis filogenético, C18 se encontró relacionado tanto a *Nostoc* provenientes de Escocia como de Chile, e incluido en el conjunto de *Nostoc* asociados a *Peltigerales* (Kaasalainen et al., 2012; Zúñiga et al., 2015).

5.1.4. Identificación de haplotipos

Aunque el marcador molecular 28S permitió agrupar las muestras a nivel de OTU y asociar su identidad a especies previamente descritas por otros autores (Zúñiga et al., 2015), este marcador relativamente conservado entre linajes no permite la identificación precisa de los especímenes a nivel de especie por sí solo, ya que especímenes de linajes crípticos o especies cercanas filogenéticamente podrían presentar secuencias muy relacionadas (e. g. Linaje *Peltigera canina*). De este modo, con el fin de corroborar los haplotipos de las muestras identificadas en el sitio de *Pradera*, se secuenció la región ITS.

La región del espaciador transcrito intergénico (región ITS) ha sido propuesto como el marcador de DNA universal para hongos (Schoch et al., 2012), ya que se encuentra menos conservada evolutivamente que los genes codificantes de los rRNA (Bruns et al., 1991), es decir, posee una tasa evolutiva mayor. Al ser típicamente especie-específico permite detectar variabilidad genética entre especies relacionadas, otorgándole un alto valor identificador y taxonómico (Bruns & Shefferson, 2004; Kõljalg et al., 2005). Sin embargo, a pesar de los esfuerzos por amplificar la región ITS para la identificación de

los micobiontes, en el presente trabajo no fue posible obtener secuencias de calidad para el análisis filogenético. Los integrantes del género *Peltigera* comúnmente presentan corridas mono-nucleotídicas en la región ITS (Miadlikowska et al., 2003), lo que se sabe causaría problemas en la secuenciación mediante el método de Sanger (Kircher & Kelso, 2010).

Considerando el posible impacto que pueden presentar los factores intrínsecos del líquen, tanto del micobionte como del cianobionte, frente a la composición de su microbiota asociada, se propuso utilizar durante los análisis del fraccionamiento de P individuos relacionados con la misma especie fúngica, presentando un mismo haplotipo para la región ITS. Debido a que no fue posible la identificación de las muestras a través de la secuenciación de la región ITS, se realizó un análisis de perfiles de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción de los amplicones obtenidos a partir de la amplificación por PCR de la región ITS (PCR-RFLP de la región ITS) de las muestras pertenecientes a los grupos de parejas más abundantes (M3C17 y M1C2), descartando para el análisis y continuidad del trabajo algunas de las muestras debido a su baja cantidad de representantes micobiontes muestreados (M10 y M6), su linaje micobionte compuesto de especímenes crípticos de difícil identificación (M5), o presentar cianobionte que no lograron ser identificados (Ps18 – Ps19 – Ps20 – Ps25 – Ps27) o diferentes de C17 (Ps9).

La técnica de análisis de PCR-RFLP ha sido ampliamente utilizada con el fin de distinguir diferentes especies de hongos y otros organismos (e. g. Carvalho et al., 2005; Fernández-Espinar et al., 2000; Guillam et al., 1998; Williams et al., 1995). Esta técnica permite diferenciar secuencias de DNA homólogas al detectar fragmentos de diferentes largos luego de la digestión enzimática de los amplicones con endonucleasas de restricción específicas, ya que los polimorfismos de nucleótido único (SNP del inglés

single nucleotide polymorphism) pueden crear o eliminar sitios de reconocimientos de las endonucleasas de restricción (NCBI, 2018), y con ello generar perfiles de fragmentos de restricción diferentes para distintas especies.

Ya que la secuencia de la región ITS de los especímenes M3 y M1 eran desconocidas, los perfiles de RFLP se obtuvieron utilizando enzimas de restricción seleccionadas de modo que presentaran (i) posibles cortes en la secuencia parcial de ITS de acuerdo a análisis *in silico*, y (ii) diversidad en sus sitios de corte. Gracias a este análisis fue posible descartar el conjunto de muestras asociadas a M1, las cuales presentaron perfiles de digestión diferente, sugiriendo una variedad de haplotipos para la región ITS. De la misma manera, las digestiones para el conjunto de muestras M3 permitieron el descarte de una de las muestras (Ps10). Considerando que las bandas de menor peso molecular resultaron a la misma altura para todas las muestras M3 (sugiriendo que presentan el mismo tamaño), la conocida hipervariabilidad que presenta la región ITS (Miadlikowska et al., 2003), y la sutil diferencia entre las bandas de mayor masa molecular (Anexo Figura A3) del conjunto de especímenes M3, se propone que el micobionte de Ps10 podrían presentar la inserción de un número pequeño no definido de nucleótidos que probablemente no interfirió con el reconocimiento y corte de la enzima *HhaI*.

De este modo, los micobiontes de Ps1 – Ps4 – Ps5 – Ps14 – Ps24 – Ps26 fueron sometidos a la digestión enzimática con las enzimas *DraI*, *HhaI* y *Hinfl*, resultando en perfiles idénticos en cada digestión de manera independiente, sugiriendo que dichos especímenes podrían pertenecer con cierto nivel de certeza al mismo haplotipo de micobionte *Peltigera sp.*, y por tanto, la misma especie.

5.2 Fracciones de fósforo en los sustratos de cianolíquenes

Con el objetivo de estimar las fracciones de P en los sustratos de los líquenes se seleccionaron las parejas más abundantes en los sitios de estudio en el presente trabajo, las cuales correspondieron a *Peltigera sp.* (M3) asociado al cianobionte C17 en *Pradera*, y *P. frigida* (M6) asociado a C1 en *Bosque*, ambos sitios ubicados en la Reserva Nacional de Coyhaique, en la Región de Aysén, Chile.

Específicamente, se evaluó la cantidad de P en su estado *soluble* (P-H₂O), *lábil* (P-NaHCO₃) y *moderadamente lábil* (P-NaOH). La fracción de *P no lábil*, que también pueden obtenerse a través del método de fraccionamiento de Hedley (1982) utilizando una solución de HCl como extractante (Hedley et al., 1982), no se analizó en el presente trabajo, ya que esta fracción ha sido descrita como indicador de la reserva de P asociado a minerales primarios o como P asociado fuertemente a la materia orgánica recalcitrante, y no se encuentra disponible en periodos cortos para el consumo por parte de la biota (Costa et al., 2016; Cross & Schlesinger, 1995).

El agua presente en el sustrato de líquenes y plantas contiene diversos nutrientes, como son los iones ortofosfatos, junto a los cuales conforma la solución acuosa del suelo (Domenech & Peral, 2006). El *P soluble* presente en esta solución acuosa puede ser asimilado directamente por los organismos, y por tanto, su cantidad en solución será un factor determinante en el desarrollo del ecosistema (Turner & Condron, 2013). Durante el fraccionamiento de Hedley, la cantidad de P en su estado de ortofosfatos (*P soluble*) es obtenido a partir de la incubación del sustrato en agua, primer y más suave extractante (pH neutro) utilizado, que busca imitar la solución acuosa del suelo. Así como se ha visto en otros trabajos, la cantidad de P en esta fracción resultó ser significativamente diferente entre sustratos de *Pradera* y *Bosque*, siendo menor en *Pradera* (Cassagne et al., 2000), y representando la fracción de P más pequeña de todas, en ambos casos (Negassa &

Leinweber, 2009; Sims & Pierzynski, 2005). Estudios sobre el *P soluble* han mostrado que factores microclimáticos, tales como la humedad del sustrato, afectarían las concentraciones del *Pi* en forma de ortofosfatos, incrementando la disponibilidad de P en suelos con mayor contenido de agua (Rojas, 2019). Considerando que se ha observado que sitios de pradera tienden a presentar una humedad del suelo menor que sitios de bosque (Huber & Lopez, 1993), y que el muestreo se realizó en periodo de verano, época con climas calurosos en el hemisferio sur, los bajos niveles de *P soluble* detectados en el sitio de *Pradera* en comparación al sitio de *Bosque*, se sugiere podrían ser consecuencia de una posible deshidratación de los suelos en sitios de *Pradera*, debido a su exposición a factores climáticos intensos, como es la exposición a la radiación solar y alta tasa de evaporación del agua desde el suelo (Bader et al., 2007).

Para la extracción de *P lábil* se utilizó como reactivo una solución de NaHCO_3 , la cual simula el ambiente de extracción del P al imitar la actividad de respiración por las raíces en el suelo (Baumann et al., 2018; Bowman & Cole, 1978), ya que éstas producen CO_2 , formando bicarbonato y varios ácidos orgánicos en la solución del suelo (Baumann et al., 2018). Por un lado, el *Pi lábil*, relacionado al P sorbido débilmente en minerales secundarios, resultó ser significativamente mayor en sitios de *Bosque* que en sitios de *Pradera*. Este fenómeno se sugiere sería consecuencia del mayor nivel de desgaste que presentan los suelos de *Bosques* debido a la mayor colonización por parte de organismos vivos, y una consecuente erosión química y física de origen biológico. Por otro lado, el *Po lábil*, el cual se ha relacionado con compuestos orgánicos fácilmente solubilizables y asociados débilmente a ácidos húmicos y fúlvicos (Busman et al., 2002; Picone & Zamuner, 2002), no fue significativamente diferente en cantidad entre ambos sitios, pero representó un porcentaje mayor en la fracción de *P lábil* de *Pradera*.

Diversos estudios han correlacionado positivamente el *Po lábil* extraído con NaHCO_3 con el crecimiento de plantas vasculares (Bowman & Cole, 1978), el P microbiano (Hedley et al., 1982), la población bacteriana y con la actividad fosfatasa (Bowman & Cole, 1978). En el presente trabajo, para ambos sitios la porción de sustrato analizada correspondió a muestras de suelo altamente meteorizado que forma parte del horizonte O. Este horizonte se caracteriza por ser el más superficial, rico en materia orgánica fresca, tanto parcialmente degradada como resistente a degradación, y con una composición de aire edáfico muy similar al aire atmosférico debido a su alta porosidad (Domenech & Peral, 2006). Estas características edáficas le otorgan al sustrato una buena calidad nutricional para el desarrollo de microorganismos (Domenech & Peral, 2006). De este modo, considerando los antecedentes y características del extractante, así como la naturaleza de las muestras analizadas, los niveles de *Po lábil* obtenidos en el estudio podrían sugerir la presencia de una microbiota acompañante del líquen similar en proporción en ambos contextos ambientales.

Además, se ha visto que el *Po lábil* presenta marcadas variaciones estacionales probablemente debidas a las diferencias en la absorción microbiana o vegetal según la época (Cassagne et al., 2000; Saunders & Metson, 1971; Sorn-srivichai et al., 1988) Por ejemplo, en épocas con temperaturas invernales se favorece la acumulación de materia orgánica (*Po lábil*) (Fabre et al., 1996; Sarathchandra et al., 1989) debido a una inhibición de la actividad de la fosfatasa, y una consecuente desaceleración del proceso de solubilización (Cassagne et al., 2000). Es así como el P en *Pradera*, el cual deriva en mayor parte del desgaste físico y químico de la roca parental por la actividad de la vegetación nativa de líquenes, musgos y pastizales, se componga de una alta proporción de *Po lábil* posiblemente debido a una acumulación de materia orgánica, tanto por el tipo

de consumo de la vegetación del sitio como por las bajas temperaturas climáticas a las que se encuentra expuesta la cima del relieve en comparación a zonas de menor altura.

La fracción más abundante de P en ambos casos fue el *P moderadamente lábil* (P-NaOH), completando sobre el 80% de P detectado en el fraccionamiento (SF). Esta fracción corresponde al P asociado a minerales secundarios de Al y Fe (*Pi*) y sustancias húmicas (*Po*), y por tanto, al P más resistente a la inmovilización y menos disponible de las fracciones estudiadas. Estos resultados coinciden con lo reportado por otros estudios en variados contextos ambientales (Cross & Schlesinger, 1995; Negassa & Leinweber, 2009; Otzen, 2016) así como en reportes sobre la topología de montañas (Cassagne et al., 2000), donde es frecuente que esta fracción (P-NaOH) corresponda a la mayor entre las fracciones analizadas (*P soluble y lábil*) (Otzen, 2016).

En el presente trabajo, el *Pi moderadamente lábil* resultó ser significativamente mayor en *Bosque* que en *Pradera*, sugiriendo un mayor desgaste del suelo en sitios de menor altura y por tanto una mayor liberación de P a partir de la roca parental, debido principalmente al asentamiento y acción de los organismos (Kitayama et al., 2000). Interesantemente, la fracción de *Po moderadamente lábil* no presentó diferencias significativas entre sitios, fenómeno observado en otros estudios (André Fabre et al., 2006) donde sitios con vegetación con alta cobertura presentaron porcentajes y cantidades de *Po moderadamente lábil* similares a sectores ricos en arbustos y de menor cobertura (<60%). Este efecto se atribuye principalmente a las condiciones medio ambientales sobre el límite arbóreo donde durante periodos con climas hostiles las plantas y microorganismos mueren, y las tasas de solubilización disminuyen, dirigiendo la acumulación de materia orgánica en estos sitios (Cassagne et al., 2000; André Fabre et al., 2006).

Finalmente, la *suma de las fracciones* de P (SF) fue significativamente mayor en los sustratos de *Bosque* que en los de *Pradera*. Este fenómeno se atribuye a los diferentes factores que intervienen en la dinámica del ciclo del P en los distintos sitios, los cuales influyen la cantidad de P y sus reservorios de acuerdo al contexto del paisaje. Por ejemplo, la salida de P por erosión es un fenómeno de mayor intensidad en cumbre (Li et al., 2009). Se ha visto que procesos erosivos operan con mayor rapidez e intensidad en áreas de montaña, lo que dirige el movimiento de suelos, ya sea en forma de pequeñas partículas o como grandes masas, desde la cumbre hacia sitios de menor altitud (Fernández, 2006; García-Ruiz, 1990), permitiendo con ello el desplazamiento del P desde la cumbre y dirigiendo la acumulación de éste en zonas de menor altura (Kitayama et al., 2000; Li et al., 2009).

Algunos autores han descrito la interacción Suelo-Vegetación-Atmósfera como un ecosistema con características que controlan su propio comportamiento, y que serán determinantes en la respuesta del sitio ante la erosión (Fernández, 2006). De este modo, la erosión en la cumbre de la montaña (*Pradera*) presentará un efecto sinérgico con la ausencia de cobertura arbórea en sitios de mayor altura (Sims & Pierzynski, 2005; Turner et al., 2007), potenciando la pérdida de P. Del mismo modo, la entrada de P a los sistemas por caída de hojarasca y desechos animales también será diferente en ambos contextos. Sitios de menor altura que presentan una mayor riqueza de organismos, como son por ejemplo las plantas vasculares (Grytnes, 2003; Grytnes et al., 2006), también presentan una mayor cobertura vegetal, lo que se ha visto implicaría una mayor entrada de P al sistema por caída de hojarasca y desechos animales (Kitayama et al., 2000), fenómeno que se repite en sitios que solo presentan una diferencia en cobertura arbórea y no altura (André Fabre et al., 2006; Gerding & Thiers, 2002).

De manera general, el *Pi* predominó significativamente en el sitio de *Bosque* en comparación al sitio de *Pradera*, donde las proporciones de *Pi* y *Po* no mostraron grandes diferencias, fenómeno previamente reportado por otros autores (André Fabre et al., 2006; Kitayama et al., 2000). Una de las posibles causas propuestas por algunos estudios corresponde a la posible acumulación de raíces o micorrizas, que han mostrado ser más abundantes en sitios de alta montaña (Kitayama et al., 2000). Esto debido a la estructura raizal que presenta el tipo de vegetación que predomina en estos sitios, como son los pastizales y arbustos, los cuales además se han relacionado con una mayor eficiencia en la captación de P para sitios deficientes en P (Kitayama et al., 2000; Negassa & Leinweber, 2009; Tiessen et al., 1984; Zhu et al., 2001), aumentando su proporción (Lambers et al., 2008), dirigiendo una rápida aparición de *Po* y generando un gran reservorio de *Po* microbiano (Negassa & Leinweber, 2009).

Por su lado, los líquenes se han descrito como un importante componente en la mantención de la biodiversidad de ecosistemas, particularmente en suelos con cantidades limitadas de N (Caldiz et al., 2007; Guzman et al., 1990), como lo son por ejemplo, los sitios de mayor altura (Wilcke et al., 2008). El talo liquénico ha evolucionado para funcionar como un micro-ecosistema capaz de seleccionar los organismos que le permitan un mayor éxito ecológico (Almendras et al., 2018; Aschenbrenner et al., 2016; Leiva et al., 2016a; Zúñiga et al., 2017), generando nichos enriquecidos o no en ciertos gremios funcionales de acuerdo a las condiciones ambientales presentes, y por tanto, un elemento clave en el desarrollo de ecosistemas. A su vez, este conjunto de microorganismos dirige el desarrollo de su entorno, determinando la composición de los suelos adyacentes y permitiendo el asentamiento de otros organismos.

De este modo, la colonización por parte de los líquenes en sitios pobres en P, como son las *Praderas* altoandinas al sur de Chile, sería un factor esencial en el

desarrollo de estos sitios, principalmente por su rol como hospederos y reclutadores de organismos involucrados en la dinámica del ciclo de nutrientes, como el P, al participar en procesos de transformación y reciclaje (Grube et al., 2015). Y así, este conjunto de microorganismos, incluyendo tanto al líquen como su microbiota asociada, serían claves en los procesos de transformación del P a *P orgánico* y *P soluble*.

A su vez, el contenido y disponibilidad de P en los diferentes ecosistemas influenciarían la naturaleza y comportamiento de la micro y macrobiota presente en los sitios. Con respecto a ello, estudios sobre cianolíquenes han mostrado que el P influiría en sus actividades metabólicas, afectando su desarrollo y crecimiento (McCune & Caldwell, 2009; Weiss et al., 2005). Por otra parte, reportes sobre la microbiota del suelo y su relación con el P han observado que el *P soluble* estaría correlacionado negativamente con genes involucrados en la solubilización de fosfato (Acuña et al., 2016; Fraser et al., 2015). De este modo, de acuerdo a lo observado en el presente trabajo, se esperaría que los microorganismos presentes en líquenes localizados en sitios de *Pradera* presenten una mayor cantidad de genes involucrados en la solubilización de P que aquellos presentes en *Bosque*, de modo que los microorganismos asociados al líquen aportaran en el suministro de este nutriente tan importante en el desarrollo del holobionte, y permitiendo su desarrollo en sitios pobres en P. Además, se sugiere que la acumulación de especies de *Po lábil* en los sustratos de estos cianolíquenes sería una consecuencia indirecta de la acción de los organismos solubilizadores presentes en la microbiota del líquen. Se espera que futuros trabajos puedan correlacionar no solo las condiciones del sitio y las fracciones de P presente, sino además incorporar al estudio la identificación y abundancia de genes solubilizadores de P.

De este modo, el presente trabajo permitió conocer las distintas fracciones de P, incluyendo *P soluble*, *lábil* y *moderadamente lábil*, en sustratos asociados a líquenes del

género *Peltigera* creciendo en dos contextos ambientales cercanos pero con diferentes condiciones bióticas y abióticas, como son un *Bosques* de *Nothofagus* típico de la región sur de Chile y una *Pradera altoandina* sobre el límite arbóreo, y de este modo, aproximar una descripción de las posibles funciones relacionadas al gremio funcional del P en dichos nichos, observando como sitios pobres en P, como *Pradera*, presentan un alta proporción de *Po lábil* en relación a la suma de las fracciones de P biodisponible, y con ello, proponiendo la existencia de un gremio rico en solubilizadores de P.

6. Conclusiones

En el presente trabajo se identificaron los simbiontes de cianolíquenes del género *Peltigera* en dos ambientes poco estudiados en cuanto a la diversidad líquénica, un bosque de *Nothofagus* típico del sur de Chile y un sitio de pradera alto andina sobre el límite arbóreo, encontrándose 5 OTUs de micobionte y 6 OTUs de cianobionte del género *Nostoc*. De los micobiontes encontrados, cuatro ya habían sido previamente descritos al sur de Chile, mientras el quinto de ellos correspondió a un haplotipo nuevo. Por su parte, cuatro de los haplotipos descritos para *Nostoc* han sido descritos en sitios al sur de Chile, y dos correspondieron a especímenes nuevos.

Los individuos más abundantes correspondieron a *Peltigera frigida* en *Bosque* y *Peltigera sp.* en *Pradera*, y fueron seleccionados para el análisis de fraccionamiento de P en sus sustratos. En el análisis de fraccionamiento secuencial de P, se observó una mayor cantidad de P en sustratos de *P. frigida* creciendo en *Bosque* que en sustratos de *Peltigera sp.* creciendo en *Pradera*. La fracción de P moderadamente lábil fue la más abundante, representando sobre el 80% del P medido en ambos sitios, mientras que el P soluble correspondió a la fracción más pequeña. Se detectó una mayor cantidad de P inorgánico en *Bosque* que en *Pradera*, mientras que las formas orgánicas de P no fueron significativamente diferentes entre los sustratos de los dos sitios. Esto sugiere una acumulación de materia orgánica similar en los sustratos de líquenes en los diferentes sitios, a pesar de las diferentes cantidades de P disponible.

Estos resultados sugieren que los líquenes estarían cumpliendo un rol en el ecosistema como filtros ambientales, al reclutar una microbiota rica en microorganismos involucrados en la dinámica del P.

7. Bibliografía

- Abdala-Roberts, L., Covelo, F., Moreira, X., Rasmann, S., Berny-Mier y Terán, J. C., & Glauser, G. (2016). Biotic and abiotic factors associated with altitudinal variation in plant traits and herbivory in a dominant oak species. *American Journal of Botany*, 103(12), 2070–2078. <https://doi.org/10.3732/ajb.1600310>
- Acuña, J. J., Durán, P., Lagos, L. M., Ogram, A., de la Luz Mora, M., & Jorquera, M. A. (2016). Bacterial alkaline phosphomonoesterase in the rhizospheres of plants grown in Chilean extreme environments. *Biology and Fertility of Soils*, 52(6), 763–773. <https://doi.org/10.1007/s00374-016-1113-9>
- Almendras, K., Leiva, D., Carú, M., & Orlando, J. (2018). Carbon consumption patterns of microbial communities associated with *Peltigera* lichens from a Chilean temperate forest. *Molecules*, 23(11), 1–18. <https://doi.org/10.3390/molecules23112746>
- Alstrup, V., Søchting, U., Dragsholt, C., Læssøe, T., Thell, A., & Kukwa, M. (2013). Additions to the lichens and lichenicolous fungi of Denmark 8. *Graphis Scripta*, 25(2), 56-63. Tartu. ISSN 0901-7593.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J., & Park, U. (1990). Basic Local Alignment Search Tool 2Department of Computer Science. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Aranda, C. (2016). *El efecto de la cobertura arbórea predomina sobre la identidad de los simbiontes en la estructuración del bacterioma de líquenes del género Peltigera*. Universidad de Chile.
- Arima, H., Horiguchi, N., Takaichi, S., Kofuji, R., Ishida, K. I., Wada, K., & Sakamoto, T. (2012). Molecular genetic and chemotaxonomic characterization of the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune* and its neighboring species. *FEMS Microbiology Ecology*, 79(1), 34–45. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01195.x>
- Aschenbrenner, I. A., Cernava, T., Berg, G., & Grube, M. (2016). Understanding microbial multi-species symbioses. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00180>
- Bader, M. Y., Van Geloof, I., & Rietkerk, M. (2007). High solar radiation hinders tree regeneration above the alpine treeline in northern Ecuador. *Plant Ecology*, 191(1), 33–45. <https://doi.org/10.1007/s11258-006-9212-6>
- Baniya, C. B., Solhøy, T., Gauslaa, Y., & Palmer, M. W. (2010). The elevation gradient of lichen species richness in Nepal. *Lichenologist*, 42(1), 83–96. <https://doi.org/10.1017/S0024282909008627>
- Bates, S. T., Cropsey, G. W. G., Caporaso, J. G., Knight, R., & Fierer, N. (2011). Bacterial communities associated with the lichen symbiosis. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(4), 1309–1314. <https://doi.org/10.1128/AEM.02257-10>
- Baumann, K., Jung, P., Samolov, E., Lehnert, L., Budel, B., Ksrsten, U., & Bendix, J. (2018). Biological soil crusts along a climatic gradient in Chile: Richness and imprints of phototrophic microorganisms in phosphorus biogeochemical cycling. *Soil Biology*

and *Biochemistry*, 127(September), 286–300.
<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.09.035>

- Beck, E., Bendix, J., Makeschin, F., Mosandl, R., & Kottke, I. (2008). Gradients in a Tropical Mountain Ecosystem — a Synthesis. In E. Beck (Ed.), *Gradients in a Tropical Mountain Ecosystem of Ecuador. Ecological Studies* (pp. 451–463). https://doi.org/10.1007/978-3-540-73526-7_43
- Bendix, J., Rollenbeck, R., Richter, M., Fabian, P., & Emck, P. (2008). Climate. In E. Beck (Ed.), *Gradients in a Tropical Mountain Ecosystem of Ecuador. Ecological Studies* (pp. 63–73). https://doi.org/10.1007/978-3-540-73526-7_8
- Benson, D., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D., Ostell, J., & Sayers, E. (2011). GenBank. *Nucleic Acids Research*, 39(Database), D32–D37. <https://doi.org/10.1093/nar/gky989>
- Bowman, R. A., & Cole. (1978). Transformations of organic phosphorus substrates in soils as evaluated by NaHCO₃ Extraction.pdf. *Soil Science*, 125(1), 49–55. <https://doi.org/https://doi.org/10.1097/00010694-197801000-00008>
- Brodo, I., Duran, S., & Sharnoff, S. (2001). *Lichens of North America*. Yale University Press, New Haven, CT, U.S.A.
- Bruns, T. D., & Shefferson, R. P. (2004). Evolutionary studies of ectomycorrhizal fungi: recent advances and future directions. *Canadian Journal of Botany*, 82(8), 1122–1132. <https://doi.org/10.1139/b04-021>
- Bruns, T. D., White, T. J., & Taylor, J. W. (1991). Fungal Molecular Systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 22(1), 525–564. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.22.110191.002521>
- Busman, B. L., Lamb, J., Randall, G., Rehm, G., & Schmitt, M. (2002). Nutrient Management: The nature of phosphorus in soils. Retrieved from <http://www.extension.umn.edu/agriculture/nutrient-management/phosphorus/the-nature-of-phosphorus> (Fecha visita: Marzo 2018)
- Cabrera, M. (1996). Temperaturas bajas y límites altitudinales en ecosistemas de plantas superiores: respuestas de las especies al frío en montañas tropicales y subtropicales. *Revista Chilena de Historia Natural*, 69, 309–320. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.4067/S0716-078X2002000300013>
- Caldiz, M. S., Brunet, J., & Nihlgård, B. (2007). Lichen litter decomposition in *Nothofagus* forest of northern Patagonia: biomass and chemical changes over time. *The Bryologist*, 110(2), 266–273. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1639/0007-2745\(2007\)110\[266:LLDINF\]2.0.CO;2](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1639/0007-2745(2007)110[266:LLDINF]2.0.CO;2)
- Cardinale, M., Grube, M., Castro, J. V., Müller, H., & Berg, G. (2012). Bacterial taxa associated with the lung lichen *Lobaria pulmonaria* are differentially shaped by geography and habitat. *FEMS Microbiology Letters*, 329(2), 1–5. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2012.02508.x>
- Carvalho, C. M., Rocha, A., Estevinho, M. L., & Choupina, A. (2005). Identification of honey yeast species based on RFLP analysis of the ITS region. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 5(1), 37–41.

<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1080/11358120509487665> PLEASE

- Cassagne, N., Remaury, M., Gauquelin, T., & Fabre, A. (2000). Forms and profile distribution of soil phosphorus in alpine Inceptisols and Spodosols (Pyrenees, France). *Geoderma*, 95(1–2), 161–172. [https://doi.org/10.1016/S0016-7061\(99\)00093-2](https://doi.org/10.1016/S0016-7061(99)00093-2)
- Chapman, M. J., & Margulis, L. (1998). Morphogenesis by symbiogenesis. *International Microbiology*, 1(4), 319–326. <https://doi.org/10.2436/im.v1i4.35>
- CONAF. (2019). Guía de Campo: Reserva Nacional Coyhaique. Retrieved from <http://turismocientifico.cl/admin/apps/filemanager/repository/Guías de Campo/Guías Turismo Científico/Guía de Campo Reserva Nacional Coyhaique.pdf>
- Cornejo, C., & Scheidegger, C. (2016). Cyanobacterial gardens: the liverwort *Frullania asagrayana* acts as a reservoir of lichen photobionts. *Environmental Microbiology Reports*, 8(3), 352–357. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12386>
- Costa, M. G., Gama-Rodrigues, A. C., Gonçalves, J. L. de M., Gama-Rodrigues, E. F., Sales, M. V. da S., & Aleixo, S. (2016). Labile and non-labile fractions of phosphorus and its transformations in soil under Eucalyptus plantations, Brazil. *Forests*, 7(1), 1–15. <https://doi.org/10.3390/f7010015>
- Crespo, A., & Pérez-Ortega, S. (2009). Cryptic species and species pairs in lichens: A discussion on the relationship between molecular phylogenies and morphological characters. *Anales Del Jardín Botánico de Madrid*, 66(1), 71–81. <https://doi.org/10.3989/ajbm.2225>
- Cross, A. F., & Schlesinger, W. H. (1995). A literature review and evaluation of the Hedley fractionation: Applications to the biogeochemical cycle of soil phosphorus in natural ecosystems. *Geoderma*, 64, 197–214. [https://doi.org/10.1016/0016-7061\(94\)00023-4](https://doi.org/10.1016/0016-7061(94)00023-4)
- Dal Grande, F. D., Beck, A., Cornejo, C., Singh, G., Cheenacharoen, S., Nelsen, M. P., ... Grande, F. D. (2014). Molecular phylogeny and symbiotic selectivity of the green algal genus *Dictyochloropsis* s. l. (Trebouxiophyceae): a polyphyletic and widespread group forming photobiont-mediated guilds in the lichen family Lobariaceae. *New Phytologist*, 202, 455–470. <https://doi.org/10.1111/nph.12678> Key
- Do Nascimento, C. A. C., Pagliari, P. H., Schmitt, D., He, Z., & Waldrup, H. (2015). Phosphorus concentrations in sequentially fractionated soil samples as affected by digestion methods. *Scientific Reports*, 5(November), 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep17967>
- Domenech, X., & Peral, J. (2006). *Química ambiental de sistemas terrestres* (1st ed.). Reverte.
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32(5), 1792–1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
- Elser, J., & Bennett, E. (2009). A broken biogeochemical cycle. *Nature*, 478, 29–31. <https://doi.org/10.1038/478029a>
- Fabre, A., Gauquelin, T., Vilasante, F., Ortega, A., & Puig, H. (2006). Phosphorus content

- in five representative landscape units of the Lomas de Arequipa (Atacama Desert-Peru). *Elsevier*, 65, 80–86. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2005.10.004>
- Fabre, A., Pinay, G., & Ruffinoni, C. (1996). Seasonal changes in inorganic and organic phosphorus in the soil of a riparian forest. *Biogeochemistry*, 35, 419–432. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/BF02183034>
- Fajardo, A., & De Graaf, R. (2004). Tree dynamics in canopy gaps in old-growth forests of *Nothofagus pumilio* in Southern Chile. *Plant Ecology*, 173(1), 95–105. <https://doi.org/10.1023/B:VEGE.0000026333.54741.97>
- Fajardo, A., & Gundale, M. J. (2015). Combined effects of anthropogenic fires and land-use change on soil properties and processes in Patagonia, Chile. *Forest Ecology and Management*, 357, 60–67. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2015.08.012>
- Fajardo, A., & McIntire, E. J. B. (2010). Merged Trees in second-growth, fire-origin forests in Patagonia, Chile: Positive spatial association patterns and their ecological implications. *American Journal of Botany*, 97(9), 1424–1430. <https://doi.org/10.3732/ajb.1000054>
- Fernández-Espinar, M. T., Esteve-Zarzoso, B., Querol, A., & Barrio, E. (2000). RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacers and the 5.8S rRNA gene region of the genus *Saccharomyces*: a fast method for species identification and the differentiation of flor yeasts. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 78, 87–97. <https://doi.org/https://doi.org/10.1023/A:1002741800609>
- Fernández Torres, R. (2006). *Evaluación Espacial de Procesos Erosivos y Su Influencia Sobre El Corredor De Comercio Las Leñas. VI Región del Libertador Gral. O'Higgins*. Universidad de Chile.
- Filippelli, G. M. (2008). The global phosphorus cycle: past, present, and future. *Elements*, 4(4), 89–95. <https://doi.org/10.2113/gselements.4.2.89>
- Flakus, A., & Bielczyk, U. (2006). New and interesting records of lichens from the Tatry Mountains. In: *Lackovičová A., Guttová A., Lisická E. & Lizoň P. (Eds.), Central European Lichens – Diversity and Threat*, 271–281. Mycotaxon Ltd., Ithaca.
- Fraser, T., Lynch, D. H., Entz, M. H., & Dun, K. E. (2015). Linking alkaline phosphatase activity with bacterial phoD gene abundance in soil from a long-term management trial. *Geoderma*, 257–258(October), 115–122. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2014.10.016>
- Frossard, E., Condron, L. M., Oberson, A., Sinaj, S., & Fardeau, J. C. (2000). Processes Governing Phosphorus Availability in Temperate Soils. *Journal of Environment Quality*, 29(1), 15–23. <https://doi.org/10.2134/jeq2000.00472425002900010003x>
- Galloway, D. J. (1992). Lichens of Laguna San Rafael , Parque Nacional ' Laguna San Rafael ', southern Chile: indicators of environmental change. *Global Ecology and Biogeography Letters*, 2, 37–45. <https://doi.org/200.29.188.60>
- Galloway, D. J. (2008). Lichen biogeography. In T. H. Nash (Ed.), *Lichen biology* (2da Ed, pp. 315–335). Cambridge University Press, UK. <https://doi.org/https://doi.org/10.1017/CBO9780511790478.017>

- García-Ruiz, J. (1990). *Geoecología de las áreas de montaña*. Geoforma Ediciones. Logroño, España.
- Gardes, M., & Bruns, T. D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 2(2), 113–118. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1993.tb00005.x>
- Gerding, V., & Thiers, O. (2002). Caracterización de suelos bajo bosques de *Nothofagus betuloides* (Mirb) Blume, en Tierra del Fuego, Chile. *Revista Chilena de Historia Natural*, 75, 819–833. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.4067/S0716-078X2002000400015>
- Goffinet, B., Miadlikowska, J., & Goward, T. (2003). Phylogenetic Inferences Based on nrDNA sequences support five morphospecies within the *Peltigera didactyla* complex (Lichenized Ascomycota). *The Bryologist*, 3 (106), 349–364. <https://doi.org/10.1080/03067317408071083>
- Goward, T., Goffinet, B., & Vitikainen, O. (1995). Synopsis of the genus *Peltigera* (lichenized Ascomycetes) in British Columbia, with a key to the North American species. *Canadian Journal of Botany*, 73(1), 91–111. <https://doi.org/10.1139/b95-012>
- Grube, M., Cernava, T., Soh, J., Fuchs, S., Aschenbrenner, I., Lassek, C., ... Berg, G. (2015). Exploring functional contexts of symbiotic sustain within lichen-associated bacteria by comparative omics. *The ISME Journal*, 9, 412–424. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.138>
- Grytnes, J. A. (2003). Species-Richness Patterns of Vascular Plants along Seven Altitudinal Transects in Norway. *Ecography*, 26(3), 291–300. <https://doi.org/https://doi.org/10.1034/j.1600-0587.2003.03358.x>
- Grytnes, J. A., Heegaard, E., & Ihlen, P. G. (2006). Species richness of vascular plants, bryophytes, and lichens along an altitudinal gradient in western Norway. *Acta Oecologica*, 29(3), 241–246. <https://doi.org/10.1016/j.actao.2005.10.007>
- Guillam, M., Sabat, J., Barrio, E., Cano, J., & Querol, A. (1998). Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. *Archives of Microbiology*, 169, 387–392. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s002030050587>
- Guzman, G., Quilhot, W., & Galloway, D. J. (1990). Decomposition of species of pseudocyphellaria and sticta in a southern Chilean forest. *Lichenologist*, 22(3), 325–331. <https://doi.org/10.1017/S0024282990000366>
- Halici, M. G., Bartak, M., & Güllü, M. (2018). Identification of some lichenised fungi from James Ross Island (Antarctic Peninsula) using nrITS markers. *New Zealand Journal of Botany*, 56(3), 276–290. <https://doi.org/10.1080/0028825X.2018.1478861>
- Hammer, Ø., Harper, D. A. T., & Ryan, P. D. (2001). PAST: Paleontological statistics software packwre pckage for education and data analysis. *Paleontologia Electronica*, 4(1), 1–9. Retrieved from http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm
- Hedley, M. J., Stewart, J. W. B., & Chauhan, B. S. (1982). Changes in inorganic and organic soil phosphorus fractions induced by cultivation practices and by laboratory

- incubations. *Soil Science Society of America Journal*, 46(5), 970–976. <https://doi.org/10.2136/sssaj1982.03615995004600050017x>
- Henríquez, C. (2005). Sorción y desorción de fósforo en n andisol de costa rica dedicado al cultivo del café, caña de azucar y bosque. *Agronomía Costarricense*, 29(3), 97–105.
- Holtan-Hartwig, J. (1993). The lichen genus *Peltigera*, exclusive of the *P. canina* group, in Norway. *Sommerfeltia*, 15, 101–102. <https://doi.org/https://doi.org/10.1017/S0024282994000150>
- Huber, A., & Lopez, D. (1993). Cambios en el balance hídrico provocados por tala rasa de un rodal adulto de *Pinus radiata* (D . Don), Valdivia , Chile. *BOSQUE*, 14(2), 11–18. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.4067/S0717-92002007000300013>
- Hurvich, C., & Tsai, C.-L. (1989). Regression and time series model selection in small samples. *Biometrika*, 76(2), 297–307. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/biomet/76.2.297>
- Jones, D. L., & Oburger, E. (2011). Solubilization of Phosphorus by Soil Microorganisms. In B. et Al. (Ed.), *Phosphorus in Action* (pp. 169–198). <https://doi.org/10.1007/978-3-642-15271-9>
- Kaasalainen, U., Fewer, D. P., Jokela, J., Wahlsten, M., Sivonen, K., & Rikkinen, J. (2012). Cyanobacteria produce a high variety of hepatotoxic peptides in lichen symbiosis. *PNAS*, 109(15), 5886–5891. <https://doi.org/10.1073/pnas.1200279109>
- Kircher, M., & Kelso, J. (2010). High-throughput DNA sequencing - Concepts and limitations. *BioEssays*, 32(6), 524–536. <https://doi.org/10.1002/bies.200900181>
- Kitayama, K., Majalap-lee, N., & Aiba, S. (2000). Soil phosphorus fractionation and phosphorus-use efficiencies of tropical rainforests along altitudinal gradients of Mount Kinabalu , Borneo. *Oecología*, 123, 342–349. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s004420051020>
- Kõljalg, U., Larsson, K., Abarenkov, K., Nilsson, R. H., Alexander, I. J., Eberhardt, U., ... Ursing, B. M. (2005). UNITE : a database providing web-based methods for the molecular identification of ectomycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 166, 1063–1068. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2005.01376.x>
- Kruse, J., Abraham, M., Amelung, W., Baum, C., Bol, R., Kuhn, O., ... Leinweber, P. (2015). Innovative methods in soil phosphorus research: A review. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 178, 43–88. <https://doi.org/10.1002/jpln.201400327>
- Lambers, H., Raven, J. A., Shaver, G. R., & Smith, S. E. (2008). Plant nutrient-acquisition strategies change with soil age. *Cell Press*, (January), 95–103. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2007.10.008>
- Leiva, D. (2015). *Relación de la producción de metabolitos y la actividad fenoloxidasa de líquenes del género Peltigera con sus comunidades bacterianas asociadas*. Universidad de Chile.
- Leiva, D., Clavero-León, C., Carú, M., & Orlando, J. (2016). Intrinsic factors of *Peltigera* lichens influence the structure of the associated soil bacterial microbiota. *FEMS*

Microbiology Ecology, 92(11), 1–30. <https://doi.org/10.1093/femsec/iw178>

- Li, F., Zhao, W., & Liu, J. (2009). Degraded vegetation and wind erosion influence soil carbon, nitrogen and phosphorus accumulation in sandy grasslands. *Plant and Soil*, 317, 79–92. <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9789-8>
- Lohtander, K., Oksanen, I., & Rikkinen, J. (2003). Genetic diversity of green algal and cyanobacterial photobionts in *Nephroma* (Peltigerales). *Lichenologist*, 35(4), 325–339. [https://doi.org/10.1016/S0024-2829\(03\)00051-3](https://doi.org/10.1016/S0024-2829(03)00051-3)
- Lomolino, M. V. (2001). Elevation gradients of species-density : historical and prospective views. *Global Ecology & Biogeography*, 10(1), 3–13. <https://doi.org/10.1046/j.1466-822x.2001.00229.x>
- Lumbsch, T., & Leavitt, S. D. (2011). Goodbye morphology? A paradigm shift in the delimitation of species in lichenized fungi. *Fungal Diversity*, 50, 59–72. <https://doi.org/10.1007/s13225-011-0123-z>
- Magain, N., Truong, C., Goward, T., Niu, D., Goffinet, B., Sérusiaux, E., ... Miadlikowska, J. (2018). Species delimitation at a global scale reveals high species richness with complex biogeography and patterns of symbiont association in *Peltigera* section *Peltigera* (Lichenized ascomycota: Lecanoromycetes). *Taxon*, 67(5), 836–870. <https://doi.org/10.12705/675.3>
- Manoharan-Basil, S. S., Miadlikowska, J., Goward, T., Andrésson, Ó. S., & Miao, V. P. W. (2016). *Peltigera islandica*, a new cyanolichen species in section *Peltigera* ('*P. canina* group'). *Lichenologist*, 48(5), 451–467. <https://doi.org/10.1017/S0024282916000414>
- Martinez, I., Burgaz, A., Vitikainen, O., & Escudero, A. (2003). Distribution of the genus *Peltigera* Wild. *Lichenologist*, 35(4), 301–323. [https://doi.org/10.1016/S0024-2829\(03\)00041-0](https://doi.org/10.1016/S0024-2829(03)00041-0)
- McCune, B., & Caldwell, B. (2009). A single phosphorus treatment doubles growth of cyanobacterial lichen transplants. *Ecology*, 90(2), 567–570. <https://doi.org/10.1890/08-0344.1>
- McKean, S. (1993). *Manual de Análisis de Suelos y Tejido Vegetal*. Laboratorio de Servicios Analíticos. Centro internacional de Agricultura Tropical.
- Miadlikowska, J., & 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. [https://doi.org/1058-5893/2000/16106-0009\\$03.00](https://doi.org/1058-5893/2000/16106-0009$03.00)
- Miadlikowska, J., & 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. <https://doi.org/10.3732/ajb.91.3.449>
- Miadlikowska, J., Lutzoni, F., Goward, T., Zoller, S., & 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. <https://doi.org/10.1080/15572536.2004.11833027>
- Moncalvo, J.-M., Rehner, S. A., & Vilgalys, R. (1993). Mycological Society of America

Directory. *Mycologia*, 85(5), 788–794.
<https://doi.org/10.1080/00275514.1944.12017584>

- Moreno, P. I. (1997). Vegetation and climate near Lago Llanquihue in the Chilean Lake District between 20200 and 9500 14C yr BP. *Journal of Quaternary Science*, 12(6), 485–500. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1099-1417\(199711/12\)12:6<485::aid-jqs330>3.3.co;2-w](https://doi.org/10.1002/(sici)1099-1417(199711/12)12:6<485::aid-jqs330>3.3.co;2-w)
- Murphy, J., & Riley, J. (1962). A Modified Single Solution Method for the Determination of Phosphate in Natural Waters. *Analytical Chemistry ACTA*, 27, 31–36. <https://doi.org/10.1057/9781137461131>
- Muster, C. (2019). *Microorganismos solubilizadores de fosfato asociados a cianolíquenes, sus sustratos y los suelos aladaños en un gradiente de recuperación de bosque nativo de lenga mediante regeneración natural y reforestación con pinos*. Universidad de Chile.
- Myllys, L., Stenroos, S., Thell, A., & Kuusinen, M. (2007). High cyanobiont selectivity of epiphytic lichens in old growth boreal forest of Finland. *New Phytologist*, 173, 621–629. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01944.x>
- Nash, T. H. (2008). *Lichen Biology* (2da Ed.). New York: Cambridge University Press.
- NCBI. (2018). Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP). Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techrflp> (Fecha visita: Marzo 2019)
- Negassa, W., & Leinweber, P. (2009). How does the Hedley sequential phosphorus fractionation reflect impacts of land use and management on soil phosphorus: A review. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 172(3), 305–325. <https://doi.org/10.1002/jpln.200800223>
- Nguyen, N., Warnow, T., Pop, M., & White, B. (2016). Roadshows to focus on the future for primary care pharmacists. *Biofilms and Microbiomes*, 2(16004), 1–8. <https://doi.org/10.1038/npjbio>
- Nimis, P. L., Hafellner, J., Roux, C., Clerc, P., Mayrhofer, H., Martellos, S., & Bilovitz, P. O. (2018). The lichens of the Alps – an annotated checklist. *MycKeys*, 31, 1–634. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.31.23568>
- O'Brien, H. E., Miadlikowska, J., & Lutzoni, F. (2009). Assessing reproductive isolation in highly diverse communities of the lichen-forming fungal genus peltigera. *Evolution*, 63(8), 2076–2086. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2009.00685.x>
- O'Brien, H. E., Miadlikowska, J., & Lutzoni, F. (2013). Assessing population structure and host specialization in lichenized cyanobacteria. *New Phytologist*, 198(2), 557–566. <https://doi.org/10.1111/nph.12165>
- O'Brien, H., Miadlikowska, J., & Lutzoni, F. (2005). Assessing host specialization in symbiotic cyanobacteria associated with four closely related species of the lichen fungus *Peltigera*. *European Journal of Phycology*, 40, 363–378. <https://doi.org/10.1080/09670260500342647>
- Otzen, A. (2016). *Formas de fósforo inorgánico y orgánico en perfiles de tres suelos con distinto grado de evolución genética*. Universidad Austral de Chile.

- Patwardhan, A., Ray, S., & Roy, A. (2014). Molecular Markers in Phylogenetic Studies-A Review. *Journal of Phylogenetics & Evolutionary Biology*, 02(02), 1–9. <https://doi.org/10.4172/2329-9002.1000131>
- Picone, L. I., & Zamuner, E. (2002). Fósforo orgánico y fertilidad fosfórica. *INPOFOS Simposio de Fósforo: "Enfoque Sistémico de La Fertilización Fosfórica,"* 11–15. Retrieved from [http://www.ipni.net/publication/ia-lacs.nsf/0/E8E2F139150F1B6D8525799C0058C6C3/\\$FILE/nota3.pdf](http://www.ipni.net/publication/ia-lacs.nsf/0/E8E2F139150F1B6D8525799C0058C6C3/$FILE/nota3.pdf)
- Plante, A. F. (2007). Soil Biogeochemical Cycling of Inorganic Nutrients and Metals. In E. Paul (Ed.), *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry* (Tercera, pp. 389–432). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-047514-1.50019-6>
- Printzen, C., Fernández-Mendoza, F., Muggia, L., Berg, G., & Grube, M. (2012). Alphaproteobacterial communities in geographically distant populations of the lichen *Cetraria aculeata*. *FEMS Microbiology Ecology*, 82, 316–325. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01358.x>
- Quilhot, W., Cuellar, M., Díaz, R., Riquelme, F., & Rubio, C. (2012). Lichens of Aisen, Southern Chile. *Gayana Botánica*, 69(1), 57–87. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.4067/S0717-66432012000100007>
- Quintanilla, V. (2008). Perturbaciones a la vegetación nativa por grandes fuegos de 50 años atrás, en bosques Nordpatagónicos. Caso de estudio en Chile Meridional. *Anales de Geografía*, 28(1), 85–104.
- Ramírez-Fernández, L., Zúñiga, C., Méndez, M. A., Carú, M., & Orlando, J. (2013). Genetic diversity of terricolous *Peltigera* cyanolichen communities in different conservation states of native forest from southern Chile. *International Microbiology*, 16(4), 243–252. <https://doi.org/10.2436/20.1501.01.200>
- Recorre Aysen. (2019). Geografía. Retrieved from <http://recorreaysen.cl/conoce-Aysen/>
- Rikkinen, J. (2003). Ecological and evolutionary role of photobiont-mediated guilds in lichens. In *Symbiosis* (Vol. 34, pp. 99–110).
- Rikkinen, J. (2013). Molecular studies on cyanobacterial diversity in lichen symbioses. *MycKeys*, 6, 3–32. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.6.3869>
- Rikkinen, J., Oksanen, I., & Lohtander, K. (2002). Lichen guilds share related cyanobacterial symbionts. *Science*, 297(5580), 357. <https://doi.org/10.1126/science.1072961>
- Rojas, C. (2019). Interpretación de la disponibilidad de fósforo en los suelos. Retrieved from <http://biblioteca.inia.cl/medios/biblioteca/serieactas/NR33852.pd>
- Rossi, M. M. S. (2011). *Adsorción y desorción de fósforo en suelos del área central de la región Pampeana*. Universidad Nacional de Córdoba.
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406–425. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
- Sarathchandra, S. U., Perrott, W., & Littler, R. A. (1989). Soil microbial temperature. *Soil*

- Sarma, T. A. (2012). *Handbook of Cyanobacteria*. CRC Press.
- Saunders, W. M. H., & Metson, A. J. (1971). New Zealand Journal of Seasonal variation of phosphorus in soil and pasture. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 14(2), 307–328. <https://doi.org/10.1080/00288233.1971.10427097>
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., ... Schindel, D. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(16), 6241–6246. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>
- Schwarz, G. (1978). Estimating the dimension of a model. *The Annals of Statistics*, 6(2), 461–464. <https://doi.org/10.1214/aos/1176344136>
- Sigurbjörnsdóttir, M. A., Andrésón, Ó. S., & Vilhelmsson, O. (2015). Analysis of the *Peltigera membranacea* metagenome indicates that lichen-associated bacteria are involved in phosphate solubilization. *Microbiology (United Kingdom)*, 161, 989–996. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000069>
- Silver, W. L. (1994). Is nutrient availability related to plant nutrient use in humid tropical forests? *Oecologia*, 98, 336–343. <https://doi.org/10.1007/BF00324222>
- Sims, T., & Pierzynski, G. M. (2005). Chemistry of phosphorus in Soils. In *Chemical processes in soil* (Vol. 8, pp. 14–31). [https://doi.org/10.1016/s1571-0661\(05\)82566-6](https://doi.org/10.1016/s1571-0661(05)82566-6)
- Sindhu, S. S., Phour, M., Choudhary, S. R., & Chaudhary, D. (2014). Geomicrobiology and Biogeochemistry. In N. Parmar & A. Singh (Eds.), *Geomicrobiology and Biogeochemistry* (Vol. 39, pp. 199–237). Springer-Verlag Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-41837-2>
- Sorn-srivichai, P., Syers, J. K., Tillman, R. W., & Cornforth, I. S. (1988). An evaluation of water extraction as a soil-testing procedure for phosphorus II. Factors affecting the amounts of water-extractable phosphorus in field soils. *Fertilizer Research*, 15, 225–236. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/BF01051344>
- Spribile, T., Tuovinen, V., Resl, P., Vanderpool, D., Wolinski, H., Aime, M. C., ... McCutcheon, J. P. (2016). Basidiomycete yeasts in the cortex of ascomycete macrolichens. *Science*, 353(6298), 488–492. <https://doi.org/10.1126/science.aaf8287>
- Stenroos, S., Ho, F., Myllys, L., Hyvo, J., & Thell, A. (2006). High selectivity in symbiotic associations of lichenized ascomycetes and cyanobacteria. *Plant Biology*, 22, 230–238. <https://doi.org/10.1111/j.1096-0031.2006.00101.x>
- Sui, Y., & Thompson, M. L. (2000). Phosphorus Sorption, Desorption, and Buffering Capacity in a Biosolids-Amended Mollisol. *Soil Science Society of America Journal*, 64(1), 164–169. <https://doi.org/10.2136/sssaj2000.641164x>

- Tamura, K., Peterson, D., Nicholas, P., Stecher, G., Nei, M., & 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. <https://doi.org/10.1093>
- Tanner, E. V. ., Vitousek, P. M., & Cuevas, E. (1998). Experimental Investigation of Nutrient Limitation of Forest Growth on Wet Tropical Mountains. *Ecology*, 79(1), 10–22. [https://doi.org/https://doi.org/10.1890/0012-9658\(1998\)079\[0010:EIONLO\]2.0.CO;2](https://doi.org/https://doi.org/10.1890/0012-9658(1998)079[0010:EIONLO]2.0.CO;2)
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). ClustalW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22(22), 4673–4680. <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>
- Tiessen, H., Stewart, J. W. B., & Cole, C. V. (1984). Pathways of Phosphorus Transformations in Soils of Differing Pedogenesis. *Soil Science Society of America Journal*, 48, 853–858. <https://doi.org/10.2136/sssaj1984.03615995004800040031x>
- Till-Bottraud, I., Fajardo, A., & Rioux, D. (2012). Multi-stemmed trees of *Nothofagus pumilio* second-growth forest in Patagonia are formed by highly related individuals. *Annals of Botany*, 110, 905–913. <https://doi.org/10.1093/aob/mcs146>
- Tipping, E., Benham, S., Boyle, J. F., Crow, P., Davies, J., Fischer, U., ... Toberman, H. (2014). Atmospheric deposition of phosphorus to land and freshwater. *Environmental Sciences: Processes and Impacts*, 16(7), 1608–1617. <https://doi.org/10.1039/c3em00641g>
- Turner, B. L., & Condrón, L. M. (2013). Pedogenesis, nutrient dynamics, and ecosystem development: the legacy of T.W. Walker and J.K. Syers. *Plant and Soil*, 367(1–2), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s11104-013-1750-9>
- Turner, B. L., Condrón, L. M., Richardson, S. J., Peltzer, D. A., & Allison, V. J. (2007). Soil organic phosphorus transformations during pedogenesis. *Ecosystems*, 10, 1166–1181. <https://doi.org/10.1007/s10021-007-9086-z>
- Veblen, T. T., Ashton, D. H., Schlegel, F. M., & Veblen, A. T. (1977). Plant Succession in a Timberline Depressed by Vulcanism in South-Central Chile. *Journal of Biogeography*, 4(3), 275–294. <https://doi.org/10.2307/3038061>
- Vitikainen, O. (2006). *Peltigera tartarea*, a new species from Arctic America. *Journal of the Hattori Botanical Laboratory*, (100), 853–854.
- Weiss, M., Hobbie, S. E., & Gettel, G. M. (2005). Contrasting responses of nitrogen-fixation in arctic lichens to experimental and ambient nitrogen and phosphorus availability. *Arctic, Antartic, and Alpine Research*, 37(3), 396–401. <https://doi.org/1523-0430/05>
- White, T. ., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, New York, 315–322. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>

- Wilcke, W., Yasin, S., Schmitt, A., Valarezo, C., & Zech, W. (2008). Soils Along the Altitudinal Transect and in Catchments. In E. Beck et al. (Ed.), *Gradients in a Tropical Mountain Ecosystem of Ecuador. Ecological Studies* (pp. 75–85). https://doi.org/10.1007/978-3-540-73526-7_9
- Williams, D. W., Wilson, M. J., Lewis, M. A. O., & Potts, A. J. C. (1995). Identification of *Candida* species by PCR and restriction fragment length polymorphism analysis of intergenic spacer regions of ribosomal DNA. *Journal of Clinical Microbiology.*, 33(9), 2476–2479.
- Wilmotte, A., Auwera, G. Van der, & Wachter, R. De. (1993). Structure of the 16S ribosomal RNA of the thermophilic cyanobacterium and phylogenetic analysis. *FEBS Letters*, 317(1), 96–100. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)81499-P](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)81499-P)
- Wolf, J. H. D. (1993). Diversity Patterns and Biomass of Epiphytic Bryophytes and Lichens Along an Altitudinal Gradient in the Northern Andes. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 80(4), 928–960. <https://doi.org/10.2307/2399938>
- Yadav, B. K., & Verma, A. (2012). Phosphate Solubilization and Mobilization in Soil Through Microorganisms Under Arid Ecosystems. In P. M. Ali & ISBN (Eds.), *The Functioning of Ecosystems* (pp. 93–108). InTech. Retrieved from <http://www.intechopen.com/books/the-functioning-of-ecosystems/phosphate-solubilization-and-mobilization-in-soil-through-microorganisms-under-arid-ecosystems>
- Yadav, R. S., Meena, S. C., Patel, S. I., Patel, K. I., Akhtar, M. S., Yadav, B. K., ... Panwar, J. (2012). Farming for Food and Water Security. In E. Lichtfouse (Ed.), *Forming for Food and Water Security* (Vol. 10, pp. 243–264). <https://doi.org/10.1007/978-94-007-4500-1>
- Yang, X., & Post, W. M. (2011). Phosphorus transformations as a function of pedogenesis: A synthesis of soil phosphorus data using Hedley fractionation method. *Biogeosciences*, 8(10), 2907–2916. <https://doi.org/10.5194/bg-8-2907-2011>
- Zhu, Y., Cavagnaro, T., Dickson, S., & Smith, S. E. (2001). Backseat driving? Accessing phosphate beyond the rhizosphere-depletion zone. *Trends in Plant Science*, 6(5), 194–195. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(01\)01957-4](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(01)01957-4)
- Zúñiga, C. (2015). *Measuring the factors involved in the successful establishment of the cyanolichen Peltigera*. Universidad de Chile.
- Zúñiga, C., Leiva, D., Carú, M., & Orlando, J. (2017). Substrates of *Peltigera* Lichens as a Potential Source of Cyanobionts. *Microbial Ecology*, 74(3), 561–569. <https://doi.org/10.1007/s00248-017-0969-z>
- Zúñiga, C., Leiva, D., Ramírez-Fernández, L., Carú, M., Yahr, R., & Orlando, J. (2015). Phylogenetic diversity of *Peltigera* cyanolichens and their photobionts in southern Chile and Antarctica. *Microbes and Environments*, 30(2), 172–179. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME14156>

8. Anexo

Tabla A1. Detalle de las muestras recolectadas: Ubicación e identificación. En amarillo las muestras seleccionadas para el fraccionamiento de fósforo de Hedley et al. (1982) modificado por do Nascimento et al. (2015).

Muestra	Ubicación				Identificación filogenética		
	Latitud	Longitud	Altitud	Característica del sitio	Micobionte	Cianobionte	
Ps1	-45,51	-72,04	1247,22	Pradera alto-andina	M3	<i>Peltigera sp</i>	C17
Ps2	-45,51	-72,04	1247,24	Pradera alto-andina	M5	<i>P. linaje canina</i>	C02
Ps3	-45,51	-72,04	1247,13	Pradera alto-andina	M5	<i>P. linaje canina</i>	C02
Ps4	-45,51	-72,04	1249,25	Pradera alto-andina	M3	<i>Peltigera sp</i>	C17
Ps5	-45,51	-72,04	1248,15	Pradera alto-andina	M3	<i>Peltigera sp</i>	C17
Ps6	-45,51	-72,04	1246,80	Pradera alto-andina	M6	<i>P. Frigida</i>	C02
Ps7	-45,51	-72,04	1246,53	Pradera alto-andina	M6	<i>P. Frigida</i>	C18
Ps8	-45,51	-72,04	1246,02	Pradera alto-andina	M10	<i>P. Retifoveata</i>	C16
Ps9	-45,51	-72,04	1245,85	Pradera alto-andina	M3	<i>Peltigera sp</i>	C15
Ps10	-45,51	-72,04	1244,93	Pradera alto-andina	M3	<i>Peltigera sp</i>	C17
Ps11	-45,51	-72,04	1262,57	Pradera alto-andina	M5	<i>P. linaje canina</i>	C02
Ps12	-45,51	-72,04	1264,59	Pradera alto-andina	M5	<i>P. linaje canina</i>	C02
Ps13	-45,51	-72,04	1263,61	Pradera alto-andina	M1	<i>P. ponojensis</i>	C02
Ps14	-45,51	-72,04	1262,99	Pradera alto-andina	M3	<i>Peltigera sp</i>	C17
Ps15	-45,51	-72,04	1263,85	Pradera alto-andina	M1	<i>P. ponojensis</i>	C02
Ps16	-45,51	-72,04	1263,71	Pradera alto-andina	M1	<i>P. ponojensis</i>	C02
Ps17	-45,51	-72,04	1265,06	Pradera alto-andina	M1	<i>P. ponojensis</i>	C02
Ps18	-45,51	-72,04	1267,18	Pradera alto-andina	M3	<i>Peltigera sp</i>	-
Ps19	-45,51	-72,04	1269,84	Pradera alto-andina	M3	<i>Peltigera sp</i>	-
Ps20	-45,51	-72,04	1271,40	Pradera alto-andina	M3	<i>Peltigera sp</i>	-
Ps21	-45,51	-72,03	1237,61	Pradera alto-andina	M5	<i>P. linaje canina</i>	C02
Ps22	-45,51	-72,03	1237,88	Pradera alto-andina	M5	<i>P. linaje canina</i>	C02
Ps23	-45,51	-72,03	1237,98	Pradera alto-andina	M1	<i>P. ponojensis</i>	C02
Ps24	-45,51	-72,03	1242,22	Pradera alto-andina	M3	<i>Peltigera sp</i>	C17
Ps25	-45,51	-72,03	1241,80	Pradera alto-andina	M3	<i>Peltigera sp</i>	-
Ps26	-45,51	-72,03	1240,95	Pradera alto-andina	M3	<i>Peltigera sp</i>	C17
Ps27	-45,51	-72,03	1240,43	Pradera alto-andina	M3	<i>Peltigera sp</i>	-
Ps28	-45,51	-72,03	1240,78	Pradera alto-andina	-	-	C17
Ps29	-45,51	-72,03	1243,65	Pradera alto-andina	M1	<i>P. ponojensis</i>	C02
Ps30	-45,51	-72,03	1244,14	Pradera alto-andina	M1	<i>P. ponojensis</i>	C02
Pf1	-45,53	-72,04	685,44	Bosque de lenga renoval	M6	<i>P.frigida</i>	C01
Pf2	-45,53	-72,05	699,96	Bosque de lenga maduro	M6	<i>P.frigida</i>	C01
Pf3	-45,53	-72,05	701,33	Bosque de lenga maduro	M6	<i>P.frigida</i>	C01
Pf4	-45,53	-72,05	701,16	Bosque de lenga maduro	M6	<i>P.frigida</i>	C01
Pf5	-45,53	-72,05	702,45	Bosque de lenga maduro	M6	<i>P.frigida</i>	C01
Pf6	-45,53	-72,05	700,97	Bosque de lenga maduro	M6	<i>P.frigida</i>	C01

Pf7	-45,53	-72,03	656,39	Bosque de lenga renoval	M6	<i>P.frigida</i>	C01
Pf8	-45,53	-72,03	656,52	Bosque de lenga renoval	M6	<i>P.frigida</i>	C01
Pf9	-45,53	-72,03	656,44	Bosque de lenga renoval	M6	<i>P.frigida</i>	C01
Pf10	-45,53	-72,03	648,70	Bosque de lenga renoval	M6	<i>P.frigida</i>	C01
Pf11	-45,53	-72,03	648,93	Bosque de lenga renoval	M6	<i>P.frigida</i>	C01
Pf12	-45,53	-72,03	652,13	Bosque de lenga renoval	M6	<i>P.frigida</i>	C01
Pf13	-45,53	-72,03	651,07	Bosque de lenga renoval con presencia de pino	M6	<i>P.frigida</i>	C01
Pf14	-45,53	-72,03	655,26	Bosque de lenga renoval con presencia de pino	M6	<i>P.frigida</i>	C01
Pf15	-45,53	-72,03	654,40	Bosque de lenga renoval con presencia de pino	M6	<i>P.frigida</i>	C01
Pf16	-45,53	-72,03	655,22	Bosque de lenga renoval con presencia de pino	M6	<i>P.frigida</i>	C01
Pf17	-45,53	-72,03	655,54	Bosque de lenga renoval con presencia de pino	M6	<i>P.frigida</i>	C01
Pf18	-45,53	-72,03	655,94	Bosque de lenga renoval con presencia de pino	M6	<i>P.frigida</i>	C01
Pf19	-45,53	-72,03	658,81	Bosque de lenga renoval con presencia de pino	M6	<i>P.frigida</i>	C01
Pf20	-45,53	-72,03	657,73	Bosque de lenga renoval con presencia de pino	M6	<i>P. linaje canina</i>	C01
Pf21	-45,53	-72,02	653,99	Bosque de lenga renoval con presencia de pino	M6	<i>P.frigida</i>	C01
Pf22	-45,53	-72,03	646,67	Bosque de lenga renoval con presencia de pino	M6	<i>P.frigida</i>	C01

Tabla A2. Librería de enzimas de restricción utilizadas en el ensayo *in silico* de la digestión enzimática del amplicón de la región ITS para las muestras asociadas a *Peltigera sp.* y *P. ponojensis*. En amarillo se indican las enzimas seleccionadas.

Enzima	Sitio de corte	Enzima	Sitio de corte
<i>Acil</i>	5' C ↓ CGC 3' 3' GGC ↑ G 5'	<i>Hhal</i>	5' GCG ↓ C 3' 3' C ↑ GCG 5'
<i>Alul</i>	5' AG ↓ CT 3' 3' TC ↑ GA 5'	<i>HindIII</i>	5' A ↓ AGCTT 3' 3' TTCGA ↑ A 5'
<i>BamHI</i>	5' G ↓ GATCC 3' 3' CCTAG ↑ G 5'	<i>Hinfl</i>	5' G ↓ ANTC 3' 3' CTNA ↑ G 5'
<i>BspTI</i>	5' C ↓ TTAAG 3' 3' GAATT ↑ C 5'	<i>MnII</i>	5' CCTC(N) ₇ ↓ 3' 3' GGAG(N) ₆ ↑ 5'
<i>Bsh1236I</i>	5' CG ↓ CG 3' 3' GC ↑ GC 5'	<i>MspI</i>	5' C ↓ CGG 3' 3' GGC ↑ C 5'
<i>Clal</i>	5' AT ↓ CGAT 3' 3' TAGC ↑ TA 5'	<i>NciI</i>	5' CC ↓ SGG 3' 3' GGS ↑ CC 5'
<i>DraI</i>	5' TTT ↓ AAA 3' 3' AAA ↑ TTT 5'	<i>Pst1</i>	5' CTGCA ↓ G 3' 3' G ↑ ACGTC 5'
<i>EcoRI</i>	5' G ↓ AATTC 3' 3' CTTAA ↑ G 5'	<i>SmaI</i>	5' CCC ↓ GGG 3' 3' GGG ↑ CCC 5'
<i>HaeIII</i>	5' GG ↓ CC 3' 3' CC ↑ GG 5'	<i>SphI</i>	5' GCATG ↓ C 3' 3' C ↑ GTACG 5'

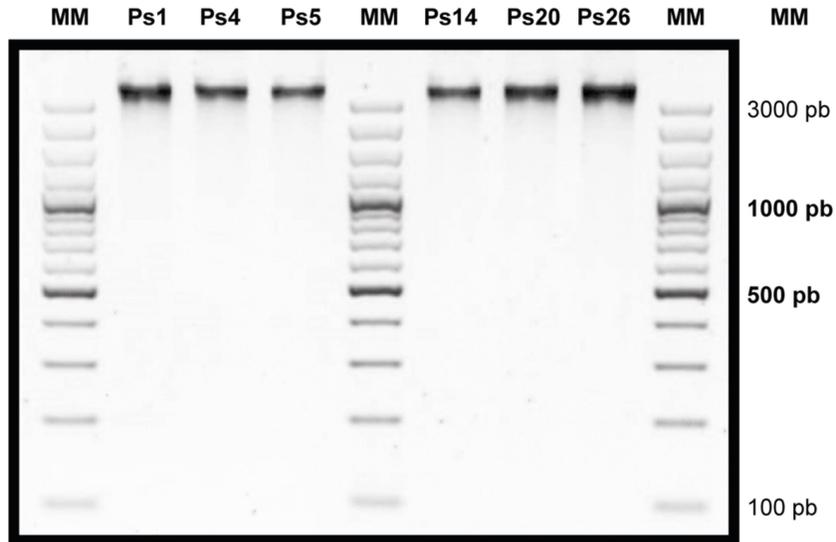


Figura A1. DNA genómico extraído de talo liquénico en gel de agarosa al 2% para las muestras Ps1 - Ps4 - Ps5 - Ps14 - Ps20 - Ps26, a modo de ejemplo. **(MM)** Marcador de peso molecular “GeneRuler™ 100 pb plus DNA Ladder” (Thermo Scientific™).

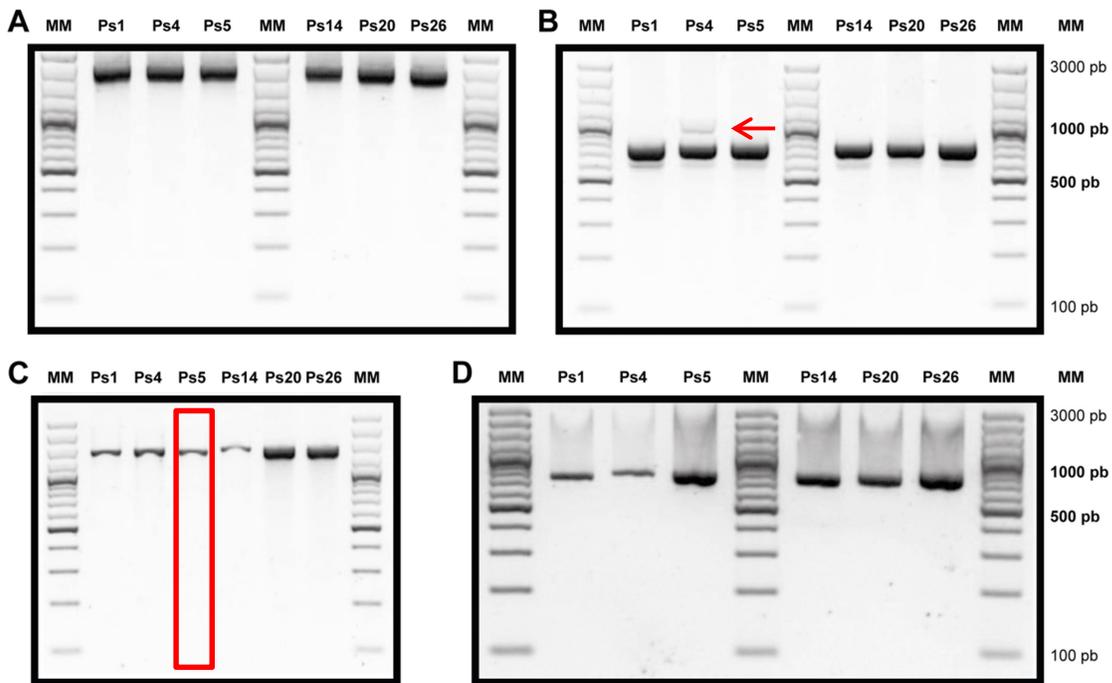


Figura A2. Producto de la amplificación de las regiones: **(A)** 28S, **(B)** ITS y **(C)** 16S. Ejemplo de amplificación específica en cuadro rojo **(C)**, y de amplificación inespecífica indicado con flecha roja **(B)**. **(D)** Producto de la purificación de banda ITS. **(MM)** Marcador de peso molecular “GeneRuler™ 100 pb plus DNA Ladder” (Thermo Scientific™).

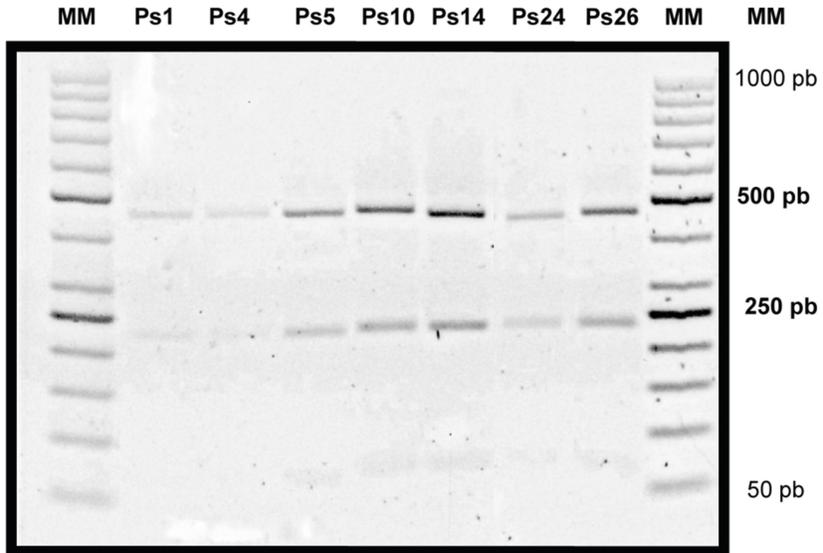


Figura A3. Digestión enzimática con la enzima *HhaI* del amplicón de la región ITS de micobionte, para muestras identificadas como *Peltigera sp.* M3 asociado a cianobiontes C17 (Ps1 – Ps4 – Ps5 – Ps10 – Ps14 – Ps24 – Ps26). **(MM)** Marcador de peso molecular “GeneRuler™ 50 pb DNA Ladder” (Thermo Scientific™).

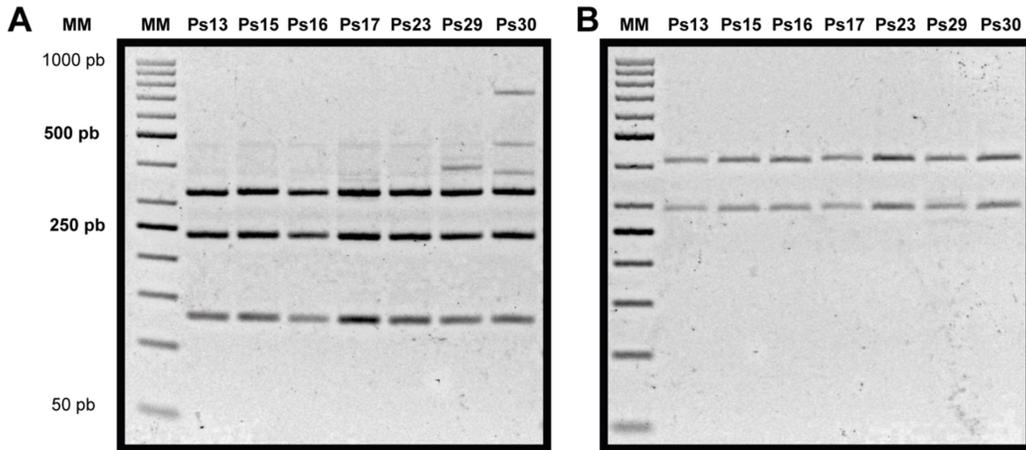


Figura A4. Digestión enzimática del amplicón de la región ITS de micobionte M1, muestras identificadas como *Peltigera ponojensis*. Las enzimas utilizadas fueron: **(A)** *ClaI* y **(B)** *HhaI*. **(MM)** Marcador de peso molecular “GeneRuler™ 50 pb DNA Ladder” (Thermo Scientific™).